

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung der Zytotoxizität am Pflanzenmaterial aus Uganda

Insbesondere in endemischen Ländern, denen herkömmliche Behandlungsmethoden gegen Malaria aufgrund finanzieller Notlagen verwehrt bleiben, setzen die Einheimischen auf das jahrhundertlang überlieferte Wissen der traditionellen Heiler. Die verwendeten, speziellen Zubereitungen aus den heimischen Heilpflanzen werden von den Heilern an Erwachsene und ihre Kinder verabreicht. Dieses arglose Verhalten ist für die Verhältnisse der westlichen Welt, die einen Wirksamkeitsnachweis beanspruchen, kaum denkbar. Wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass viele Pflanzen, die in der traditionellen Medizin angewendet werden, je nach eingesetzter Pflanzenfamilie potentiell toxisch, mutagen und karzinogen sein können (Schimmer et al. 1994; De Sá Ferreira et al. 1999). In dieser Arbeit werden insbesondere Heilpflanzen aus Uganda, die traditionell gegen Malaria eingesetzt werden, auf ihre eventuelle Zytotoxizität gegenüber zwei unterschiedlichen Karzinom-Zelllinien untersucht.

Das auf eventuelle Zytotoxizität geprüfte Pflanzenmaterial stammte von unserem Kooperationspartner aus Uganda. Die Bestimmung der Zytotoxizität der Extrakte von *Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams, *Momordica foetida* Schum. und *Vernonia amygdalina* Delile wurde an ECV-304 und HepG2 Zellen durchgeführt. In Blindversuchen wurde der Einfluss der Extrakte auf die Bestimmungsmethode untersucht, um eine Reduktion des MTT bzw. eine Hemmung der Reduktion allein durch die Inhaltsstoffe der Extrakte auszuschließen. Es zeigten sich keine Hinweise auf eine entsprechende Störung der Methode.

Die Bestimmung der Zahl der lebenden Zellen erfolgte mit Hilfe des MTT-Testes. Das Prinzip dieser kolorimetrischen Methode zur Messung der Vitalität und Proliferation von Zellkulturen basiert auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes MTT durch aktive intrazelluläre Dehydrogenasen. Lebende Zellen nehmen das wasserlösliche gelbe Tetrazoliumsalz MTT auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark violett-blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um (Mosmann, 1983).

Für die photometrische Messung werden die Zellen lysiert, um den Farbstoff freizusetzen.

#### 4.1.1 *Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams, Asteraceae

*Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams (Syn: *Aspilia latifolia* Oliver & Hiern), Asteraceae, ist ein ausdauerndes, mehrjähriges kletterndes Kraut, das durchschnittlich 1,5 m Höhe erreichen kann. Die Pflanze ist stark verzweigt und beblättert. Der Stängel ist am Grund holzig und behaart. Die Laubblätter sind gegenständig angeordnet und behaart. Die Form der Laubblätter ist oval bis lanzettlich. *A. africana* besitzt einzelne, endständige, goldgelbe Blütenköpfe, die von behaarten langen Stielen getragen werden. Der Blütenstand ist ein Pseudanthium. Die Stiele sind circa 4 bis 10 cm lang. Die Blütenköpfe haben einen Durchmesser von etwa 2 bis 4 cm. Die Kronblätter liegen als Zungen- und Röhrenblüten vor. Die Zungenblüten liegen außen, sind 2- bis 4-fach gelappt und steril. Die Röhrenblüten befinden sich im Inneren der Blüte, sind 5- bis 6-fach gelappt und zwittrig. Die Hüllblätter sind in drei Runden von fünf Blättern angeordnet. Die Blütezeit ist im Monat Juli.

*A. africana* ist in weiten Teilen Afrikas beheimatet und ist ein fester Bestandteil des Graslandes von Uganda. Es wächst als Wildkraut auf kultivierten Böden, Brachland und vor allem in Waldgebieten. *A. africana* ist in der afrikanischen Volksmedizin weit verbreitet. Die Blattdroge wird vor allem zur Behandlung von Wunden, Entzündungen und Hauterkrankungen (Burkill, 1985), Bakterieninfektionen (Gonorrhö), Trübungen der Hornhaut, Magengeschwüren und zum Stillen von Blutungen sowie bei Anämien (Iwu, 1993) eingesetzt. Vorwiegend in Ost- und Zentralafrika wird *A. africana* gegen Malaria und ihre Symptome angewendet (Rwangabo, 1993).

Im Vorfeld wurde der lipophile Rohextrakt (EtOAc/PE 1:1) und der hydrophile MeOH-Rohextrakt der Blätter auf antiplasmodiale Aktivität an einem chloroquin-sensitiven (PoW) *P. falciparum* Stamm getestet (Jenett-Siems Habil., 2002).

Der lipophile Extrakt zeigte eine halbmaximale Hemmwirkung von 30,3 µg/mL an einem chloroquin-sensitiven (PoW) *P. falciparum* Stamm (Jenett-Siems Habil., 2002), das einer moderaten Aktivität entsprach. Bezüglich der *in vitro* Aktivität werden IC<sub>50</sub> Werte < 50 µg/mL als positiv bewertet (O'Neill et al. 1985).

Um entscheiden zu können, ob diese antiplasmodiale Aktivität auf eine eventuelle Zytotoxizität der enthaltenen Inhaltsstoffe des Extraktes zurückzuführen ist, wurde diese an den beiden Zell-Linien ECV-304 und HepG2 überprüft. Hier zeigte sich keine ausgeprägte Toxizität ( $IC_{50}$  Wert  $> 50 \mu\text{g/mL}$ , Tabelle 8).

Interessant war der Unterschied der Zytotoxizitäten zwischen Blätter- und Wurzel-Extrakt im Fall der Leberkarzinomzellen. Demnach befinden sich im lipophilen Wurzel-Extrakt scheinbar aktivere Verbindungen als im Blätter-Extrakt.

#### **4.1.2 *Momordica foetida* Schum., Cucurbitaceae**

*Momordica foetida* Schum. (Syn: *M. morkorra* A. Rich.), Cucurbitaceae, sind häufig Kräuter, die mit Hilfe von Ranken klettern können. Sie sind gewöhnlich eingeschlechtlich, da sowohl weibliche als auch männliche Blüten an derselben oder an verschiedenen Pflanzen existieren (Jeffrey, 1967) (Kapitel 4.6).

Im Vorfeld wurden der lipophile Rohextrakt (EtOAc/PE 1:1) und der hydrophile MeOH-Rohextrakt auf antiplasmodiale Aktivität an einem chloroquin-sensitiven (PoW) und einem chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stamm getestet (Jenett-Siems Habil., 2002). Der lipophile Blätterextrakt von *M. foetida* zeigte eine halbmaximale Hemmwirkung von  $7,3 \mu\text{g/mL}$  am chloroquin-sensitiven (PoW) (Tabelle 8) und von  $13,0 \mu\text{g/mL}$  (Jenett-Siems Habil., 2002) am chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stamm. Diese Ergebnisse erwiesen sich als viel versprechend. Daher waren die Zytotoxizitäten für meine Arbeit von besonderem Interesse. Die von mir getesteten Extrakte dieser Pflanze zeigten keine zytotoxischen Auffälligkeiten (Tabelle 8). Erstaunlicherweise waren die zytotoxischen Effekte des lipophilen Blätterextraktes auf die Leberkarzinomzelle intensiver als auf die Blasenkarzinomzelle.

#### **4.1.3 *Vernonia amygdalina* Delile, Asteraceae**

*Vernonia amygdalina* Delile, Asteraceae, ist ein Strauch oder ein kleiner Baum, der eine Höhe von 2 bis 8 m erreichen kann. Die länglichen, elliptischen Blätter sind 7 – 15 cm lang und 3 – 7 cm breit mit keilförmiger Basis. Die Blätter sind grün mit einem charakteristischen Geruch und von bitterem Geschmack. *V. amygdalina* ist in weiten Teilen Afrikas anzutreffen, auch im Grasland, Gestrüpp und Buschland von Uganda.

Die Blätter werden vor Gebrauch gewaschen, um den unangenehmen, bitteren Geschmack zu entfernen und sind daher auch unter der Bezeichnung „bitter leaf“ bekannt. Die Blätter werden nach Auswaschen der Bitterstoffe auch als Gemüse verzehrt und stimulieren das Verdauungssystem (Arene, 1972). Diese Pflanze wird in Afrika vorwiegend zur Behandlung von Malaria, Fieber und gegen Blutegel (Blutsauger), die die Bilharziose übertragen, eingesetzt. Frei lebende Schimpansen fressen die Blätter, wenn sie von Parasiten befallen worden sind, wie z.B. Schistosomen (Jisaka et al. 1992). Des Weiteren wird *V. amygdalina* im gekochten Zustand in Süd-Äthiopien zur Mastzucht von Hähnchen (broilers) eingesetzt (Tegua et al. 1993). In Uganda werden Zubereitungen aus der Wurzel gegen Malaria verwendet (Jenett-Siems Habil., 2002).

Im Vorfeld wurden der lipophile Rohextrakt EtOAc/PE (1:1) und der hydrophile MeOH-Rohextrakt der Wurzeln auf antiplasmodiale Aktivität an einem chloroquin-sensitiven (PoW) *P. falciparum* Stamm getestet (Jenett-Siems Habil., 2002).

Der lipophile Blätterextrakt von *V. amygdalina* erwies sich als besonders zytotoxisch (Tabelle 8). In früheren Studien konnten aus einem Blätterextrakt die Sesquiterpenlactone Vernodalin, Vernodalol und Vernolid isoliert werden, die signifikant plasmodizide Effekte (IC<sub>50</sub> Werte: 4,0 µg/mL, 4,2 µg/mL und 8,4 µg/mL gegen einen multiresistenten (K1) *P. falciparum* Stamm) zeigten (Ohigashi et al. 1994). Der Wurzel-Extrakt hingegen erwies sich mit IC<sub>50</sub>Werten größer 50 µg/mL als deutlich weniger toxisch (Tabelle 8).

## **4.2 Bestimmung der Selektivitätsindices am Pflanzenmaterial aus Uganda**

Der Selektivitätsindex wird erhalten, indem man die zytotoxische mit der antiplasmodialen Aktivität ins Verhältnis setzt (Kapitel 3.2.1.6). Anhand dieser Indices kann beurteilt werden, inwieweit die antiplasmodiale Aktivität auf eine spezifische Hemmung des Malariaerregers zurückzuführen ist bzw. wie selektiv die Testsubstanz auf den Parasiten wirkt. Für bekannte Antimalariamittel, wie z.B. das Artemisinin liegt der SI-Wert in der Größenordnung > 1000. Weitere in der Malaria-Therapie eingesetzte Wirkstoffe verfügen abhängig von der gewählten Zell-Linie, wie z.B. Chloroquin (158 bis > 8000), Chinin (162 bis > 2631) und Mefloquin (22 bis 4417) über unterschiedlich große Selektivitätsindices. Dagegen weisen Verbindungen, die eine

allgemeine Zelltoxizität besitzen, einen Selektivitätsindex von  $< 10$  auf (Likhitwitayawuid et al. 1993).

Tabelle 8 Bestimmung der Selektivitätsindices der Pflanzenextrakte aus Uganda anhand von Zytotoxizitäten und antiplasmodiale Aktivität

Pflanzen- species		<i>Plasmodium falciparum</i> <sup>a,*</sup>		SI ECV/Pf	HepG2 <sup>b</sup>	
		IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ECV-304 <sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL±SD)		IC <sub>50</sub> (µg/mL±SD)	SI HepG2/Pf
<i>Aspilia africana</i>	Blätter					
	EtOAc/PE	30,3	72,1±2,9	2	136,1±2,5	4
	MeOH	> 50	118,3±2,4		175,4±5,9	
<i>Aspilia africana</i>	Wurzeln					
	EtOAc/PE	n.b.	83,6±1,9		82,7±1,4	
	MeOH	n.b.	131,9±4,7		264,1±17	
<i>Momordica foetida</i>	Blätter					
	EtOAc/PE	7,3	106,0±4,0	15	85,7±2,6	12
	MeOH	> 50	141,8±4,8		185,1±8,0	
<i>Vernonia amygdalina</i>	Blätter					
	EtOAc/PE	n.b.	2,3±0,5		7,8±0,6	
	MeOH	n.b.	69,8±3,8		185,2±8,9	
<i>Vernonia amygdalina</i>	Wurzeln					
	EtOAc/PE	19,0	51,4±9,4	3	84,9±5,2	5
	MeOH	> 50	87,6±3,1		327,0±8,9	

n.b. = nicht bestimmt

<sup>a</sup> PoW-Stamm = IC<sub>50</sub> Wert für Chloroquin x 2 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 0,011 µM

<sup>b</sup> getestet in 3 unabhängigen Versuchen, n = 8

\* (Kraft Thesis, 2003)

Der lipophile Extrakt des Blattmaterials von *A. africana* zeigte zwar eine moderate antiplasmodiale Aktivität, bei jedoch nur geringer Selektivität. Ähnlich verhält es sich bei dem Drogenmaterial von *V. amygdalina*. Der lipophile Wurzelextrakt von *V. amygdalina* verfügt über eine höhere antiplasmodiale Aktivität als der Blätterextrakt von *A. africana*, aber dafür ist die Zytotoxizität gegenüber ECV-304 und HepG2 erheblich höher. Selbst wenn das sehr toxische Sesquiterpenlacton Vernodalin im

Wurzelextrakt fehlt, spielen die noch vorhandenen Sesquiterpenlactone bezüglich der Zytotoxizität eine Rolle. Die Selektivitätsindices von 3 (ECV-304) und 5 (HepG2) lassen einen therapeutischen Einsatz fragwürdig erscheinen.

Das Drogenmaterial von *M. foetida* erweist sich aufgrund der sehr guten antiplasmodialen Aktivität von 7,3 µg/mL (PoW) (Tabelle 8) und der Selektivitätsindices von 15 (ECV-304) und 12 (HepG2) (Tabelle 8) als viel versprechender im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Drogenmaterial (*A. africana* und *V. amygdalina*) aus Uganda.

### **4.3 Bestimmung der Zytotoxizität an isolierten Substanzen des Blattmaterials aus *Exostema mexicanum***

Bei den drei untersuchten Substanzen handelte es sich um die aus dem hydrophilen Ethylacetat-Extrakt isolierten 4-Phenylcumaringlykoside 5-*O*-β-D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**3**) und 5-*O*-β-D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**4**) und das aus dem lipophilen Dichlormethan-Extrakt gewonnene 4-Phenylcumarinaglykon 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**).

In einer früheren Arbeit zeigten die aus der Zweig- und Stammrinde von *E. mexicanum* isolierten 4-Phenylcumarinaglyka eine deutliche Zytotoxizität gegenüber der Blasenkarzinomzelllinie ECV-304 (Köhler Thesis, 2002).

Interessant war nun der Vergleich der Zytotoxizität zwischen Aglyka und Glykosiden aus dem **Blattmaterial**.

Die aus den Blättern von *E. mexicanum* gewonnenen 4-Phenylcumaringlykoside **3**, **4** wurden zusammen mit dem 4-Phenylcumarinaglykon **5** auf ihre Toxizität gegenüber der ECV-304 Zelllinie untersucht. Das 5-*O*-β-D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**3**) zeigte gegenüber der ECV-304 Zelllinie einen IC<sub>50</sub>-Wert von 67,8 µg/mL, das 5-*O*-β-D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**4**) einen IC<sub>50</sub>-Wert von 65,2 µg/mL, wo hingegen das 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**) hohe Zytotoxizität von 1,0 µg/mL aufwies.

#### 4.4 Phytochemische Untersuchung von *Exostema mexicanum* A. Gray

Die neotropische Gattung *Exostema* umfasst 25 Arten von Bäumen und Sträuchern, deren Verbreitung von Bolivien bis Mexiko und von da aus bis zu den Westindischen Inseln reicht. Die meisten Arten sind im Gebiet der Großen Antillen heimisch (Mc Dowell et al. 1998). Biogeographisch wurde *Exostema* in Süd-Amerika hervorgebracht und migrierte nach Zentral-Amerika zu den Großen Antillen, wo die morphologische Streuung und die Artenentstehung sich besonders intensivierten (Mc Dowell et al. 1998).

*Exostema mexicanum* A. Gray (Syn: *Exostema indutum* Standl.), Rubiaceae, in Mexiko als „quina“ bzw. „melena de león“ und als „quino“ oder „quina“ in El Salvador bekannt, wird im lateinamerikanischen Raum volksmedizinisch zur Behandlung von Malaria und Denguefieber verwendet (Morton, 1981). Es handelt es sich um einen in Mittel- und Südamerika beheimateten Baum, der eine Größe von 18 bis 23 m und einen Stammdurchmesser von 45 cm erreichen kann. Die Zweige sind schmal und auffallend mit linsenförmigen Punkten bedeckt. An den 1 cm langen Blattstielen sind einfache, elliptische Blätter gegenständig angeordnet. Die Basis ist spitz, der Rand ganzrandig und ein bisschen gewellt (Abbildung 9). Das Laubblatt verfügt über eine deutlich hervortretende tropfenförmige Spitze mit zwischen den Blattstielen sitzende Nebenblätter. Der Blütenstand ist endständig, es handelt sich um eine zusammengesetzte Trugdolde; die weiße Blüte besitzt eine 1 cm lange Röhre mit 5 gleich langen Lämpchen. Die Frucht ist eine Steinfrucht (Hayden, 2005).

*E. mexicanum* wird von Panama bis Tamaulipas (Zentral-Mexiko) in Höhenlagen von bis zu 1000 m über dem Meeresspiegel gefunden (Mc Dowell et al. 1998). Die Pflanze wächst bevorzugt entlang von Wasserläufen in feuchten Waldgebieten (Morton, 1981). Die Stammrinde wird auch unter dem Begriff Copalchi-Rinde gehandelt, was eigentlich eine Sammelbezeichnung für Rinden unterschiedlicher *Exostema*- oder *Coutarea*- Arten ist, die in der lateinamerikanischen traditionellen Medizin vielfältig genutzt werden (Noster Thesis, 1992).

Klasse:	Magnoliopsida
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Gentianales
Familie:	Rubiaceae
Gattung:	<i>Exostema</i>



Bildmaterial von Hayden 2005

Abbildung 9 Blätter und Blüten von *Exostema mexicanum*

Interessanterweise wies der lipophile Rohextrakt (PE-EtOAc 1:1) aus Zweigen und Rinden eine antiplasmodiale Aktivität mit  $IC_{50}$ - Werten von  $9 \mu\text{g/mL}$  [PoW] und  $11,5 \mu\text{g/mL}$  [Dd2] auf (Köhler Thesis, 2002). Für diese biologische Aktivität konnten 4-Phenylcumarine verantwortlich gemacht werden. Das in dieser Arbeit verwendete, oberirdische Pflanzenmaterial (**Blätter**) wurde bislang weder phytochemisch noch auf antiplasmodiale Aktivität untersucht.

Aus den luftgetrockneten Blättern von *E. mexicanum* wurden zwei lipophile und zwei hydrophile Rohextrakte hergestellt, mit dem Ziel entweder weitere neue oder schon bereits bekannte 4-Phenylcumarine oder andere Stoffgruppen zu isolieren.

Der Ethylacetat-Rohextrakt wurde über eine mit LiChroprep RP-18 Material gefüllte Säule fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie aufgereinigt. Diese Methode führte zur Isolierung von zwei bereits bekannten 4-Phenylcumaringlykosiden (**3,4**) sowie einem neuen 4-Phenylcumaringlykosid (**2**) und zwei neuen acylierten Flavonoltetraglykosiden (**6,7**). Aus dem Butanol-Rohextrakt konnten mittels Fraktionierung über eine Sephadex LH-20 Säule und weiterer Aufreinigung durch die präparative Dünnschichtchromatographie ein weiteres 4-Phenylcumaringlykosid (**1**) und nochmals das aus dem Ethylacetatextrakt isolierte 4-Phenylcumaringlykosid (**4**) erhalten werden.

Der Dichlormethan-Rohextrakt wurde zuerst über eine mit Kieselgel 60 Material gefüllte Säule gegeben und folgend wurden die vereinten Fraktionen 25 und 26 mittels



einer mit LiChroprep RP-18 Material gefüllten Säule fraktioniert. Mit dieser Methode ließen sich das 4-Phenylcumarinaglykon (**5**), ein methoxyliertes Cumarin (**8**) und ein Abbauprodukt der Carotinoide (**9**) isolieren.

Der Petrolether-Rohextrakt wurde mittels einer mit LiChroprep RP-18 Material gefüllten Säule fraktioniert und anschließend mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt und ergab Substanz (**10**).

#### 4.4.1 Strukturaufklärung von 5-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcumarin (**1**)

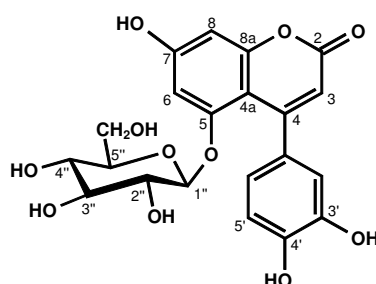


Abbildung 10 Strukturformel von 5-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcumarin (**1**)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein Pseudomolekülionenpeak der Verbindung bei  $[M-H]^-$  447  $m/z$ , der eine Summenformel von  $C_{21}H_{20}O_{11}$  wahrscheinlich machte.

Die im  $^1H$  NMR Spektrum erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,81 ppm (1H, *d*,  $J = 8,2$  Hz, H-5'), 6,82 ppm (1H, *d*,  $J = 1,8$  Hz, H-2') und 6,72 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,1$  Hz, H-6') wiesen auf ein 1,3,4-trisubstituiertes aromatisches System hin. Die Dubletts bei  $\delta$  6,46 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-8) und  $\delta$  6,54 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-6) deuteten auf einen weiteren Aromaten hin mit zwei zueinander *meta*-ständigen Protonen. Das auftretende Singulett bei  $\delta$  5,87 ppm (1H, *s*, H-3) ist ein charakteristisches Merkmal für 4-Phenylcumarine (Neoflavone).

Im  $^1H$  NMR Spektrum waren noch weitere Signale bei  $\delta$  2,73 ppm (1H, *t*,  $J = 8,0$  Hz, H-2''),  $\delta$  3,30- 3,75 ppm (3H, *m*, H-3'', H-4'', H-5'') und  $\delta$  3,69 ppm (1H, *dd*,  $J = 4,0$  Hz,  $J = 10,0$  Hz, H-6''a) sowie bei  $\delta$  3,86 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 10,1$  Hz, H-6''b) zu erkennen, die auf einen Zuckerrest hinweisen. Ein Dublett bei  $\delta$  4,82 ppm (1H, *d*,  $J = 7,69$  Hz, H-1'') ließ sich als anomeres Proton identifizieren.

Im  $^{13}C$  NMR Spektrum lagen im Tieffeldbereich die Signale für zwölf aromatische, zwei olefinische und ein Carbonyl Kohlenstoffatom. Die weiteren sechs Signale bei

$\delta$  62,3 ppm (C-6''), 71,0 ppm (C-4''), 74,6 ppm (C-2''), 77,7 ppm (C-5''), 78,2 ppm (C-3'') und 101,3 ppm konnten dem Zuckerrest zugeordnet werden. Diese Daten in Verbindung mit entsprechenden Literaturstellen konnten eindeutig belegen, dass es sich um das 4-Phenylcumaringlykosid 5-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcumarin handelte, das zuvor aus *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum., Rubiaceae (Aquino et al. 1988) und *Hintonia latiflora* (Sessé & Moc. ex. DC.) Bullock, Rubiaceae (Mata et al. 1990a) isoliert wurde.

#### 4.4.2 Strukturaufklärung von 5-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (2)

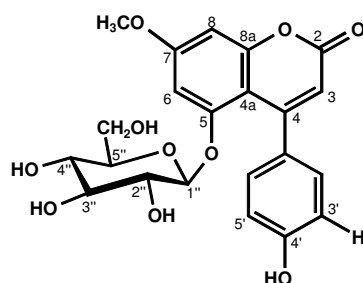


Abbildung 11 Strukturformel von 5-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (2)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein Pseudomolekülionenpeak bei  $[M-H]^-$   $m/z$  445, der eine Summenformel von  $C_{22}H_{22}O_{10}$  wahrscheinlich machte.

Die im  $^1H$  NMR Spektrum erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,83 ppm (2H,  $d$ ,  $J = 8,5$  Hz, H-3', H-5') und bei  $\delta$  7,22 ppm (2H,  $d$ ,  $J = 8,5$  Hz, H-2', H-6') deuteten auf ein aromatisches AA'BB' System hin. Es zeigte sich ein „zwei“ Protonensingulettsignal bei  $\delta$  6,67 ppm für das H-6 und H-8, wo sonst zwei Dubletts erwartet wurden, die auf einen 1,2,3,5-tetrasubstituierten Aromaten hindeuten würden. Diese Signale fallen offensichtlich zusammen.

Das Singulett bei  $\delta$  3,88 ppm (3H,  $s$ ,  $OCH_3$ -7) wies auf die Anwesenheit einer Methoxygruppe hin. Diese Daten in Kombination mit einem im  $^1H$  NMR Spektrum auftretenden Singulett bei  $\delta$  5,93 ppm (1H,  $s$ , H-3) führten zu der Annahme, dass es sich bei **2** ebenfalls um ein 4-Phenylcumarinderivat handelte.

Im  $^1H$  NMR Spektrum zeigten sich weitere Signale bei  $\delta$  2,68 ppm (1H,  $dd$ ,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 9,5$  Hz, H-2''),  $\delta$  3,45-3,65 ppm (3H,  $m$ , H-3'', H-4'', H-5'') sowie  $\delta$  3,50 ppm (1H,  $dd$ ,  $J = 7,0$  Hz,  $J = 11,0$  Hz, H-6''a) und  $\delta$  3,58 ppm (1H,  $dd$ ,  $J = 5,0$  Hz,  $J = 11,0$  Hz,

H-6''b), die zusammen mit dem Dublett bei  $\delta$  4,83 ppm (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz, H-1'') für ein anomeres Proton, auf einen Zuckerrest hindeuteten.

Im  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum lagen im Tieffeldbereich die Signale für zwölf aromatische, zwei olefinische und ein Carbonyl Kohlenstoffatom. Das im Hochfeld auftretende Signal bei  $\delta$  56,5 ppm konnte dem Methoxy-Kohlenstoffatom am C-7 zugeordnet werden. Die weiteren sechs Signale bei  $\delta$  62,6 ppm (C-6''), 71,2 ppm (C-4''), 74,5 ppm (C-2''), 77,8 ppm (C-5''), 78,4 ppm (C-3'') und 101,5 ppm (C-1'') konnten der Glucose als Zuckerrest wie bei der Verbindung **1** zugeordnet werden. Die Position der Methoxygruppe konnte mittels NOE-Spektren bestimmt werden; eine Einstrahlung in die Methoxygruppe bei  $\delta$  3,88 ppm führte zu einer deutlichen Intensitätserhöhung des Signals bei  $\delta$  6,67 ppm. Somit musste sich die Methoxygruppe in Position 7 befinden. Diese Substanz ist bisher noch nicht beschrieben und isoliert worden.

#### 4.4.3 Strukturaufklärung von 5-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**3**)

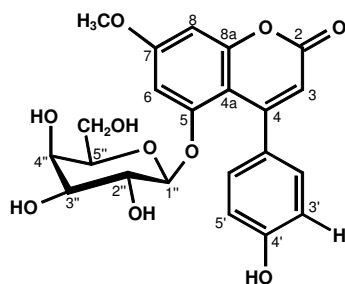


Abbildung 12 Strukturformel von 5-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**3**)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein  $[\text{M}-\text{H}]^-$  Peak bei  $m/z$  445, der eine Summenformel von  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$  wahrscheinlich machte.

Die im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,85 ppm (2H, *d*,  $J = 8,6$  Hz, H-3', H-5') und bei  $\delta$  7,24 ppm (2H, *d*,  $J = 8,6$  Hz, H-2', H-6') deuteten auf ein aromatisches AA'BB' System hin. Die beiden Dubletts bei  $\delta$  6,66 ppm (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz, H-8) und bei  $\delta$  6,73 ppm (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz, H-6) wurden einem 1,2,3,5-tetrasubstituierten Aromaten zugeordnet. Das Singulett bei  $\delta$  3,88 ppm (3H, *s*,  $\text{OCH}_3$ -7) deutete auf die Anwesenheit einer Methoxygruppe hin, ein weiteres Singulett bei  $\delta$  5,93 ppm (1H, *s*, H-3) konnte dem olefinischen Proton an Position 3 eines 4-Phenylcumarinderivates zugeordnet werden.

Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zeigten sich weitere Signale bei  $\delta$  3,09 ppm (1H, *dd*,  $J = 7,7$  Hz,  $J = 9,6$  Hz, H-2''),  $\delta$  3,40-3,75 ppm (4H, *m*, H-3'', H-5'', H-6''a, H-6''b),  $\delta$  3,79 ppm (1H, *d*,  $J = 3,0$  Hz, H-4'') sowie ein Dublett bei  $\delta$  4,73 ppm (1H, *d*,  $J = 7,7$  Hz, H-1'') für ein anomeres Proton, die auf einen Zuckerrest wiesen. Im Gegensatz zu den Verbindungen **1** und **2** handelte es sich nicht um Glucose, sondern um Galactose. Diese Annahme konnte durch das für Galactopyranosylreste typische Signal bei  $\delta$  3,79 ppm (1H, *d*,  $J = 3,0$  Hz, H-4'') bestätigt werden. In der Galactose ist das H-4'' im Gegensatz zur Glucose äquatorial-ständig und zeigt infolgedessen eine kleine Kopplungskonstante von  $J = 3,0$  Hz. Diese Signale in Kombination mit einem Literaturvergleich konnten bestätigen, dass es sich um das 4-Phenylcumaringlykosid 5-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin handelte, das zuvor aus *Hintonia latiflora* (Sesse & Moc. ex. DC.) Bullock, Rubiaceae (Mata et al. 1990a) isoliert worden war.

#### 4.4.4 Strukturaufklärung von 5-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**4**)

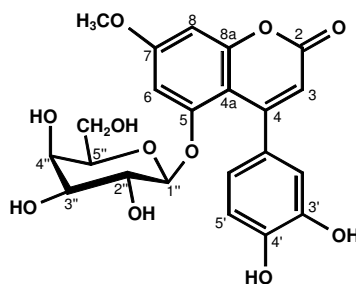


Abbildung 13 Strukturformel von 5-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**4**)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein Pseudomolekülionenpeak bei  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  461, der die Summenformel von  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  glaubhaft machte.

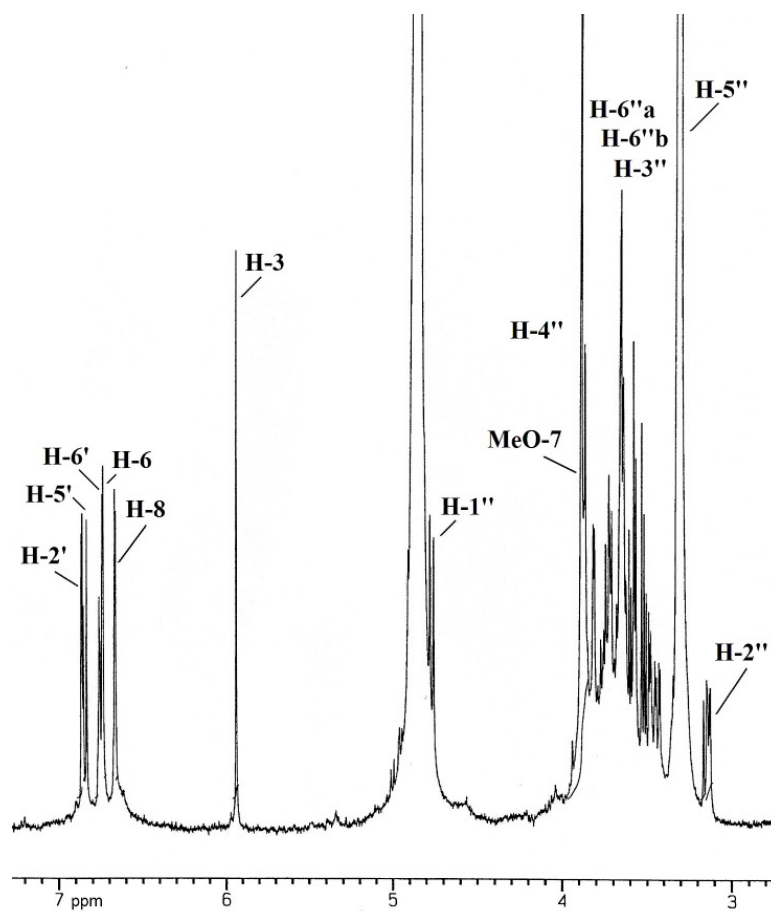


Abbildung 14  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von 5-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (4) (400 MHz, Methanol- $d_4$ )

Die im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum (Abbildung 14) erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,74 ppm (1H, *dd*,  $J = 1,9$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-6'),  $\delta$  6,84 ppm (1H, *d*,  $J = 8,1$  Hz, H-5') und  $\delta$  6,86 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2') wiesen auf ein 1,3,4 trisubstituiertes aromatisches System hin. Die Dubletts bei  $\delta$  6,66 ppm (1H, *d*,  $J = 2,3$  Hz, H-8) und  $\delta$  6,73 ppm (1H, *d*,  $J = 2,3$  Hz, H-6) deuteten auf einen weiteren Aromaten mit zwei zueinander *meta*-ständigen Protonen hin. Das Singulett bei  $\delta$  3,88 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-7) deutete auf das Vorhandensein einer Methoxygruppe hin, ein weiteres Singulett bei  $\delta$  5,94 ppm (1H, *s*, H-3) konnte dem olefinischen Proton an Position 3 eines 4-Phenylcumarinderivates zugeordnet werden. Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum waren weitere Signale bei  $\delta$  3,14 ppm (1H, *dd*,  $J = 7,8$  Hz,  $J = 9,5$  Hz, H-2''), 3,30 ppm (1H, unter Methanol, H-5''),  $\delta$  3,43 ppm (1H, *dd*,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 9,7$  Hz, H-3'') sowie  $\delta$  3,65 ppm (1H, *br d*,  $J = 11,0$  Hz, H-6''b),  $\delta$  3,73 ppm (1H, *dd*,  $J = 4,5$  Hz,  $J = 11,8$  Hz, H-6''a) und  $\delta$  3,81 ppm (1H, *d*,  $J = 3,0$  Hz, H-4'') und ein

Dublett bei  $\delta$  4,77 ppm (1H, *d*,  $J = 7,7$  Hz, H-1'') für ein anomeres Proton zu erkennen, die auf einen Zuckerrest deuteten.

Im Gegensatz zu den Verbindungen **1** und **2** handelte es sich nicht um Glucose, sondern wie bei **3** um Galactose. Diese Annahme wurde wiederum durch das für Galactopyranosylreste typische Signal bei  $\delta$  3,81 ppm (1H, *d*,  $J = 3,0$  Hz, H-4'') bestätigt. Diese Signale in Kombination mit Literaturdaten konnten belegen, das es sich bei dieser Verbindung um das 4-Phenylcumaringlykosid 5-*O*- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin handelte. Dieses 4-Phenylcumaringlykosid wurde erstmalig aus *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. & Schult., Rubiaceae (Mata et al. 1987) isoliert.

#### 4.4.5 Strukturaufklärung von 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**)

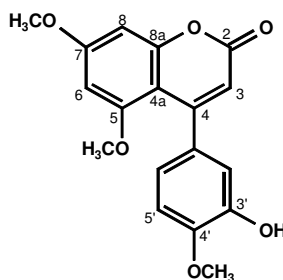


Abbildung 15 Strukturformel von 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**)

Das EI Massenspektrum zeigte einen Molekülionenpeak bei  $m/z$  328 und einen weiteren Peak bei  $m/z$  300, der auf die Abspaltung einer Carbonyleinheit hinwies. Im  $^1\text{H}$  NMR konnten drei Methoxygruppen bei  $\delta$  3,93 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-7),  $\delta$  3,90 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-4') und bei  $\delta$  3,55 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-5) nachgewiesen werden. Das charakteristische Kopplungsmuster der Signale bei  $\delta$  6,97 ppm (1H, *d*,  $J = 8,2$  Hz, H-5'), 6,82 ppm (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz, H-2') und 6,78 ppm (1H, *dd*,  $J = 8,2$  Hz,  $J = 2,1$  Hz, H-6') deutete auf einen 1,3,4-trisubstituierten Aromaten hin. Dubletts bei  $\delta$  6,56 ppm (1H, *d*,  $J = 2,3$  Hz, H-8) und  $\delta$  6,42 ppm (1H, *d*,  $J = 2,3$  Hz, H-6) sowie ein Singulett bei  $\delta$  5,86 (1H, *s*, H-3) führten zu der Schlussfolgerung, dass **5** einem 3',4',5,7-tetrasubstituierten 4-Phenylcumarin entsprach. Diese Signale in Kombination mit Literaturdaten konnten bestätigen, das es sich hierbei um 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin handelte, das zuvor aus *Coutarea hexandra* (Jacq.) K.

Schum., Rubiaceae (Delle Monache et al. 1983) und aus der **Rinde** von *Exostema mexicanum* A. Gray, Rubiaceae (Köhler Thesis, 2002) isoliert worden war.

#### 4.4.6 Strukturaufklärung von Kämpferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,4-diacetyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-cumaroyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (6)

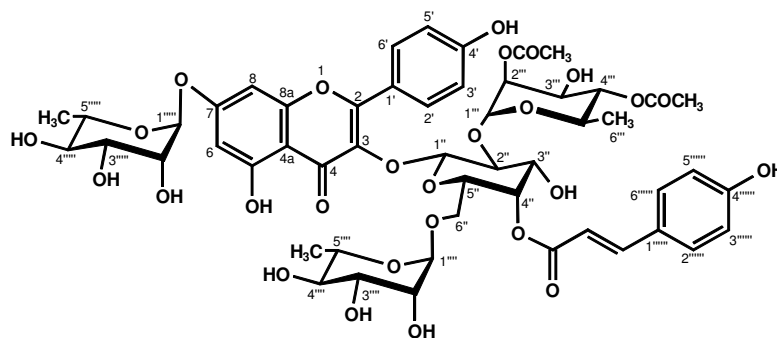


Abbildung 16 Strukturformel von Kämpferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,4-diacetyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-cumaroyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (6)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein  $[M-H]^-$  Peak bei  $m/z$  1115, der eine Summenformel von  $C_{52}H_{60}O_{27}$  glaubhaft machte. Die im  $^1H$  NMR Spektrum (Tabelle 9) erkennbaren Signale bei  $\delta$  8,12 ppm (2H, *d*,  $J = 9,0$  Hz, H-2', H-6'), und  $\delta$  6,95 ppm (2H, *d*,  $J = 9,0$  Hz, H-3', H-5') deuteten auf ein aromatisches AA'BB' System hin. Die Dubletts bei  $\delta$  6,48 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-6) und  $\delta$  6,76 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-8) wiesen auf einen weiteren Aromaten im Molekül hin, dessen aromatische Protonen aufgrund der kleinen Kopplungskonstante in *meta*-Stellung zueinander stehen. Diese Signale in der aromatischen Region sind typisch für ein Kämpferolgrundgerüst.

Des Weiteren waren Signale bei  $\delta$  6,84 ppm (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-3''''', H-5''''') und  $\delta$  7,51 ppm (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-2''''', H-6''''') zu erkennen, die auf das Kopplungsmuster eines *para*-substituierten Aromaten zeigten. Dieser Aromat erwies sich als Bestandteil einer *p*-Cumarsäure, da zusätzlich Signale für eine *trans*-Doppelbindung bei  $\delta$  6,35 ppm (1H, *d*,  $J = 16,0$  Hz, H-8''''') und  $\delta$  7,64 ppm (1H, *d*,  $J = 16,0$  Hz, H-7''''') zu identifizieren waren. Im  $^{13}C$  NMR Spektrum konnte zusätzlich die Carbonyl-Gruppe der *p*-Cumarsäure bei  $\delta$  168,9 ppm am C-9''''') eindeutig beobachtet werden.

Zusätzlich zeigten sich Signale für vier anomere Zucker-Protonen bei  $\delta$  4,44 ppm (1H, *br s*, H-1'''),  $\delta$  5,20 ppm (1H, *br s*, H-1''),  $\delta$  5,55 ppm (1H, *br s*, H-1''''') und  $\delta$  5,64 ppm (1H, *d*,  $J = 7,0$  Hz, H-1'') sowie Signale für zwei Acetyl-Gruppen bei  $\delta$  2,02 ppm und  $\delta$  2,20 ppm. Aus diesen Daten ließ sich folgern, dass es sich bei dieser Verbindung (**6**) um ein acyliertes Kämpferoltetraglykosid handelte. Die kleinen Kopplungskonstanten der anomeren Protonen bei  $\delta$  4,44 ppm,  $\delta$  5,20 ppm und  $\delta$  5,55 ppm deuteten auf drei Rhamnose-Moleküle hin, die durch drei Signale für Methylgruppen bei  $\delta$  0,93 ppm (3H, *d*,  $J = 6,5$  Hz, H-6'''),  $\delta$  1,04 ppm (3H, *d*,  $J = 6,5$  Hz, H-6''''') und  $\delta$  1,26 ppm (3H, *d*,  $J = 6,0$  Hz, H-6''''') bestätigt werden konnten. Der verbleibende Zucker musste eine Hexose sein. Die Annahme, es könnte sich um eine Galactose handeln, wurde durch das für Galactopyranosylreste typische Signal bei  $\delta$  5,34 ppm (1H, *d*,  $J = 3,5$  Hz, H-4'') im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum und durch das charakteristische Signal des C-4'' ( $\delta$  71,9 ppm) mittels  $^{13}\text{C}$  NMR bestätigt. In der Galactose ist das **H-4** im Gegensatz zur Glucose äquatorial-ständig und bedingt infolgedessen eine kleine Kopplungskonstante von  $J = 3,5$  Hz.

Die Tieffeldverschiebung der Protonen H-6 und H-8 am Kämpferolmolekül im Vergleich zu einem Kämpferol-Aglykon ist bedingt durch die Verknüpfung eines Rhamnopyranosyl-Restes an der Hydroxyl-Gruppe in Position C-7. Die Verbindung zeigte außerdem Übereinstimmung mit  $^1\text{H}$  NMR und  $^{13}\text{C}$  NMR Daten von Astrasikokiosid I, einem Kämpferoltetraglykosid, das aus *Astragalus shikokianus*, Fabaceae (Yahara et al. 2000) isoliert worden ist. Astrasikokiosid I (Kämpferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopyranosyl-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid) zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit der isolierten Verbindung **6** und die Übereinstimmung der  $^{13}\text{C}$  NMR Daten der Zuckermoleküle in der Literatur (Yahara et al. 2000) mit den eigenen  $^{13}\text{C}$  NMR Daten legte eine identische Verknüpfung nahe.

Anhand der Tieffeldverschiebung der korrespondierenden Kohlenstoffatome im  $^{13}\text{C}$  NMR konnte davon ausgegangen werden, dass die Galactose an Position 2 und 6 glycosidiert ist. An den Positionen 2 und 6 der Galactose konnte mittels  $^1\text{H}$  NMR und  $^{13}\text{C}$  NMR Daten jeweils eine L-Rhamnose identifiziert werden (Tabelle 9). Die Acetylreste und der p-Cumaroylrest mussten sich aufgrund der Tieffeldverschiebung der korrespondierenden Protonen in Position 2''', 4''' und 4'' befinden. Alle Protonen-



und die meisten Kohlenstoff-Signale konnten mittels H-H COSY und HSQC Spektren zugeordnet werden. Bei dieser als Kämpferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[2,4 diacetyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-cumaroyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**6**) identifizierten Substanz handelt es sich um einen neuen Naturstoff.

Tabelle 9  $^1\text{H}$  NMR Daten [400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  (ppm),  $J$  (Hz)] und  $^{13}\text{C}$  NMR Daten [100,6 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  (ppm)<sup>a</sup>] von Substanz 6

Position	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	Position	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
Kämpferol			6''-O-Rhamnose		
2		n.b.	1''''	4,44 br s	102,3
3		n.b.	2''''	3,52 m	72,0
4		n.b.	3''''	3,85 m	73,8
4a		100,5	4''''	3,21 m	73,2
5		n.b.	5''''	3,32 m	70,0
6	6,48 d (2,0)	n.b.	6''''	1,04 d (6,0)	17,9
7		n.b.	7-O-Rhamnose		
8	6,76 d (2,0)	95,7	1'''''	5,55 br s	100,1
8a		158,3	2'''''	4,02 br s	71,8
1'		122,9	3'''''	3,82 m	72,1
2'	8,12 d (9,0)	132,5	4'''''	3,60 m	71,0
3'	6,95 d (9,0)	116,0	5'''''	3,62 m	73,9
4'		161,2	6'''''	1,26 d (6,0)	18,1
5'	6,95 d (9,0)	116,0	4''-O- <i>p</i> -Cumaroyl		
6'	8,12 d (9,0)	132,5	1''''''		127,0
3-O-Galactose			2''''''	7,51 d (8,5)	131,6
1''	5,64 d (7,0)	101,1	3''''''	6,84 d (8,5)	116,9
2''	3,94 t (7,0)	78,1	4''''''		161,3
3''	4,00 m	73,9	5''''''	6,84 d (8,5)	116,9
4''	5,34 d (3,5)	71,9	6''''''	7,51 d (8,5)	131,6
5''	3,48 m	72,2	7''''''	7,64 d (16,0)	114,9
6''a	3,52 m	64,6	8''''''	6,35 d (16,0)	147,2
6''b	3,58 m	64,6	9''''''		168,9
2''-O-Rhamnose			<u>COCH<sub>3</sub></u>	2,20 s	21,0
1'''	5,20 br s	99,9	<u>COCH<sub>3</sub></u>		171,2
2'''	5,27 br s	74,1	<u>COCH<sub>3</sub></u>	2,02 s	21,2
3'''	4,20 br d (3,5)	68,7	<u>COCH<sub>3</sub></u>		171,5
4'''	4,85 m	75,7	<u>COCH<sub>3</sub></u>		
5'''	4,36 m	67,8			
6'''	0,93 d (6,5)	17,1			

n.b. = nicht bestimmt

a Daten aus HSQC- und HMBC-Spektren, Substanzmenge war limitiert, daher nicht alle Kohlenstoffatome bestimmbar

#### 4.4.7 Strukturaufklärung von Kämpferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-cumaroyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (7)

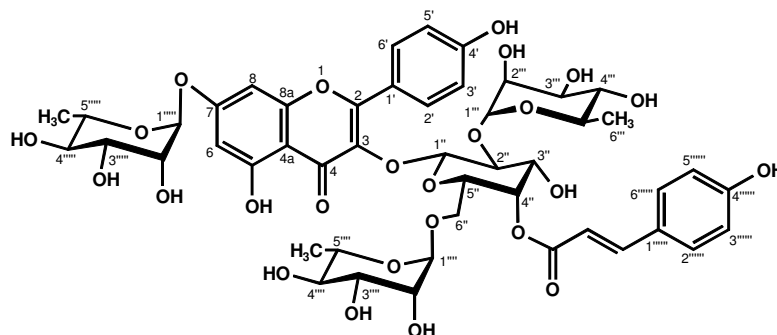


Abbildung 17 Strukturformel von Kämpferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-cumaroyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (7)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein  $[M-H]^-$  Peak bei  $m/z$  1031, der eine Summenformel von  $C_{48}H_{56}O_{25}$  wahrscheinlich machte. Die im  $^1H$  NMR Spektrum erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,96 ppm (2H, *d*,  $J = 9,0$  Hz, H-3', H-5') und  $\delta$  8,16 ppm (2H, *d*,  $J = 9,0$  Hz, H-2', H-6') deuteten auf ein aromatisches AA'BB' System hin.

Die Dubletts bei  $\delta$  6,47 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-6) und  $\delta$  6,75 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-8) deuteten auf einen weiteren Aromaten hin, dessen aromatische Protonen aufgrund der kleinen Kopplungskonstante in *meta*-Stellung zueinander stehen. Diese Signale in der aromatischen Region sind typisch für ein Kämpferolgrundgerüst. Des Weiteren waren zwei Dubletts im aromatischen Bereich bei  $\delta$  6,84 ppm (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-3''''', H-5''''') und  $\delta$  7,49 ppm (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-2''''', H-6''''') zu erkennen, die auf einen *para*-substituierten Aromaten hindeuteten sowie Signale für zwei miteinander koppelnde olefinische Protonen bei  $\delta$  6,34 ppm (1H, *d*,  $J = 16,0$  Hz, H-8''''') und  $\delta$  7,63 ppm (1H, *d*,  $J = 16,0$  Hz, H-7'''''), deren große Kopplungskonstanten auf eine *trans*-Doppelbindung hinwiesen. Der Vergleich mit der strukturell schon aufgeklärten Verbindung (6) konnte bestätigen, dass es sich bei diesem Aromaten ebenfalls um die *p*-Cumarsäure handelte. Bei dieser Verbindung waren ebenfalls Signale für vier anomere Zucker-Protonen bei  $\delta$  4,46 ppm (1H, *br s*, H-1'''),  $\delta$  5,20 ppm (1H, *br s*, H-1'''),  $\delta$  5,56 ppm (1H, *br s*, H-1''''') und  $\delta$  5,73 ppm (1H, *d*,  $J = 7,0$  Hz, H-1''') zu erkennen.

Die kleinen Kopplungskonstanten der anomeren Protonen bei  $\delta$  4,46 ppm,  $\delta$  5,20 ppm und  $\delta$  5,56 ppm deuteten auf drei Rhamnose-Moleküle hin, die durch drei Signale für Methylgruppen bei  $\delta$  1,02 ppm (3H, *d*,  $J = 6,5$  Hz, H-6'''),  $\delta$  1,03 ppm (3H, *d*,  $J = 6,0$  Hz, H-6''') und  $\delta$  1,26 ppm (3H, *d*,  $J = 6,0$  Hz, H-6''') bestätigt werden konnten. Der verbleibende Zucker konnte nur eine Hexose sein. Auch in diesem Fall sollte es sich um eine Galactose handeln, denn das für Galactopyranosylreste typische Signal mit kleiner Kopplungskonstante bei  $\delta$  5,34 ppm (1H, *br s*, H-4'') zeigte sich im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum. Die Signale für Acetyl-Gruppen fehlten, daher ließ sich aus den vorhandenen Daten schließen, das es sich bei dieser Verbindung um das deacetylierte Derivat der Verbindung **6** handelte. Das Fehlen der Acetyl-Reste bedingt eine Verschiebung der Signale ins Hochfeld. Der Vergleich mit Literaturdaten (Yahara et al. 2000) konnte bestätigen, dass es sich bei dieser Substanz ebenfalls um ein Kämpferoltetraglykosid handelte, dessen Verknüpfungsmuster dem des Astrasikokiosid I (Yahara et al. 2000) entsprach. Somit wurde Verbindung (**7**) als Kämpferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-cumaroyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid identifiziert. Auch bei dieser Substanz handelt es sich um eine neue Verbindung.

#### 4.4.8 Strukturaufklärung von Scopoletin (**8**)

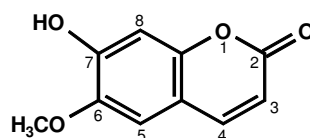


Abbildung 18 Strukturformel von Scopoletin (**8**)

Das EI Massenspektrum von **8** zeigte einen Molekülionenpeak bei  $m/z$  192  $[\text{M}]^+$ . Das Fragment bei  $m/z$  177 deutete auf den Verlust einer Methylgruppe hin. Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum konnten eine Methoxygruppe bei  $\delta$  3,90 ppm (3H, *s*) sowie zwei isolierte aromatische Protonen bei  $\delta$  6,80 ppm und 7,19 ppm (jeweils 1H, *s*) nachgewiesen werden. Die restlichen zwei Signale entsprachen jeweils einem olefinischen Proton und bildeten jeweils ein Dublett bei  $\delta$  6,16 ppm und 7,84 ppm. Die Kopplungskonstante von  $J = 9,4$  Hz deutete auf eine klassische *cis*- Doppelbindung hin, die typisch für Coumarine ist. Die isolierten *para*-ständigen Protonen wurden H-5 und H-8 zugeordnet. Der Vergleich der eigenen Daten mit denen der Literatur führte zu der Schlussfolgerung,

dass es sich bei der Substanz **8** um Scopoletin handelt, ein in der Pflanzenwelt häufig vorkommendes einfach methoxyliertes Cumarin, das zuvor z. B. aus *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Müll. Arg., Euphorbiaceae gewonnen werden konnte (Silva et al. 2001).

#### 4.4.9 Strukturaufklärung von Loliolid (**9**)

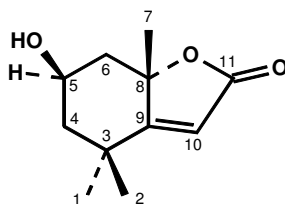


Abbildung 19 Strukturformel von Loliolid (**9**)

Das Massenspektrum von **9** ergab einen Molekülionenpeak bei  $m/z$  196, der eine Summenformel von  $C_{11}H_{16}O_3$  wahrscheinlich machte. Das Fragment bei  $m/z$  178 deutete auf eine Wasserabspaltung hin. Im  $^1H$  NMR Spektrum zeigten sich drei Singulets bei  $\delta$  1,27 ppm, 1,47 ppm und 1,79 ppm, die drei Methylgruppen zugeordnet werden konnten. Das Singulett bei  $\delta$  5,69 ppm mit einem Integral für 1 H deutete auf ein isoliertes olefinisches Proton hin. Im Spektrum zeigte sich weiterhin ein Quintett bei  $\delta$  4,33 ppm mit einer Kopplungskonstante von  $J = 3$  Hz. Daraus konnte geschlossen werden, dass hier ein Proton mit vier Kopplungspartnern vorliegt. Da die Methylgruppen als Kopplungspartner ausscheiden, musste sich dieses Proton zwischen zwei Methylengruppen befinden. Aus der chemischen Verschiebung des Signals konnte auf die direkte Nachbarschaft des Protons mit einer Hydroxylgruppe geschlossen werden. Die restlichen vier Signale entsprachen jeweils einem Proton, zwei dieser Signale ( $\delta$  1,53 ppm,  $J = 3,5$  Hz,  $J = 14,0$  Hz und  $\delta$  1,78 ppm,  $J = 3,5$  Hz,  $J = 14,0$  Hz) bildeten ein Doppeldoublett mit einer vicinalen und einer geminalen Kopplung aus. Die anderen beiden Signale ( $\delta$  1,98 ppm,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 15,0$  Hz und  $\delta$  2,46,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 15,0$  Hz) spalteten sich jeweils in ein Doublett eines Triplets auf. Das vorhandene Kopplungsmuster und die Tatsache, dass keine weiteren Protonensignale im Spektrum zu erkennen waren, deuteten auf das Vorhandensein zweier Methylengruppen hin. Diese lagen nicht benachbart zueinander; die zusätzliche Aufspaltung in ein *dt* bei  $\delta$  1,98 ppm und  $\delta$  2,46 ppm konnte durch das Vorliegen einer W-Kopplung der beiden äquatorialen Protonen der Methylengruppen untereinander erklärt werden. Das Proton

bei  $\delta$  4,33 ppm konnte nur zwischen den beiden Methylengruppen liegen. Die Verschiebung des olefinischen Signals und die Tatsache, dass laut Massenspektrum neben der im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zu erkennenden Hydroxygruppe noch zwei weitere Sauerstoffatome im Molekül vorhanden sein mussten, machten einen  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Laktoring wahrscheinlich. Da sich aus der Summenformel insgesamt vier Doppelbindungsäquivalente ergaben, von denen erst drei durch den ungesättigten Laktoring abgedeckt wurden, musste noch ein weiterer Ring im Molekül sein. Die drei Methylsingulets im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum sprachen für eine terpenoide Grundstruktur. Der Vergleich der ermittelten Daten mit Literaturangaben (Tanaka et al. 1989) führte zu dem Ergebnis, dass es sich bei Substanz **9** um Loliolid handelt, einem in der Natur weit verbreiteten Abbauprodukt der Carotinoide.

#### 4.4.10 Strukturaufklärung von 2-Hydroxybenzoesäure (Salicylsäure) (10)

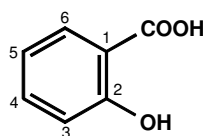


Abbildung 20 Strukturformel von Salicylsäure (10)

Das EI Massenspektrum zeigte einen Molpeak bei  $m/z$  138 und einen weiteren Peak bei  $m/z$  120, der auf die Abspaltung von Wasser hinwies. Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zeigten sich Signale eines *dt* bei  $\delta$  7,48 ppm (1H, *dt*,  $J = 0,5$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-4/H-5) und  $\delta$  6,90 ppm (1H, *dt*,  $J = 0,5$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-4/H-5) und zwei Signale eines *dd* bei  $\delta$  7,90 ppm (1H, *dd*,  $J = 0,5$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-6) und  $\delta$  7,00 ppm (1H, *dd*,  $J = 0,5$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-3). Das beobachtete Kopplungsmuster ist typisch für einen *ortho*-disubstituierten Aromaten. Die Tieffeldverschiebung des einen *dd* zu  $\delta$  7,90 ppm ließ sich durch die Nachbarschaft zur Carbonsäurefunktion bei  $\delta$  10,53 ppm (1H, *br s*, -COOH) erklären. Anhand dieser Daten konnte gefolgert werden, dass es sich bei der Verbindung **10** um Salicylsäure handelte, was durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit Referenzsubstanz bestätigt wurde.

#### 4.5 Phytochemische Untersuchung von *Stachytarpheta guatemalensis* Moldenke

Die Gattung *Stachytarpheta*, die zur Familie der Verbenaceae zählt, umfasst über 140 Arten und Unterarten, die im subtropischen und tropischen Amerika weit verbreitet sind. Es gibt Ausnahmen, dabei handelt es sich um einheimisch gemachte Arten, die auch im tropischen Asien, Afrika und in Ozeanien anzutreffen sind (Moldenke, 1973).

Bei *S. guatemalensis* Moldenke, handelt es sich um Kräuter oder kleine Sträucher, die eine Höhe von 1,3 m erreichen können und reichlich verzweigt sind. Stiele und Zweige sind von schlanker Gestalt, meist spitz tetragonal (vierkantig), unbehaart oder spärlich behaart zur Laubspitze hin sowie am ringförmigen Knoten. Die Blätter sind kreuzgegenständig, papierartig und dünnhäutig, eiförmig mit abgerundeter Spitze bis elliptisch; sie sind 3 bis 10 cm lang und 1,5 bis 4,5 cm breit, häufig spitz zulaufend. Der Blattrand ist regelmäßig gekerbt und gezackt von unterhalb des breitesten Teiles bis zur Laubspitze. Die Spreite ist glatt oder fast völlig unbehaart und glänzend auf beiden Seiten. Die Blattstiele sind weniger als 1 cm lang oder verkümmert, aber die verschmälerte Blattbasis täuscht einen Blattstiel vor. Die Blütenähren sind schlank, 6 bis 17 cm lang, dicht mit Blüten versehen, glatt oder fast völlig unbehaart. Die Deckblätter sind schmal lanzettlich, 5 bis 7 mm lang und begrannt, sie sind lang zugespitzt, vom Rand bis zur Basis hin trockenhäutig und ausgespreizt. Die Blumenkrone besteht aus einer Röhre mit einem verbreiterten Rand, sie ist häufig blau, veilchenblau bis purpurfarben (Abbildung 21).

*S. guatemalensis* ist in Wäldern, im Dickicht, in Sumpfgebieten, auf Abfallplätzen, am Waldrand und in Savannen von Mexiko bis nach Panama anzutreffen.

Diese Pflanze ist im lateinamerikanischen Raum auch bekannt als „camaq olal“, „San Diego“, „verbena“ und „vervena“. Traditionell wird der gekochte Saft von Einheimischen als Heilmittel gegen Malaria und Ruhr eingesetzt (Moldenke, 1973).

*Stachytarpheta guatemalensis* ist trotz ihres ethnobotanischen Einsatzes als Heilmittel gegen Malaria noch nicht phytochemisch untersucht worden. Im Vorfeld wurde der lipophile Rohextrakt der Ganzpflanze (EtOAc/PE 1:1) auf antiplasmodiale Aktivität an einem chloroquin-sensitiven (PoW) und einem chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stamm getestet und zeigte nur mäßige *in vitro* Effekte (IC<sub>50</sub>- Werte: > 50 µg/mL (Jenett-Siems Habil., 2002)). Mit der Extraktion der

Ganzdroge und Isolierung der Reinsubstanzen sollte überprüft werden, welche Stoffgruppen enthalten sind.

Abbildung 21 *Stachytarpheta guatemalensis*, Verbenaceae

Klasse:	Magnoliopsida
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Lamiales
Familie:	Verbenaceae
Gattung:	<i>Stachytarpheta</i>



Bildmaterial von PD K. Jenett-Siems

Aus der luftgetrockneten Ganzdroge von *S. guatemalensis* wurden zwei lipophile (PE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) Extrakte und ein hydrophiler (EtOAc) Rohextrakt hergestellt. Alle drei Extrakte wurden mit Hilfe der analytischen HPLC auf detektierbare Substanzen untersucht. Nur der Ethylacetat-Extrakt erwies sich als viel versprechend und wurde daraufhin dünnschichtchromatographisch geprüft.

Mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie konnten aus dem Ethylacetat-Rohextrakt die beiden Phenylethanoidglykoside Iso-Acteosid (**12**) und Acteosid (**11**) isoliert werden. Der restliche Ethylacetat-Rohextrakt wurde über eine mit LiChroprep RP-18 Material gefüllte Säule fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mittels analytischer Dünnschichtchromatographie auf detektierbare Substanzen hin untersucht. Aus der Fraktion C2 ließen sich nach durchgeführter präparativer Dünnschichtchromatographie insgesamt drei weitere Phenylethanoidglykoside isolieren. Dabei handelte es sich um das Leucosceptosid (**13**) und die im Gemisch (Verhältnis 3:1) vorliegenden Verbindungen Martynosid (**14**) und Jionosid D (**15**).

## 4.5.1 Strukturaufklärung von Acteosid (11)

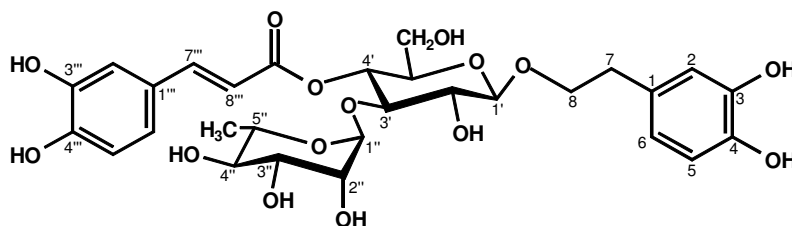
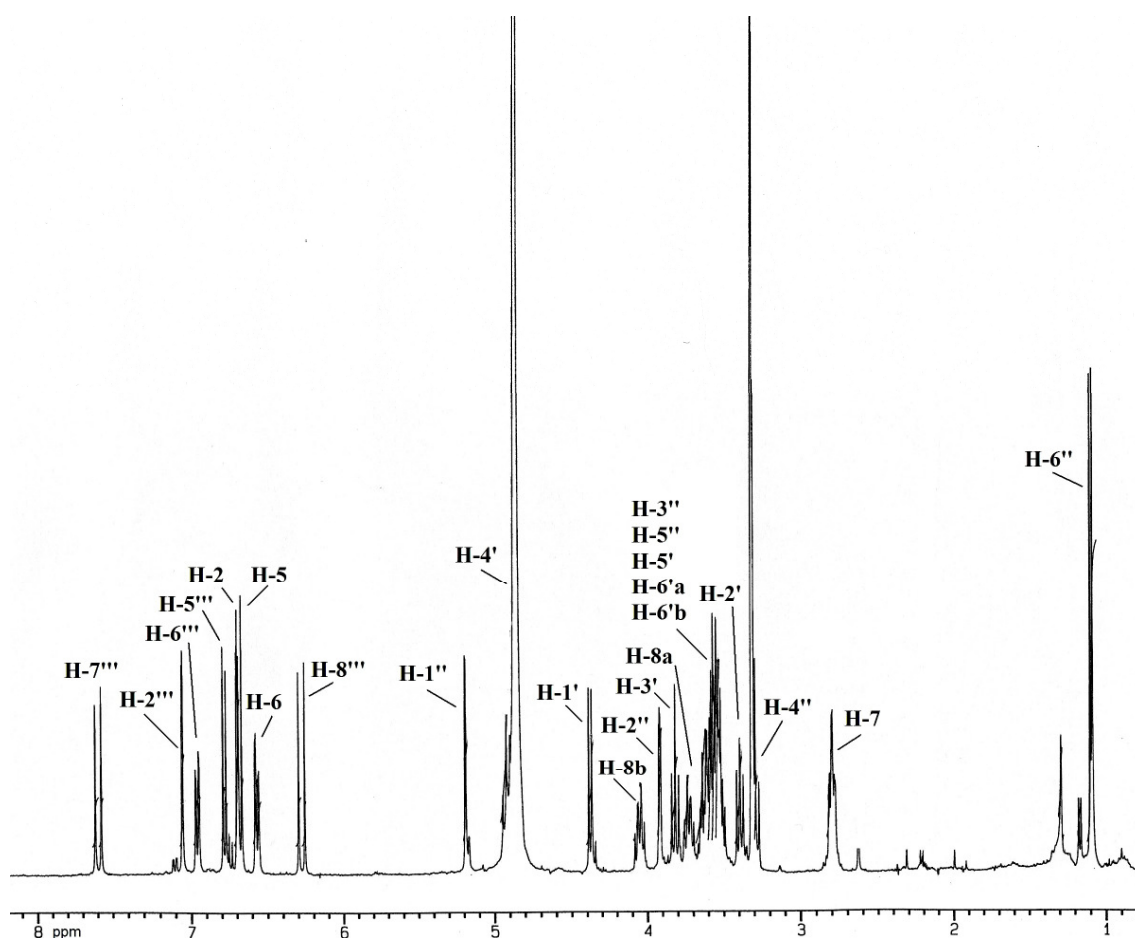


Abbildung 22 Strukturformel von Acteosid (11)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein Pseudomolpeak bei  $[M-H]^-$   $m/z$  623, der eine Summenformel von  $C_{29}H_{36}O_{15}$  wahrscheinlich machte.


 Abbildung 23  $^1H$  NMR Spektrum von Acteosid 11 (400 MHz, Methanol- $d_4$ )

Die im  $^1H$  NMR Spektrum (Abbildung 23) erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,67 ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-5), 6,69 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2) und 6,56 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-6) sowie die Signale bei  $\delta$  6,77 ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-5'''), 6,95 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-6''') und 7,05 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2''')



deuteten auf das Vorliegen von zwei 1,3,4-trisubstituierten Aromaten hin. Einer dieser Aromaten ist Bestandteil eines Caffeoyl-Restes, da zusätzlich Signale für eine *trans*-Doppelbindung bei  $\delta$  6,27 ppm (1H, *d*,  $J = 15,9$  Hz, H-8''') und bei  $\delta$  7,59 ppm (1H, *d*,  $J = 15,9$  Hz, H-7''') zu erkennen sind. Die Signale bei  $\delta$  2,79 ppm (2H, *t*,  $J = 8,0$  Hz, H-7), 3,72 ppm (1H, *m*, H-8a) und 4,05 ppm (1H, *m*, H-8b) deuteten daraufhin, dass der zweite Aromat Bestandteil eines Phenylethanoid-Grundkörpers ist. Darüber hinaus sind anhand der zahlreichen Signale zwischen 3 und 4 ppm im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum Zucker im Molekül zu vermuten. Das Signal bei  $\delta$  1,09 ppm (3H, *d*,  $J = 6,1$  Hz, H-6'') konnte als Methyldoublett der L-Rhamnose zugeordnet werden, des Weiteren wurde das Signal bei  $\delta$  5,18 ppm (1H, *d*,  $J = 1,5$  Hz, H-1'') mit kleiner Kopplungskonstante dem anomeren Proton der L-Rhamnose eindeutig zugeordnet. Das zweite anomere Proton bei  $\delta$  4,37 ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-1') mit einer Kopplungskonstanten von 8,0 Hz deutete auf eine Hexose hin. Der Vergleich eigener Daten mit den Acteosid-Daten aus der Literatur (Sasaki et al. 1978; Miyase et al. 1982; Andary et al. 1989) zeigte eine hervorragende Übereinstimmung.

#### 4.5.2 Strukturaufklärung von Iso-Acteosid (12)

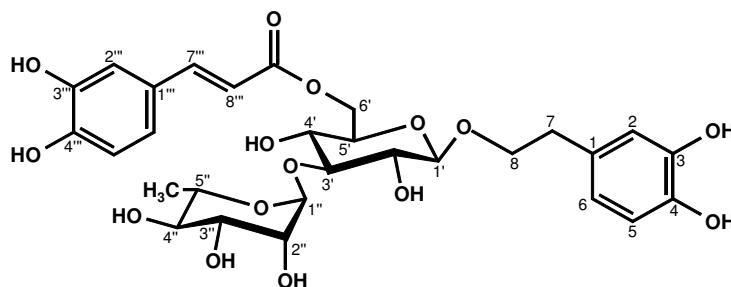


Abbildung 24 Strukturformel von Iso-Acteosid (12)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich wie bei **11** ein Pseudomolekülionenpeak bei  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  623, der eine Summenformel von  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$  wahrscheinlich machte.

Die im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,62 ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-5), 6,66 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2) und 6,53 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-6) sowie die Signale bei  $\delta$  6,76 ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-5'''), 6,89 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-6''') und 7,02 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2''') zeigten wiederum das Vorhandensein zweier 1,3,4-trisubstituierter Aromaten. Einer dieser Aromaten ist auch in diesem Fall Bestandteil eines Caffeoyl-Restes, da zusätzlich zwei Signale für

*trans*-ständige olefinische Protonen bei  $\delta$  6,28 ppm (1H, *d*,  $J = 16,0$  Hz, H-8''') und bei  $\delta$  7,55 ppm (1H, *d*,  $J = 16,0$  Hz, H-7''') zu erkennen sind. Die Signale bei  $\delta$  2,77 ppm (2H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H-7), 3,70 ppm (1H, *m*, H-8a) und 3,97 ppm (1H, *m*, H-8b) deuteten daraufhin, dass der zweite Aromat Bestandteil eines Phenylethanoid-Grundkörpers ist. Des Weiteren sind anhand der zahlreichen Signale ähnlich Verbindung **11** im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum Zucker im Molekül zu vermuten. Das Signal bei  $\delta$  1,24 ppm (3H, *d*,  $J = 6,0$  Hz, H-6'') konnte als Methyldublett der L-Rhamnose zugeordnet werden, darüber hinaus wurde das Signal bei  $\delta$  5,17 ppm (1H, *d*,  $J = 1,5$  Hz, H-1'') mit kleiner Kopplungskonstante dem anomeren Proton der L-Rhamnose eindeutig zugeordnet. Das zweite anomere Proton bei  $\delta$  4,32 ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-1') mit einer Kopplungskonstanten von 8,0 Hz deutete auf eine Hexose hin. Die tieffeldverschobenen Signale bei  $\delta$  4,34 ppm (1H, *dd*,  $J = 6,0$  Hz,  $J = 12,0$  Hz, H-6'a) und  $\delta$  4,49 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 12,0$  Hz, H-6'b) konnten den Protonen am C-6 zugeordnet werden. Die Verschiebung ins Tieffeld in Kombination mit dem Kopplungsmuster deutete daraufhin, dass der Caffeoyle-Rest dieses Mal mit dem C-6 der Glucose verknüpft ist. Durch den Vergleich mit Literaturdaten (Miyase et al. 1982; Kawada et al. 2002) konnte diese Verbindung eindeutig als Iso-Acteosid (**12**) identifiziert werden.

#### 4.5.3 Strukturaufklärung von Leucosceptosid (**13**)

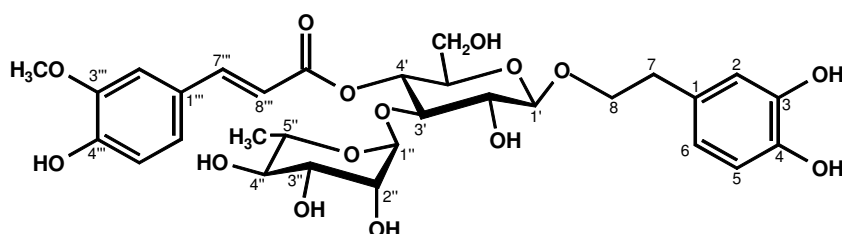


Abbildung 25 Strukturformel von Leucosceptosid (**13**)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein Pseudomolpeak bei  $[M-H]^-$   $m/z$  637, der eine Summenformel von  $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_{15}$  glaubhaft machte. Die im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,67 ppm (1H, *d*,  $J = 7,9$  Hz, H-5),  $\delta$  6,56 ppm (1H, *dd*,  $J = 1,9$  Hz,  $J = 8,1$  Hz, H-6) und  $\delta$  6,69 ppm (1H, *d*,  $J = 1,9$  Hz, H-2) sowie die Signale bei  $\delta$  6,81 (1H, *d*,  $J = 8,2$  Hz, H-5'''),  $\delta$  7,08 ppm (1H, *dd*,  $J = 1,7$  Hz,  $J = 8,2$  Hz, H-6''') und  $\delta$  7,19 ppm (1H, *d*,  $J = 1,7$  Hz, H-2''') zeigten die Anwesenheit von zwei 1,3,4-trisubstituierten Aromaten. Wiederum konnten zusätzlich Signale für eine *trans*-

Doppelbindung bei  $\delta$  6,37 ppm (1H, *d*,  $J = 15,8$  Hz, H-8''') und bei 7,66 ppm (1H, *d*,  $J = 15,8$  Hz, H-7''') sowie charakteristische Signale der Phenylethanoid-Seitenkette bei  $\delta$  2,79 ppm (2H, *t*,  $J = 6,2$  Hz, H-7), 3,79 ppm (1H, *m*, H-8a) und 4,05 ppm (1H, *m*, H-8b) beobachtet werden.

Das Signal für eine Methoxygruppe bei  $\delta$  3,88 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>) ließ sich unschwer erkennen. Des Weiteren deuteten zahlreiche Signale zwischen 3 und 4 ppm im <sup>1</sup>H NMR Spektrum auf Zucker im Molekül hin. Das Signal bei  $\delta$  1,10 ppm (3H, *d*,  $J = 6,2$  Hz, H-6'') konnte der Methylgruppe der L-Rhamnose zugeordnet werden, des Weiteren wurde das Signal bei  $\delta$  5,19 ppm (1H, *d*,  $J = 1,5$  Hz, H-1'') mit kleiner Kopplungskonstante dem anomeren Proton der L-Rhamnose eindeutig zugeordnet. Das zweite anomere Proton bei  $\delta$  4,37 ppm (1H, *d*,  $J = 7,9$  Hz, H-1') mit einer Kopplungskonstanten von 7,9 Hz deutete auf die Anwesenheit einer Hexose hin. Der Vergleich mit Literaturdaten (Miyase et al. 1982; Sasaki et al. 1989) ließ keinen Zweifel darüber, dass es sich bei dieser Verbindung um Leucosceptosid A (**13**), das eine Methoxygruppe in Position C-3''' trägt, handelte.

#### 4.5.4 Strukturaufklärung von Martynosid (14)

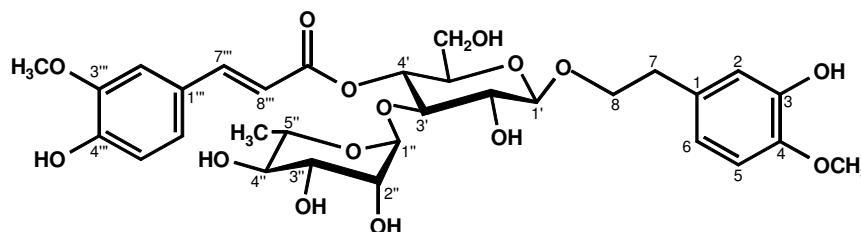


Abbildung 26 Strukturformel von Martynosid (14)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein Pseudomolekülionenpeak bei  $[M-H]^-$   $m/z$  651, das entsprach einer Summenformel von C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>O<sub>15</sub>. Die im <sup>1</sup>H NMR Spektrum erkennbaren Signale bei  $\delta$  6,80 ppm (1H, *d*,  $J = 8,2$  Hz, H-5),  $\delta$  6,68 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,1$  Hz, H-6) und  $\delta$  6,73 ppm (1H, *d*,  $J = 1,9$  Hz, H-2) sowie die Signale bei  $\delta$  6,82 ppm (1H, *d*,  $J = 8,1$  Hz, H-5'''),  $\delta$  7,08 ppm (1H, *dd*,  $J = 1,8$  Hz,  $J = 8,2$  Hz, H-6''') und  $\delta$  7,19 ppm (1H, *d*,  $J = 1,8$  Hz, H-2''') deuteten auf die Anwesenheit von zwei 1,3,4-trisubstituierten Aromaten hin. Einer dieser Aromaten wurde wie bei **13** als Bestandteil eines Feruloyl-Restes identifiziert, da außerdem Signale für eine *trans*-Doppelbindung bei  $\delta$  6,36 ppm (1H, *d*,  $J = 15,9$  Hz, H-8''') und bei  $\delta$  7,66 ppm (1H, *d*,

$J = 15,9$  Hz, H-7''') sowie das Signal für eine Methoxygruppe bei  $\delta$  3,89 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-3'') zu erkennen waren. Allerdings war eine zweite Methoxygruppe bei  $\delta$  3,81 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-4) vorhanden. Die Signale bei  $\delta$  2,82 ppm (2H, *t*,  $J = 7,5$  Hz, H-7), 3,75 ppm (1H, *m*, H-8a) und 4,07 ppm (1H, *m*, H-8b) deuteten daraufhin, dass der zweite Aromat ein Phenylethanoid-Grundkörper sein muss.

Im <sup>1</sup>H NMR Spektrum waren noch weitere zahlreiche Signale zwischen 3 und 4 ppm zu erkennen, die auf Zucker im Molekül hindeuteten. Das Signal bei  $\delta$  1,10 ppm (3H, *d*,  $J = 6,2$  Hz, H-6'') konnte als Methyldublett der L-Rhamnose identifiziert werden, darüber hinaus wurde das Signal bei  $\delta$  5,19 ppm (1H, *d*,  $J = 1,7$  Hz, H-1'') mit kleiner Kopplungskonstante dem anomeren Proton der L-Rhamnose eindeutig zugeordnet. Ein zweites anomeres Protonensignal bei  $\delta$  4,37 ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-1') mit einer Kopplungskonstanten von 8,0 Hz deutete auf die Anwesenheit einer Hexose hin. Der Vergleich eigener Daten mit Martynosid-Daten aus der Literatur (Sasaki et al. 1978; Miyase et al. 1982; Calis et al. 1984; Teborg et al. 1989) zeigte eine hervorragende Übereinstimmung.

#### 4.5.5 Strukturaufklärung von Jionosid D (15)

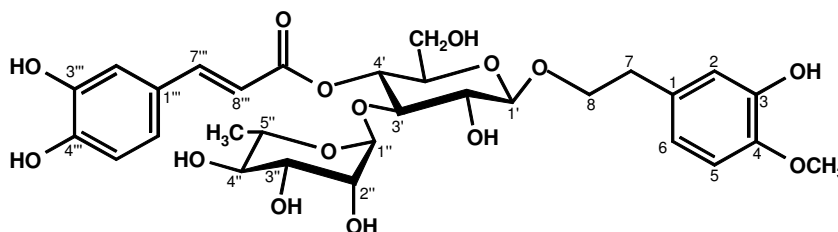


Abbildung 27 Strukturformel von Jionosid D (15)

Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich wie bei **13** ein Pseudomolekülionenpeak bei  $[M-H]^-$   $m/z$  637, der einer Summenformel von C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>15</sub> entsprach. Im <sup>1</sup>H NMR Spektrum zeigten sich Signale bei  $\delta$  6,82 ppm (1H, *d*,  $J = 8,1$  Hz, H-5),  $\delta$  6,68 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,1$  Hz, H-6) und  $\delta$  6,73 ppm (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2) sowie Signale bei  $\delta$  6,76 ppm (1H, *d*,  $J = 8,2$  Hz, H-5'''),  $\delta$  6,94 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, H-6''') und  $\delta$  7,06 ppm (1H, *d*,  $J = 1,7$  Hz, H-2'''), die auf die Anwesenheit von zwei 1,3,4-trisubstituierten Aromaten hinwiesen. Ein Vergleich der <sup>1</sup>H NMR Daten mit **13** zeigte eindeutig, dass sich die Methoxygruppe bei  $\delta$  3,81 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-4) dieses Mal im Phenylethanoid-Baustein befinden musste. Darüber hinaus waren wie bei **13**

zusätzlich zwei Signale für *trans*-ständige olefinische Protonen bei  $\delta$  6,27 ppm (1H, *d*,  $J = 15,9$  Hz, H-8''') und  $\delta$  7,59 ppm (1H, *d*,  $J = 15,6$  Hz, H-7''') sowie Signale bei  $\delta$  2,82 ppm (2H, *t*,  $J = 7,5$  Hz, H-7), 3,76 ppm (1H, *m*, H-8a) und 4,05 ppm (1H, *m*, H-8b) zu erkennen.

Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zeigten sich noch weitere Signale, die auf Zucker im Molekül hinwiesen. Das Signal eines Methyldoublets bei  $\delta$  1,15 ppm (3H, *d*,  $J = 6,2$  Hz, H-6'') ließ sich der L-Rhamnose zuordnen und das Signal für ein anomeres Proton bei  $\delta$  5,20 ppm (1H, *d*,  $J = 1,7$  Hz, H-1'') mit kleiner Kopplungskonstante gehörte ebenso zur L-Rhamnose. Ein weiteres anomeres Protonensignal bei  $\delta$  4,37 ppm (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-1') mit einer Kopplungskonstanten von 8,0 Hz deutete auf die Gegenwart einer Hexose hin. Ein Vergleich mit Literaturdaten (Sasaki et al. 1989) konnte bestätigen, dass es sich bei der Verbindung (**15**) um Jionosid D handelte.

#### 4.6 Phytochemische Untersuchung von *Momordica foetida* Schum.

Die Vertreter der Cucurbitaceen sind häufig Kräuter, die mit Hilfe von Ranken klettern können. Sie sind gewöhnlich eingeschlechtlich, da sowohl weibliche als auch männliche Blüten an derselben oder an verschiedenen Pflanzen existieren (Jeffrey, 1967). Bei *Momordica foetida* Schum. (Syn: *M. morkorra* A. Rich.) handelt es sich um eine mehrjährige Kletterpflanze (Abbildung 28), deren Stängel auf dem Boden kriechen oder nach oben ranken. Diese Stängel verbreiten beim Zerstoßen einen unangenehmen Geruch, der dieser Pflanze wahrscheinlich den Artnamen (*foetidus*: stinkend) beschert hat. Die Frucht ist leuchtend orange und zerfällt leicht in drei stachelige Teile. In diesen Schalen befinden sich die Samen, eingebettet in strahlend rotem Gel. Die cremefarbenen Blüten sind im Zentrum rot oder orange (Lind et al. 1962). *M. foetida* wächst ursprünglich am Waldrand, im bewaldeten Weideland und am Fluss gelegenen Randgebieten in Höhen von 350 bis 2250 m und ist vorrangig im tropischen Afrika, insbesondere in Uganda geographisch anzutreffen (Hyde et al. 2005).

*M. foetida* ist in der ethnobotanischen Literatur häufig erwähnt worden. Der Einsatz von unterschiedlichen Zubereitungen reicht vom Heilmittel gegen Diabetes (Marquis et al. 1977) bis zur Behandlung von Bluthochdruck und parasitären Erkrankungen. Insbesondere in Uganda und anderen Teilen Ost-Afrikas finden Extrakte zur Behandlung der Malaria Anwendung. In Ost- und Zentral-Afrika wird ein wässriger

Blätterextrakt von Einheimischen zur Behandlung von Malaria eingesetzt (Hakizamungu et al. 1992; Rwangabo, 1993).

Abbildung 28 *Momordica foetida*, Cucurbitaceae

Klasse:	Magnoliopsida
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Cucurbitales
Familie:	Cucurbitaceae
Gattung:	<i>Momordica</i>

Frucht mit Samen



Bildmaterial von Hyde & Wursten 2006

Aus der Pflanze konnten Sitosterolglykosid, 5,25-Stigmastadien-3- $\beta$ -yl-glykosid und 1- $\beta$ -Hydroxyfriedel-6-en-3-on isoliert und strukturell aufgeklärt (Olaniyi, 1975a; Olaniyi, 1980) sowie Cucurbitacine gewonnen werden (Mulholland et al. 1997). Des Weiteren sind aus der Ganzpflanze Alkaloide isoliert worden (Olaniyi et al. 1975b). Foetidin, ein homogenes Produkt aus gleichen Anteilen von  $\beta$ -Sitosterolglucosid und 5,25-Stigmastadienolglucosid konnte den Blutglukosespiegel von Albinoratten senken (Marquis et al. 1977).

Im Vorfeld wurde der lipophile Rohextrakt (EtOAc/PE 1:1) auf antiplasmodiale Aktivität an einem chloroquin-sensitiven (PoW) und einem chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stamm getestet und zeigte sehr viel versprechende *in vitro* Effekte (IC<sub>50</sub>- Wert: 7,3  $\mu$ g/mL [PoW] und 13,0  $\mu$ g/mL [Dd2], Jenett-Siems Habil., 2002).

Aus dem luftgetrockneten Blattmaterial von *M. foetida* wurden zwei lipophile (PE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und zwei hydrophile Rohextrakte (Butanol, EtOAc) hergestellt. Der Ethylacetat-Rohextrakt wurde über eine mit Sephadex LH 20 gefüllte Glassäule in 50 Fraktionen aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen mit Hilfe der analytischen

Dünnschichtchromatographie auf eventuelle Inhaltsstoffe untersucht, Fraktionen wurden auf diese Weise vereinigt. Aus den vereinigten Fraktionen 13-17 kristallisierte spontan das Flavanoglykosid 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Prunin) (**16**) aus. Aus den Fraktionen 11-12 konnte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie das 5,7-Dihydroxychromon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**19**) isoliert werden. Die Fraktionen 18-24 wurden ebenfalls einer präparativen Dünnschichtchromatographie unterzogen und nach Detektion mit dem Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz konnten drei Zonen isoliert werden. Eine weitere Aufreinigung mittels analytischer HPLC ergab 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Eriodictyol-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid) (**17**), das Kämpferol-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Populnin) (**18**) und nochmals das 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Prunin) (**16**).

Der Butanol-Extrakt wurde ebenfalls über eine Sephadex LH 20 Säule in 255 Fraktionen aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden einer analytischen Dünnschichtchromatographie unterzogen und anschließend wurden einzelne Fraktionen vereinigt. Aus den Fraktionen 196-230 konnten mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie das 5,7-Dihydroxychromon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**19**), 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Eriodictyol-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid) (**17**) und das Kämpferol-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Populnin) (**18**) isoliert werden.

Der Dichlormethan-Extrakt wurde über eine mit LiChroprep RP-18 Material gefüllte Säule gegeben und in 123 Fraktionen getrennt. Nach einer analytischen Dünnschichtchromatographie und Vereinigung einzelner Fraktionen wurden die Fraktionen 5-14 einer präparativen DC unterzogen und aus der Isolierung resultierte das 5,7-Dihydroxychromon (**20**). Eine weitere präparative DC, die an den vereinigten Fraktionen 15-21 vorgenommen wurden, ergab letztendlich die Salicylsäure (**10**).

### 4.6.1 Strukturaufklärung von 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (16)

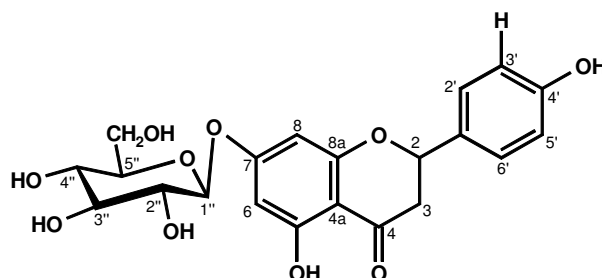


Abbildung 29 Strukturformel von 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (16)

Zur Strukturaufklärung wurden EI- und FAB-Massenspektren und  $^1\text{H}$  NMR Spektren herangezogen. Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molpeak bei  $m/z$  272 und weitere charakteristische Fragmente bei  $m/z$  153 und  $m/z$  120. Im (-)-FAB Massenspektrum zeigte sich ein Pseudomolpeak bei  $[\text{M-H}]^-$   $m/z$  433, der eine Summenformel von  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$  wahrscheinlich machte.

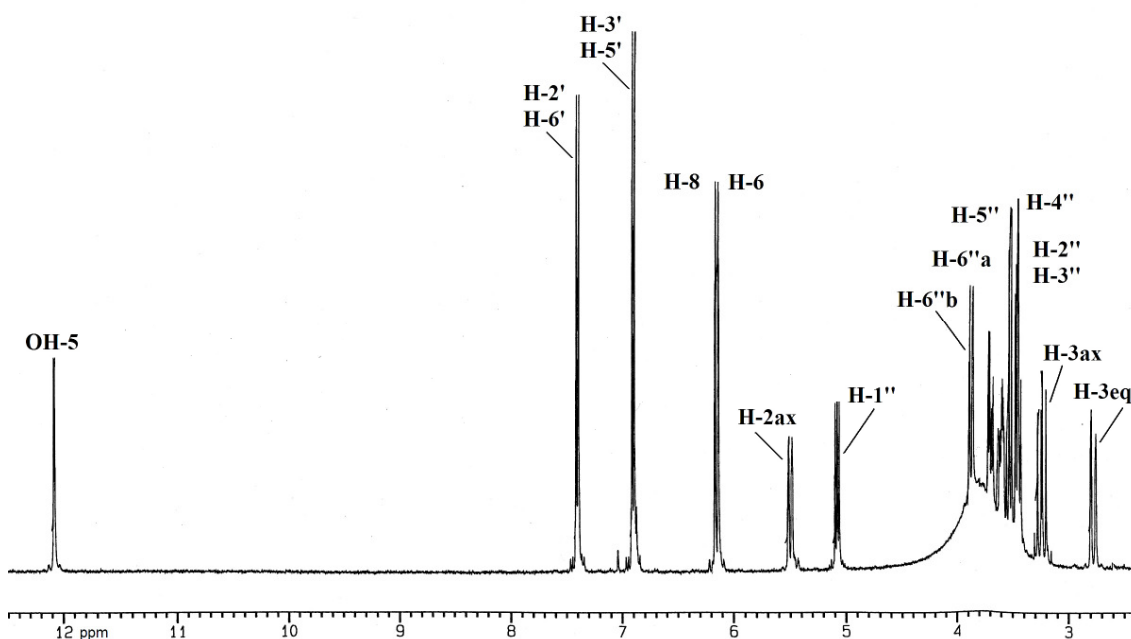


Abbildung 30  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (16) (400 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ )

Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum (Abbildung 30) auftretende Dubletts bei  $\delta$  7,38 ppm (2H,  $d$ ,  $J = 8,6$  Hz, H-2', H-6') und  $\delta$  6,90 ppm (2H,  $d$ ,  $J = 8,6$  Hz, H-3', H-5') zeigten ein aromatisches AA'BB'-System an. Zwei weitere Dubletts bei  $\delta$  6,17 ppm (1H,  $d$ ,  $J = 2,2$



Hz, H-8) und  $\delta$  6,14 ppm (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-6) wiesen auf einen 1,3,4,5-tetrasubstituierten Aromaten hin. Ein Singulett bei  $\delta$  12,07 ppm (1H, *s*, 5-OH) konnte einer Hydroxygruppe an Position 5 eines Flavonderivates (Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-C-Atom) zugeordnet werden. Des Weiteren konnten die beiden Signale bei  $\delta$  2,77 ppm (1H, *dd*,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 17,0$  Hz, H-3<sub>eq</sub>) und  $\delta$  3,23 ppm (1H, *dd*,  $J = 13,0$  Hz,  $J = 17,0$  Hz, H-3<sub>ax</sub>) als Methylen-Protonen am C-3 identifiziert werden. Ein weiteres Signal bei  $\delta$  5,49 ppm (1H, *dd*,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 13,0$  Hz, H-2<sub>ax</sub>) konnte dem Proton am Chiralitätszentrum des C-2 zugeordnet werden. Die beschriebenen Daten deuteten auf das Grundgerüst eines Flavanons hin. Im <sup>1</sup>H NMR Spektrum zeigten sich weitere Signale bei  $\delta$  3,47 ppm (2H, *t*,  $J = 8,8$  Hz, H-2'', H-3''),  $\delta$  3,60 ppm (1H, *m*, H-5''),  $\delta$  3,70 ppm (1H, *dd*,  $J = 5,3$  Hz,  $J = 11,8$  Hz, H-6''a),  $\delta$  3,88 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,3$  Hz,  $J = 11,8$  Hz, H-6''b) sowie ein Dublett bei  $\delta$  5,07 ppm (1H, *d*,  $J = 7,4$  Hz, H-1'') für ein anomeres Proton, die auf einen Zuckerrest wiesen. Bei dieser Hexose handelte es sich um eine Glucose, was durch das Signal bei  $\delta$  3,56 ppm (1H, *t*,  $J = 8,8$  Hz, H-4'') bestätigt wurde. In der Glucose ist das H-4'' im Gegensatz zur Galactose axial-ständig und daraus resultiert eine größere Kopplungskonstante von  $J = 8,8$  Hz.

Diese Signale in Kombination mit Literaturdaten (Zapesochnaya et al. 2002) konnten bestätigen, dass es sich um das bekannte Flavanonderivat 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (**16**) handelte. Diese Verbindung ist unter dem Trivialnamen Prunin bekannt und wurde zuvor aus der Rinde von *Salix acutifolia* Willd. (Salicaceae) isoliert. 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (**16**) wurde erstmalig aus *M. foetida* gewonnen.

#### 4.6.2 Strukturaufklärung von 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-O- $\beta$ -D-glucoopyranosid (17)

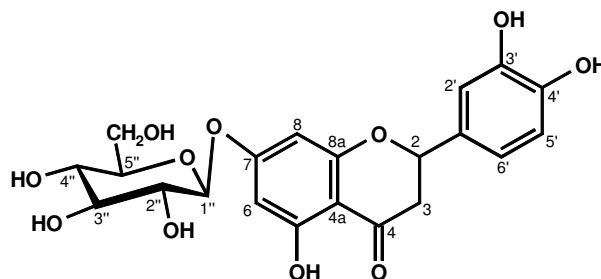


Abbildung 31 Strukturformel von 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-O- $\beta$ -D-glucoopyranosid (17)

Zur Strukturaufklärung wurden EI- und FAB-Massenspektren und  $^1\text{H}$  NMR Spektren herangezogen. Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molpeak bei  $m/z$  288 und weitere charakteristische Fragmente bei  $m/z$  153 und  $m/z$  136. Im (-)-FAB Massenspektrum erschien der Pseudomolpeak bei  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  449, der eine Summenformel von  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  wahrscheinlich machte. Die im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum (Abbildung 32) auftretenden Signale bei  $\delta$  7,04 ppm (1H, s, H-6') und  $\delta$  6,88 ppm (2H, s, H-2', H-5') wiesen auf ein 1,3,4-trisubstituiertes aromatisches System hin; das übliche Kopplungsmuster ist hier nicht zu beobachten, da zwei Signale zusammenfallen. Die im Spektrum auftretenden Dubletts bei  $\delta$  6,16 ppm (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-6) und  $\delta$  6,13 ppm (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-8) wiesen auf einen 1,3,4,5-tetrasubstituierten Aromaten hin. Ein Singulett bei  $\delta$  12,07 ppm (1H, s, 5-OH) konnte einer Hydroxygruppe am C-5 eines Flavonderivates (Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-C-Atom) zugeordnet werden.

Die Signale bei  $\delta$  2,77 ppm (1H, dd,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 17,1$  Hz, H-3<sub>eq</sub>) und  $\delta$  3,20 ppm (1H, dd,  $J = 12,6$  Hz,  $J = 17,1$  Hz, H-3<sub>ax</sub>) ließen sich als Methylen-Protonen, positioniert am C-3, identifizieren. Das Signal bei  $\delta$  5,44 ppm (1H, dd,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 12,6$  Hz, H-2<sub>ax</sub>) konnte dem Proton am Chiralitätszentrum des C-2 zugeordnet werden. Diese Daten wiesen auch hier auf ein Flavanon-Grundgerüst hin. Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum präsentierten sich weitere Signale bei  $\delta$  3,47 ppm (2H, t,  $J = 9,3$  Hz, H-2'', H-3''),  $\delta$  3,61 ppm (1H, m, H-5''),  $\delta$  3,70 ppm (1H, dd,  $J = 5,4$  Hz,  $J = 11,9$  Hz, H-6''a),  $\delta$  3,89 ppm (1H, dd,  $J = 2,9$  Hz,  $J = 11,9$  Hz, H-6''b) sowie ein Dublett bei  $\delta$  5,08 ppm (1H, d,

$J = 7,6$  Hz, H-1'') für ein anomeres Proton, die auf Zucker im Molekül hinwiesen. Auch hier handelte es sich bei dieser Hexose um eine Glucose, was durch das Signal bei  $\delta$  3,53 ppm (1H, t,  $J = 8,9$  Hz, H-4'') bestätigt wurde. Da das H-4'' der Glucose im Gegensatz zur Galactose axial-ständig ist, resultiert daraus eine größere Kopplungskonstante von  $J = 8,9$  Hz.

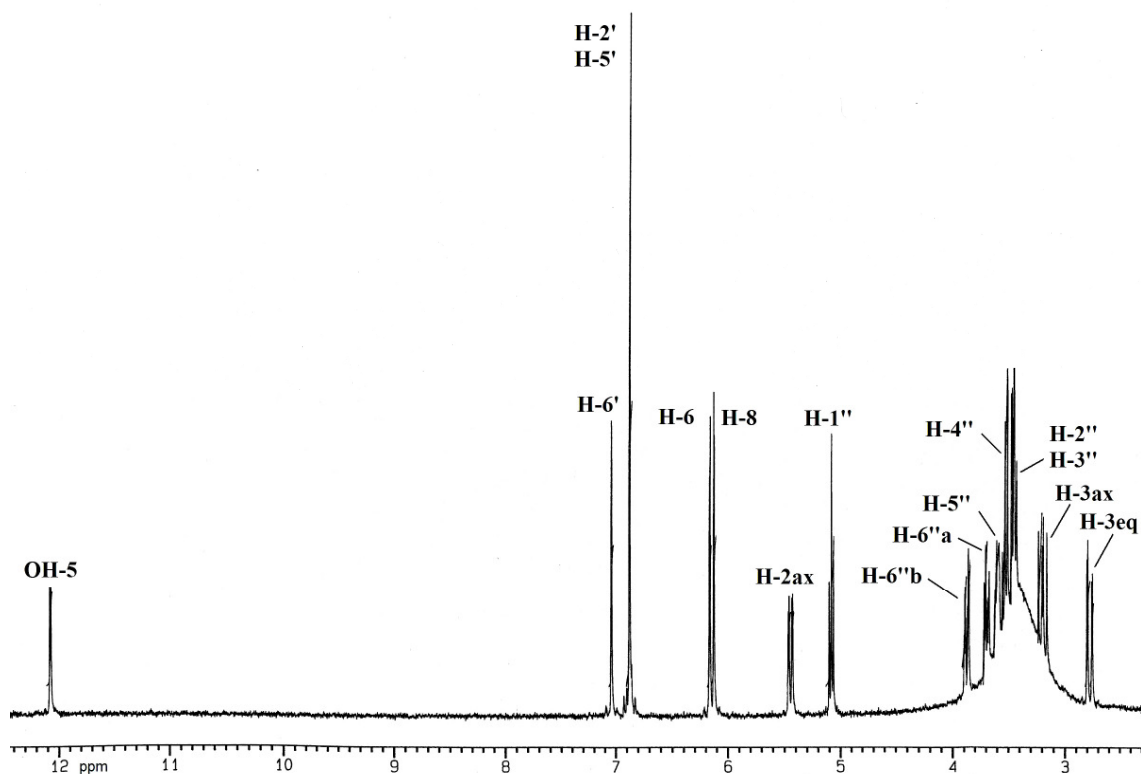


Abbildung 32  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**17**) (400 MHz, Aceton- $d_6$ )

Der Vergleich mit Literaturdaten (Mun'im, 2003) ließ keinen Zweifel darüber, dass es sich bei dieser Verbindung um 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**17**) (Trivialname: Eriodictyol-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid) handelte, das zuvor aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *Crotalaria sessiliflora* L., (Fabaceae) (Mun'im et al. 2003) und hier erstmalig aus *M. foetida* isoliert wurde.

### 4.6.3 Strukturaufklärung von Kämpferol-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (18)

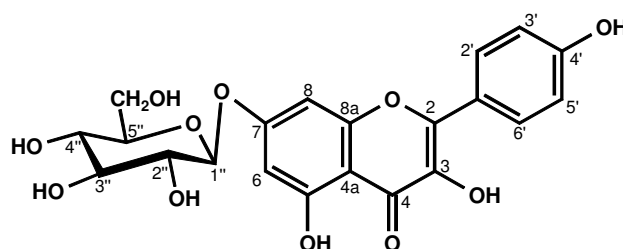


Abbildung 33 Strukturformel von Kämpferol-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (18)

Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe von FAB-Massenspektren und  $^1\text{H}$  NMR Spektren. Im (-)-FAB Massenspektrum erschien der Pseudomolpeak bei  $[\text{M-H}]^- m/z$  447, was eine Summenformel von  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$  glaubhaft machte. Die im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum auftretenden Signale bei  $\delta$  8,15 ppm (2H, *d*,  $J = 8,9$  Hz, H-2', H-6') und  $\delta$  6,98 ppm (2H, *d*,  $J = 8,9$  Hz, H-3', H-5') zeigten ein aromatisches AA'BB'-System an. Zwei weitere Dubletts bei  $\delta$  6,53 ppm (1H, *d*,  $J = 1,9$  Hz, H-8) und  $\delta$  6,29 ppm (1H, *d*,  $J = 1,9$  Hz, H-6) wiesen auf einen 1,3,4,5-tetrasubstituierten Aromaten hin. Ein Singulett bei  $\delta$  12,44 ppm (1H, *s*, 5-OH) konnte einer Hydroxygruppe an Position 5 eines Flavonderivates (Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-C-Atom) zugeordnet werden. Das Fehlen der Signale für die Methylen-Protonen am C-3 deutete daraufhin, dass sich an dieser Position eine Doppelbindung befinden musste und es sich bei dieser Verbindung um ein Flavonol-Grundgerüst handelte.

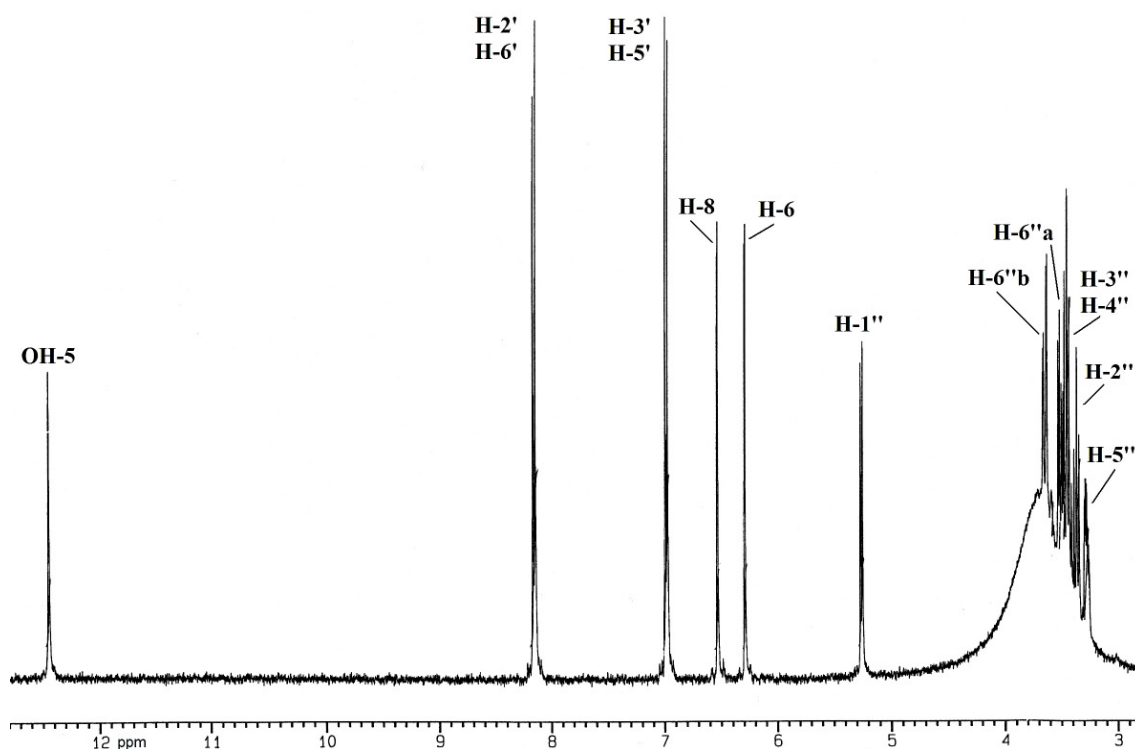


Abbildung 34  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von Kämpferol-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**18**) (400 MHz, Aceton- $d_6$ )

Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum (Abbildung 34) zeigten sich weitere Signale bei  $\delta$  3,28 ppm (1H, *m*, H-5''),  $\delta$  3,36 ppm (1H, *t*,  $J = 8,5$  Hz, H-2''),  $\delta$  3,45 ppm (2H, *m*, H-3'', H-4''),  $\delta$  3,51 ppm (1H, *dd*,  $J = 5,5$  Hz,  $J = 11,5$  Hz, H-6''a) und  $\delta$  3,64 ppm (1H, *dd*,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 11,5$  Hz, H-6''b) sowie ein Dublett bei  $\delta$  5,26 ppm (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz, H-1'') für ein anomeres Proton, die auf Zucker im Molekül hinwiesen. Die vorhandenen Daten deuteten auf die Anwesenheit einer Hexose hin. Der Vergleich mit Literaturdaten (Harbourne, 1994) konnte die Substanz (**18**) eindeutig als Kämpferol-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Trivialname: Populnin) bestätigen. Kämpferol-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**18**) wurde ebenfalls erstmalig aus *M. foetida* isoliert.

#### 4.6.4 Strukturaufklärung von 5,7-Dihydroxychromon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (19)

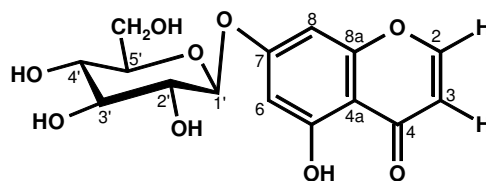


Abbildung 35 Strukturformel von 5,7-Dihydroxychromon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (19)

Zur Strukturaufklärung wurden FAB-Massenspektren und  $^1\text{H}$  NMR Spektren herangezogen. Im (+)-FAB Massenspektrum erschien der Pseudomolpeak bei  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  363, was eine Summenformel von  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_9$  wahrscheinlich machte. Die im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum (Abbildung 36) auftretenden Dubletts bei  $\delta$  6,45 ppm (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-6) und  $\delta$  6,66 ppm (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-8) deuteten auf zwei aromatische Protonen hin, die aufgrund der kleinen Kopplungskonstante in *meta*-Stellung zueinander standen. Zusammen mit dem Signal bei  $\delta$  12,72 ppm (1H, *s*, 5-OH), bedingt durch die Wasserstoffbrückenbildung zwischen der Hydroxylgruppe am C-5 mit der Carbonylfunktion am C-4 sowie den Signalen für zwei olefinische Protonen bei  $\delta$  8,14 ppm (1H, *d*,  $J = 6,0$  Hz, H-2) und  $\delta$  6,28 ppm (1H, *d*,  $J = 6,0$  Hz, H-3) konnte auf eine Chromonstruktur geschlossen werden, da weitere Signale für einen zweiten Aromaten fehlten. Im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zeigten sich weitere Signale bei  $\delta$  3,42-3,62 ppm (4H, *m*, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''),  $\delta$  3,71 ppm (1H, *dd*,  $J = 5,5$  Hz,  $J = 11,5$  Hz, H-6''a) und  $\delta$  3,91 ppm (1H, *dd*,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 11,5$  Hz, H-6''b) sowie ein Dublett bei  $\delta$  5,13 ppm (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz, H-1'') für ein anomeres Proton, die auf Zucker im Molekül hindeuteten. Der Vergleich der Daten mit denen in der Literatur (Simon et al. 1994) konnte bestätigen, dass es sich bei dieser Substanz um das 5,7-Dihydroxychromon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (19) handelte.

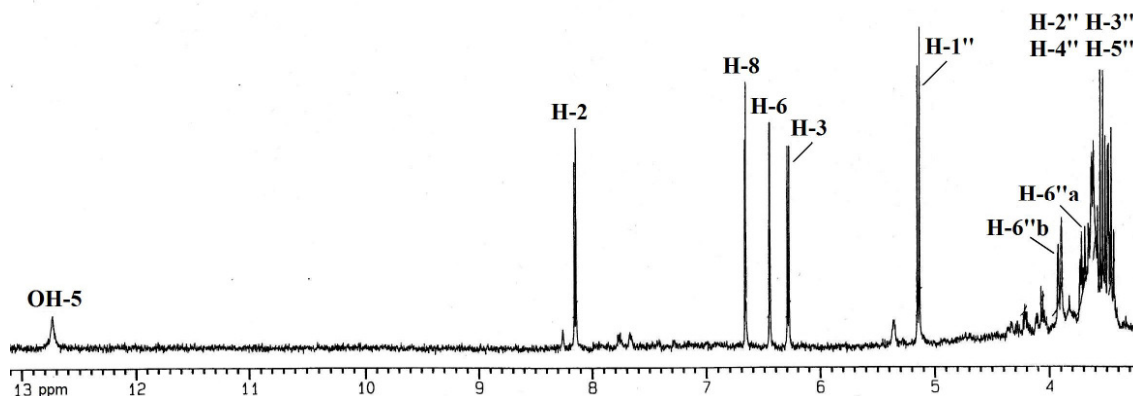


Abbildung 36  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von 5,7-Dihydroxychromon-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (19) (400 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ )

Dieses Flavonabbauprodukt wurde zuvor aus den Blüten von *Calluna vulgaris* (L.) Hull, (Ericaceae) (Simon et al. 1994) gewonnen und hier erstmalig aus *M. foetida* isoliert.

#### 4.6.5 Strukturaufklärung von 5,7-Dihydroxychromon (20)

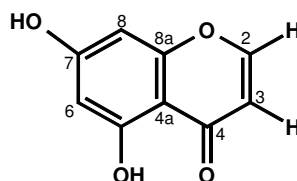


Abbildung 37 Strukturformel von 5,7-Dihydroxychromon (20)

Zur Strukturaufklärung wurden EI-Massenspektren und  $^1\text{H}$  NMR Spektren herangezogen. Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molpeak bei  $m/z$  178 und einen weiteren Peak bei  $m/z$  150, was auf die Abspaltung von CO hinwies.

Die im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum auftretenden Dubletts bei  $\delta$  6,27 ppm (1H,  $d$ ,  $J = 2,0$  Hz, H-6) und  $\delta$  6,15 ppm (1H,  $d$ ,  $J = 2,0$  Hz, H-8) deuteten auf zwei aromatische Protonen hin, die aufgrund der kleinen Kopplungskonstante in *meta*-Stellung zueinander standen. Des Weiteren zeigten sich Signale für zwei olefinische Protonen bei  $\delta$  7,93 ppm (1H,  $d$ ,  $J = 6,0$  Hz, H-2) und  $\delta$  6,14 ppm (1H,  $d$ ,  $J = 6,0$  Hz, H-3). Die Hydroxylgruppe am C-5, die die Wasserstoffbrückenbildung mit der Carbonylfunktion am C-4 bedingt, konnte im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum aufgrund des Aufnahmemediums Methanol- $\text{d}_4$  nicht nachgewiesen werden.

Der Vergleich eigener Daten mit 5,7-Dihydroxychromon-Daten aus der Literatur (Aquino et al. 1988) zeigte hervorragende Übereinstimmung und konnte bestätigen, dass es sich bei dieser Substanz um das 5,7-Dihydroxychromon handelte, das zuvor aus den Blüten von *Calluna vulgaris* (L.) Hull, (Ericaceae) (Simon et al. 1994) gewonnen und nun zum ersten Mal aus *M. foetida* isoliert wurde.

## 4.7 Hemmung des glutathionabhängigen Heminabbaus

### 4.7.1 Durchführung an isolierten Hopfeninhaltsstoffen

Die Trophozoiten verstoffwechseln bei der Merogonie und Gamogonie Hämoglobin. Aus dem Proteinanteil gewinnt das Plasmodium mittels verschiedener Proteasen durch Hydrolyse freie Aminosäuren. Das Häm ( $\text{Fe}^{2+}$ ) wird zu toxischem Ferrin-III-protoporphyrin-IX oxidiert. Dieses wird in der lysosomalen Vakuole zum untoxischen Hämozoin (= „Malariapigment“) formiert, was einen Schutz für den Parasiten bedeutet. Häm wird für den Parasiten problematisch, wenn die Umwandlung zum Hämozoin verhindert oder der Glutathion vermittelte Hämabbau inhibiert wird (Ginsburg et al. 1998).

Mit Hilfe eines *in vitro* Testverfahrens nach Steele et al. (2002) soll der Einfluß von Naturstoffen auf den glutathionabhängigen Hämabbau dargestellt werden. Anstelle des natürlichen, parasitischen Häms wird die synthetische Variante „Hemin“ verwendet. Dabei wird die Reaktion von Hemin und Glutathion in Anwesenheit von Anti-Malariawirkstoffen spektrophotometrisch bei pH 7,0 verfolgt (Abbildung 38).

Hemin besitzt bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  einen breiten Absorptionsbereich von 360 nm bis 390 nm. Dieser Bereich ändert sich durch die Zugabe von Glutathion zu einem Peak bei 364 nm. Innerhalb von 30 Minuten verringert sich dieses Maximum um etwa die Hälfte.



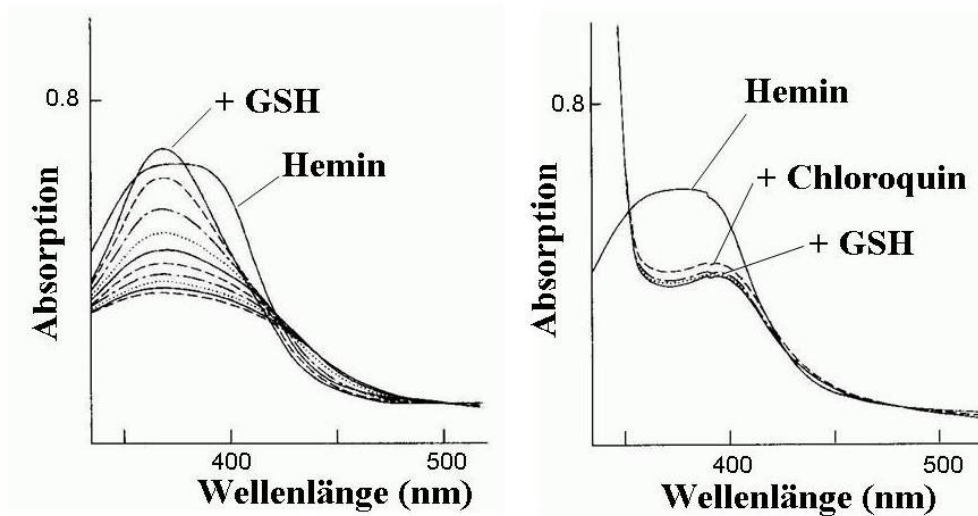


Abbildung 38 Effekt des Chloroquins auf den glutathionabhängigen Heminabbau (Steele et al. 2002)

Die Zugabe von Chloroquindiphosphat zum Hemin bewirkt durch Ausbildung eines Alkaloid-Hemin-Komplexes eine Veränderung des Heminpektrums.

Ein Peak bei 364 nm kann bei Zugabe von Chloroquindiphosphat nicht ausgebildet werden, auch ist im Verlauf von 30 Minuten keine Änderung des Absorptionsmaximums zu beobachten.

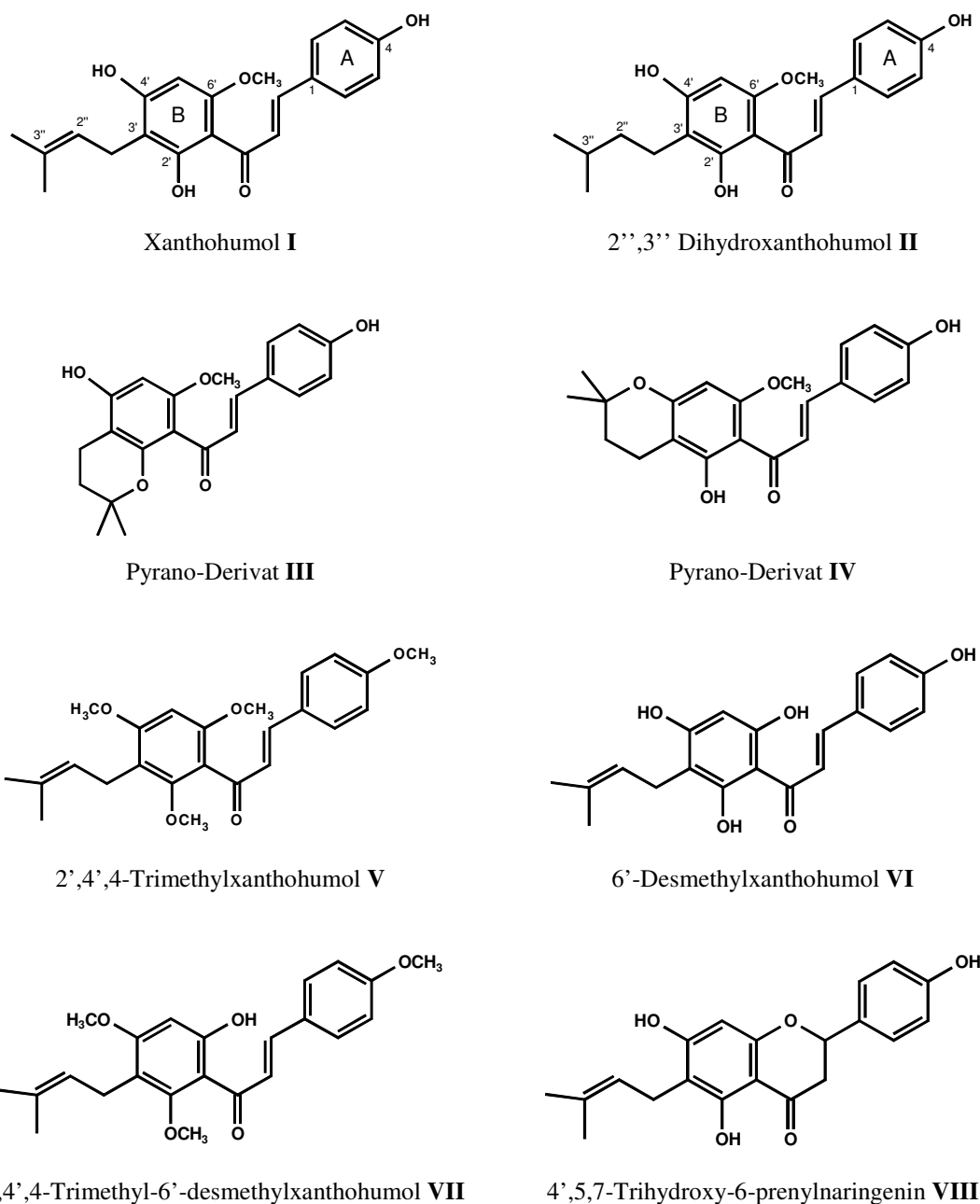
Dieses von Steele für synthetische und alkaloidische Substanzen entwickelte *in vitro* Modell sollte im Folgenden an die von mir untersuchten Naturstoffe adaptiert werden.

Die im Experimentellen Teil, Kapitel 3.2.2 aufgeführten Lösungen wurden mit Hilfe der Achtkanalpipette in die 96 well Mikrotiterplatte (flat-bottomed) gegeben und die Absorption bei 360 nm nach 1 min und nach 30 min im Plattenphotometer Tecan Spectra Fluor vermessen und anschließend die  $\Delta A_{360}$  bestimmt.

Die bekannten Anti-Malariawirkstoffe Chinin und Artemisinin dienten als Vergleich, Chloroquindiphosphat wurde als Standard herangezogen. Zur Etablierung der Methode wurden als Untersuchungssubstanzen insgesamt 8 Substanzen (Chalkone und andere natürliche oder halbsynthetische Derivate, Abbildung 39), die aus dem Hopfen isoliert worden waren, herangezogen (Hänsel et al. 1988).

Die *in vitro* antiplasmodiale Aktivität dieser 8 Substanzen wurde zuvor an einem chloroquin-sensitiven (PoW) und an einem chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stamm bestimmt (Tabelle 10, Frölich et al. 2005).

Abbildung 39 Übersicht der Hopfenchalkone und Derivate



Das Xanthohumol (I) zeigte in dem [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Incorporations-Assay die höchste Aktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten von 8,2 μM (PoW) und 24,0 μM (Dd2). Das 2'',3''-Dihydroxanthohumol II konnte einen IC<sub>50</sub>-Wert von 12,9 μM gegen den chloroquin-sensitiven (PoW) Stamm vorweisen und selbst die zwei Pyrano-Derivate (III, IV), bei denen der Prenyl-Rest einen weiteren Ring formt, zeigten antiplasmodiale Effekte mit IC<sub>50</sub>-Werten von 16,4 μM und 23,7 μM (PoW). Das 6'-Desmethylxanthohumol (VI) verfügte nur über einen moderaten Effekt mit IC<sub>50</sub>-Werten von 42,4 μM (PoW) und

92,1  $\mu\text{M}$  (Dd2). Die beiden Substanzen **V** (2',4',4-Trimethylxanthohumol) und **VII** (2',4',4-Trimethyl-6'-desmethylxanthohumol) waren inaktiv mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten über 100  $\mu\text{M}$  für beide Stämme. Das Flavanon-Derivat 4',5,7-Trihydroxy-6-prenylnaringenin (**VIII**) hatte einen moderaten antiplasmodialen Effekt gegen den chloroquin-resistenten Stamm Dd2 gezeigt ( $\text{IC}_{50}$ -Wert: 55,3  $\mu\text{M}$ ), aber keinen Effekt gegenüber dem chloroquin-sensitiven Stamm PoW ( $\text{IC}_{50}$ -Wert: > 100  $\mu\text{M}$ ).

Anhand dieser Daten war es von Interesse, inwieweit die auf antiplasmodiale Aktivität getesteten 8 Substanzen einen Effekt auf den glutathionabhängigen Heminabbau haben. In dem Testsystem des glutathionabhängigen Heminabbaus zeigten die aktiven Substanzen **I**, **II** und **IV** in einer Konzentration von 11  $\mu\text{M}$  eine Hemmung von über 60 % im Vergleich zum Chloroquindiphosphat mit 82 %. Die Substanzen **VI** und **VIII** waren sehr schwach wirksam, in dem sie den glutathionabhängigen Heminabbau um 36 % und 24 % hemmten. Die Substanzen **III**, **V** und **VII** erwiesen sich als inaktiv. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen des antiplasmodialen Assays, so stellt man eine partielle Übereinstimmung fest.

Eine Ausnahme stellte offenbar das Pyrano-Derivat (**III**) dar, da es eine Aktivität gegenüber *P. falciparum* zeigte, jedoch nicht in der Lage war, den Heminabbau zu hemmen. Derartige Substanzen, die über eine 2'-Methoxygruppe (**V**, **VII**) oder über einen 2',3'-Pyrano-Ringsystem (**III**) verfügen anstatt einer freien Hydroxylgruppe, sind offensichtlich nicht in der Lage mit Hemin zu interagieren. Desmethylxanthohumol (**VI**) und das Flavanon-Derivat (**VIII**) zeigten nur eine schwache Aktivität trotz ihrer freien Hydroxylgruppen. Möglicherweise sind zyklisierte Chalkone, wie z.B. Flavanone und Flavone nicht befähigt, aufgrund ihrer strukturellen Merkmale Hemin zu binden, da dem Grundgerüst eine gewisse Flexibilität fehlt. Das Desmethylxanthohumol (**VI**) wird in wässrigen Lösungen zu analogen Flavanonen isomerisiert (Hänsel et al. 1988), das wahrscheinlich diese schwache Aktivität im glutathionabhängigen Heminabbaustest erklärt.

Tabelle 10 Ergebnisübersicht der Hopfeninhaltsstoffe bezüglich ihrer Hemmung des glutathionabhängigen Heminabbaus und ihrer antiplasmodialen Aktivität

<b>Substanzen</b>	<b>% Hemmung<sup>a</sup> ± SD</b>	<b>PoW IC<sub>50</sub> (µM)<sup>b</sup> ± SD</b>	<b>Dd2 IC<sub>50</sub> (µM)<sup>b</sup> ± SD</b>
	<b>GSH-Heminabbau</b>	<b><i>P. falciparum</i> Stamm</b>	<b><i>P. falciparum</i> Stamm</b>
<b>I</b>	<b>60,8 ± 0,9</b>	8,2 ± 0,3	24,0 ± 0,8
<b>II</b>	<b>62,1 ± 1,3</b>	12,9 ± 0,6	17,4 ± 0,6
<b>III</b>	<b>inaktiv</b>	16,4 ± 0,9	10,7 ± 0,3
<b>IV</b>	<b>68,3 ± 1,6</b>	23,7 ± 1,5	35,0 ± 2,9
<b>V</b>	<b>inaktiv</b>	> 126	> 126
<b>VI</b>	<b>36,2 ± 2,0</b>	42,4 ± 0,3	92,1 ± 2,4
<b>VII</b>	<b>inaktiv</b>	> 131	> 131
<b>VIII</b>	<b>24,3 ± 2,1</b>	> 147	55,3 ± 2,1
<b>Chloroquin x 2 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>82,1 ± 0,5</b>	0,015 ± 0,002	0,14 ± 0,012

<sup>a</sup> getestet in 4 unabhängigen Versuchen, n = 8

<sup>b</sup> getestet in 3 unabhängigen Versuchen von C. Schubert, geb. Kraft, (Frölich et al. 2005)

#### 4.7.2 Durchführung an Rohextrakten und isolierten Substanzen aus *Momordica foetida*

Drei Rohextrakte (PE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und EtOAc) und die isolierten Reinsubstanzen aus dem Ethylacetat-Extrakt von *M. foetida* wurden ebenfalls auf eine mögliche Hemmung des Heminabbaus getestet (Tabelle 11). Nur der Ethylacetat-Rohextrakt zeigte eine Hemmung des Heminabbaus von über 88 %, und war damit aktiver als das Chloroquindiphosphat (84 %). Die lipophilen PE- und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakte wiesen eine Hemmung von 38 % bzw. 44 % auf. Das aus dem Ethylacetat-Extrakt isolierte Flavanonglykosid Eriodictyol-7-*O*-β-D-glucopyranosid (**17**) inhibierte den Heminabbau um 86 %. Das zweite Flavanonglykosid Prunin (**16**) erwies sich mit 2 % als inaktiv. Auch das Flavonolglykosid Populnin (**18**) und das Chromonglykosid (**19**) offenbarten sich als inaktiv mit Hemmungen im Bereich von 13 % und 4 %. Das Eriodictyol-7-*O*-β-D-glucopyranosid (**17**) weist eine Catechol-Grundstruktur auf, die für die Interaktion mit dem Hemin verantwortlich gemacht werden könnte.

Tabelle 11 Ergebnisübersicht von den Rohextrakten und isolierten Substanzen von *M. foetida* bezüglich ihrer Hemmung des glutathionabhängigen Heminabbaus

<b>Extrakte und Reinsubstanzen</b>	<b>% Hemmung<sup>a</sup> ± SD</b>
Ethylacetat-Extrakt	88,4 ± 0,9
Dichlormethan-Extrakt	44,1 ± 1,3
Petrolether-Extrakt	38,5 ± 1,3
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosid (Eriodictyol-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosid) ( <b>17</b> )	86,2 ± 1,6
5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosid (Prunin) ( <b>16</b> )	2,1 ± 2,4
Kämpferol-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosid (Populnin) ( <b>18</b> )	13,1 ± 2,3
5,7-Dihydroxychromen-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosid ( <b>19</b> )	4,2 ± 2,8
Artemisinin	4,1 ± 0,5
Chinin	21,2 ± 1,1
Chloroquin x 2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	84,1 ± 0,9

<sup>a</sup> getestet in 3 unabhängigen Versuchen, n = 8

#### 4.8 Die inhibitorische Aktivität gegenüber Papain

Cystein-Proteasen verschiedener Parasiten sind seit Jahren als potentielles Target für Chemotherapeutika von Interesse.

Erreger parasitären Erkrankungen verfügen in ihren Organellen über Proteasen, wie die Cystein-Proteasen Falcipain-1, 2A und 2B sowie das Falcipain-3 (*Plasmodium falciparum*), das Rhodesain (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) und das Cruzain (*Trypanosoma cruzi*), die an erregerspezifischen Prozessen beteiligt sind.

Da die Herstellung der Falcipaine sich als schwierig gestaltet und rekombinant produzierte Falcipaine kostspielig sind, wurde die Cystein-Protease Papain als Modellsubstanz verwendet, die eine Sequenzhomologie von 34 % zum Falcipain-2 aufweist. Die verwendete Cystein-Endopeptidase Papain (E.C.3.4.22.2) wird ursprünglich aus dem Milchsaft des Melonenbaumes *Carica papaya* L., Caricaceae gewonnen. Papain ist in Konzentrationen von 10 mg/mL wasserlöslich. Im natürlichen Zustand ist diese Protease nur bedingt aktiv, da ihre freien Sulfhydrylgruppen (SH-) blockiert sind. Für eine komplette Aktivierung muss eine „milde“ Reduktion vorgenommen werden, die mit reduzierenden Reagenzien, wie beispielsweise Dithiothreitol (DTT), Cystein oder Glutathion erreicht werden kann. Ein Optimum an Aktivierung wird erreicht, indem man dem Puffer EDTA-di-Na<sup>+</sup> und Dithiothreitol hinzufügt. Als hervorragender Inhibitor für Papain wurde das E-64 gewählt, das ursprünglich 1978 von Hanada und Mitarbeitern aus *Aspergillus japonicus* isoliert wurde (Hanada et al. 1978). Bei dem E-64 handelt es sich um einen potenten und irreversiblen Inhibitor, der Papain, aber auch andere Cystein-Proteasen, wie z.B. Cathepsin B, H und L kovalent bindet (Drahl et al. 2005).

Dank der Kooperationspartner Prof. James H. McKerrow und Elizabeth Hansell im Sandler Center for Basic Research in Parasitic Diseases an der Universität in Kalifornien, San Francisco, USA konnten 5 Hopfeninhaltsstoffe (**I**, **II**, **V**, **VI**, **VII**) zusätzlich an den parasitären Cystein-Proteasen Cruzain und Rhodesain überprüft werden.

Im Papain-Micro-Assay erwies sich das 6'-Desmethylxanthohumol (**VI**) als auffällig gut mit der stärksten inhibitorischen Eigenschaft gegenüber Papain (70,8 %, Tabelle 12), obwohl kaum antiplasmodial wirksam (Tabelle 13). Interessanterweise wurde

dieses Ergebnis durch die Testergebnisse aus San Francisco gegenüber den beiden parasitären Cystein-Proteasen Cruzain (89 %) und Rhodesain (84 %) bestätigt (s. Tabelle 12). Es müssten abschließend eine große Anzahl an Untersuchungen mit unterschiedlichen Substanzen gemacht werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten zu können. Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang auch die Verwendung von Falcipain-2A als Cystein-Protease.

Tabelle 12 Ergebnisübersicht Hopfeninhaltsstoffe und ihre Hemmwirkung in % auf Papain, Cruzain und Rhodesain

<b>Substanzen</b>	Papain <sup>a,b</sup> Hemmung in % ± SD	Cruzain <sup>c</sup> Hemmung in %	Rhodesain <sup>c</sup> Hemmung in %
<b>I</b>	69,6 ± 3,1	16	43
<b>II</b>	43,0 ± 2,7	11	56
<b>V</b>	54,1 ± 10,0	keine Hemmung	28
<b>VI</b>	70,8 ± 4,3	89	84
<b>VII</b>	41,9 ± 5,9	5	33
<b>Phloretin</b>	52,7 ± 5,3	n.b.	n.b.
<b>Chloroquin x 2 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	19,9 ± 1,2	n.b.	n.b.

<sup>a</sup> getestete Substanz-Konzentration 100 µg/mL

<sup>b</sup> getestet in 4 unabhängigen Versuchen, n = 8

<sup>c</sup> getestete Substanz-Konzentration 1µM;

getestet von E. Hansell im Mc Kerrow Lab Sandler Center for Basic Research in Parasitic Diseases, University of California in San Francisco, USA

n.b. = nicht bestimmt

Das Xanthohumol (**I**) folgte an zweiter Position mit einer Hemmwirkung von 69,6 % gegenüber Papain (Tabelle 12). Betrachtet man die Hemmeffekte gegenüber Cruzain (16 %) und Rhodesain (43%), findet sich keine Übereinstimmung. Stellt man dagegen einen Vergleich zwischen dem Ergebnis der Papain-Inhibition mit den bekannten antiplasmodialen Aktivitäten an (Tabelle 13), so existiert eine gewisse Übereinstimmung. Das 2',4',4'-Trimethylxanthohumol (**V**) konnte die Papain-Aktivität um 54,1 % hemmen, zeigte gegenüber Cruzain keinen Effekt und gegen Rhodesain nur 28 % Hemmung (Tabelle 12). Als antiplasmodial aktiv erwies sich (**V**) nicht (Tabelle 13). Das käuflich erworbene Chalkon Phloretin war von Interesse, da es über gute antiplasmodiale Aktivitäten (Tabelle 13) verfügte. Papain wurde durch das Phloretin nur um 52,7 % gehemmt, ein Resultat, das etwas erstaunte.

2'',3''-Dihydroxanthohumol (**II**) konnte im Papain-Micro-Assay eine Hemmung von 43,0 % bewirken, hatte dagegen nur einen geringen Hemmeffekt von 11 % auf das

Cruzain, auf das Rhodesain jedoch eine Hemmung von 56 % (Tabelle 12). Von dieser Substanz (**II**) musste aufgrund der guten antiplasmodialen Aktivitäten (Tabelle 13) gegenüber den chloroquin-sensitiven (PoW) und chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stämmen ein entsprechender Effekt erwartet werden. 2', 4', 4-Trimethyl-6'-desmethylxanthohumol (**VII**) hatte einen hemmenden Einfluß von 41,9 % auf das Papain, zeigte gegenüber Cruzain (5 %) praktisch keinen Effekt und hemmte Rhodesain nur um 33 %. In Anbetracht der Tatsache, das Substanz (**VII**) kaum antiplasmodial aktiv war (Tabelle 13), ist das Gesamtergebnis nicht verwunderlich.

Tabelle 13 Papain-Hemmung in % sowie antiplasmodiale Aktivität der Hopfensubstanzen

Substanzen	Papain <sup>a,b</sup> Hemmung in % ± SD	PoW IC <sub>50</sub> (µM) <sup>c</sup> ± SD	Dd2 IC <sub>50</sub> (µM) <sup>c</sup> ± SD
<b>I</b>	69,6 ± 3,1	8,2 ± 0,3	24,0 ± 0,8
<b>II</b>	43,0 ± 2,7	12,9 ± 0,6	17,4 ± 0,6
<b>V</b>	54,1 ± 10,0	> 126	> 126
<b>VI</b>	70,8 ± 4,3	42,4 ± 0,3	92,1 ± 2,4
<b>VII</b>	41,9 ± 5,9	> 131	> 131
<b>Phloretin</b>	52,7 ± 5,3	28,1 ± 0,25	31,72 ± 0,3
<b>Chloroquin x 2 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	19,9 ± 1,2	0,015 ± 0,002	0,14 ± 0,012

<sup>a</sup> getestete Substanz-Konzentration 100 µg/mL  
<sup>b</sup> getestet in 4 unabhängigen Versuchen, n = 8  
<sup>c</sup> getestet in 3 unabhängigen Versuchen von C. Schubert, geb. Kraft, (Frölich et al. 2005)

Der potente Anti-Malaria-Wirkstoff Chloroquindiphosphat wies nur eine inhibitorische Aktivität von 19,9 % gegenüber Papain auf. Dieses Resultat überrascht nicht, da das Chloroquindiphosphat an der Häm-Detoxifikation in der Nahrungsvakuole und im Cytosol beteiligt ist und nicht auf die Cystein-Proteasen in der Nahrungsvakuole einwirken soll.