

6. Strukturaufklärung von Einzelsubstanzen

6.1. Strukturaufklärung von Cumarinen (V 1-6)

Cumarine sind einer der am stärksten vertretenen Inhaltstoffklassen in *P. sidoides*. Sie zeigen meist im UV Licht bei 365 nm eine blaue, einige aber auch eine bräunliche Fluoreszenz, die sich durch Detektion mit alkalischen Reagenzien intensiviert. Alle hier isolierten Cumarine trugen keine Substituenten an der C3/C4-Doppelbindung an der Position 3 und 4, so dass sie alle im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum für die olefinischen Protonen zwei Dubletts zwischen δ 6,0 und 6,3 ppm sowie zwischen δ 7,8 und 8,1 ppm aufwiesen. Die Kopplungskonstanten von δ 8,6-9,9 Hz deuteten auf eine *cis*-Konfiguration an der Doppelbindung, in Einklang mit einer Lactonteilstruktur. Die Signale zwischen beiden Dubletts repräsentierten die Protonen am aromatischen Ring des CumarinGrundgerüsts. Resonanzen für aromatische Methoxygruppen befanden sich zwischen δ 3,7 und 4,1 ppm.

6.1.1. Umckalin (V1)

Umckalin zeigt bei einem R_f -Wert von 0,78 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) eine rötlich, graue Fluoreszenz im UV bei 365 nm.

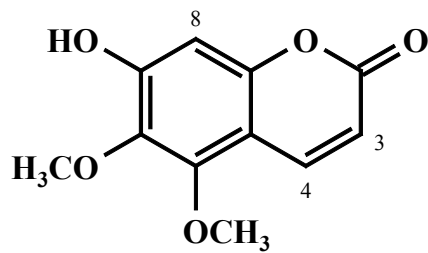
Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum fanden sich die Signale der olefinischen Protonen bei δ 6,16 und δ 8,03 ppm mit einer Kopplungskonstante von 9,7 Hz, weiterhin ein Singulett für das Proton an Position 8 bei δ 6,56 ppm. Die Singulett für die Methoxygruppen lagen bei δ 3,85 und δ 4,01 ppm.

NOE-Experimente zeigten die vicinale Anordnung der beiden Methoxygruppen, sowie deren Lage an den Positionen 5 und 6. Für das aromatische Proton ergab sich eine isolierte Lage, welches demnach zwangsläufig der Position 8 zuzuordnen war.

Das EI-MS-Spektrum lieferte den Molpeak $[\text{M}]^+$ bei m/z 222 und damit einen eindeutigen Hinweis auf das Vorhandensein einer Hydroxylfunktion. NOE-Untersuchungen zeigten zwar Korrelationen zwischen beiden Methoxyfunktionen, sowie zwischen einer Methoxygruppe und dem Proton an Position 4 an, jedoch keine zu dem aromatischen

Proton, das damit isoliert an der Position 8 mit der Hydroxyfunktion an Position 7 vorliegen musste.

Bisher konnte Umckalin nur aus den Wurzeln von *P. sidoides* isoliert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verbindung, deren Vorkommen bislang nur für diese *Pelargonium* Art dokumentiert war, auch in den oberirdischen Teilen der Pflanze vorhanden ist (Kayser, 1997). Frühere Angaben zum Vorkommen von Umckalin in *P. reniforme* beruhten auf einer offensichtlichen Verwechslung der beiden *Pelargonium* Arten.



Umckalin (VI)

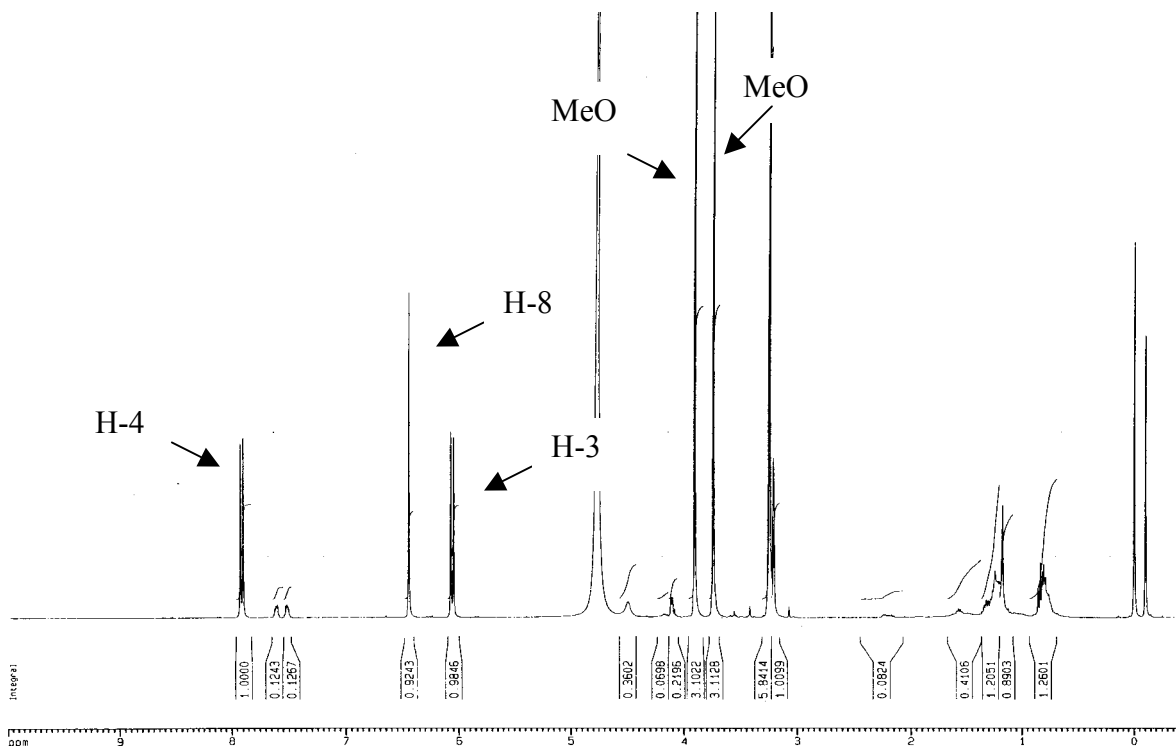
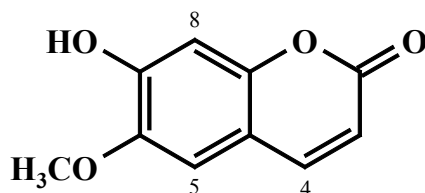


Abbildung 10: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Umckalin (VI; 400 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

6.1.2. Scopoletin (V2)

Scopoletin wies einen R_f Wert von 0,69 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) auf und zeigte eine tiefblaue Fluoreszenz im UV bei 365 nm.

Scopoletin kommt häufig im Pflanzenreich vor und ist auch aus den oberirdischen Teilen der Pflanze bereits isoliert worden. Ein Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Daten mit Literaturwerten (Kayser und Kolodziej, 1995; Tsukamoto *et al.*, 1984) sowie NOE-Experimente und der Molpeak $[\text{M}]^+$ von m/z 192 im EI-MS Spektrum belegten eindeutig, dass es sich bei der Verbindung 2 um Scopoletin handelte.



Scopoletin (V2)

Tabelle 2: $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindungen V1-4 (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als innerer Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)*			
	Substanz 1	Substanz 2	Substanz 3	Substanz 4
H-3	6,16 (<i>d</i> , $J=9,7$)	6,20 (<i>d</i> , $J=9,5$)	5,96 (<i>d</i> , $J=9,1$)	6,31 (<i>d</i> , $J=9,5$)
H-4	8,03 (<i>d</i> , $J=9,6$)	7,86 (<i>d</i> , $J=9,5$)	7,79 (<i>d</i> , $J=9,2$)	7,90 (<i>d</i> , $J=9,5$)
H-5	-	7,11 (<i>s</i>)	6,77 (<i>s</i>)	7,21 (<i>s</i>)
H-8	6,56 (<i>s</i>)	6,77 (<i>s</i>)	-	7,18 (<i>s</i>)
OCH_3	3,85 (<i>s</i>); 4,01 (<i>s</i>)	3,91 (<i>s</i>)	3,82 (<i>s</i>)	3,90 (<i>s</i>)
Glucosyl-Rest				
H-1'	-	-	4,72 (<i>d</i> , $J=7,6$)	5,07 (<i>d</i> , $J=7,3$)
H-2'	-	-	3,4-3,54 [M]	3,4-3,54 [M]
H-3'	-	-		
H-4'	-	-		
H-5'	-	-		
H-6'	-	-		

* Multiplizität und Kopplungskonstante in Hz in Klammern

6.1.3. Fraxetin-7- β -glucopyranosid (V3)

Fraxetin-7- β -glucopyranosid zeigte bei einem R_f Wert von 0,23 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Methanol-Wasser (18:1:1) eine hellblaue Fluoreszenz im UV bei 365 nm. Detektion mit Gibbs-Reagenz ergab eine dunkelblaue Färbung (positive Gibbs-Reaktion).

Die olefinischen Protonen an den Positionen 3 und 4 zeigten Signale bei δ 5,96 und δ 7,79 ppm (*d*, $J=9,2$ Hz). Ein weiteres Singulett für ein aromatisches Proton erschien bei δ 6,77 ppm sowie das für eine Methoxygruppe bei δ 3,82 ppm. Zusätzlich fanden sich weitere Signale im Bereich zwischen δ 3,4 bis 3,6 ppm sowie ein Dublett bei δ 4,72 ppm mit einer Kopplungskonstante von 7,6 Hz für ein anomeres Proton eines Zuckerrestes. Ein Vergleich der Signallagen und deren Aufspaltungsmuster (Bock und Pedersen, 1983; Debendetti *et al.*, 1997; Vera *et al.*, 2001) identifizierten den Zuckerrest eindeutig als β -Glucose.

NOE-Experimente zeigten, dass das Signal bei δ 6,77 ppm dem Proton an Position 5 zuzuordnen war über die Korrelation zum Protonensignal an Position 4; außerdem bestand zwischen diesem aromatischen Proton eine weitere Korrelation zu der aromatischen Methoxygruppe, deren Lage damit an Position 6 gesichert war.

Somit konnte der Zuckerrest über eine der Hydroxygruppe an Position 7 oder 8 gebunden sein. Ein Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Daten (Okuyama *et al.*, 1996; Tsukamoto *et al.*, 1985) sowie der Untersuchungen mit Fraxin (Fraxetin-8- β -glucopyranosid) als Referenzsubstanz und Detektion mit Gibbs-Reagenz (siehe Seite 94: negative Reaktion mit Fraxin), zeigten eindeutig, dass es sich bei der Verbindung 3 um Fraxetin-7- β -glucopyranosid handelte.

Während sich im EI-MS Spektrum nur das Fragment des Aglykons bei m/z 208 finden ließ, konnte der Pseudomolpeak der Verbindung 3 im FAB-Massenspektrum eindeutig für $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei m/z 371 bzw. für $[\text{M}-\text{H}]^-$ bei m/z 369 ausgemacht werden.

Die Hochauflösung des Peaks m/z 208 für das Aglykon bestätigte die molekulare Zusammensetzung $[\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5]^+$ mit einer gefundenen Masse von 208,03701 gegenüber der berechneten von 208,03718.

Fraxetin-7- β -glucopyranosid ist bislang nur aus wenigen Quellen isoliert worden (Plouvier und Plantefol, 1969 und 1970; Batirov *et al.*, 1983; Vdovin *et al.*, 1987, Wu *et al.*, 1995). Hier konnte erstmals ein $^1\text{H-}$ sowie ein $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum der reinen Substanz aufgenommen werden, sowie die Signalzuordnung durch ergänzende HMBC

Untersuchungen abgesichert werden, was die Charakterisierung der Verbindung vervollständigte.

6.1.4. 7-Methoxycumarin-6- β -glucopyranosid (V4)

Die Verbindung 4 zeigte bei einem R_f Wert von 0,23 im Fließmittel Ethylacetat-Methanol-Wasser (18:1:1) eine dunkelblaue Fluoreszenz.

Tabelle 3: ^{13}C NMR Daten der Verbindungen V1,3,4,6 (100,6 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Kohlenstoff	Chemische Verschiebung δ (ppm)			
	Verbindung 1	Verbindung 3	Verbindung 4	Verbindung 6
C-2	169,3	165,5	163,6	163,3
C-3	111,9	107,1	114,6	112,1
C-4	141,0	146,3	145,7	141,3
C-5	150,9	105,0	110,9	140,9*
C-6	138,9	150,8	151,8	130,6*
C-7	157,1	147,3	148,3	143,3*
C-8	99,9	134,8	105,3	139,4*
C-9	152,7	156,5	151,1	145,5*
C-10	107,7		114,6	107,0
OCH ₃	61,4	56,4	57,1	61,5
OCH ₃	62,2	-	-	62,6
Glucosyl-Rest				
C-1'	-	108,1	102,1	-
C-2'	-	75,6	74,8	-
C-3'	-	78,4	77,9	-
C-4'	-	71,1	71,3	-
C-5'	-	78,6	78,5	-
C-6'	-	62,6	62,5	-

* Signale sind austauschbar

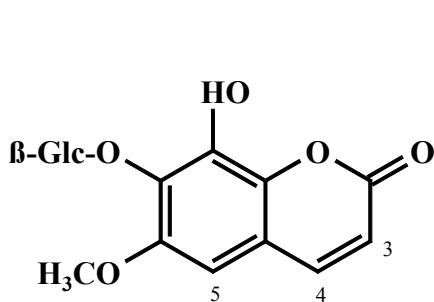
Die Signale für zwei olefinische Protonen bei δ 6,31 und δ 7,90 ppm ($J=9,5$ Hz), sowie zwei aromatische Singulets bei δ 7,18 und δ 7,21 ppm und ein Signal für eine aromatische Methoxygruppe bei δ 3,90 ppm deuten gegenüber Verbindung 3 auf ein zweifach substituiertes CumarinGrundgerüst hin..

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Verbindung 4 weist ebenso wie das von Verbindung 3 Signale zwischen δ 3,4 und 3,6 ppm, sowie ein Dublett bei δ 5,07 ($J=7,3$ Hz) für ein anomeres Proton auf, so dass auch hier eine glykosidierte Substanz vorliegt. NOE-Experimente zeigten die Bindung der beiden aromatischen Protonen an den Positionen 5 und 8, sowie die der Methoxygruppe an Position 7. Die Hydroxygruppe und der dort gebundene Zuckerrest befand sich an Position 6. In Analogie zu Verbindung 3 konnte dieser als β -Glucose identifiziert werden.

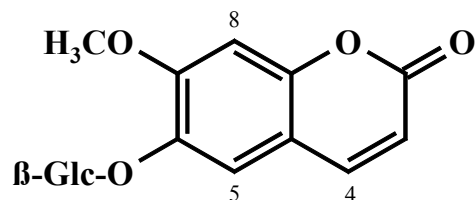
Der Pseudomolpeak $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei m/z 355 wurde im (+)-FAB Massenspektrum gefunden.

Im EI Massenspektrum konnte das Fragment des Aglykons bei m/z 192 nachgewiesen werden, dessen Hochauflösung die molekulare Zusammensetzung der Substanz als $[\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4]^+$ mit einer gefundenen Masse von 192,04218 gegenüber der berechneten von 192,04226 bestätigte.

Die Verbindungen 3 und 4 lagen als Gemisch vor, das aufgrund zu geringer Mengen nicht weiter aufgetrennt werden konnte. Die Substanzen konnten jedoch mit Hilfe von HMBC-, $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$ - und HETCOR-Messungen sowie dem Vergleich mit Daten aus der Literatur (Vdovin *et al.*, 1987, Tsukamoto *et al.*, 1985; Cussans und Huckerby, 1975, Shafizadeh und Melnikoff, 1970) eindeutig identifiziert werden. Da die Verbindungen 3 und 4 nur als Gemisch verfügbar waren, konnten die UV-Daten, optische Drehwerte sowie Schmelzpunkte nicht bestimmt werden.



Fraxetin-7- β -glucopyranosid (V3)



7-Methoxycumarin-6- β -glucopyranosid (V4)

Molekül. Schwefel besteht zu 95,06% aus ^{32}S , zu 0,74% aus ^{33}S und zu 4,18% aus ^{34}S ; dieses Massenverhältnis ist nur für Schwefel typisch und spiegelt sich in beiden Peaks wider (siehe Abbildung 13).

Der Molpeak, der jeweils ein Schwefelatom enthielt, ist bei der Darstellung gleich 100% gesetzt worden. Der um zwei Masseneinheiten schwerere Peak nimmt relativ hierzu gut 4% ein, was einem Anteil von 4,18% ^{34}S am Schwefel in den Substanzmolekülen der Probe entsprach. Kohlenstoff besteht dem gegenüber zu 98,89% aus ^{12}C und nur zu 1,11% aus ^{13}C (Holleman und Wieberg, 1971).

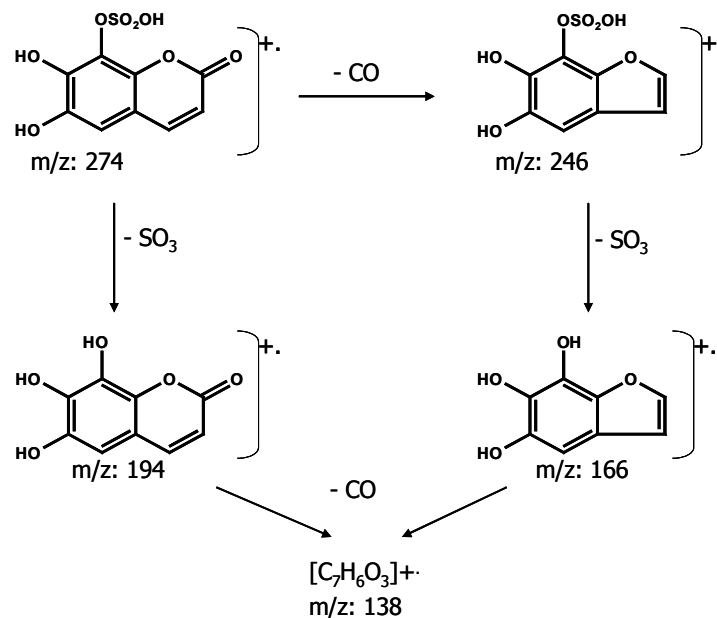


Abbildung 12: Zerfallsschema von 6,7-Dihydroxy-8-cumarinsulfat

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum wies die beiden für Cumarine typischen Dubletts bei δ 6,41 ppm (H-3) und δ 7,99 ppm (H-4) mit einer Kopplungskonstante von 9,5 Hz auf. Zusätzlich befand sich ein Singulett bei δ 7,6 für ein isoliertes Proton an C-5, wie sich aus NOE-Untersuchungen ableiten ließ.

Es lag also ein Derivat eines 6,7,8-trihydroxylierten Cumarins vor, wie an dem Fragment m/z 194 des EI-MS Spektrums deutlich wird. Ein Vergleich der hier gefundenen Daten mit den spektroskopischen und dc Daten dieses Cumarins aus der Literatur (Nakazawa und Ohsawa, 1998; Kayser und Kolodziej, 1995; Döpke *et al.*, 1990) zeigte, dass eine

hochpolare Gruppe [geringes Laufvermögen der Substanz 5 auf Kieselgel in Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) sowie die relative Tieffeldverschiebung einiger Signale im ^1H sowie ^{13}C NMR Spektrum] an eine der Hydroxylgruppen gebunden sein musste. Dass sich die Verbindung 5 wie bei Lemmich und Shabana, 1984 beschrieben durch die reversible Bindung an Polyamid von den restlichen Substanzen trennen ließ, legte nahe, dass es sich um eine sulfatierte Verbindung handelte, was durch (-)-FAB und durch HREI-MS Messungen belegt werden konnte, die beide das Vorhandensein eines Schwefelatoms belegten.

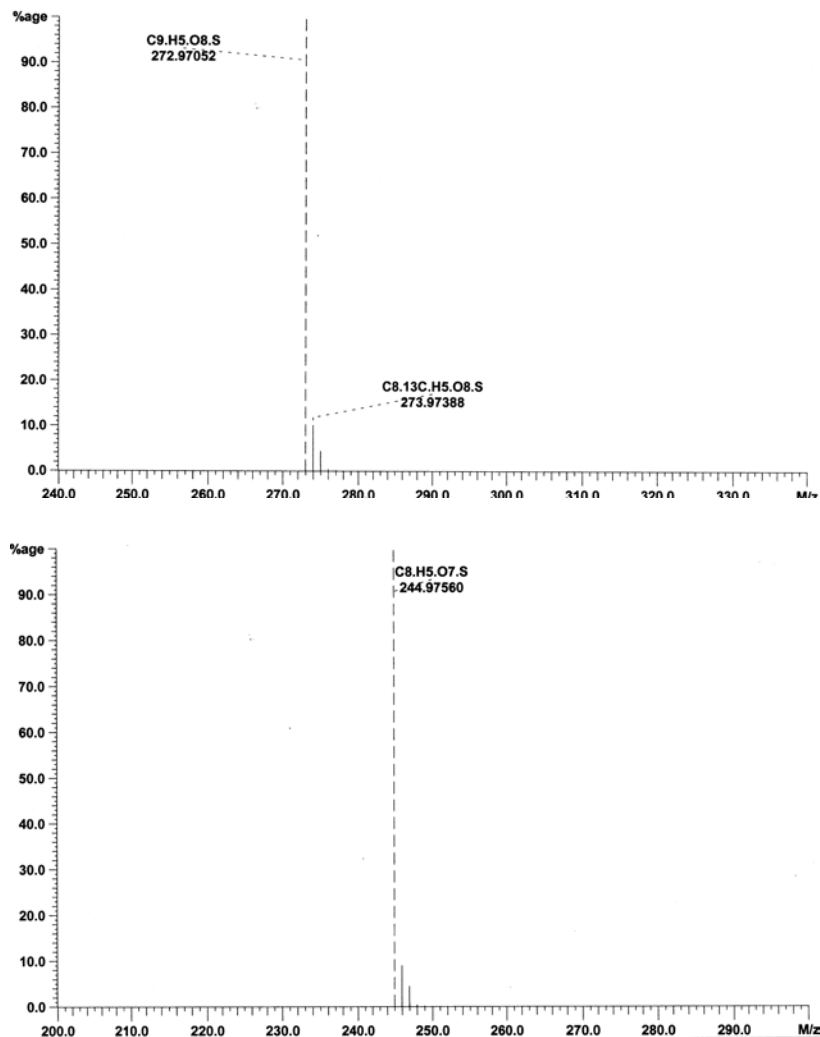


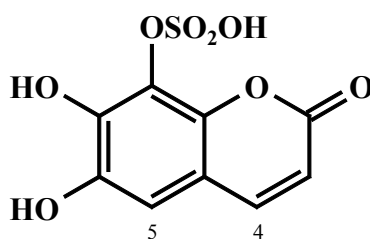
Abbildung 13: Isotopenverteilungen der Massenpeaks von C₉H₅O₈S (m/z: 273) und C₈H₅O₇S (m/z: 243)

Die Frage, an welcher Position sich die Sulfatgruppe befand, erklärte sich über die Kombination einiger einfacher Tests und Überlegungen. Zum einen war die Signallage von H-5 relativ weit ins tiefe Feld verschoben, was durch den starken (-)-I Effekt der

Sulfatgruppe erklärbar war. Dieser Effekt kann sich vor allem in *ortho*- oder *para*-Position auswirken, so dass eine Substitution an Position 7 nicht in Frage kam. Eine Differenzierung zwischen den Positionen 6 und 8 ließ sich mit Hilfe der Gibbs-Reaktion auf DC-Platten klären. Die Reaktion verläuft dann positiv mit einer Blaufärbung der Substanzbande, wenn in *para* Position zum Proton eine freie Hydroxylfunktion vorliegt.

Auf der gleichen DC-Platte wurden Capsaicin und Fraxetin-7- β -glucopyranosid als Positivkontrollen und Fraxin als Negativkontrolle mitchromatographiert. Die Verbindung 5 reagierte analog zum Fraxin negativ, so dass die Sulfatgruppe in Position 8 gebunden sein musste.

Auch wenn sulfatierte Verbindungen in der Natur relativ häufig vorkommen, sind Cumarinsulfate bislang nur selten beschrieben worden (Latté, *et al.*, 2000; Lemmich und Shabana, 1984) Bei der Verbindung 5 handelt es sich um einen neuen Naturstoff, der die kleine Gruppe bekannter Cumarinsulfate erweitert.



6,7-Dihydroxycumarin-8-sulfat (V5)

Tabelle 4: $^1\text{H-NMR}$ Daten V5 (400 MHz, D_2O , TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)		
	Verbindung 5	Multiplizität	Kopplungskonstante (Hz)
H-3	6,41	<i>d</i>	9,5
H-4	7,99	<i>d</i>	9,5
H-5	7,60	<i>s</i>	

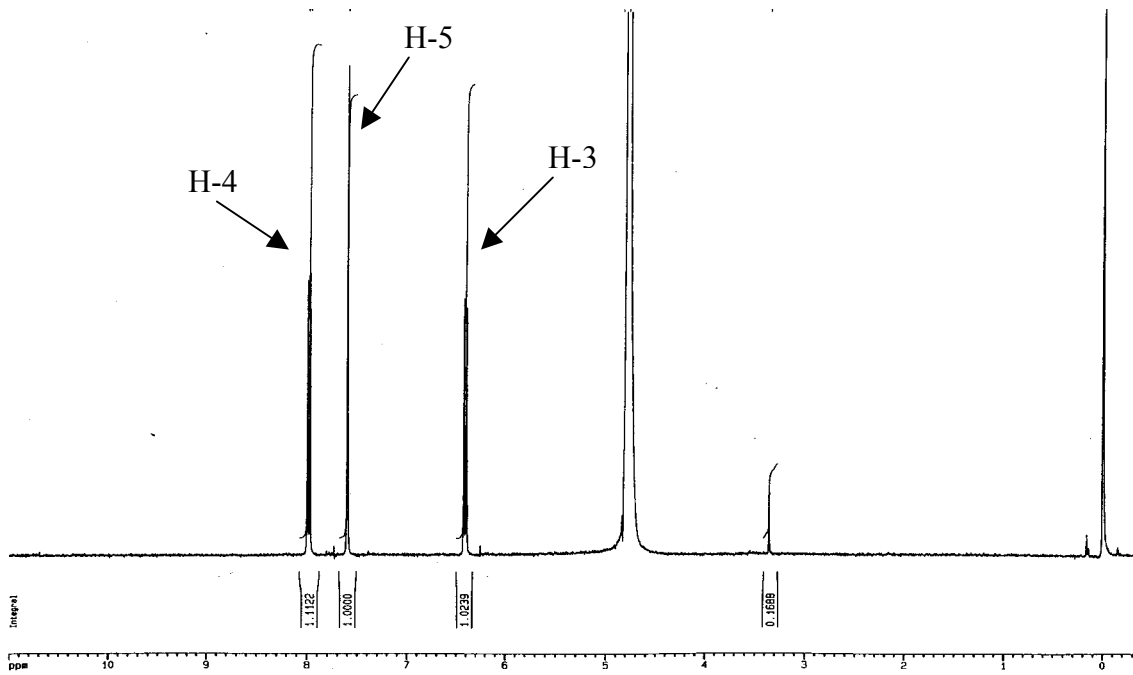


Abbildung 14: ^1H -NMR Spektrum von 6,7-Dihydroxycumarin-8-sulfat (V5; 400 MHz, D_2O , TMS als interner Standard)

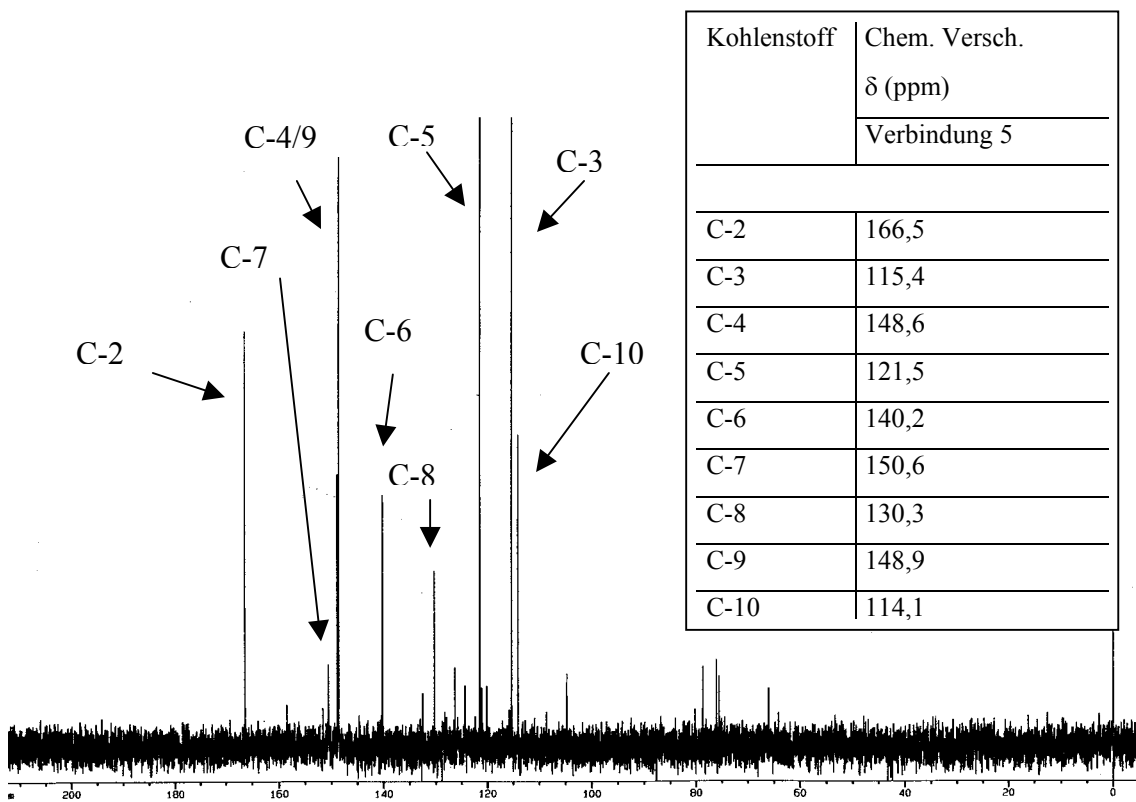
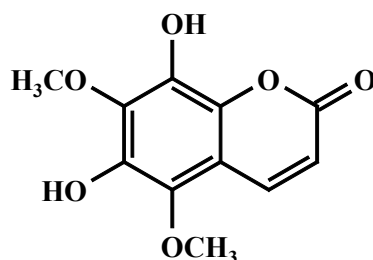


Abbildung 15: ^{13}C -NMR Spektrum von 6,7-Dihydroxycumarin-8-sulfat (V5; 100,6 MHz, D_2O , TMS als interner Standard)

6.1.6. 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin (V6)

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum wies die beiden olefinischen Protonen an den Positionen 3 und 4 bei δ 6,17 ppm und bei δ 8,03 ppm mit der Kopplungskonstante 9,6 Hz auf. Des Weiteren waren zwei Signale für aromatische Methoxygruppen bei δ 3,87 und bei δ 3,91 ppm vorhanden.



6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin V6

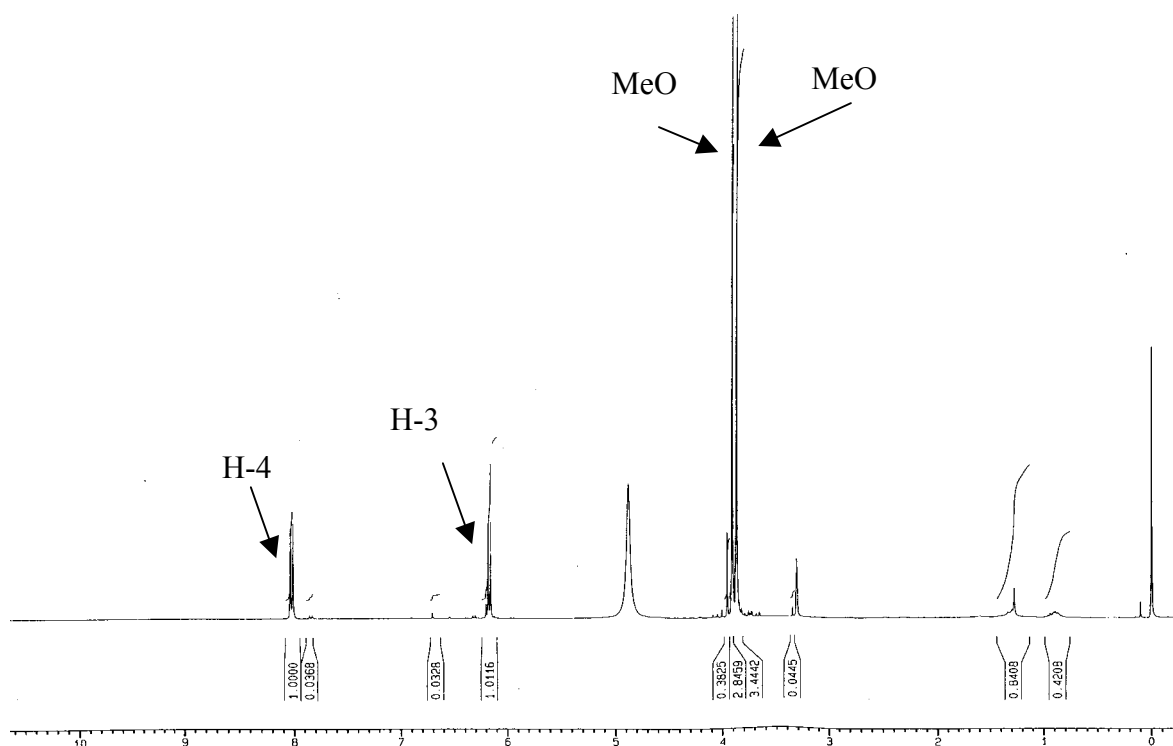
Aus dem EI Massenspektrum konnte der Molpeak $[\text{M}]^+$ bei m/z 252 gefunden werden, was auf die Anwesenheit von zwei weiteren Sauerstofffunktionen am Cumarinringgerüst hindeutete. Es konnte also angenommen werden, dass ein mit jeweils zwei Methoxy- und zwei Hydroxygruppen tetrasubstituiertes Cumarin vorlag. Eine HMBC Messung zeigte einen Kreuzpeak zwischen dem C-10 mit H-4 sowie einer Methoxygruppe, die somit an Position 5 gebunden war. Durch einen weiteren Kreuzpeak der beiden Methoxygruppen mit dem C-6, konnte die Lage der zweiten Methoxygruppe eindeutig an Position 7 festgelegt werden.

Tabelle 5: $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindung V6 (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)		
		Multiplizität	Kopplungskonstante (Hz)
H-3	6,17	<i>d</i>	9,6
H-4	8,03	<i>d</i>	9,7
OCH_3	3,87	<i>s</i>	
OCH_3	3,91	<i>s</i>	

Tabelle 6: ^{13}C NMR Daten der Verbindungen V6-7 (100,6 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Kohlenstoff	Chemische Verschiebung δ (ppm)	
	Verbindung 6	Verbindung 7
C-2	163,3	163,8
C-3	112,2	112,7
C-4	141,3	146,8
C-5	143,3	101,1
C-6	112,1	147,2
C-7	139,4	140,7
C-8	139,4	134,1
C-9	130,6	140,8
C-10	107,0	112,2
OCH_3	62,6	56,8
OCH_3	61,5	-


 Abbildung 16: ^1H -NMR Spektrum von 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin (V6; 400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

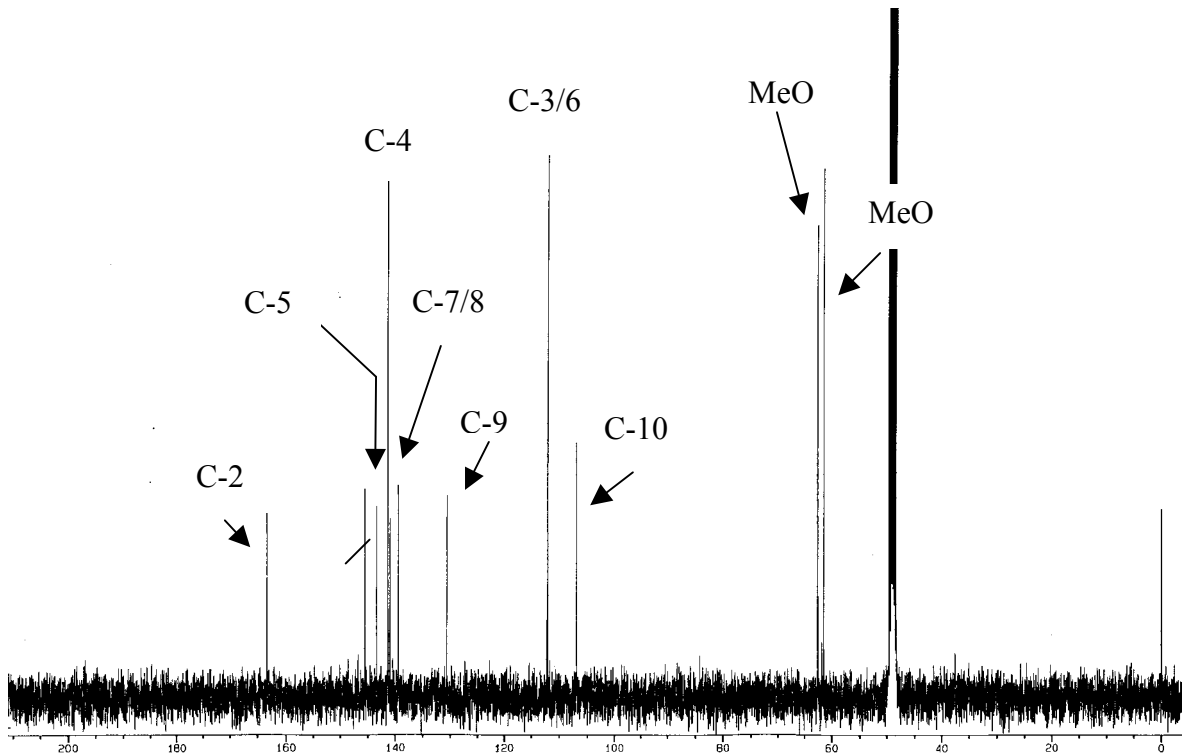
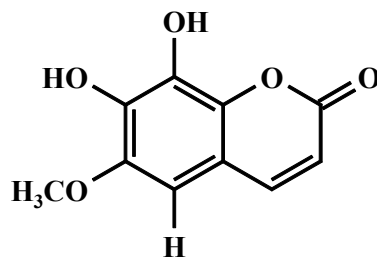


Abbildung 17: ^{13}C -NMR Spektrum von 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin (V6; 100,6 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Die gefundenen spektroskopischen Daten stimmten vollkommen überein mit 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin, welche zuvor schon aus den Wurzeln von *P. sidoides* isoliert worden war (Kayser und Kolodziej, 1995) und konnte hier zum ersten Mal auch aus den oberirdischen Pflanzenteilen isoliert werden.

6.3.3. 7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin (= Fraxetin) (V7)

Im ^1H -NMR Spektrum befanden sich die Signale der beiden olefinischen Protonen bei δ 6,21 ppm und δ 7,84 ppm ($J=8,3$ Hz). Ein weiteres Signal für ein isoliertes aromatisches Proton lag bei δ 6,72 ppm, das Signal einer aromatischen Methoxygruppe bei δ 3,90 ppm.



7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin (V7)

Tabelle 7: $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindung V7 (400 MHz, MeOH- d_4 , TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)		
		Multiplizität	Kopplungskonstante (Hz)
H-3	6,21	<i>d</i>	8,3
H-4	7,84	<i>d</i>	8,4
H-5	6,72	<i>s</i>	
OCH ₃	3,90	<i>s</i>	

Im EI Massenspektrum lag der Molpeak $[\text{M}]^+$ bei m/z 208. Außerdem konnten die Fragmente $[\text{M-CH}_3]^+$ bei m/z 193, $[\text{M-CO}]^+$ bei m/z 180 sowie ein weiteres Fragment: $[\text{M-CO-CH}_3]^+$ bei m/z 165 gefunden werden.

Von allen Peaks konnte durch Hochauflösung die molekulare Zusammensetzung bestimmt werden (siehe Tabelle 8)

Tabelle 8: Hochauflösung einiger EI-Massenpeaks von V7

	gefundene Masse	berechnete Masse
$[\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5]^+$	208,03701	208,03718
$[\text{C}_9\text{H}_5\text{O}_5]^+$	193,01353	193,01370
$[\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4]^+$	180,04222	180,04226
$[\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4]^+$	165,01861	165,01879

Die Positionen der beiden Hydroxygruppen, der Methoxygruppe sowie des Protons am aromatischen Ring des CumarinGrundgerüsts konnten mit Hilfe einer HMBC Messung geklärt werden. Es zeigte sich, dass das Proton an Position 5 zu finden war, während die Methoxygruppe an Position 6 vorlag. Die Positionen 7 und 8 trugen somit die beiden Hydroxygruppen, was sich auch an der relativen Tieffeldverschiebung der Signale für diese Kohlenstoffatome gegenüber unsubstituiertem Cumarin (www.aistgo.jp) zeigte.

Die spektroskopischen Daten identifizierten V7 als Fraxetin, welches zwar aus verschiedenen Quellen bekannt ist (Okuyama *et al.*, 1996; Vdovin, 1987; Tsukamoto, 1985), jedoch aus *P. sidoides* zum ersten Mal isoliert werden konnte. Die gefundenen Daten stimmen vollständig mit denen aus der Literatur überein. Es stellt einen weiteren Vertreter der für die Pflanze typischen hochoxygenierten Cumarine dar.

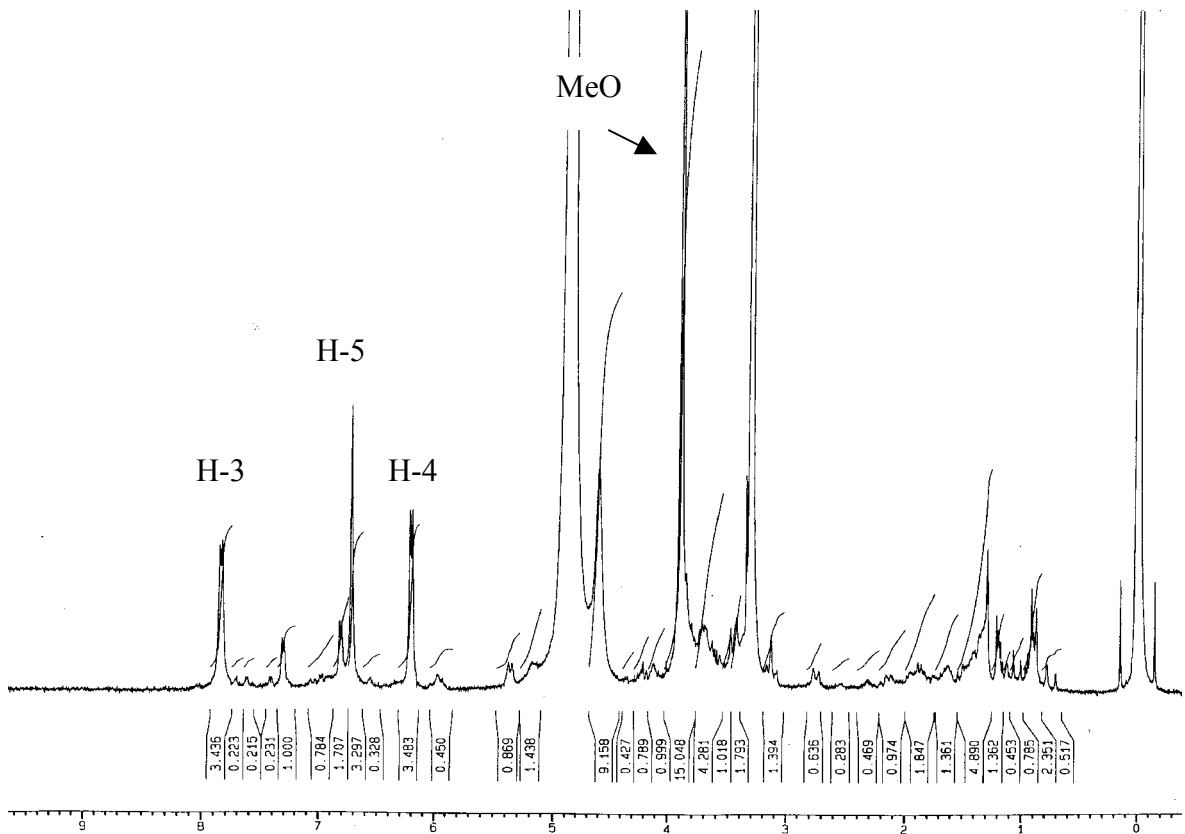


Abbildung 18: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin (V7; 400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

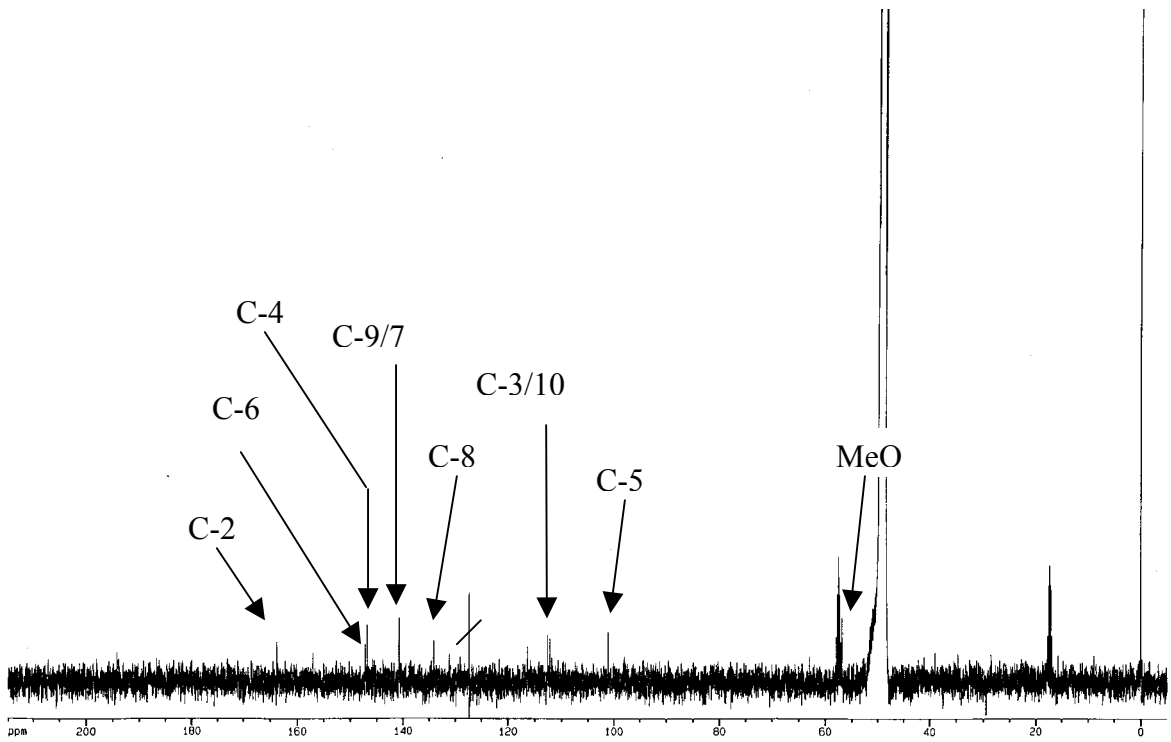


Abbildung 19: $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von 7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin (V7; 100,6 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

6.2. Strukturaufklärung einfacher phenolischer Verbindungen (V 8-10)

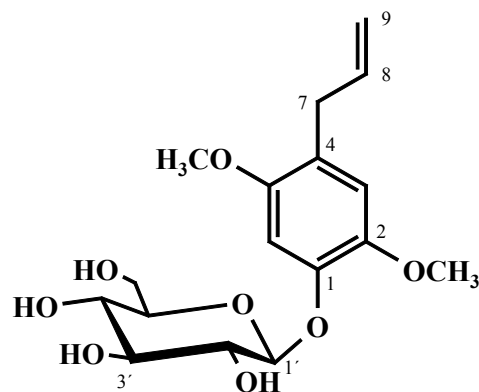
Einfache phenolische Verbindungen lassen sich auf DC durch eine starke Fluoreszenzlöschung erkennen. Außerdem sind sie im Allgemeinen gut mit Vanillin/H₂SO₄-Reagenz detektierbar.

6.2.1. 4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1-β-D-glucoopyranosid (V8)

Verbindung 6 zeigte bei dc Untersuchungen bei einem R_f-Wert von 0,36 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) eine Bande starker Fluoreszenzlöschung, die sich mit Vanillin/H₂SO₄-Reagenz anfärben ließ.

Das ¹H-NMR Spektrum wies zwei aromatische Protonensignale bei δ 6,78 und δ 6,90 ppm auf, sowie zwei Singulets bei δ 3,77 und δ 3,80 ppm von aromatischen Methoxygruppen. Außerdem waren noch Signale zwischen δ 3,4 und 3,9 ppm sowie ein weiteres Dublett bei δ 4,86 ppm (J=7,9 Hz) zu erkennen. Ein Vergleich der Signallagen im ¹³C-NMR Spektrum mit der Literatur ergab, dass ein β-Glucoserest im Molekül vorhanden sein musste (Bock und Pedersen, 1983).

In NOE-Experimenten zeigten sich Interaktionen zwischen jeweils einer Methoxygruppe mit einem der beiden aromatischen Proton, sowie zwischen dem anomeren Proton δ 4,86 ppm (J=7,9 Hz) und einem der Protonen. Die chemische Verschiebung der beiden Methoxysignale im ¹³C-NMR Spektrum bei δ_c 56,6 bestätigt die Lage jeder Methoxygruppe in Nachbarschaft zu mindestens einem Proton am aromatischen Ring.



4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1-β-D-glucoopyranosid (V8)

Im ^1H -NMR Spektrum fanden sich zusätzlich drei weitere Signale, ein Singulett bei δ 3,23 ppm sowie zwei Multipletts bei δ 5,93 ppm und δ 5,0 ppm. Die Aufspaltungsmuster dieser Signale ließ deren Anordnung zueinander erkennen sowie die Anzahl der beteiligten Protonen. Vergleiche mit den ^1H - und ^{13}C -NMR Daten aus der Literatur, zeigten dass ein Allylrest vorlag, der NOE-Experimenten zufolge an die Position 4 des Aromaten gebunden sein musste (Sy *et al.*, 1997; Baek *et al.*, 1992; Yakashijin *et al.*, 1982). Die Zuordnung aller Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von ^1H - ^1H -COSY und HETCOR Daten.

Der Pseudomolpeak im (+)-FAB-MS lag bei m/z 356. Im EI Massenspektrum gab das Fragment des Aglykons bei m/z 194 einen Peak, außerdem fand sich für ein weiteres Bruchstück nach Abgabe einer Methylgruppe ein Peak bei m/z 179. Im HREI-MS konnte die molekulare Zusammensetzung beider Fragmente bestätigt werden (siehe Experimenteller Teil).

Die Verbindung 7 wurde sauer hydrolysiert und die optische Drehung der Glucose mit $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +14,3^\circ$ ($c=0,56$ in Wasser) bestimmt. Sie konnte so der D-Reihe der Zucker zugeordnet werden. Das Aglykon von 4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1- β -D-glucopyranosid ist eine bekannte Verbindung (Diaz *et al.*, 1980). Bei dem hier isolierten glykosidischen Derivat handelt es sich jedoch um einen neuen Naturstoff.

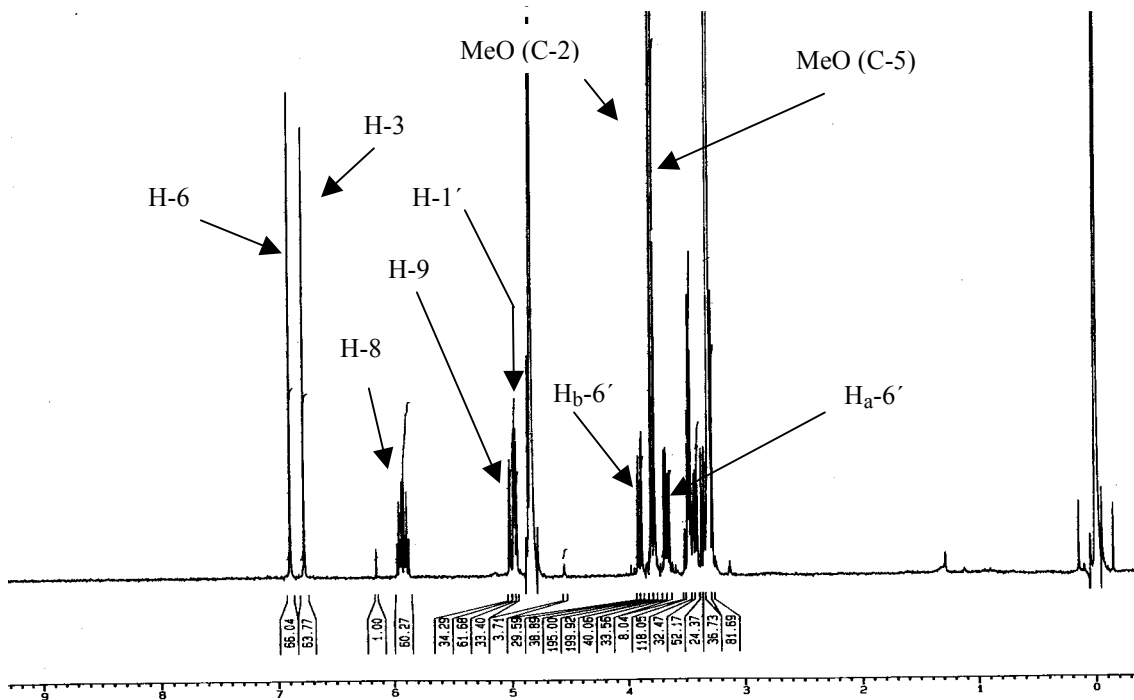


Abbildung 20: ^1H -NMR Spektrum von 4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1- β -D-glucopyranosid (V8; 100,6 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

Strukturaufklärung von Einzelsubstanzen

 Tabelle 9: $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindung 8 (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)		
	Verbindung 8	Multiplizität	Kopplungskonstante (Hz)
H-3	6,78	<i>s</i>	
H-6	6,90	<i>s</i>	
H-7	3,23	<i>s</i>	
H-8	5,93	<i>m</i>	6,5; 10,2; 6,8;
H-9	5,00	<i>m</i>	
OCH_3 (C-2)	3,80	<i>s</i>	
OCH_3 (C-5)	3,77	<i>s</i>	
Glucosyl-Rest			
H-1'	4,86	<i>d</i>	7,85
H-2'-5'	3,35 – 3,49	<i>m</i>	
H _a -6'	3,66	<i>dd</i>	12,0; 6,2; 6,3
H _b -6'	3,90	<i>dd</i>	12,0; 2,2; 2,2

 Tabelle 10: $^{13}\text{C-NMR}$ Daten der Verbindung V8 (100,6 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Kohlenstoff	Chem. Versch. δ (ppm)	Kohlenstoff	Chem. Versch. δ (ppm)
Aglykon		Glucosyl-Rest	
C-1	153,3	C-1'	103,6
C-2	144,4	C-2'	75,0
C-3	116,8	C-3'	78,0
C-4	123,7	C-4'	71,7
C-5	147,2	C-5'	78,5
C-6	103,6	C-6'	62,7
C-7	34,9		
C-8	138,5		
C-9	115,5		
OCH_3	56,6		
OCH_3	56,6		

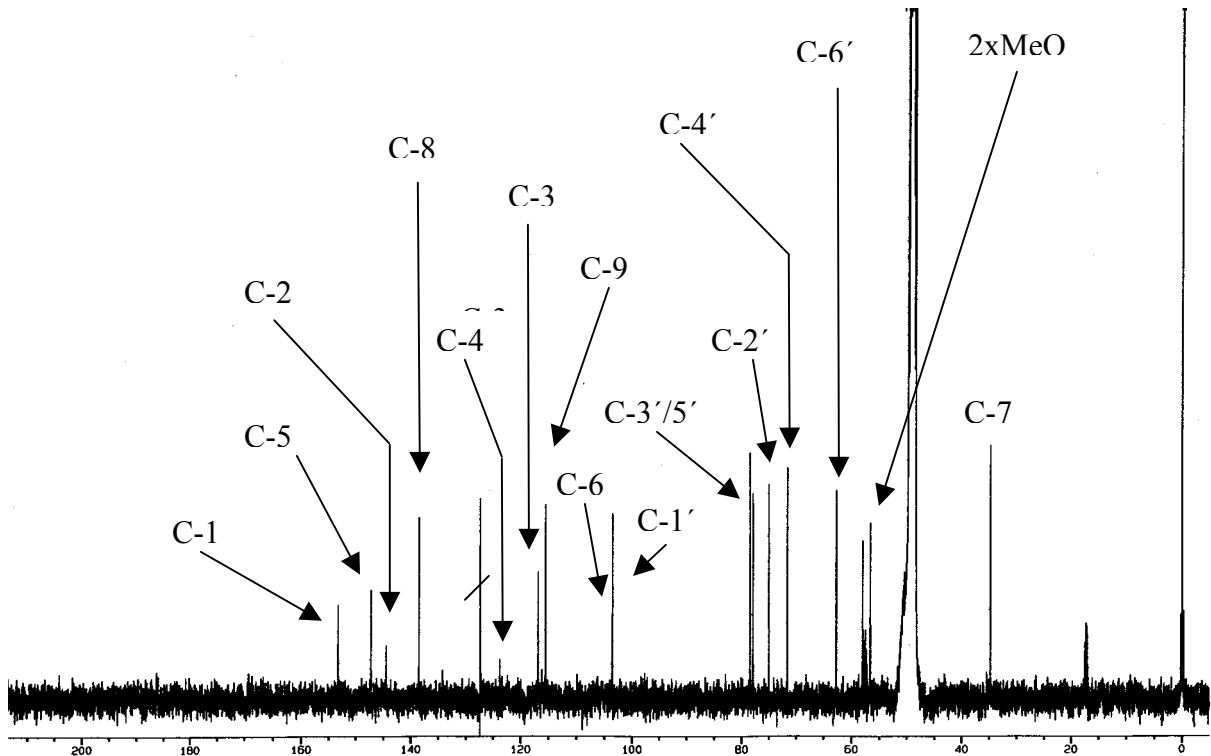


Abbildung 21: ^{13}C -NMR Spektrum von 4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1-O- β -glucopyranosid (V8; 100,6 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

6.2.2. Gallussäure (V9)

Gallussäure wies bei den Untersuchungen eine Fluoreszenzlöschung bei einem R_f -Wert von 0,7 im Fließmittel Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) auf. Bei Detektion mit FeCl_3 -Reagenz trat Blaufärbung auf.

Im ^1H -NMR Spektrum fand sich ein Signal der beiden Protonen an den Positionen 2 und 6 bei δ 7,06 ppm.

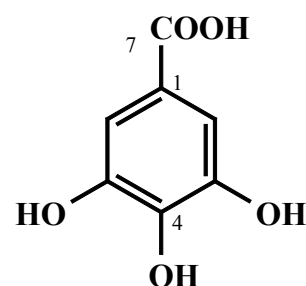
Die Signallagen im ^{13}C -NMR Spektrum stimmten mit denen aus der Literatur (Kayser, 1997; Sakar *et al.*, 1993) ebenfalls vollständig überein. Das EI Massenspektrum wies den Molpeak [M] bei m/z 170 auf, sowie auch das für Gallussäure charakteristische Zerfallschema über das Fragment [M-OH] bei m/z 153 und den Peak für [M-OH-CO] bei m/z 125.

Gallussäure ist sowohl aus den Wurzeln als auch aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *P. sidoides* zuvor isoliert worden (Kayser, 1997).

Tabelle 11: $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindungen V9-10 (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)*	
	Substanz 9	Substanz 10
H-2	7,06 (s)	7,43 (br s)
H-3	-	-
H-4	-	-
H-5	7,06 (s)	6,78 (br d; J=8,1)
H-6	-	7,40 (d; J=1,8)

* Multiplizität und Kopplungskonstante in Hz in Klammern



Gallussäure (V 9)

6.2.3. Protocatechusäure (V 10)

Protocatechusäure wies bei den Untersuchungen eine Fluoreszenzlöschung bei einem R_f -Wert von 0,75 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) auf. Bei Detektion mit FeCl_3 -Reagenz färbte sich die Substanzbande graublau, was auf die Anwesenheit von nur zwei vicinalen Hydroxylfunktionen am aromatischen Ring hindeutete, im Gegensatz zur tiefblauen Färbung der Gallussäurebande.

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung 8 zeigte das Muster eines ABX Systems eines trisubstituierten Aromaten. So befand sich ein breites Singulett bei δ 7,43 ppm, bei dem die Kopplungskonstante für die *meta*-Kopplung von etwa 2 Hz nicht aufgelöst war. Ein Signal für das Proton an Position 5 lag bei δ 6,78 ppm ($J=8,1$ Hz). Das Signal bei δ 7,4 ppm ($J=1,8$ Hz) gehörte zu dem Proton an Position 6.

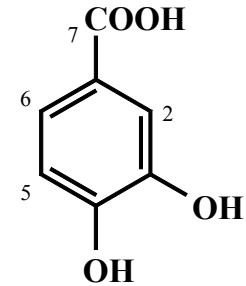
Die Positionen 3 und 4 trugen Sauerstofffunktionen, wie aus der chemischen Verschiebung der Signale für C-3 und C-4 im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum erkennbar wurde.

Das EI-Massenspektrum wies auch hier analog zur Gallussäure das charakteristische Zerfallsschema auf, das auf die Anwesenheit einer Carboxylgruppe im Molekül hindeutet ($[\text{M}]^+$ m/z 154; $[\text{M-OH}]^+$ m/z 137; und $[\text{M-OH-CO}]^+$ m/z 109).

Tabelle 12: ^{13}C -NMR Daten der Verbindungen V9-10 (100,6 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Kohlenstoff	Chemische Verschiebung δ (ppm)	
	Substanz 9	Substanz 10

C-1	122,7	124,4
C-2	120,3	117,8
C-3	146,4	151,2
C-4	139,4	146,0
C-5	146,4	115,7
C-6	110,3	123,8
C-7	170,9	?



Protocatechusäure (V 10)

Signale austauschbar

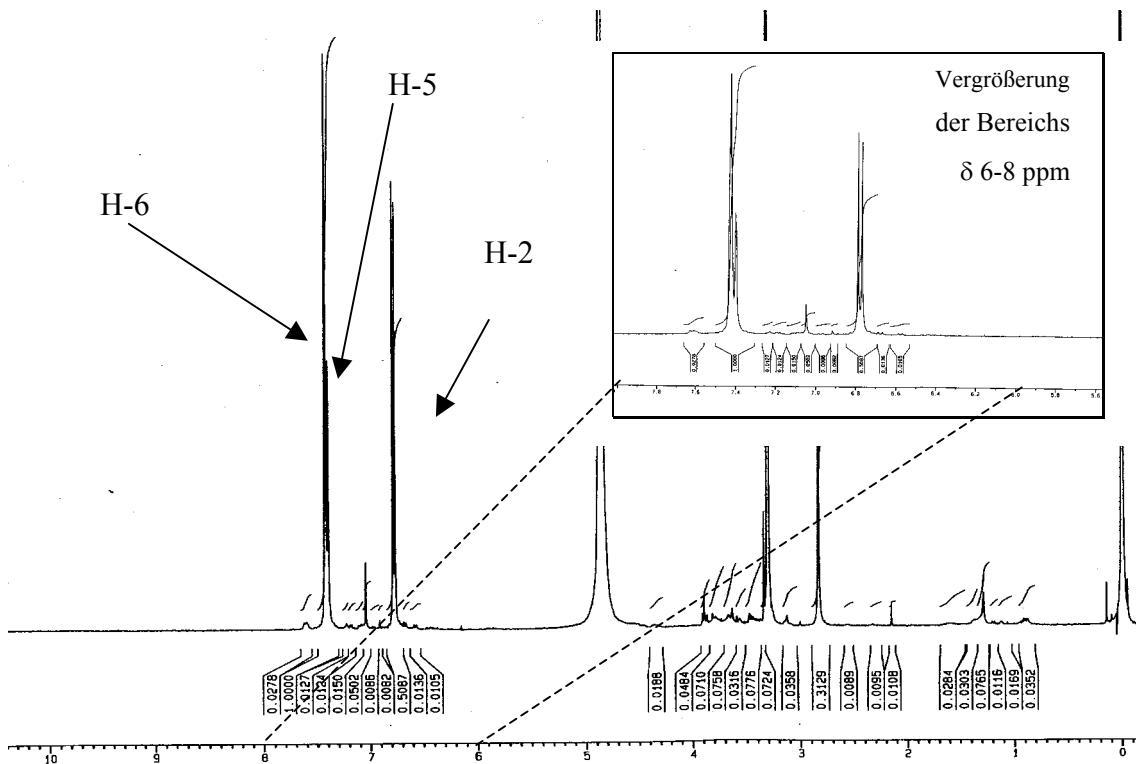


Abbildung 22: ^1H -NMR Spektrum von Protocatechusäure (V10; 400 MHz, $\text{Methanol-}d_4$, TMS als interner Standard)

Protocatechusäure kommt in der Natur sehr häufig vor, konnte aber zum ersten Mal aus dieser Pflanzenquelle isoliert werden.

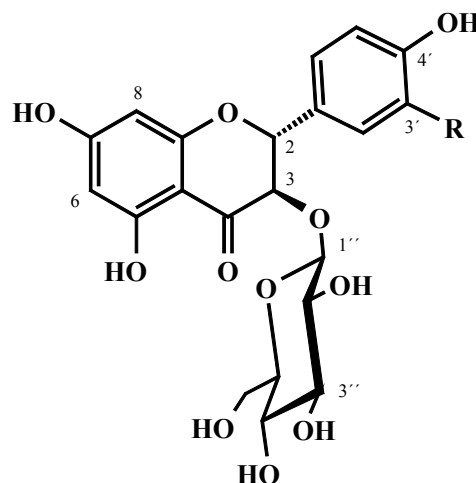
6.3. Strukturaufklärung von Flavonoiden und Catechin-Derivaten (V 11-17)

Auf DC Platten wiesen alle Derivate eine starke Fluoreszenzlöschung auf. Flavonoide lassen sich alle mit Naturstoff-Reagenz detektieren und zeigen dann unspezifisch eine gelbe Färbung im UV bei 365 nm wie auch im VIS auf. Detektion mit AlCl_3 -Reagenz führt durch Ausbildung von Al^{3+} -Komplexen zu unterschiedlichen und für einzelne Verbindungen typischen Fluoreszenzfärbungen im UV bei 365 nm.

Catechine zeigen auch eine intensive Fluoreszenz-Löschung und lassen sich mit Vanillin/Salzsäure-Reagenz spezifisch unter Rotfärbung im VIS detektieren.

6.3.1. (+)-(2R,3R)-Taxifolin-3- β -glucopyranosid (V11)

(+)-(2R,3R)-Taxifolin-3- β -glucopyranosid zeigte bei dc Untersuchungen eine Fluoreszenzlöschung bei einem R_f -Wert von 0,22 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1). Die Detektion mit AlCl_3 -Reagenz führte zu einer gelb Färbung der Bande im VIS und im UV bei 365 nm.



R=OH; (+)-trans-(2R,3R)-Taxifolin-3- β -glucopyranosid (V11)

R=H; (+)-trans-(2R,3R)-Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosid (V12)

Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum war ein ABX System (δ 6,96, $J=8,2$ Hz, H-2'; δ 6,77, $J=8,2$ Hz, H-5'; δ 6,84, $J=8,2$; 1,9, H-6') des B-Ringes erkennbar.

Des weiteren fanden sich zwei Dubletts für *meta*-koppelnde Protonen an den Positionen 6 und 8 bei δ 5,90 und 5,92 ppm ($J=2,0$ Hz).

Im heterozyklischen Bereich befanden sich zwei Signale bei δ 4,93 und 5,24 ppm ($J=9,6$ Hz), welche den Protonen an den Positionen 2 und 3 zugeordnet werden konnten. Die Kopplungskonstante von 9,6 Hz deutete auf die relative *trans*-Stellung dieser Protonen hin.

Tabelle 13: $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindungen V11-12 (400 MHz, MeOH-*d*4, TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)*	
	Substanz 11	Substanz 12
H-2	4,93 (<i>d</i> , $J=9,6$)	4,98 (<i>d</i> ; $J=10,1$)
H-3	5,24 (<i>d</i> ; $J=9,6$)	5,27 (<i>d</i> ; $J=10,1$)
H-6	5,90 (<i>d</i> ; $J=2,0$)	5,90 (<i>d</i> ; $J=2,0$)
H-8	5,92 (<i>d</i> ; $J=2,1$)	5,92 (<i>d</i> ; $J=2,1$)
H-2'	6,96 (<i>d</i> ; $J=8,2$)	7,36 (<i>d</i> ; $J=8,5$)
H-3'	-	6,82 (<i>d</i> ; $J=8,5$)
H-5'	6,77 (<i>d</i> , $J=8,2$)	6,82 (<i>d</i> ; $J=8,5$)
H-6'	6,84 (<i>dd</i> ; $J=8,2$; 1,9)	7,36 (<i>d</i> ; $J=8,5$)
Glucosyl-Rest		
H-1'	3,87 (<i>d</i> , $J=7,6$)	3,80 (<i>d</i> ; $J=7,67$)
H-2'	2,98 – 3,25 (<i>m</i>)	2,95 – 3,25 (<i>m</i>)
H-3'		
H-4'		
H-5'		
H _a -6'	3,61 (<i>dd</i> , $J=12,0$; 5,8; 5,8)	3,59 (<i>dd</i> ; $J=12,0$; 5,8; 5,8)
H _b -6'	3,78 (<i>dd</i> ; $J=10,0$; 1,9; 2,0)	3,76 (<i>dd</i> ; $J=12,0$; 2,0; 2,0)

* Multiplizität und Kopplungskonstante in Hz in Klammern

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum wies noch weitere Signale zwischen δ 2,9 und 3,8 ppm auf, was auf einen Zuckerrest hindeutete, sowie ein Dublett bei δ 3,87 ppm ($J=7,6$ Hz) für ein anomeres Proton. Die entsprechenden Signale im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum konnten mit Hilfe eines Literaturvergleiches eindeutig der β -Glucose zugeordnet werden (Bock und Pedersen, 1983).

Tabelle 14: ^{13}C -NMR Daten der Verbindungen V11-12 (100,6 MHz, MeOH-*d*4, TMS als interner Standard)

Kohlenstoff	Chemische Verschiebung δ (ppm)	
	Substanz 11	Substanz 12
C-2	83,6	83,6
C-3	77,3	77,2
C-4	195,9	196,2
C-5	164,2	164,3
C-6	96,4	96,4
C-7	169,3	169,2
C-8	97,4	97,4
C-9	165,6	165,6
C-10	102,6	102,6
C-1'	129,1	128,6
C-2'	115,9	130,5
C-3'	147,4	116,3
C-4'	146,5	159,4
C-5'	116,3	116,3
C-6'	121,1	130,5
Glucosyl-Rest		
C-1''	102,6	102,6
C-2''	74,7	74,6
C-3''	77,7	77,6
C-4''	71,4	71,3
C-5''	78,3	78,3
C-6''	62,7	62,7

Die relative Tieffeldlage von H-3 deutete auf eine Bindung der Glucose über diese Position hin (Agrawal, 1989; Samaiya und Saxena, 1988; Sakurai *et al.*, 1982; Sakurai und Okumura, 1983).

Im (+)-FAB und (-)-FAB Massenspektrum befand sich der jeweilige Pseudomolpeak der Verbindung 11 $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei m/z 467 bzw. bei $[\text{M}-\text{H}]^-$ bei m/z 465. Im EI-Massenspektrum wurden die Peaks für das Aglykon $[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7]^+$ bei m/z 304 sowie für das Fragment

$[C_{15}H_{10}O_6]^+$, das nach Abgabe eines Moleküls Wasser entstand, bei m/z 286 registriert. Die molekulare Zusammensetzung beider Fragment Peaks wurde durch deren Hochauflösung bestätigt (Daten siehe Experimenteller Teil).

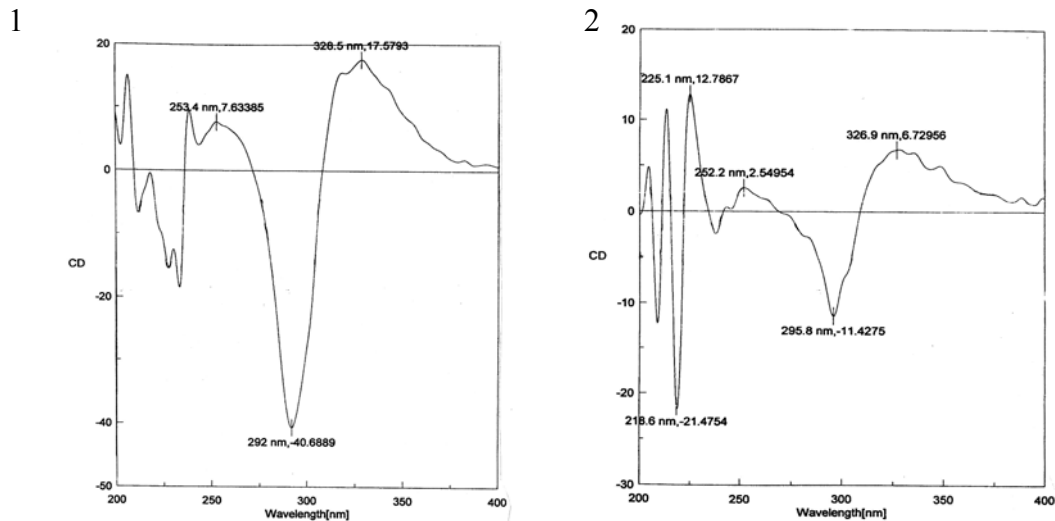


Abbildung 23: CD-Spektren von (+)-trans-(2R,3R)-Taxifolin-3-β-glucopyranosid (1) und (+)-trans-(2R,3R)-Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid (2)

Taxifolin-3-β-glucopyranosid ist zwar zuvor schon aus dem oberirdischen Teil von *P. sidoides* isoliert und beschrieben worden, allerdings ohne eindeutige Aufklärung der absoluten Konfiguration an den beiden Chiralitätszentren C-2 und C-3 (Kayser, 1997). Mit Hilfe von CD-Messungen konnte eine 2R,3R Konfiguration bestimmt werden in Einklang mit einem positiven bzw. negativen Cotton-Effekt im diagnostischen Wellenlängenbereich von 270-300 nm bzw. 300-350 nm. (s. Abbildung 23) (Gaffield und Waiss, 1995; Gaffield, 1970). Für die Verbindung 11 konnte eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{22} = +41,7^\circ$ ($c=0,64$ in Methanol) bestimmt werden.

6.3.2. (+)-(2R,3R)-Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid (V12)

Die Substanz 12 zeigte auf DC bei einem R_f -Wert von 0,28 im Fließmittel Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) eine Fluoreszenzlöschung sowie nach Detektion mit $AlCl_3$ -Reagenz eine gelbe Fluoreszenz im UV bei 365 nm.

Das 1H -NMR Spektrum wies große Übereinstimmungen mit dem Spektrum von Taxifolin-3-β-glucopyranosid auf (Tabelle 13, Seite 44).

Ein wesentlicher Unterschied bestand im Substitutionsmuster des B-Rings des Flavonoidgerüsts, dessen Protonen ein AA'BB'Spinsystem bildeten, was auf eine 1,4 Substitution des Aromaten hindeuteten.

Im (+)-FAB bzw. im (-)-FAB Massenspektrum wurden die erwarteten Pseudomolpeaks der Verbindung $[M+H]^+$ bei m/z 451 und $[M-H]^-$ bei m/z 449 registriert. Im EI Massenspektrum war der Molpeak $[M]^+$ bei m/z 450 zu finden, sowie auch das Fragment des Aglykons $[C_{15}H_{12}O_6]^+$ bei m/z 288 und des nach Wasserabgabe daraus entstandenen Fragments $[C_{15}H_{10}O_5]^+$ bei m/z 270. Die molekulare Zusammensetzung dieser Peaks konnte durch Hochauflösung bestätigt werden (Daten siehe Experimenteller Teil).

Durch CD Messungen konnte die Konfiguration der Verbindung 12 an den beiden Chiralitätszentren C-2 und C-3 mit 2*R*,3*R* bestimmt werden, basierend auf dem negativen Cotton-Effekt bei ca. 330 nm für den $n \rightarrow \pi^*$ Übergang sowie dem positiven Cotton-Effekt bei einer Wellenlänge von ca. 295 nm für den $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang. (siehe Abbildung 23) (Gaffield und Waiss, 1995; Gaffield, 1970).

Der Wert für die optische Drehung der Verbindung 12 wurde mit $[\alpha]_D^{20} = +35,7^\circ$ ($c=0,68$ in MeOH) bestimmt und steht damit im Gegensatz zum Literaturwert von $[\alpha]_D = -17,6^\circ$ ($c=0,79$ in MeOH) (Dayal und Parthasarathy 1977). Dort wurde allerdings die Konfiguration der Verbindung nicht ermittelt.

Die Verbindung 12 kommt in der Natur nicht häufig vor und ist nur für einige wenige Pflanzen dokumentiert (Lima *et al.*, 1995, Samaiya *et al.*, 1988). Die Isolierung von Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosid aus dieser Pflanzenquelle wurde noch nicht zuvor beschrieben.

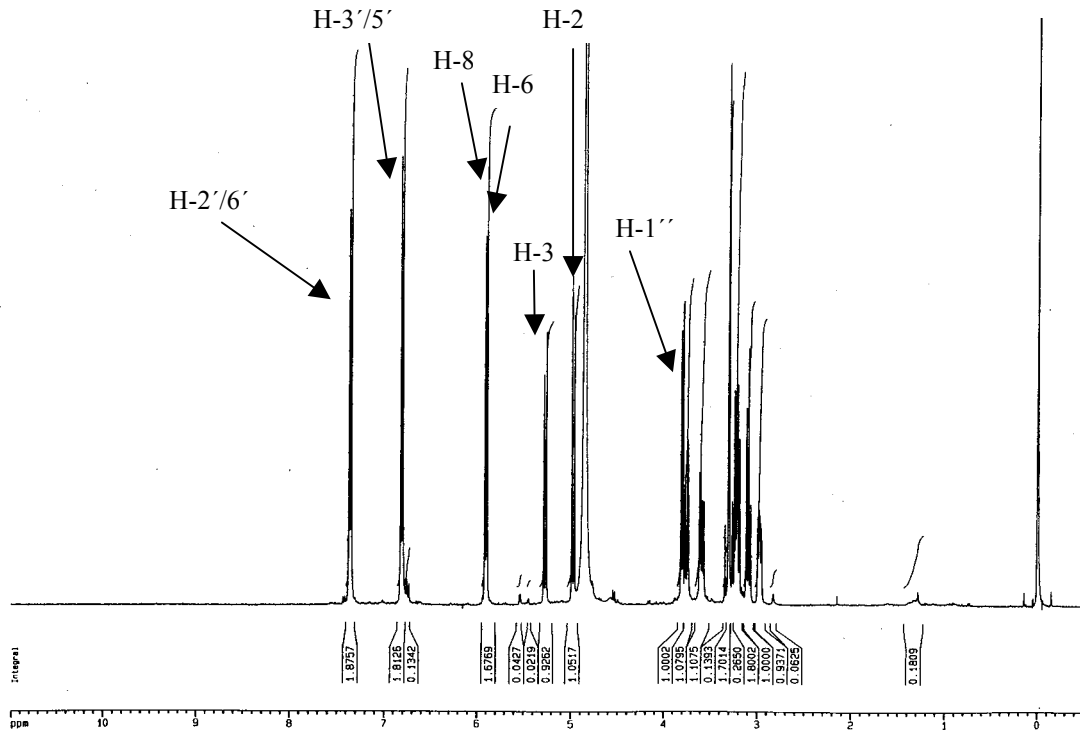


Abbildung 24: ^1H -NMR Spektrum von Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosid (V12; 400 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

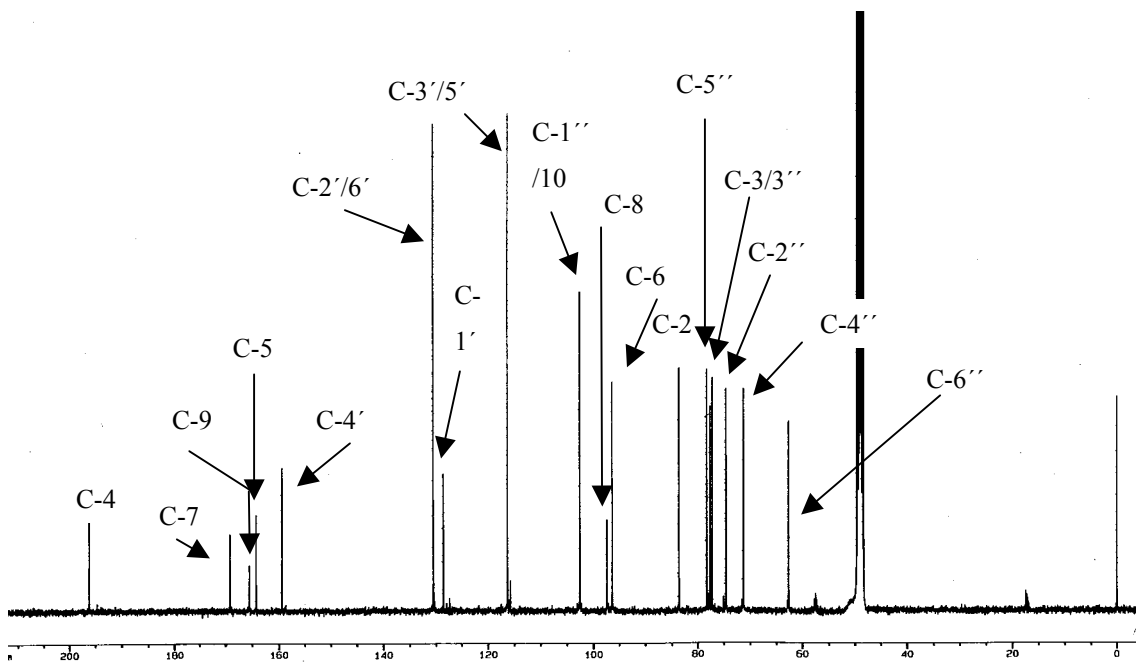


Abbildung 25: ^{13}C -NMR Spektrum von Dihydrokämpferol-3- β -glucopyranosid (V12; 100,6 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

6.3.4. Orientin-2''-gallat (V13)

Die Substanz zeigte auf DC bei einem R_f -Wert von 0,39 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) eine Löschung. Nach Detektion mit $AlCl_3$ -Reagenz fluoreszierte die Bande im UV bei 365 nm orange.

Tabelle 15: 1H -NMR Daten der Verbindungen 13-14 (400 MHz, MeOH- d_4 , TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)*	
	Verbindung 13	Verbindung 14
H-3	6,54 (6,36)** (s)	6,47 (s)
H-6	6,06 (6,20)** (s)	-
H-8	-	6,40 (s)
H-2'	7,65 (d, J=1,8)	7,31 (s)
H-5'	6,93 (d, J=8,4)	6,86 (d, J=9,0)
H-6'	7,58 (dd, J=8,4; 1,9)	7,35 (br dd)
Glucosylrest		
H-1''	5,2 (d, J=10,1)	5,16 (d, J=10,0)
H-2''	5,72 (t, J=9,6; 9,2)	5,74 (br t)
H-3''	3,84 (t, J=7,4; 9,0)	3,76 (t, J=9,1)
H-4''	3,80 (t, J=7,4; 9,0)	3,62 (t, J=9,4; 9,1)
H-5''	3,55 (m)	3,49 (m)
H-6'' a	4,04 (br dd, J=11,8)	3,94 (br d, J=10,7)
H-6'' b	3,93 (dd, J=5,8; 12,1)	3,79 (br d, J=11,8)
Galloylrest		
H-2'''	6,90 (6,70)** (s)	6,94 (s)
H-6'''	6,90 (6,70)** (s)	6,94 (s)

* Multiplizität und Kopplungskonstante in Hz in Klammern

** Signalverdopplung

Im 1H -NMR Spektrum befanden sich drei Signale für ein ABX-Spinsystem eines 1,3,4-substituierten Aromaten: ein Dublett bei δ 7,65 ppm ($J=1,8$ Hz) für das Proton an Position 2', ein Dublett des Protons an Position 5' bei δ 6,93 ppm ($J=8,4$ Hz) sowie ein Doppeldublett bei δ 7,58 ppm ($J=8,4$ und 1,9 Hz) für das Proton an Position 6'.

Das ^1H -NMR wie auch das ^{13}C -NMR Spektrum waren in Übereinstimmung mit Orientin (Latté *et al.*, 1997; Agrawal, 1989).

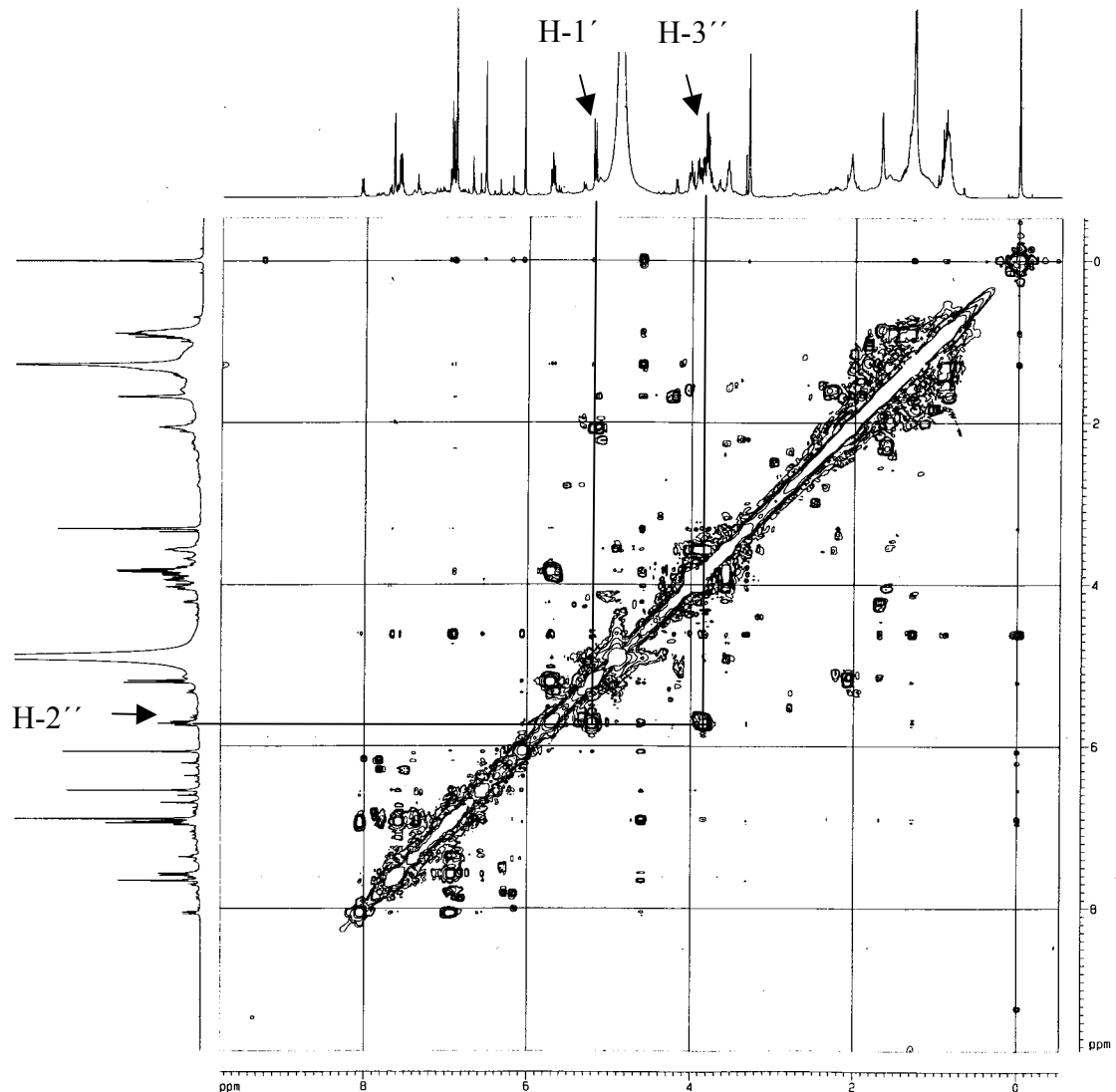


Abbildung 27: $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY von Orientin-2''-gallat (V13; 400 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

Zusätzlich war ein Singulett bei δ 6,90 ppm, das zwei Protonen entsprach, vorhanden. Es gehörte zu einem Gallussäurerest, dessen Kohlenstoffresonanzen im ^{13}C -NMR-Spektrum eindeutig mit denen der Gallussäure übereinstimmten.

Strukturaufklärung von Einzelsubstanzen

 Tabelle 16: ^{13}C -NMR Daten der Verbindungen V13-14 (100,6 MHz, MeOH- d_4 , TMS als interner Standard)

Kohlenstoff	Chemische Verschiebung δ (ppm)	
	Verbindung 13	Verbindung 14
C-2	167,6	167,6
C-3	103,8	104,0
C-4	184,1	183,9
C-5	162,7	164,7
C-6	99,0	110,3
C-7	164,0	162,7
C-8	103,6	95,0
C-9	158,5	158,8
C-10	105,7	110,3
C-1'	124,3	123,6
C-2'	115,1	114,2
C-3'	147,1	147,0
C-4'	151,0	151,0
C-5'	116,8	116,8
C-6'	121,0	120,4
Glucosyl-Rest		
C-1''	73,4	73,2
C-2''	74,1	73,9
C-3''	78,1	78,2
C-4''	72,4	71,9
C-5''	83,2	82,9
C-6''	63,1	62,9
Galloylrest		
C-1'''	121,3	121,5
C-2'''	110,3	110,3
C-3'''	146,2	146,2
C-4'''	139,6	139,6
C-5'''	146,2	146,2
C-6'''	110,3	110,3
C-7'''	166,7	166,3

□ : Signale austauschbar

Des Weiteren war die relative Tieffeldverschiebung des Protonensignals an Position 2 der Glucose (t , δ 5,72 ppm, $J=9,6$ und $9,2$ Hz) auffällig. Durch HETCOR und $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY Untersuchungen konnten jedoch eindeutig Korrelationen dieses Signals mit dem C-2' bzw. mit dem anomeren Proton gezeigt werden. Dieser Befund legte die Anbindung des Gallussäurerestes über die Position 2 des Glucoserestes am Orientinmolekül nah (siehe Abbildung 27) (Leitao und Monache, 1998; Sood *et al.*, 1976).

Die Verbindung 13 ist schon zuvor isoliert und beschrieben worden (Latté *et al.*, 2002), die hier gefundenen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.

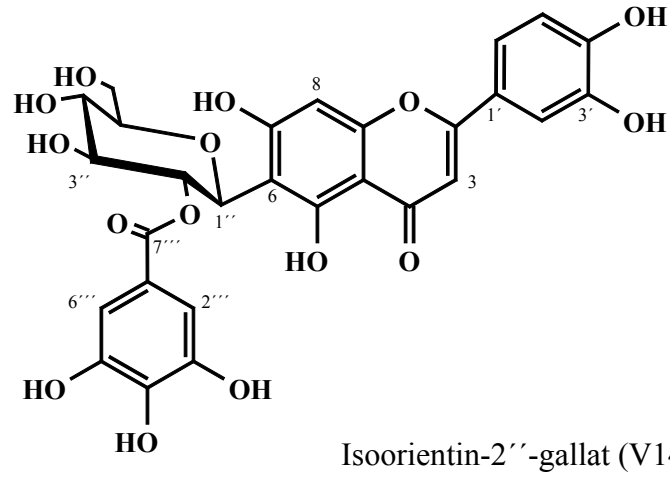
Im (+)-FAB wie auch im (-)-FAB Massenspektrum fanden sich die Pseudomolpeaks $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei m/z 601 und $[\text{M}-\text{H}]^-$ bei m/z 599. Im (-)-FAB Spektrum waren zusätzlich die Fragmente $[\text{M}-\text{Gallussäure}]^-$ bei m/z 431 sowie $[\text{M}-\text{Gallussäure}-\text{Glucose}]^-$ bei m/z 285 erkennbar. Das EI Massenspektrum wies ausschließlich den Molpeak $[\text{M}]^+$ der Gallussäure bei m/z 170 sowie $[\text{M}-\text{OH}]^+$ bei m/z 153 auf.

Die Isolierung der Verbindung 13 ist bisher nur aus der nah verwandten Art *P. reniforme* dokumentiert (Latté *et al.*, 2001). Sie konnte hier zum ersten Mal aus *P. sidoides* isoliert werden.

6.3.5. Isoorientin-2''-gallat (V14)

Die Substanz zeigte bei dc Untersuchungen einen R_f -Wert von 0,26 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) eine Fluoreszenzlöschung. Nach Detektion mit AlCl_3 -Reagenz fluoreszierte die Bande im UV bei 365 nm orange.

Das ^1H -NMR-Spektrum wies wesentliche Übereinstimmungen mit dem von Orientin-2''-gallat auf. Ein Unterschied bestand in der Anbindung des Glucosylrestes an das Flavongerüst. Im ^1H -NMR Spektrum der Verbindung 14 befand sich das Singulett für ein aromatisches Proton bei δ 6,40 ppm. Die chemische Verschiebung lies dieses der Position 8 zuordnen im Gegensatz zu H-6 der Verbindung 13 (δ 6,06 ppm). Es handelte sich hier demnach um Isoorientin (Kayser, 1997), an dessen Glucose analog zur Verbindung 14 über die Position 2 ein Gallussäurerest gebunden war, wie aus den HETCOR und $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY Daten erkennbar war.



Im (-)-FAB-Massenspektrum ließ sich der Pseudomolpeak $[M-H]^-$ bei m/z 599 finden, wie auch die Fragmente $[M-C_7H_5O_5]^-$ bei m/z 431, $[M-C_7H_5O_5-C_6H_{10}O_4]^-$ bei m/z 285 und $[C_7H_5O_5]^-$ bei m/z 169.

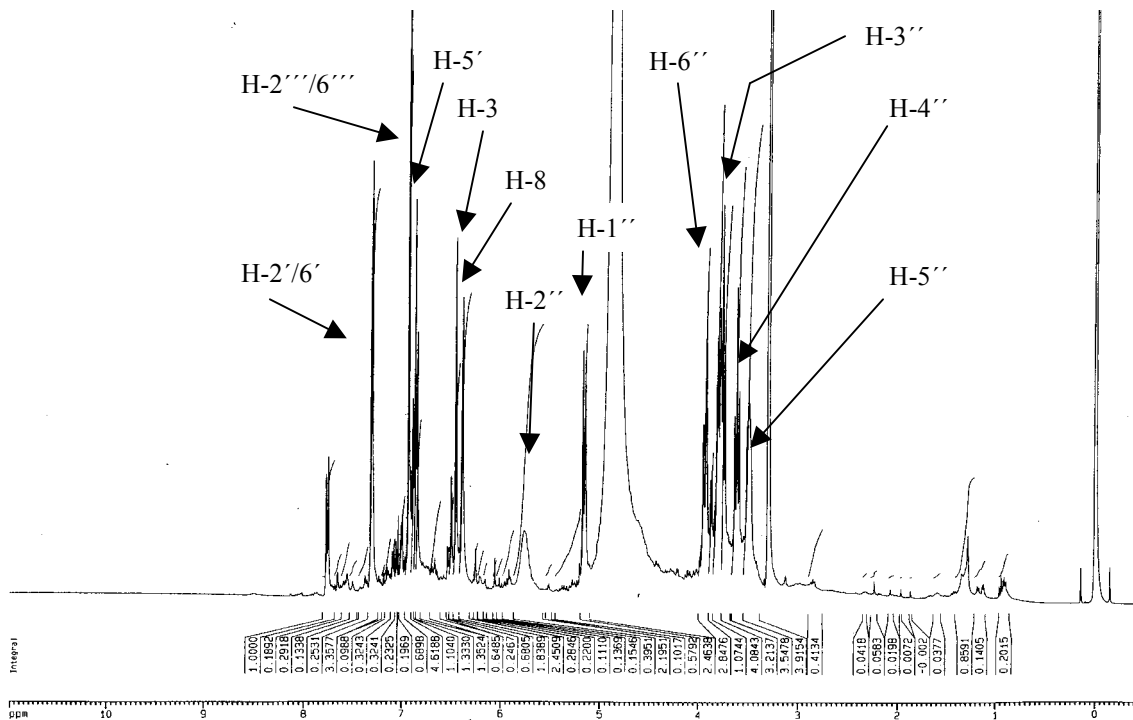


Abbildung 28: 1H -NMR Spektrum von Isoorientin-2''-gallat (V14; 400 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

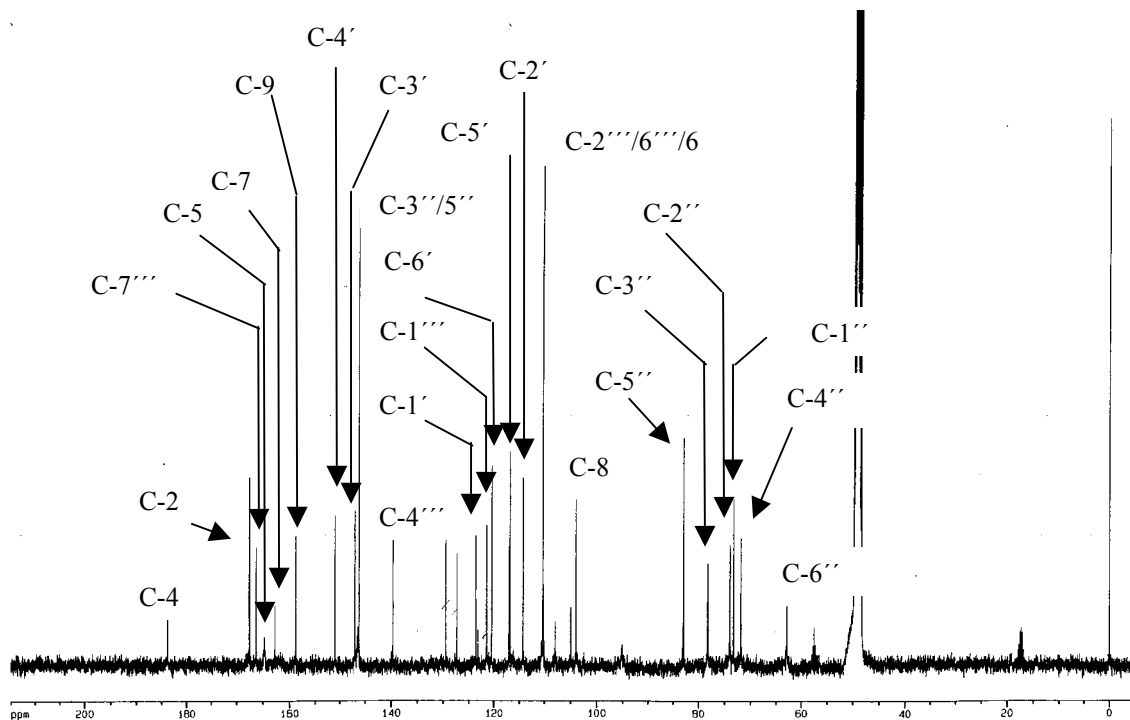


Abbildung 29: ^{13}C -NMR Spektrum von Isoorientin-2''-gallat (V14; 100,6 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

Isoorientin-2''-gallat ist bislang nur aus einer Quelle dokumentiert (Latté *et al.*, 2002) und konnte hier zum ersten Mal aus *P. sidoides* isoliert und beschrieben werden.

6.3.6. Orientin (V15)

Orientin zeigte bei dc Untersuchungen bei einem R_f -Wert von 0,34 im Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) eine Fluoreszenzlöschung, sowie eine gelbe Färbung im VIS. Nach Detektion mit AlCl_3 -Reagenz wies die Bande eine gelbe Fluoreszenz im UV bei 365 nm auf.

Das ^1H -NMR Spektrum zeigte das Signalmuster eines 1,3,4-substituierten Aromaten (B-Ring), bestehend aus einem breiten Singulett bei δ 7,55 ppm für das Proton an Position 2', einem Dublett bei δ 6,91 ppm ($J = 8,2$ Hz) für das Proton an Position 5', sowie einem breiten Dublett für das Proton an Position 6' bei δ 7,51 ppm ($J = 8,3$ Hz).

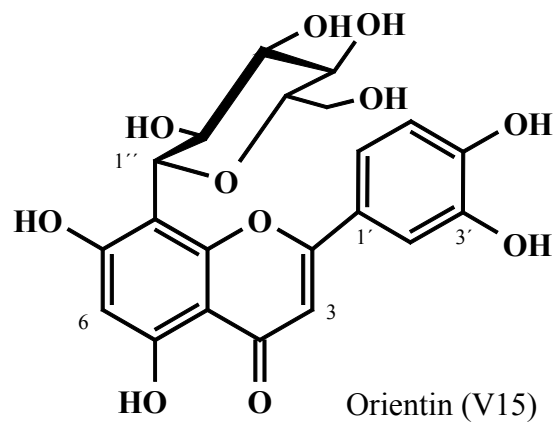
Des weiteren befanden sich zwei Singulett für die isolierten Protonen am Flavongerüst bei δ 6,53 ppm für H-3 und bei δ 6,27 ppm für das an Position 6.

Zwischen δ 3,4 und 4,1 ppm waren die Signale des Glucoserestes zu finden, das Dublett des anomere Protons lag bei δ 4,98 ppm ($J=9,9$ Hz). Die Bindung an das Flavongerüst erfolgte über die Position 8.

Tabelle 17: $^1\text{H-NMR}$ Daten der Verbindungen V15-16 (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$, TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)*	
	Verbindung 15	Verbindung 16
H-3	6,53 (<i>s</i>)	6,62 (<i>s</i>)
H-6	6,27 (<i>s</i>)	-
H-8	-	6,56 (<i>s</i>)
H-2'	7,55 (<i>br s</i>)	7,45 (<i>br s</i>)
H-5'	6,91 (<i>d</i> ; $J=8,2$)	6,96 (<i>d</i> ; $J=8,2$)
H-6'	7,51 (<i>br d</i> ; $J=8,3$)	7,43 (<i>br d</i> ; $J=7,7$)
Glucosylrest		
H-1''	4,98 (<i>d</i> ; $J=9,9$)	4,97 (<i>d</i> ; $J=9,4$)
H-2''	4,11 (<i>t</i> ; $J=9,2$)	4,16 (<i>br t</i> ; $J=9,2$)
H-3''		
H-4''	3,43 – 3,67 (<i>m</i>)	3,42-3,48 (<i>m</i>)
H-5''		
H _a -6''	3,82 – 3,96 (<i>m</i>)	3,87 (<i>br d</i> ; $J=11,2$)
H _b -6''		3,74 (<i>dd</i> ; $J=11,3; 5,2$)

* Multiplizität und Kopplungskonstante in Hz in Klammern



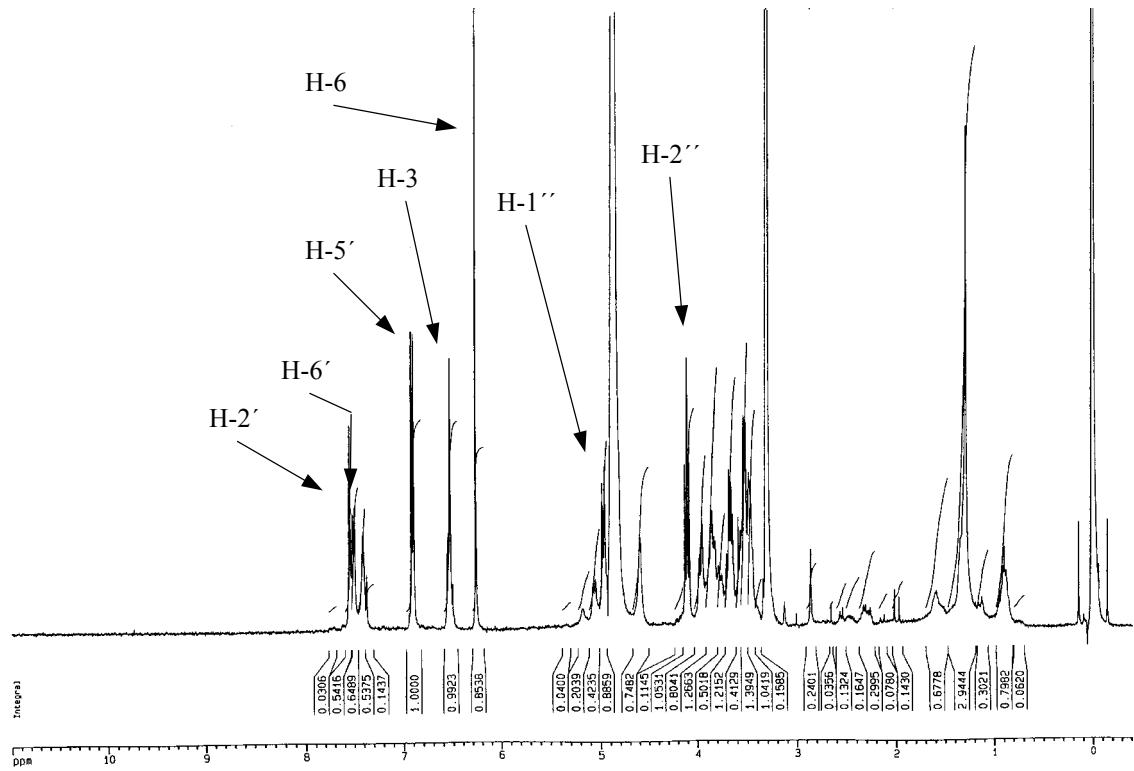


Abbildung 30: ^1H -NMR Spektrum von Orientin (V15; 400 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

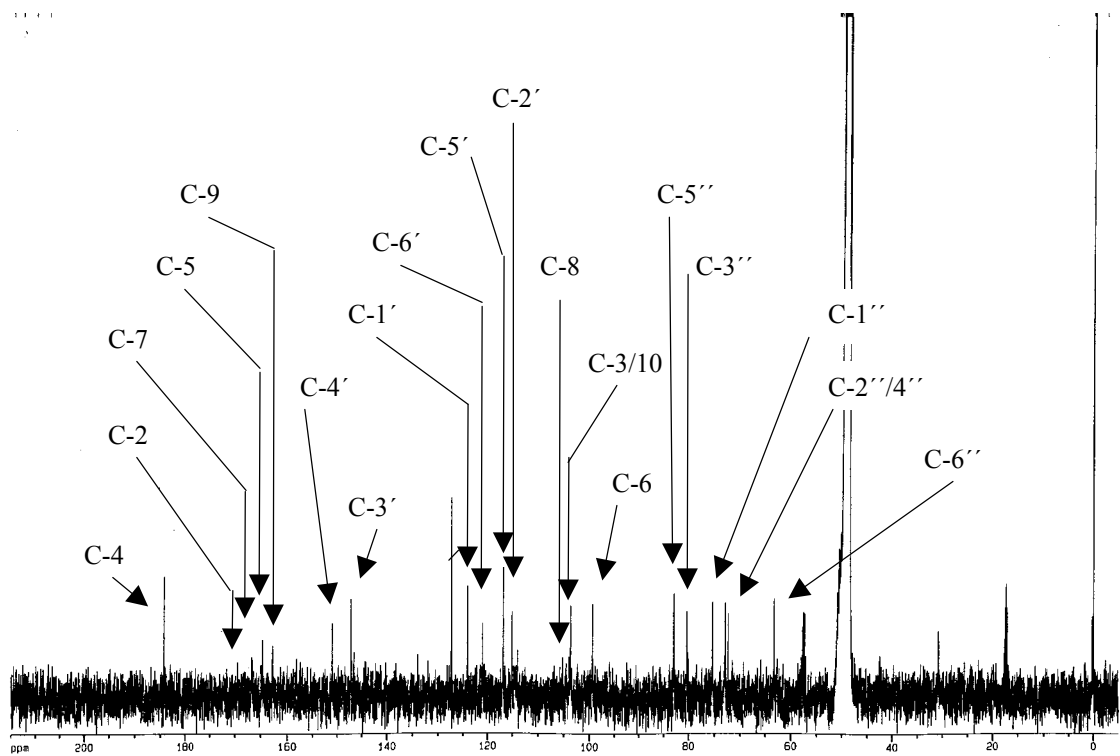


Abbildung 31: ^{13}C -NMR Spektrum von Orientin (V15; 100,6 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

Der Vergleich der ^1H und ^{13}C -NMR Daten für Orientin, zeigte eine völlige Übereinstimmung mit denen in der Literatur (Nielsen *et al.*, 1998; Latté, 1997; Agrawal, 1989; Markham *et al.*, 1984; Escobar *et al.*, 1983).

Das EI-Massenspektrum zeigte ausschließlich das Fragment $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5]^+$ bei m/z 286, im (+)-FAB und (-)-FAB Massenspektrum war der Pseudomolpeak $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei m/z 449 und $[\text{M}-\text{H}]^-$ bei m/z 447 auszumachen.

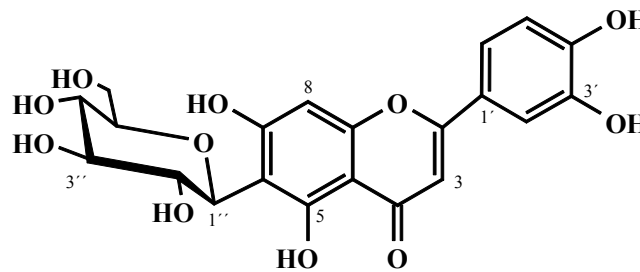
Tabelle 18: ^{13}C -NMR Daten der Verbindungen 15-16 (100,6 MHz, MeOH-*d*4, TMS als interner Standard)

Kohlenstoff	Chemische Verschiebung δ (ppm)	
	Verbindung 15	Verbindung 16
C-2	166,8	166,3
C-3	103,7	105,3
C-4	184,2	184,1
C-5	162,7	158,8
C-6	99,5	109,2
C-7	164,7	165,0
C-8	105,3	95,2
C-9	157,4	162,1
C-10	103,7	104,0
C-1'	124,1	123,6
C-2'	115,0	120,4
C-3'	147,1	147,1
C-4'	151,0	151,1
C-5'	116,8	116,8
C-6'	121,0	114,2
Glucosyl-Rest		
C-1''	75,4	75,4
C-2''	72,9	72,6
C-3''	80,4	80,2
C-4''	72,3	71,8
C-5''	83,0	82,7
C-6''	63,3	62,9

Orientin ist ein weit verbreiteter Naturstoff (Hörhammer *et al.*, 1953), konnte hier jedoch zum ersten Mal aus *P. sidoides* isoliert und beschrieben werden.

6.3.7. Isoorientin (V16)

Die Substanz zeigt eine Fluoreszenzlöschung auf DC sowie eine gelbe Färbung im VIS bei einem R_f -Wert von 0,23 im Fließmittel Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1). Nach Detektion mit $AlCl_3$ -Reagenz zeigte die Bande eine gelbe Fluoreszenz im UV bei 365 nm auf.



Isoorientin (V16)

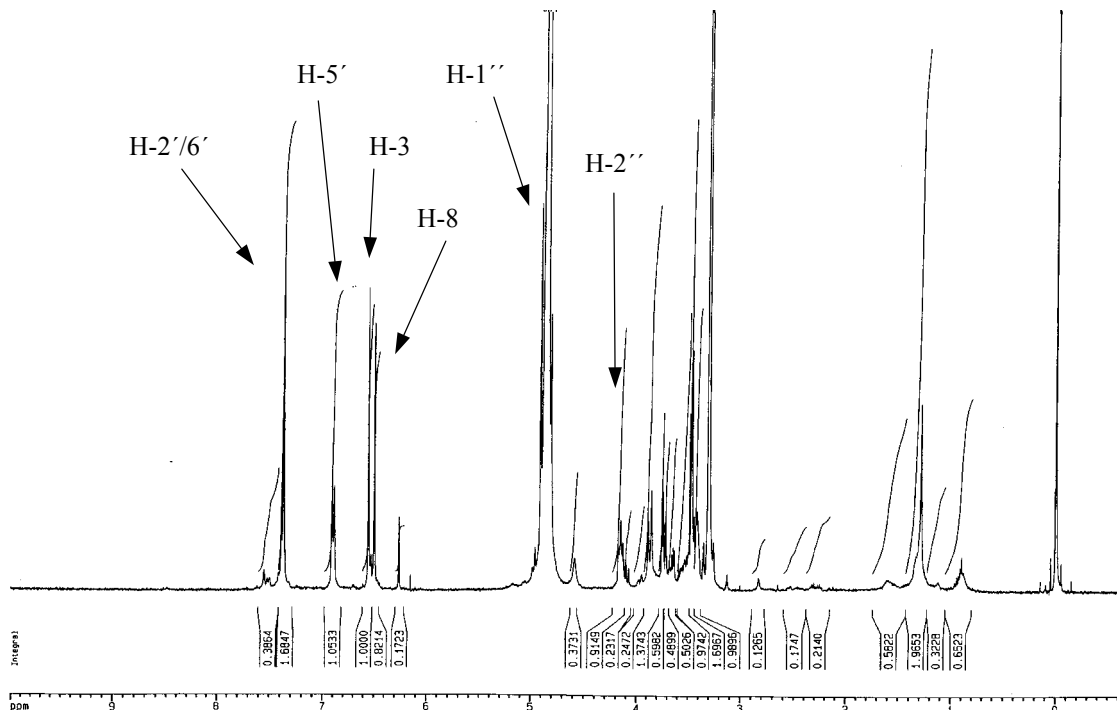


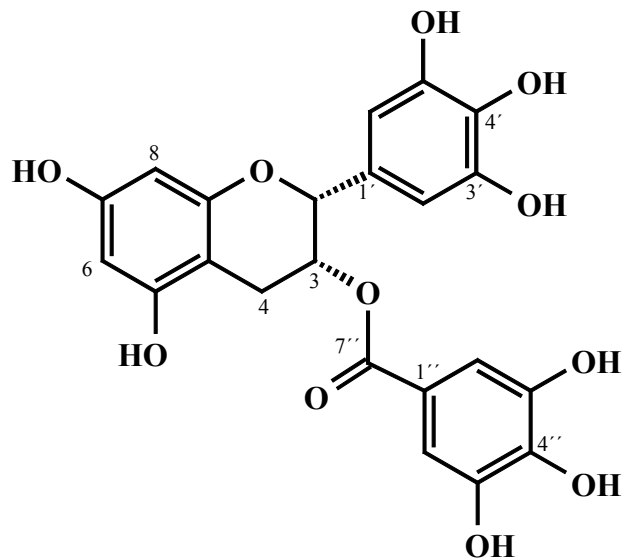
Abbildung 32: 1H -NMR Spektrum von Isoorientin (V16; 400 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

Die Signallagen im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum wiesen eine völlige Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Agrawal, 1989; Freitag *et al.*, 1986; Chulla und Mariotte, 1985) für Isoorientin auf, ebenso wie die Daten aus den EI- und FAB-Massenspektren (Kayser, 1997; Latté, 1999).

Isoorientin ist aus der gleichen Pflanzenquelle schon zuvor isoliert und beschrieben worden (Kayser, 1997).

6.3.8. (-)-(2R,3R)-Epigallocatechin-3-gallat (V17)

Substanz 18 zeigte auf DC Platten im VIS eine rotbraune Färbung bei einem R_f -Wert von 0,66 im Fließmittel Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1). Durch Detektion mit FeCl_3 -Reagenz trat eine tiefblaue Färbung der Substanzbande auf. Detektion mit Vanillin/HCl-Reagenz führte zu der für Catechine charakteristischen Rotfärbung der Bande.



(-)-(2R,3R)-Epigallocatechin-3-gallat (V17)

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum wies drei Singulett, die jeweils zwei Protonen entsprachen auf (bei δ 5,96 ppm, δ 6,51 ppm und bei δ 6,95 ppm). Zwei weitere breite Singulett befanden sich bei δ 4,97 ppm und bei δ 5,53 ppm, entsprechend der Protonen an den Positionen 2 und 3 des Catechingerüsts. Auffällig waren zwei Doppeldoublets bei δ 2,85 ppm ($J= 2,3$ und 17,3 Hz) sowie bei δ 2,99 ppm ($J= 4,5$ und 17,3 Hz). Kopplungskonstanten von über

17 Hz sind typisch für geminal gebundene Protonen, wie es für die beiden Protonen an Position 4 eines Catechins der Fall ist.

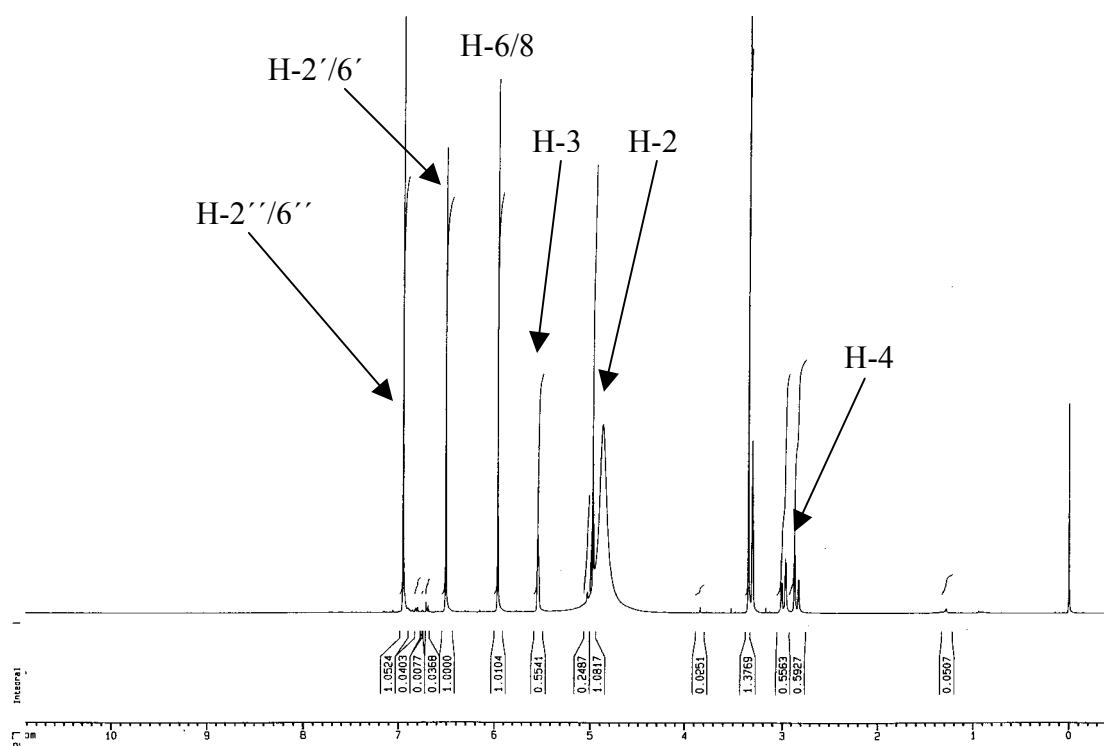


Abbildung 33: ^1H -NMR Spektrum von Epigallocatechin-3-gallat (V17; 400 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

Tabelle 19: ^1H -NMR Daten der Verbindung 17 (400 MHz, MeOH- d_4 , TMS als interner Standard)

Proton	Chemische Verschiebung δ (ppm)*
	Verbindung 17

H-2	4,97 (s)
H-3	5,53 (br s)
H-4	2,85 (dd, J=2,3; 17,4)
	2,99 (dd; J=4,5; 17,3)
H-6/8	5,96 (s)
H-2'/6'	6,51 (s)
H-2''/6''	6,95 (s)

* Multiplizität und Kopplungskonstante in Hz in Klammern

Der B-Ring des Catechins musste demnach ein 1,3,4,5-tetrasubstituierter Aromat sein, dessen Protonen an den Positionen 2' und 6' im ^1H -NMR Spektrum analog zur Gallussäure

als Singulett erschienen. Die Pyrogallolstruktur des B-Rings deutete auf das Vorliegen eines Gallo catechin-Derivates hin. Die beiden Protonen an den Positionen 6 und 8 bildeten ebenfalls nur ein Signal (δ 5,96 ppm) im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum, die zugehörigen Kohlenstoffatome C-6 und C-8 zeigten allerdings zwei Signale im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum. Beim Vergleich der NMR Daten (Sakar *et al.*, 1993; Wolbis, 1989; Tanaka *et al.*, 1983) fiel auf, dass das Signal von H-3 eine relative Tieffeldverschiebung aufwies, was auf die Bindung eines Acylrestes an dieser Position hindeutete. Das dritte Singulett im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (δ 6,95 ppm) gehörte demnach zu einem Gallussäurerest an Position 3. Der Literaturvergleich zeigte eine völlige Übereinstimmung der gefundenen Daten mit denen von Epigallocatechin-3-gallat (Hartisch und Kolodziej, 1996; Agrawal, 1989; Wolbis, 1989; Sun *et al.*, 1988; Escudero *et al.*, 1985).

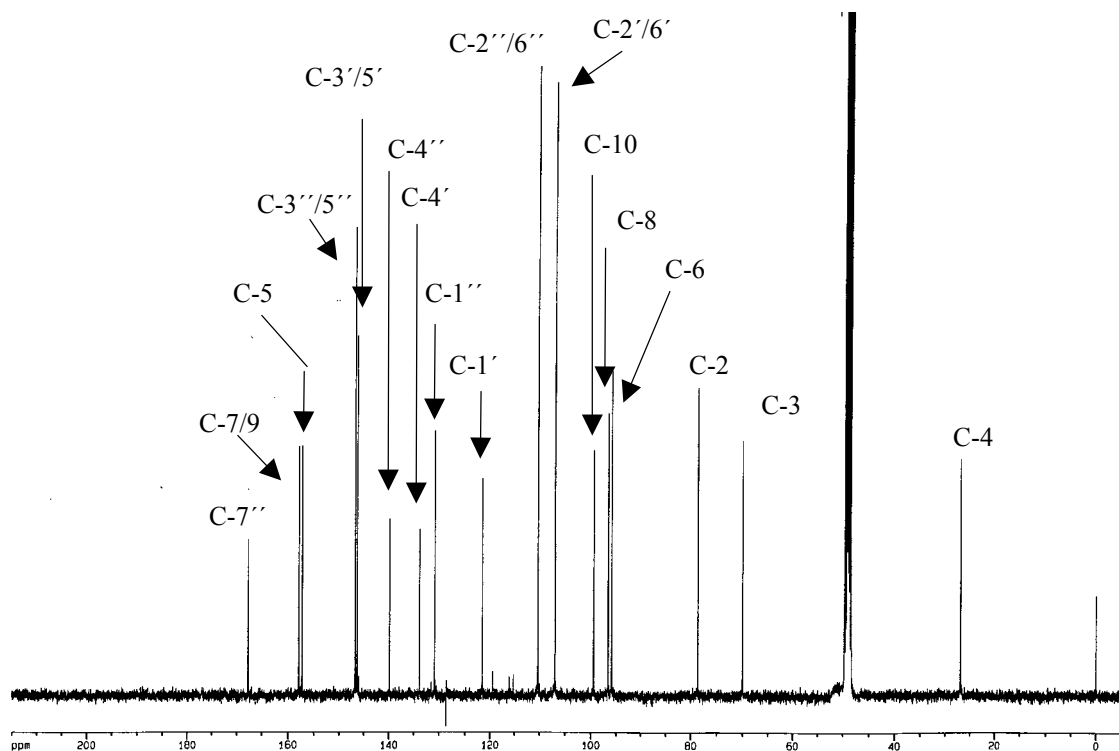


Abbildung 34: $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von Epigallocatechin-3-gallat (V17; 100,6 MHz, Methanol- d_4 , TMS als interner Standard)

Das EI Massenspektrum wies die typischen Gallussäure Peaks $[\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5]^+$ bei m/z 170, $[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4]^+$ bei m/z 153, $[\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3]^+$ bei m/z 126, sowie $[\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2]^+$ bei m/z 108 auf. Die molekulare Zusammensetzung aller Peaks wurde durch die Hochauflösung bestätigt (Daten siehe Experimenteller Teil). Im (-)-FAB Massenspektrum befand sich der Pseudomolpeak

[M-H]⁻ bei m/z 457, sowie der eines Fragments nach Abspaltung der Gallussäure [M-C₇H₅O₄]⁻ bei m/z 305.

Tabelle 20: ¹³C-NMR Daten der Verbindung V17 (100,6 MHz, MeOH-*d*4, TMS als interner Standard)

Kohlenstoff	Chemische Verschiebung δ (ppm)
C-2	78,7
C-3	70,0
C-4	26,9
C-5	157,3
C-6	95,9
C-7	157,9
C-8	96,6
C-9	157,9
C-10	99,5
C-1'	130,9
C-2'	106,9
C-3'	146,3
C-4'	133,8
C-5'	146,3
C-6'	106,9
Galloyl-Rest	
C-1''	121,6
C-2''	110,3
C-3''	146,7
C-4''	139,8
C-5''	146,7
C-6''	110,3
C-7''	167,7

Die Daten der CD Messung mit einem negativen Cotton-Effekt bei ca. 280 nm und einem positiven Cotton-Effekt bei ca. 240 nm stimmen mit den Literaturdaten für die Verbindung mit 2*R*,3*R* Konfiguration überein (Korver und Wilkins, 1971). Darüber hinaus korrespondiert auch der Wert für die optische Drehung der Verbindung 17 von $[\alpha]_D^{22} = -180,0^\circ$ bei $c=0,53$ in MeOH mit den Literaturwerten (Sakar *et al.*, 1993).

(-)-Epigallocatechin-3-gallat ist aus anderen pflanzlichen Quellen schon mehrfach isoliert und beschrieben worden (Wolbis, 1989; Sun *et al.*, 1988; Hartisch und Kolodziej, 1996), konnte hier aber zum ersten Mal im oberirdischen Teil von *P. sidoides* gefunden werden. Dc-Untersuchungen zeigten, dass die Verbindung in den Wurzelextrakten, wenn überhaupt, nur in Spuren vorkommt.