

5 Experimenteller Teil

5.1 Pflanzenmaterial

5.1.1 Bereitstellung des Pflanzenmaterials aus El Salvador

Das untersuchte Pflanzenmaterial wurde von M. A. Hernández und R. A. Ibarra (ProBioTec, San Salvador, El Salvador) in El Salvador gesammelt. Die Pflanzenteile wurden für einige Tage luftgetrocknet und nachfolgend in Plastiktüten gelagert. Die Pflanzenarten wurden anhand von Belegexemplaren in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. W. G. Berendsohn (Botanischer Garten und Botanisches Museum, FU Berlin) identifiziert. Herbarbelege befinden sich in Missouri Botanical Garden (MO), Herbario Jardín Botánico La Laguna, El Salvador (LAGU), Instituto Tropical de Investigaciones Científicas, Universidad de San Salvador, El Salvador (ITIC), Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem (B) und im National Herbarium of Mexico (MEXU).

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

Die Blätter von *C. tenuifolia* wurden im Oktober 1996 in La Palma, Chalatenango gesammelt (PBT230).

Momordica charantia L. (Cucurbitaceae):

Oberirdische Pflanzenteile von *M. charantia* wurden im Juni 1996 an der Laguna de Chanmico, San Juan Opico, La Libertad gesammelt (PBT169).

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae):

Die Blätter von *J. curcas* wurden im April 1996 in Rosario de Mora, San Salvador gesammelt (PBT024).

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

Die Blätter von *S. saman* wurden im Mai 1995 in San Pedro Mashuat, La Paz gesammelt (PBT032).

Hymenaea courbaril L. (Fabaceae):

Die Rinde (PBT066) und die Blätter (PBT066a) von *H. courbaril* wurden im Juni 1995 in Calderitas, Apastepeque, San Vicente gesammelt.

Moringa oleifera LAM. (Moringaceae):

Die Blätter von *M. oleifera* wurden im Februar 1998 in Comalapa, La Paz gesammelt (PBT331).

Exostema mexicanum GRAY (Rubiaceae):

Die Zweige und Rindenteile von *E. mexicanum* wurden im Department of Ahuachapán (PBT 275) gesammelt.

5.1.2 Bereitstellung des Pflanzenmaterials aus Ghana

Das untersuchte Pflanzenmaterial wurde von Dr. D. Abbiw und Mitarbeitern (Department of Botany, University Legon–Accra, Ghana) in Ghana in den Gebieten Greater Accra und Upper East Region gesammelt. Die Pflanzenarten wurden anhand von Belegexemplaren von Dr. D. Abbiw identifiziert. Sämtliche Pflanzenteile wurden für einige Tage luftgetrocknet und nachfolgend in Plastiktüten gelagert. Herbarbelege befinden sich im Herbarium des Department of Botany (University Legon–Accra), Belegexemplare am Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie (FU Berlin).

Gomphrena celosioides MART. (Amaranthaceae):

Oberirdische Pflanzenteile von *G. celosioides* wurde im März 2000 in Accra–Legon gesammelt (Herbarbeleg: GC 39071).

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

Rindenteile von *P. nitida* wurden im Februar 2000 von Dr. Bruce (Phytotherapeut in Accra–North Kaneshie) erhalten. Das Pflanzenmaterial wurde von Dr. D. Abbiw identifiziert (Herbarbeleg: GC 39064).

Pergularia daemia (FORSSK) CHIOV. [syn.: *P. extensa* (R. BR.) N. E. BR.], (Asclepiadaceae):

Oberirdische Pflanzenteile von *P. daemia* wurden im April 2001 im Department of Botany (University Legon–Accra) gesammelt (Herbarbeleg: GC 39070).

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

Oberirdische Pflanzenteile von *E. sonchifolia* wurden im März 2000 in Accra–Legon gesammelt (Herbarbeleg: 39072).

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

Blätter und Wurzeln von *M. pyrifolia* wurden im März 2000 und im April 2001 in Aburi (Akuapem–Region) gesammelt (Herbarbeleg: GC 47681).

Adansonia digitata L. (Bombaceae):

Reife Früchte von *A. digitata* wurden im April 2001 in Navrongo (Upper East Region) erhalten.

Euphorbia hirta L. (Euphorbiaceae):

Das Kraut von *E. hirta* wurde im März 2000 in Greater Accra Region gesammelt (Herbarbeleg: GC 39068).

Phyllanthus niruroides MÜLL. ARG. (Euphorbiaceae):

Oberirdische Pflanzenteile von *P. niruroides* wurden im März 2000 in Greater Accra Region gesammelt (Herbarbeleg: GC 39069).

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

Reife, getrocknete Früchte von *T. tetraptera* wurden im Makola–Market (Accra) erhalten und von Dr. D. Abbiw identifiziert (Herbarbeleg: 39065).

Mitragyna inermis (WILLD.) KUNTZE (Rubiaceae):

Blätter, Zweigrinde und Wurzeln von *M. inermis* wurden im März 2000 in Greater Accra Region gesammelt (Herbarbeleg: GC 39066).

Mitragyna stipulosa (DC.) KUNTZE (Rubiaceae):

Blätter, Zweigrinde und Wurzeln von *M. stipulosa* wurden im März 2000 in Greater Accra Region gesammelt (Herbarbeleg: GC 39067).

5.1.3 Anzucht von *Crotalaria laburnifolia* L. (Fabaceae)

Als Ausgangsmaterial für die Anzucht von *C. laburnifolia* L. dienten Samenmaterial der Pflanzenart, welches 1999 von Frau Dr. B. Onegi, Department of Pharmacy, Makerere University Kampala (Uganda), in Uganda gesammelt und im September 1999 dem Arbeitskreis zur Verfügung gestellt wurde. Die Anzucht erfolgte von April 2000 bis Juni 2001 im beheizten Gewächshaus des Instituts für Pharmazie, Freie Universität Berlin. Die Kultivierung von *C. laburnifolia* wurde von S. Ott durchgeführt. Alle geernteten Pflanzenteile wurden nach der Ernte an der Luft oder bei 30 °C im Trockenschrank getrocknet. Ein Herbarbeleg befindet sich am Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie (FU Berlin).

5.2 *In-vitro*–Testsystem gegen *Plasmodium falciparum*

Die Kultivierung von *P. falciparum* und die Durchführung des antiplasmodialen *in-vitro*–Testsystem erfolgte am Institut für Tropenmedizin, Medizinische Fakultät Charité, Humboldt Universität zu Berlin. Die semi–automatische Zellernte und die Messung der

Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler wurden in Laboratorien des Arbeitskreises Prof. Schäfer–Korting am Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin durchgeführt.

Waschmedium (1 l): – RPMI 1640 Medium (GIBCOBRL)

- NaHCO₃ (2,33 g)
- Glucose (2,00 g)
- Gentamycin (0,04 g)

Komplettmedium: – Waschmedium + 10 % Humanserum

Testmedium: – Komplettmedium + Erythrozytensuspension (= Erythrozyten ohne Parasiten)

Die *in-vitro*-Testung gewonnener Pflanzenextrakte, Fraktionen und Verbindungen gegenüber *Plasmodium falciparum* erfolgte durch Messung des Hypoxanthin-Einbaus. Hypoxanthin ist ein essentieller Metabolit für die Nukleinsäuresynthese von *P. falciparum*. Der Einbau Tritiummarkierten Hypoxanthins in die Parasiten kann als Maß für die DNA-Syntheseleistung und somit die Vitalität von Plasmodienkulturen verwendet werden. Gemessen wird der Grad der Aufnahme des markierten Metaboliten in die Parasiten bei unterschiedlichen Konzentrationen einer Testsubstanz. In Verbindung mit der Kultivierung in 96-Loch-Mikrotiterplatten, semi-automatischer Zellernte und Messung der Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler ergibt sich ein Verfahren, das eine quantitative Messung der antiparasitären Aktivität von Testsubstanzen gegen *P. falciparum in vitro* ermöglicht (Desjardins *et al.*, 1979). (Im Zusammenhang mit der Kultivierung in 96-Loch-Mikrotiterplatten sind die Begriffe 'Loch', 'well' und 'Kavität' gebräuchlich.)

Kultur: Die Kultivierung von *P. falciparum* erfolgte nach dem Protokoll von Trager und Jensen (1976): Erythrozytäre Stadien eines Chloroquin-sensiblen Stammes [PoW] und eines multiresistenten Klons [Dd2] von *P. falciparum* wurden in humanen Erythrozyten (Hämatokrit 5%, Parasitämie 1–5%) in geeignetem Komplettmedium unter einem Gasgemisch (90% N₂, 5% O₂, 5% CO₂) bei 37°C in 50 ml-Kulturflaschen gehalten. Nach Sedimentation der Erythrozyten wurde der Überstand täglich entfernt und die entsprechende Menge an Komplettmedium hinzugegeben (Mediumwechsel). Bei Bedarf (Parasitämie > 10%) wurde die Kultur verdünnt. Die Parasitämie wurde durch mikroskopische Auswertung von Ausstrichen (Giemsa-Färbung, 'dünner Film') kontrolliert.

Das Kompletmedium bestand aus Waschmedium, welches mit 10% Humanserum versetzt wurde. Die Erythrozyten (Blutgruppe A, Rh⁺) wurden aus Erythrozytenkonzentraten (Eigenblutspender) gewonnen, und mit Waschmedium im Verhältnis 1:1 verdünnt und bei 4°C gelagert (max. 4 Wochen). Das verwendete Humanserum wurde aus dem Plasma des Eigenblutspenders aufbereitet.

Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀-Wert): Die jeweiligen Konzentrationen an Testsubstanz, die zu einer 50%igen Reduktion des Parasitenwachstums führen (IC₅₀-Wert), wurden im Abgleich zu den Messungen der Negativkontrollen (je 150 µl Erythrozytensuspension, 2,5 % Hämatokrit) bestimmt. Hierzu wurden Pflanzenrohextrakte als Triplikate auf beiden Stämmen (c₀=100 µg/ml), Fraktionen als Duplikate auf einem Stamm (c₀=100 µg/ml) und isolierte Verbindungen als Triplikate auf beiden Stämmen (c₀=50 µg/ml) getestet. Für die Screeningverfahren wurden zuerst sämtliche Pflanzenrohextrakte als Triplikate auf einem Stamm bei einer Fixkonzentration von 50 µg/ml getestet. Rohextrakte, die bei dieser Konzentration die halbmaximale Hemmkonzentration überschritten hatten, wurden als inaktiv angesehen (O'Neill *et al.*, 1985).

Bei Rohextrakten, die eine Aktivität aufwiesen (IC₅₀ < 50 µg/ml), wurde anschließend in der unten beschriebenen Weise eine IC₅₀-Bestimmung vorgenommen. Die monomeren Ergoline und semisynthetischen N,N'-verknüpften Oligomere wurden als Triplikate auf beiden Stämmen (c₀=5 µg/ml) in drei unabhängigen Experimenten getestet.

Zur Beginn eines Tests wurden Stammlösungen der Substanzen von 20 mg/ml in DMSO, bzw. bei wässrigen Rohextrakte in Waschmedium, hergestellt. Die Stammlösungen wurden je nach gewählter Anfangskonzentration mit dem Waschmedium verdünnt und serielle Verdünnungsreihen angefertigt. (Bsp.: 25 µl DMSO-Stammlösung + 975 µl Waschmedium ergaben eine Konzentration von 500 µg/ml, beim Übertragen auf die 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde nochmals 1:10 verdünnt, was einer Anfangskonzentration von 50 µg/ml entsprach). In der Anfangsreihe (B-Reihe) wurden 270 µl Testmedium (0,5% Parasitämie, 2,5% Hämatokrit) und 30 µl der verdünnten Stammlösung vorgelegt. In die restlichen Reihen wurden jeweils 150 µl Testmedium pipettiert. Zur Anfertigung der Verdünnungsreihen wurde ausgehend von der B-Reihe im Verhältnis 1:1 verdünnt. Zusätzlich wurden 5 Positivkontrollen (je 150 µl Testmedium) und 5 Negativkontrollen angefertigt. Nach 24 Stunden Inkubation im Kerzentopf wurden zu jedem Kulturansatz 20 µl [³H]-Hypoxanthinhaltiges Kompletmedium (0,5 µCi/well) zugegeben. Nach einer

anschließenden Inkubation von 18 Stunden wurden die Zellen durch Absaugen mittels eines Zell-Harvesters (INOTECH) auf Glasfaser-Membranen geerntet, zweimal gewaschen und die Radioaktivität des inkorporierten [^3H]-Hypoxanthins der Einzelkulturen im Flüssigszintillationszähler (MicroBeta-Counter INOTECH) gemessen. Die IC_{50} -Werte wurden durch graphische Interpolation ermittelt: $(1 - [\text{cpm im Testmedium} / \text{cpm in der Negativkontrolle}]) \times 100$. Bei Rohextrakten, Fraktionen und isolierten Naturstoffen erfolgte die Angabe des IC_{50} -Wertes auf eine Dezimalstelle. Bei den monomeren Ergolinen und semisynthetischen N,N' -verknüpften Oligomeren wurde der IC_{50} -Werte auf zwei Dezimalstellen angegeben. Tabelle 25 gibt für die bekannten Malariamittel Artemisinin, Chininsulfat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und Chloroquin $\times 2 \text{ H}_3\text{PO}_4$ die erhaltenen IC_{50} -Werte in unserem Testsystem wider.

Tab. 25:

In-vitro*-Aktivität von Artemisinin, Chininsulfat und Chloroquin $\times 2 \text{ H}_3\text{PO}_4$ gegenüber *Plasmodium falciparum

Testsubstanz	IC_{50} -Werte ^a			
	PoW		Dd2	
	$\mu\text{g/ml}$	μM	$\mu\text{g/ml}$	μM
Artemisinin	0,001	0,003	0,004	0,015
Chininsulfat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,031	0,038	0,092	0,115
Chloroquin $\times 2 \text{ H}_3\text{PO}_4$	0,008	0,015	0,073	0,140

^a: getestet als Triplikat

5.2.1 Modifizierung des Testsystems

5.2.1.1 72–Stunden–Test

Da prinzipiell die Kulturen nicht synchronisiert wurden, führte man zur Bestimmung der IC_{50} –Werte aller lipophiler und methanolischer Rohextrakte von *E. mexicanum*, *C. tenuifolia*, *M. pyrifolia* zusätzlich einen 72–Stunden–Test durch (Benoit *et al.*, 1995). Somit konnte sichergestellt werden, dass die Pflanzenrohextrakte mit allen morphologischen Stadien von *P. falciparum* interagieren konnten. Der Naturstoff 6*E*,10*E*,14*E*–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (**17**) wurde ebenfalls dem 72–Stunden–Test zugeführt. Die Zugabe des [3 H]–Hypoxanthinhaltigen Komplettmediums erfolgte nach 56stündiger Exposition der Extrakte bzw. Testsubstanzen gegenüber dem Parasiten.

5.2.1.2 Testung von 3',4'–Dihydroxy–5,7–dimethoxy–4–phenylcumarin (**1**) in Gegenwart von $FeCl_3 \times 6 H_2O$

Im Rahmen der Untersuchungen von *E. mexicanum* wurde die Hemmwirkung von 3',4'–Dihydroxy–5,7–dimethoxy–4–phenylcumarin (**1**) in Gegenwart von $FeCl_3 \times 6 H_2O$ im antiplasmodialen Testsystem untersucht. Von der Substanz $FeCl_3 \times 6 H_2O$ wurden 6,7 mg in 100 ml dest. H_2O gelöst. Zur Herstellung der verdünnten Stammlösung wurden 1 ml der wässrigen $FeCl_3$ –Lösung (m/V) auf 100 ml Waschmedium gegeben und steril filtriert. Die Anfangskonzentration zur Bestimmung des IC_{50} –Wertes des reinen Phenylcumarins wurde mit 50 μ g/ml festgelegt, dies entspricht einer molaren Konzentration von 159 μ M. In einem zweiten Versuch wurden zu dem Phenylcumarin **1** 10 μ l der verdünnten Stammlösung von $FeCl_3 \times 6 H_2O$ zugegeben und der IC_{50} –Wert bestimmt. Desweiteren wurden sechs zusätzliche Positivkontrollen mit jeweils 150 μ l Testmedium und 10 μ l der verdünnten Stammlösung von $FeCl_3 \times 6 H_2O$ durchgeführt.

5.2.1.3 Testung von Flavon-Fettsäure-Gemischen

Im Rahmen der Untersuchungen von *C. tenuifolia* wurden Flavon-Fettsäure-Gemische verschiedener Konzentrationen dem antiplasmodialen Test zugeführt. Die jeweilige Anfangskonzentration betrug 50 µg/ml. Als Testsubstanzen wurden Apigenin (MERCK), 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (**10**) und Palmitinsäure (MERCK) verwendet.

Tab. 26:

Konzentrationen der Flavon-Fettsäure-Gemische unter Verwendung von Apigenin, Genkwanin (10**) und Palmitinsäure**

Getestetes Substanzverhältnis (m/m)		Anfangskonzentration Flavon		Anfangskonzentration Palmitinsäure	
		µg/ml	µM	µg/ml	µM
Apigenin		50	185		
Palmitinsäure				50	195
Apigenin : Palmitinsäure	2 : 1	50	185	25	98
	1 : 1	50	185	50	195
	1 : 2	50	185	100	391
Genkwanin		50	176		
Genkwanin : Palmitinsäure	2 : 1	50	176	25	98
	1 : 1	50	176	50	195
	1 : 2	50	176	100	391

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

Von 6E,10E,14E–Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17) wurde die Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum* in Gegenwart von Chloroquin untersucht (siehe Kap. 2.5.7.2.). Der gesamte Versuch wurde gegenüber dem Chloroquin–resistenten Stamm Dd2 durchgeführt. Für diesen Test wurde Chloroquin x 2 H₃PO₄ in Waschmedium gelöst (Anfangskonzentration $c_0 = 1,0 \mu\text{g/ml}$), um eine optimale Löslichkeit der Substanz gewährleisten zu können. Zunächst wurden die IC₅₀–Werte von 17 (Anfangskonzentration $c_0 = 12,5 \mu\text{g/ml}$) und von Chloroquin x 2 H₃PO₄ bestimmt. Anschließend wurde eine Konzentration ausgewählt, bei der Chloroquin allein nicht mehr wirksam ist ($c = 0,01 \mu\text{g/ml}$). In einem zweiten Versuch wurde daraufhin der IC₅₀–Wert von 17 bei einer Anfangskonzentration von $c_0 = 12,5 \mu\text{g/ml}$ unter Zugabe von $0,01 \mu\text{g/ml}$ Chloroquin pro Kavität bestimmt. Es wurden sechs zusätzliche Positivkontrollen mit jeweils $150 \mu\text{l}$ Testmedium und $0,01 \mu\text{g/ml}$ Chloroquin x 2 H₃PO₄ durchgeführt. Der gesamte Test wurde gegenüber dem Chloroquin–resistenten Klon Dd2 durchgeführt.

5.3 Untersuchung zur Zytotoxizität

5.3.1 *In-vitro*–Testung der isolierten Naturstoffe gegenüber der Zelllinie ECV 304

Die *in-vitro*–Zytotoxizitätstests der isolierten Inhaltsstoffe aus *E. mexicanum*, *C. tenuifolia* und *M. pyrifolia* wurden von Dr. Beyer, Institut für Pharmazie, Humboldt Universität zu Berlin durchgeführt.

Kulturmedium (11):

- Medium 199 mit Eagle’s Salzen mit $2,2 \text{ g/l NaHCO}_3$ und stabilem Glutamin (SEROMED)
- 10 % Fetales Kälberserum

5%ige MTT–Lösung (m/V):

- MTT–Reagenz (3–[4,5–Dimethylthiazol–2–yl]–2,5–diphenyltetrazoliumbromid)
- PBS–Puffer (phosphate buffer saline, pH = 7)

Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte gegenüber der humanen Endothelzelllinie ECV 304. Dieser *in-vitro*–Zellwachstumstests wurde mittels des MTT–Tests ausgewertet.

Verschiedene Dehydrogenasen sind in der Lage Tetrazolium-Salze wie MTT umzusetzen. Deshalb ist das MTT-Reagenz dazu geeignet, die Lebensfähigkeit von Zellen zu bestimmen (Slater *et al.*, 1963). Die MTT-Ringöffnung erfolgt bei allen metabolisierenden lebenden Zellen in den Mitochondrien, jedoch nicht bei Erythrozyten oder toten Zellen. Somit ist der Gehalt an gebildetem Formazan direkt proportional der Anzahl der lebenden Zellen in einer homogenen Zellkultur. Die Kultivierung und Testung erfolgte nach dem Protokoll von Mosmann (1983).

Kultur: In 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden humane Endothelzellen im Kulturmedium bei 37 °C unter CO₂-Atmosphäre (5 %) kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einer Anzahl von ca. 1000–1500 Zellen pro Kavität gezüchtet.

Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀-Wert): Zur Herstellung der Stammlösungen wurden alle Testsubstanzen in Aceton bzw. DMSO gelöst. 24 Stunden nach der Einsaat der Zellen erfolgte die Zugabe der verdünnten Stammlösung. Im ersten Testansatz wurden folgende Anfangskonzentrationen gewählt: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml. Im zweiten Testansatz wurde der Konzentrationsbereich nochmals entsprechend eingengt. In der Regel wurden bei ausreichender Substanzmenge 4 Bestimmungen je 8 Messwerten pro Konzentration durchgeführt. Nach 4 Tagen wurde die Kultivierung abgebrochen und die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Hierzu wurden 40 µl einer frisch hergestellten MTT-Lösung pro Kavität zugegeben und die gesamte 96-Loch-Mikrotiterplatte für 3 min auf einem Schüttelgerät geschüttelt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde pro Kavität das überstehende Kulturmedium abgezogen. Da das violett gefärbte Formazanprodukt im Kulturmedium nur bedingt löslich ist, erfolgte die Zugabe von DMSO um gebildete Kristalle in Lösung zu bringen. Hierzu wurden 100 µl DMSO pro Kavität pipettiert und die gesamte 96-Loch-Mikrotiterplatte für 15 min geschüttelt. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung mittels eines "ELISA plate reader" bei 580 nm gegen eine Referenzmessung bei 620 nm. Die Mittelwertbestimmung der erhaltenen Daten erfolgte von jeweils acht parallel laufenden Testansätzen pro Konzentration. Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) wurden graphisch ermittelt durch lineare Regression. Für alle getesteten Verbindungen wurden die zytotoxische Wirkung wie folgt interpretiert:

IC ₅₀ -Werte ≤ 30,0 µM:	zytotoxisch,
IC ₅₀ -Werte < 100,0 µM:	moderate Zytotoxizität,
IC ₅₀ -Werte > 100,0 µM:	geringfügig zytotoxisch und
IC ₅₀ -Werte > 300,0 µM:	kein zytotoxischer Effekt.

5.3.2 *In-vitro*-Testung der Ergolinderivate gegenüber der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3

Die *in-vitro*-Testung der Ergolinderivate zur Bestimmung des zytotoxischen Effekts wurde von Dr. Ulrichova und Mitarbeitern (Institut für Medizinische Chemie, Palacky Universität, Olomouc, Tschechische Republik) durchgeführt.

Medium:

- Medium D-5921 (DULBECCO)
- 10 % Fetales Kälberserum
- 100 U/ ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

5%ige MTT-Lösung (m/V):

- MTT-Reagenz (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
- PBS-Puffer (phosphate buffer saline, pH = 7)

Die Zytotoxizität der getesteten Ergolinderivate wurde an der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 untersucht. Die Auswertung des *in-vitro*-Zellwachstums erfolgte mit Hilfe des MTT-Tests. Die Zelllinie NIH 3T3 wurde von der European Collection of Cell Cultures (CAMR, Salisbury, UK) erhalten. Die Zellen wurden bei 37°C unter CO₂-Atmosphäre (5%) in DULBECCO's Medium kultiviert. Zur Herstellung der Stammlösungen wurden alle zu testenden Substanzen mit DMSO zu den jeweiligen Endkonzentrationen (0,1, 0,5, 1, 10, 25, 50, 75 und 100 µM) verdünnt. Die Fibroblastenzellen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten bis zu einer Dichte von ca. 10000 Zellen pro Kavität gezüchtet. Bei dieser Zelldichte wurde die Kultur für 24 h gehalten. Anschließend erfolgte die Zugabe der Stammlösungen. Nach 24 h wurden das Medium gewechselt und 100 µl MTT-Reagenz pro Kavität hinzugefügt. Nach 3 h wurden das

Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 min in 1 ml 1%iger (V/V) ammoniakalischer DMSO-Lösung lysiert. Das Lysat wurde 1:20 mit 1%iger (V/V) ammoniakalischer DMSO-Lösung verdünnt und die Absorption bei 540 nm gemessen. Als Kontrollwert wurde DMSO + 1 % NH₃ (V/V) vermessen. Die Messwerte wurden auf den Kontrollwert bezogen ($100 \times A_{\text{Testsubstanz}} / A_{\text{Kontrollwert}}$) und prozentual angegeben. Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) wurden graphisch ermittelt durch lineare Regression. Die Angabe der Standardabweichung erfolgte mittels des Dunnett's Tests (Varianzanalyse).

5.4 Log P- und log D-Wert-Berechnung

Alle log P-Werte und log D-Werte wurden mit Hilfe der Software: "log P-Suite[®] ACD" (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Kanada) von Frau Dr. Ganzer, Abteilung Forschungsphysikochemie der Schering AG Berlin, erstellt.

5.5 Phytochemische Methoden

5.5.1 Chromatographie

Alle eingesetzten Lösemittel hatten p. a. (pro analysi) Qualität bzw. wurden vor ihrer Verwendung destilliert. Es wurde ausschließlich dest. H₂O verwendet.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen (DC)

Es wurden analytische und präparative Dünnschichtchromatographien durchgeführt. Lagen in einem zu trennenden Gemisch Substanzgruppen vor, die sich in ihrem Adsorptions- oder Verteilungsverhalten kaum unterschieden (fast identische R_F-Werte), wurde die Mehrfach-Entwicklung angewandt. Bei diesem speziellen Verfahren der DC-Entwicklung wird mehrmals mit dem gleichen Laufmittel entwickelt. Zwischen jeder Entwicklung muß das Laufmittel von der Schicht abgedampft sein, um wieder erneut kapillar durchwandern zu können (Stahl, 1967). Mit Hilfe dieser Methode können auch sich überlagernde Banden voneinander getrennt werden.

Allgemeine Bedingungen:

- eindimensionale Entwicklung
- Stationäre Phase: DC-Alufolie Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0,2 mm, MERCK)

- Kammersättigung
- Fließhöhe: 10 cm

Laufmittelsysteme:

LM _{DC} 1:	Cyclohexan : EtOAc (3 : 7, V/V)
LM _{DC} 2:	Cyclohexan : EtOAc (1 : 1, V/V)
LM _{DC} 3:	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O (70 : 30 : 3, V/V/V)
LM _{DC} 4:	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O (60 : 10 : 1, V/V/V)
LM _{DC} 5:	CHCl ₃ : EtOAc (9 : 1, V/V)
LM _{DC} 6:	PE : EtOAc (3 : 1, V/V)
LM _{DC} 7:	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (10 : 1, V/V)
LM _{DC} 8:	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (15 : 1, V/V)
LM _{DC} 9:	PE : EtOAc (2 : 1, V/V)
LM _{DC} 10:	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (20 : 1, V/V)
LM _{DC} 11:	Cyclohexan : CHCl ₃ : MeOH (5 : 3 : 45 : 2, V/V/V)
LM _{DC} 12:	PE : EtOAc (1 : 1, V/V)
LM _{DC} 13:	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (60 : 1, V/V)

Detektion:

Die Chromatogramme wurden zunächst im sichtbaren und im UV-Licht ausgewertet. Es erfolgte die Markierung der bei 366 nm fluoreszierenden Verbindungen und der bei 254 nm fluoreszenzlöschenden Zonen.

Sprühreagenzien:

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Stahl, 1967):

Zu 0,5 ml Anisaldehyd in 85 ml MeOH und 10 ml Eisessig wurden vorsichtig 5 ml konz. H₂SO₄ hinzugegeben. Nach dem Besprühen wurde die DC-Platte 5 min. bei 100 °C bis zur maximalen Farbintensität der Banden erhitzt.

Naturstoff-Reagenz nach Neu (Stahl, 1967):

Methanolische Diphenylboryloxyethylamin-Lösung (1%, m/V). Die Auswertung der DC-Chromatogramme erfolgte bei 366 nm.

Sprühreagenz nach van Urk (Stahl, 1967):

500 mg 4-Dimethylaminobenzaldehyd wurden in 250 ml 25%iger (V/V) HCl gelöst und 8 Tropfen einer 10%igen Eisen (III)-chloridlösung (m/V) in 3%iger (V/V) HCl zugesetzt. Zur Farbentwicklung (blau) wurden die besprühten DC-Platten mit einer Bunsenbrennerflamme vorsichtig erhitzt.

Säulenchromatographie (SC)

Sorbentien:

Celite 545 (FLUKA)

Kieselgel 60 (63–200 μm , MERCK)

LiChroprep RP-18 (40–63 μm , MERCK)

Sephadex LH-20 (PHARMACIA)

Zunächst erfolgte jeweils eine Äquilibrationsphase (2–3 Säulenvolumina) mit dem ersten Laufmittel. Prinzipiell wurde die Probe auf Celite aufgezogen. Das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen vereinigt. Bei offenen Säulenchromatographien betrug die Fließgeschwindigkeit ca. 2 ml/min. Fraktionierungen mit RP-18-Sorbentien wurden unter Verwendung einer Pumpe (DURAMAT) im Sinne einer Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC) durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit der Säule wurde mit Hilfe der Hubhöhe und Hubfrequenz der Pumpe eingestellt. Es wurden folgende RP-18-Säulen verwendet:

Fraktionierungen von Rohextrakten: RP-18-Säule (4 x 45 cm),

Fließgeschwindigkeit 7 ml/min

Auftrennung von Fraktionen: RP-18-Säule (3 x 27 cm),

Fließgeschwindigkeit 4 ml/min

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Pumpen: PHARMACIA LKB-HPLC pump 2248

UV-Detektor: KNAUER WellChrom DAD K-2700

Software: KNAUER Eurochrom™ 2000

Säulen: KNAUER Eurospher 100 C-18, 10 μm , (4 x 250 μm)

KNAUER Eurospher 100-C18, 10 μm , (16 x 250 μm);

KNAUER Nucleosil P 300 C-18, 10 μm , (16 x 250 μm)

Fluß: 1,5 ml/min (analyt. HPLC); 5,5 ml/min (präp. HPLC)

Laufmittelsysteme der analytischen (al-HPLC) und präparativen HPLC (präp-HPLC):

LM _{al-HPLC1} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 70 : 30 nach 20 min 30 : 70
LM _{al-HPLC2} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 70 : 30 nach 20 min 30 : 70 nach 30 min 0 : 100
LM _{al-HPLC3} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 50 : 50 nach 30 min 0 : 100
LM _{al-HPLC4} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 60 : 40 nach 40 min 0 : 100
LM _{al-HPLC5} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 40 : 60 nach 20 min 20 : 80
LM _{al-HPLC6} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 60 : 40 nach 10 min 50 : 50 nach 30 min 40 : 60
LM _{präp-HPLC1} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 50 : 50
LM _{präp-HPLC2} :	Acetonitril : H ₂ O : MeOH (V/V/V) 75:17:8
LM _{präp-HPLC3} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 55 : 45
LM _{präp-HPLC4} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 45 : 55
LM _{präp-HPLC5} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 65 : 35
LM _{präp-HPLC6} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 60 : 40 nach 25 min 50 : 50 nach 50 min 40 : 60
LM _{präp-HPLC7} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 60 : 40
LM _{präp-HPLC8} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 25 : 75 nach 30 min 10 : 90 nach 40 min 0 : 100
LM _{präp-HPLC9} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 95 : 5
LM _{präp-HPLC10} :	H ₂ O : MeOH (V/V) 20 : 80 nach 40 min 0 : 100
LM _{präp-HPLC11} :	H ₂ O : MeOH (V/V)

	15 : 85 nach 30 min 0 : 100
LM _{präp-HPLC} 12 :	H ₂ O : MeOH (V/V)
	30 : 70 nach 20 min 10 : 90
LM _{präp-HPLC} 13:	H ₂ O : MeOH (V/V)
	70 : 30 nach 40 min 0 : 100
LM _{präp-HPLC} 14:	H ₂ O : MeOH (V/V)
	40 : 60

5.5.2 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Für die Aufnahme der NMR-Spektren wurden die Proben in Aceton-*D*₆, CDCl₃ oder MeOD gelöst.

¹H-NMR-Spektren: 400 MHz: BRUKER DPX 400
 500 MHz: BRUKER DRX
 (TMS als innerer Standard)

¹³C-NMR-Spektren: 100,6 MHz: BRUKER AC 400, BRUKER DPX 400

Massenspektroskopie (MS):

EI-MS: VARIAN MAT CH₇A, 70 eV

HR-MS: FINNIGAN MAT 711, 80 eV

FAB-MS: VARIAN MAT CH₅DF, 7 kV (Xenon)

UV-Spektroskopie:

Photodiodenarray Detector der HPLC (KNAUER)

5.5.3 Extraktion und aktivitätsgeleitete Fraktionierung

5.5.3.1 Herstellung der lipophilen und methanolischen Rohextrakte

Zur Evaluierung der biologisch aktiven Pflanzen wurden für das anfängliche Screening jeweils Rohextrakte aller vorhandenen Pflanzenteile in kleineren Mengen hergestellt. Zur Herstellung des lipophilen Rohextraktes wurden 10 g gemahlene Droge mit 100 ml PE – EtOAc (1:1, V:V) versetzt, für 30 min in ein Ultraschallbad (Wassertemperatur = RT) gestellt und anschließend über Nacht bei RT belassen. Anschließend wurde filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer (Wasserbad = 40 °C) entfernt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Alle erhaltenen lipophilen Rückstände wurden zusammengefasst und dem Testsystem zugeführt. Nach dem Trocknen des Pflanzenmaterials erfolgte die Zugabe von 100 ml MeOH. Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurde die Kaltextraktion dreimal durchgeführt und der erhaltene methanolische Rohextrakt für das Screeningprogramm bereitgestellt.

5.5.3.2 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung

Pflanzen, die man aufgrund der antiplasmodialen Aktivität der Rohextrakte für eingehendere phytochemische Untersuchungen auswählte, wurden im Sinne einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung ("bioassay-guided fractionation") aufgereinigt. Nach der jeweilig durchgeführten Trennmethode wurden die erhaltenen Fraktionen dem biologischen Test zugeführt. Orientierend an den IC₅₀-Werten wurden für den folgenden Trennungsschritt jeweils nur die biologisch aktiven Fraktionen berücksichtigt. Bei fortgeschrittener Aufreinigung einer Fraktion wurde in einigen Fällen, aufgrund der geringen Probenmenge, von einer Testung abgesehen.

5.5.3.3 Herstellung der wässrigen traditionellen Zubereitungen

Basierend auf den Informationen eines lokalen Phytotherapeuten (= "Herbalist") erfolgte die Herstellung der wässrigen Extrakte der ghanaischen Heilpflanzen (Bruce, 2000): Zur Herstellung der Rohextrakte aus oberirdischen Pflanzenteilen wurden zu 5 g gemahlener

Droge, unter Zugabe von 2 g Na₂CO₃, 200 ml kochendes Wasser gegeben und für 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Der wässrige Infus wurde nach 4 h bei RT abdekantiert und am Rotationsverdampfer (Wasserbad = 50 °C) eingeeengt. Zur Herstellung der Rohextrakte aus den Wurzeln wurden 5 g gemahlene Droge, unter Zugabe von 2 g Na₂CO₃, in 250 ml Wasser 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde abdekantiert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer (Wasserbad = 50 °C) eingeeengt. Die erhaltenen wässrigen Rohextrakte wurden dem Test zugeführt.

Über die Herstellung der traditionellen wässrigen traditionellen Auszüge der Heilpflanzen aus El Salvador lagen keine ethnobotanischen Informationen vor. Aus diesem Grund wurden nur von *Exostema mexicanum* und *Calea tenuifolia* wässrige Rohextrakte hergestellt und getestet: Zur Herstellung eines wässrigen Auszuges aus den Zweigen und der Rinde vom Stamm von *E. mexicanum* wurden 5 g gemahlene Droge in 300 ml Wasser 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde abdekantiert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer (Wasserbad = 50 °C) eingeeengt. Zur Herstellung eines wässrigen Auszuges aus den Blättern von *C. tenuifolia* wurden 5 g gemahlene Droge zu 200 ml kochendem Wasser gegeben und für 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Der Auszug wurde nach 4 h bei RT abdekantiert und für 24 h gefriergetrocknet (Gefrier Trocknung: Alpha 2–4 CHRIST). Die erhaltenen wässrigen Rohextrakte wurden dem Test zugeführt.

5.6 Isolierung der Verbindungen aus aktiven Fraktionen von *Exostema mexicanum*

Die luftgetrockneten, gemahlene Zweige und Rindenteile vom Stamm von *E. mexicanum* (450 g) wurden dreimal bei Raumtemperatur mit PE–EtOAc (1:1, V:V, jeweils 2,5 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach Verdunsten des Lösemittels wurde das Drogenmaterial unter den gleichen Bedingungen mit MeOH (2,5 l, V/V) kaltextrahiert. Nach dem Entfernen des Lösemittels am Rotavapor lagen 6,0 g des lipophilen PE–EtOAc–Rohextraktes und 32,0 g des methanolischen Rohextraktes vor. Proben beider Rohextrakte wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt. Der lipophile Rohextrakt zeigte eine antiplasmodiale Aktivität mit IC₅₀–Werten von 11,5 µg/ml [PoW] und 9,0 µg/ml [Dd2]. Der methanolische Rohextrakt erwies sich als nicht aktiv. Aufgrund der biologischen Aktivität wurde der lipophile Rohextrakt an einer offenen Kieselgelsäule fraktioniert. Hierzu wurde der ölige Rückstand (5,7 g), gelöst in 100 ml PE–EtOAc (1:1, V:V), auf 10 g Celite aufgezogen. Die Kieselgelsäule (80 g) wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen des Lösemittelgemisches Cyclohexan–EtOAc (9:1, V:V) äquilibriert. Anschließend wurde der Extrakt auf das Säulenbett aufgetragen und mit Lösemittelgemischen steigender Polarität folgendermaßen

fraktioniert: Cyclohexan–EtOAc (9:1, 7:3, 3:7, V/V), EtOAc und MeOH (jeweils 400 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen vereinigt, welche anschließend dem antiplasmodialen Test zugeführt wurden (jeweils Dd2). Fraktionen 7–9 (eluiert mit Cyclohexan–EtOAc 3:7, V/V) wiesen eine antiparasitäre Aktivität auf:

Fraktion 7: IC_{50} -Wert: 4,8 $\mu\text{g/ml}$,

Fraktion 8: IC_{50} -Wert: 5,1 $\mu\text{g/ml}$,

Fraktion 9: IC_{50} -Wert: 5,6 $\mu\text{g/ml}$.

Mit allen drei aktiven Fraktionen wurden DC-Tests (LM_{DC1} , Detektion: 254 nm und Anisaldehydreagenz) und analytische HPLC-Läufe ($LM_{al-HPLC1}$) durchgeführt. Die quantitative Aufarbeitung von Fraktion 7 (350 mg) erfolgte mittels präparativer HPLC ($LM_{präp-HPLC1}$) und führte zur Isolierung der Reinstoffe **1** und **2** und der Fraktion 7A. Aufgrund der antiplasmodialen Aktivität von Fraktion 7A (IC_{50} -Wert: 3,0 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]) wurde eine säulenchromatographische Trennung durchgeführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte an einer offenen Sephadex LH 20-Säule (2,0 g), die mit dem zweifachen Säulenvolumen an EtOAc (100%) äquilibriert wurde. Die gesamte Probenmenge (140 mg), gelöst in 300 ml EtOAc, wurde auf die Säule aufgetragen und isokratisch mit EtOAc (100%) fraktioniert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Das dünnschichtchromatographisch kontrollierte Eluat wurde zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst, welche man dem Malariatst zuzuführte. Als einzige biologisch aktive Fraktion erwies sich Fraktion 7A/1 (IC_{50} -Wert: 3,5 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]), welche mittels präparativer HPLC ($LM_{präp-HPLC2}$) weiter aufgereinigt wurde, was zur Isolierung von **3** führte. Fraktion 8 (250 mg) wurde mittels präparativer HPLC quantitativ aufgetrennt ($LM_{präp-HPLC3}$), wobei die Verbindungen **1**, **4** und Fraktion 8A (120 mg) erhalten wurden. Die weitere Aufarbeitung der biologisch aktiven Fraktion 8A (IC_{50} -Wert: 5,6 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]) erfolgte, analog zu Fraktion 7A, an einer offenen Sephadex LH 20-Säule unter den gleichen Versuchsbedingungen. Als einzig aktive Fraktion erwies sich Fraktion 8A/1 (IC_{50} -Wert: 9,9 $\mu\text{g/ml}$ [PoW]), welche quantitativ über präparative HPLC ($LM_{präp-HPLC1}$) aufgetrennt wurde. Dies führte zur erneuten Isolierung von Verbindung **3**. Fraktion 9 wurde ebenfalls durch präparative HPLC ($LM_{präp-HPLC1}$) aufgearbeitet, wodurch die Naturstoffe **4**, **5** und **6** gewonnen wurden. In Übersicht I ist das Schema der Fraktionierung des lipophilen Rohextraktes von *E. mexicanum* wiedergegeben.

Mit dem Ziel möglicherweise weitere biologisch aktive Verbindungen zu isolieren, wurde die Fraktionierung des methanolischen Rohextraktes (31,0 g) durchgeführt. Die gesamte Probenmenge, gelöst in 200 ml MeOH und auf 40 g Celite aufgezogen, wurde mittels einer offenen Kieselgelsäule (500 g) fraktioniert. Die Äquilibration erfolgte mit dem zweifachen Säulenvolumen des Lösemittelgemisches CH₂Cl₂–MeOH (90:10; V/V). Anschließend wurde der Extrakt auf das Säulenbett aufgetragen und mit folgendem Lösemittelgradienten fraktioniert: CH₂Cl₂–MeOH (90:10, V/V, 700 ml), CH₂Cl₂–MeOH–H₂O (85:15:2, V/V/V, 600 ml), CH₂Cl₂–MeOH–H₂O (70:30:3, V/V/V, 700 ml) und MeOH (1000 ml). Das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und zu entsprechenden Fraktionen vereinigt, welche anschließend getestet wurden. Die Fraktionen 2–5 (eluiert mit CH₂Cl₂–MeOH–H₂O 85:15:2 und 70:30:3, V/V/V) wiesen folgende Aktivität auf:

Fraktion 2: IC₅₀–Wert: 12,5 µg/ml [Dd2],

Fraktion 3: IC₅₀–Wert: 6,9 µg/ml [PoW],

Fraktion 4: IC₅₀–Wert: 4,2 µg/ml [PoW],

Fraktion 5: IC₅₀–Wert: 4,8 µg/ml [Dd2].

Mit allen vier Fraktionen wurden DC–Tests (LM_{DC}2 Detektion: 254 nm, Anisaldehyd–reagenz, Naturstoffreagenz) und analytische HPLC–Läufe (LM_{al}–HPLC2, LM_{al}–HPLC3) durchgeführt. Fraktion 2 (254 mg) wurde mittels LM_{präp}–HPLC4 quantitativ getrennt, wobei die Verbindungen **2** und **7** erhalten wurden. Die Aufarbeitung von Fraktion 3 (320 mg) und Fraktion 4 (180 mg) erfolgte mittels präparativer HPLC (LM_{präp}–HPLC5, LM_{präp}–HPLC6). Aus Fraktion 3 wurden die Naturstoffe **2**, **4**, **7** und aus Fraktion 4 die Verbindungen **1** und **4** gewonnen. Die präparative Aufarbeitung mit LM_{präp}–HPLC7 von Fraktion 5 (235 mg) führte zur wiederholten Isolierung von **1**, **4** und **5**.

Übersicht II zeigt eine grafische Darstellung der Fraktionierung des methanolischen Rohextraktes von *E. mexicanum*.

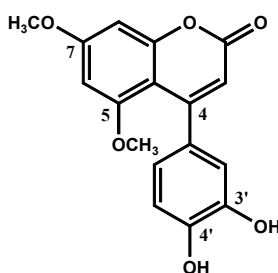
5.7 Eigenschaften der isolierten Verbindungen aus den Zweigen und der Stammrinde von *Exostema mexicanum*

5.7.1 3',4'–Dihydroxy–5,7–dimethoxy–4–phenylcumarin (**1**)

Menge: 65 mg

Eigenschaften: rostfarbene Nadeln

Chromatographische Parameter:	R _f : 0,29 (LM _{DC1} , Detektion: Tageslicht, 254 nm); R _T : 22,5 min (LM _{präp-HPLC1})
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	314 (100), 286 (98), 271 (22), 243 (7)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 8,00 (2H, s, 2 x OH); 6,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-5'); 6,85 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-2'); 6,69 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8 Hz, 2 Hz, H-6'); 6,56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-8); 6,43 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-6); 5,85 (1H, <i>s</i> , H-3); 3,92 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -7); 3,56 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -5) ppm
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ 6,87 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-5'); 6,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-2'); 6,73 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8 Hz, 2 Hz, H-6'); 6,52 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-8); 6,25 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-6); 5,99 (1H, <i>s</i> , H-3); 3,88 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -7); 3,51 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -5) ppm
¹³ C-NMR (500 MHz, Aceton-D ₆):	δ 164,5 (C-2); 160,5 (C-4'); 159,6 (C-8a); 158,2 (C-7); 156,5 (C-5); 145,0 (C-4); 132,6 (C-1'); 120,2 (C-2' und C-6'); 115,8 (C-3' oder C-5'); 115,2 (C-5' oder C-3'); 112,8 (C-3); 104,2 (C-4a); 96,6 (C-8); 94,5 (C-6); 56,3 (C-5-OCH ₃); 56,1 (C-7-OCH ₃) ppm

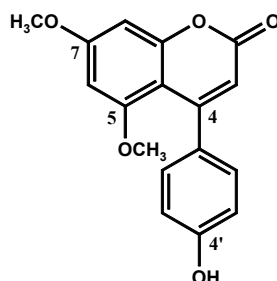


3',4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin (1)

5.7.2 4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin (2)

Menge:	40 mg
Eigenschaften:	zitronengelbe Nadeln
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,36 (LM _{DC1} , Detektion: Tageslicht, 254 nm); R _T : 49,3 min (LM _{präp-HPLC1})

Summenformel:	$C_{17}H_{14}O_5$
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	298 (80), 270 (79), 255 (38), 227 (10)
1H -NMR (400 MHz, Aceton- D_6):	δ 7,20 (2H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz, H-3', H-5'); 6,87 (2H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz, H-2', H-6'); 6,56 (1H, <i>d</i> , $J = 2$ Hz, H-8); 6,42 (1H, <i>d</i> , $J = 2$ Hz, H-6); 5,85 (1H, <i>s</i> , H-3); 3,93 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -4'); 3,55 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -5) ppm
1H -NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ 7,16 (2H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz, H-3', H-5'); 6,84 (2H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz, H-2', H-6'); 6,52 (1H, <i>d</i> , $J = 2$ Hz, H-8); 6,24 (1H, <i>d</i> , $J = 2$ Hz, H-6); 5,99 (1H, <i>s</i> , H-3); 3,87 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -4'); 3,48 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -5) ppm
^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl ₃):	δ 163,3 (C-2); 161,1 (C-4'); 158,3 (C-8a); 157,3 (C-4); 155,8 (C-5 oder C-7); 155,6 (C-7 oder C-5); 132,2 (C-1'); 119,2 (C-6' und C-2'); 114,2 (C-3' oder C-5'); 114,3 (C-5' oder C-3'); 112,6 (C-3); 103,7 (C-4a); 96,0 (C-8); 95,9 (C-6); 56,0 (C-5-OCH ₃); 55,8 (C-4'-OCH ₃) ppm

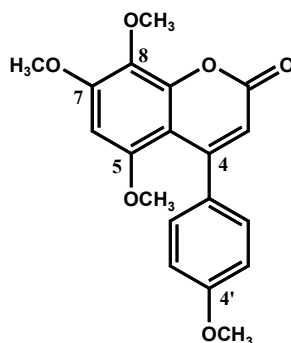


4'-Hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (**2**)

5.7.3 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarin [O-Methyl-exostemin] (**3**)

Menge:	18 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R_f : 0,37 (LM _{DC1} , Detektion: Tageslicht, 254 nm); R_T : 13,6 min (LM _{präp} -HPLC2)
Summenformel:	$C_{19}H_{18}O_6$
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	342 (100), 327 (28), 299 (24)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ 7,24 (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H-2', H-6'); 6,95 (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H-3', H-5'); 6,56 (1H, *s*, H-6); 5,93 (1H, *s*, H-3); 3,98 (3H, *s*, OCH₃); 3,86 (3H, *s*, OCH₃); 3,85 (3H, *s*, OCH₃); 3,51 (3H, *s*, OCH₃-5) ppm



4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcoumarin [O-Methyl-exostemin] (3)

5.7.4 4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin [Exomexin A] (4)

Menge: 15 mg

Eigenschaften: zitronengelbe Nadeln

Chromatographische Parameter: R_f : 0,18 (LM_{DC1}, Detektion: Tageslicht, 254 nm); R_T : 31,5 min (LM_{präp-HPLC3})

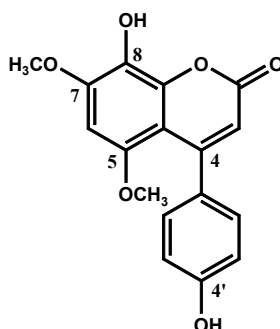
Summenformel: C₁₇H₁₄O₆

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 314 (86), 299 (12), 286 (15), 271 (20), 267 (16), 243 (7), 229 (5)

HR-MS, m/z , 80 eV: 314,07916 (C₁₇H₁₄O₆, berechnet für 314,07904)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton-D₆): δ 8,51 (1H, *s*, OH); 7,74 (1H, *s*, OH); 7,20 (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H-2', H-6'); 6,87 (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H-3', H-5'); 6,64 (1H, *s*, H-6); 5,84 (1H, *s*, H-3); 3,97 (3H, *s*, OCH₃-7); 3,50 (3H, *s*, OCH₃-5) ppm

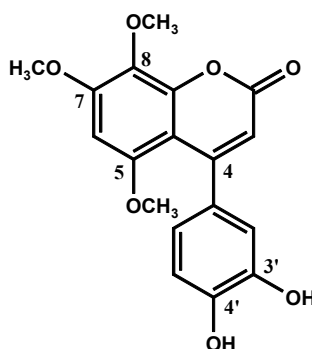
$^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, MeOD): δ 163,0 (C-2); 159,0 (C-4'); 158,8 (C-8a); 152,9 (C-7); 152,4 (C-5); 145,1 (C-4); 132,4 (C-1'); 130,0 (C-2' und C-6'); 127,4 (C-8'); 115,3 (C-3' und C-5'); 112,5 (C-3); 104,9 (C-4a); 95,0 (C-6); 57,0 (C-7-OCH₃); 56,7 (C-5-OCH₃) ppm



4',8-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin [Exomexin A] (4)

5.7.5 3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcoumarin [Exomexin B] (5)

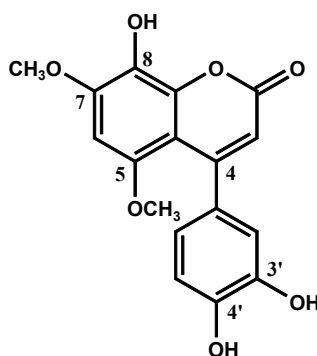
Menge:	12 mg
Eigenschaften:	gelbe Nadeln
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,19 (LM _{DC1} , Detektion: Tageslicht, 254 nm); R _T : 32,3 min (LM _{präp-HPLC1})
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₆ O ₇
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	344 (100), 329 (50), 316 (6), 301 (30), 273 (20)
HR-MS, <i>m/z</i> , 80 eV:	344,08948 (C ₁₈ H ₁₆ O ₇ , berechnet für 344,08961)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 8,09 (1H, <i>s</i> , OH); 8,11 (1H, <i>s</i> , OH); 6,85 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-5'); 6,83 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-2'); 6,68 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8 Hz, 2 Hz, H-6'); 6,63 (1H, <i>s</i> , H-6), 5,86 (1H, <i>s</i> , H-3); 3,99 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -7); 3,83 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -8); 3,57 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -5) ppm



3',4'-Dihydroxy-5,7,8-trimethoxy-4-phenylcoumarin [Exomexin B] (5)

5.7.6 3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (6)

Menge:	23 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,12 (LM _{DC1} , Detektion: Tageslicht, 254 nm); R _T : 51,7 min (LM _{präp-HPLC1})
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	330 (100), 302 (15), 287 (25), 259 (8)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 6,85 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-5'); 6,83 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-2'); 6,69 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8 Hz, 2 Hz, H-6'); 6,64 (1H, <i>s</i> , H-6); 5,84 (1H, <i>s</i> , H-3); 3,97 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -7); 3,51 (3H, <i>s</i> , OCH ₃ -5) ppm

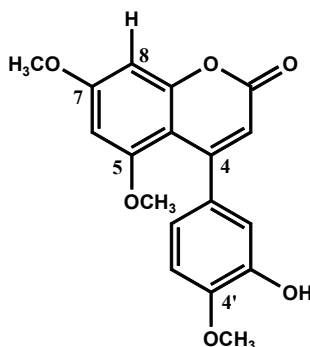


3',4',8-Trihydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenylcumarin (6)

5.7.7 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (7)

Menge:	26 mg
Eigenschaften:	gelbe Nadeln
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,41 (LM _{DC1} , Detektion: Tageslicht, 254 nm); R _T : 12,3 min (LM _{präp-HPLC4})
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₆ O ₆
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	328 (100), 300 (75), 285 (25)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 8,53 (1H, <i>s</i> , OH); 6,97 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-5'); 6,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-2'); 6,78 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8 Hz, 2 Hz, H-6'); 6,56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-8); 6,42 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2

Hz, H-6); 5,86 (1H, s, H-3); 3,93 (3H, s, OCH₃-7);
3,90 (3H, s, OCH₃-4'); 3,55 (3H, s, OCH₃-5) ppm



3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcoumarin (7)

5.8 Isolierung der Verbindungen aus aktiven Fraktionen von *Calea tenuifolia*

Die luftgetrockneten, gemahlene Blätter von *C. tenuifolia* (300 g) wurden dreimal bei Raumtemperatur mit PE-EtOAc (1:1, V/V, jeweils 1,5 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach Verdunsten des Lösemittels wurde das Drogenmaterial unter den gleichen Bedingungen mit MeOH (1,5 l) kaltextrahiert. Nach Einengen des Lösemittels lagen 22 g des lipophilen PE-EtOAc-Rohextrakts und 4 g des methanolischen Rohextrakts vor. Proben beider Rohextrakte wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt. Der lipophile Rohextrakt wies eine antiplasmodiale Aktivität mit IC₅₀-Werten von 10,4 µg/ml [PoW] und 24,3 µg/ml [Dd2] auf. Der methanolische Rohextrakt zeigte eine Aktivität von 19,7 µg/ml [PoW] und 19,5 µg/ml [Dd2]. Der lipophile Rohextrakt wurde an einer RP-18-Säule weiter aufgetrennt. Hierzu wurden 15 g des Rohextrakts, gelöst in 200 ml PE-EtOAc (1:1; V/V), auf 50 g Celite aufgezogen. Die RP-18-Säule (MPLC) wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen des Lösemittelgemisches MeOH-H₂O (4:6, V/V) äquilibriert. Anschließend wurde der Extrakt auf das Säulenbett aufgetragen und mit einem MeOH-H₂O-Gradienten abnehmender Polarität (4:6 bis 9:1, V/V, je 500 ml), MeOH (900 ml) und CHCl₃ (900 ml) fraktioniert. Die Fließgeschwindigkeit 8 ml/min. Das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen vereinigt, welche anschließend gegenüber Dd2 getestet wurden. Fraktionen 8–12 (eluiert mit 80 % bis 100 % MeOH; V/V) wiesen folgende biologische Aktivitäten auf:

Fraktion 8: IC₅₀-Wert: 9,4 µg/ml,

Fraktion 9: IC₅₀-Wert: 17,4 µg/ml,

Fraktion 10: IC₅₀-Wert: 6,6 µg/ml,

Fraktion 11: IC_{50} -Wert: 4,8 $\mu\text{g/ml}$ und

Fraktion 12: IC_{50} -Wert: 9,9 $\mu\text{g/ml}$.

Mit allen fünf aktiven Fraktionen wurden DC-Tests (LM_{DC1} , LM_{DC3}) und analytische HPLC-Läufe ($LM_{al-HPLC4}$) durchgeführt. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde die präparative HPLC als optimale Trennmethode für alle fünf Fraktionen ausgewählt. Fraktion 8 (420 mg) wurde mit $LM_{präp-HPLC8}$ quantitativ aufgetrennt, was zur Isolierung der Verbindung **8** führte. Mittels präparativer HPLC ($LM_{präp-HPLC9}$) konnten aus Fraktion 9 (530 mg) die Naturstoffe **8**, **9** und **10** isoliert werden. Fraktion 10 (340 mg) wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen wie Fraktion 8 aufgetrennt, wobei die Verbindungen **8** und **9** erhalten wurden. Fraktion 11 (450 mg) wurde mittels $LM_{präp-HPLC10}$ quantitativ aufgearbeitet. Dies führte zur Isolierung der Naturstoffe **8–11** und **12**. Da Verbindung **11** noch Verunreinigungen enthielt, wurde eine zusätzliche Auftrennung mittels präparativer DC (LM_{DC3} , Detektion: UV = 254 nm) vorgenommen, die zur Isolierung des reinen Naturstoffes führte. Die Aufarbeitung der Fraktion 12 (580 mg) erfolgte unter Verwendung von $LM_{präp-HPLC11}$. Es wurden die Verbindungen **10**, **12** und ein biologisch aktives Dreikomponentengemisch (IC_{50} -Wert: 5,1 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) isoliert. Letzteres wurde durch präparative DC mit Mehrfachentwicklung (LM_{DC1} , Detektion: UV = 254 nm, Anisaldehyd-Reagenz) aufgereinigt. Dies führte zur Isolierung der Verbindungen **12**, **13** und **14**. Übersicht III gibt den Fraktionierungsvorgang des lipophilen Rohextraktes der Blattdroge von *C. tenuifolia* grafisch wider.

Aufgrund der antiplasmodialen Aktivität des methanolischen Rohextraktes wurde eine Fraktionierung über eine RP-18-Säule (MPLC) durchgeführt. Hierzu wurde der Extrakt (4 g), gelöst in 100 ml MeOH, auf 20 g Celite aufgezogen. Die Säule wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen des Lösemittelgemisches MeOH-H₂O (3:7, V/V) äquilibriert. Anschließend wurde der Extrakt auf das Säulenbett aufgetragen und mit einem MeOH-H₂O-Gradienten abnehmender Polarität (3:7 bis 9:1, V/V, je 400 ml), MeOH (400 ml) und CHCl₃ (400 ml) fraktioniert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 8 ml/min. Von den erhaltenen sieben Fraktionen erwies sich ausschließlich Fraktion 5 (220 mg), welche mit MeOH-H₂O (8:2, V/V) eluiert wurde, als biologisch aktiv (IC_{50} -Wert: 4,4 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]). Anschließende Untersuchungen mittels $LM_{al-HPLC5}$ und die Aufreinigung durch präparative HPLC ($LM_{präp-HPLC12}$) führten zur erneuten Isolierung von **9**.

Im Anschluss wurde ein wässriger Auszug von *C. tenuifolia* hergestellt. Hierzu wurden 5 g gemahlene Droge zu 200 ml kochendem Wasser gegeben und für 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Der Auszug wurde nach 4 h bei RT abdekantiert und für 24 h

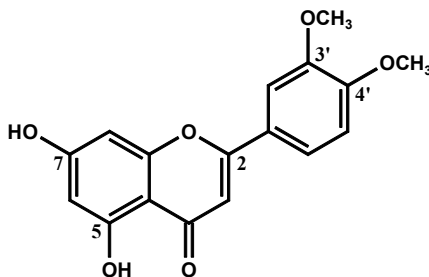
gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand (600 mg) wurde in 3 ml H₂O gelöst und auf eine RP-18-Säule aufgetragen, welche vorher mit MeOH-H₂O (3:7, V/V, 150 ml) äquilibriert wurde. Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Die Fraktionierung wurde mit einem MeOH-H₂O-Gradienten abnehmender Polarität (3:7 bis 9:1, V/V, je 100 ml) und MeOH

(200 ml) durchgeführt. Das Eluat wurde in 15 Fraktionen aufgefangen und über Nacht gefriergetrocknet. Anschließend wurden sämtliche Fraktionen dem antiplasmodialen Test zugeführt. Ausschließlich die Fraktionen 10 und 11 (eluiert mit 70% und 80% MeOH; V/V) wiesen eine geringfügige antiparasitäre Hemmwirkung auf (IC₅₀-Wert: 83,7 µg/ml und 41,5 µg/ml, [Dd2]). Mittels ¹H-NMR- und MS-Spektren konnten in Fraktion 10 und 11 die Verbindung **8** und **10** detektiert werden.

5.9 Eigenschaften der isolierten Verbindungen aus den Blättern von *C. tenuifolia*

5.9.1 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (**8**)

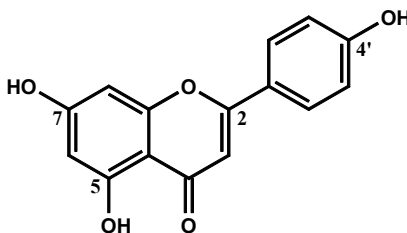
Menge:	28 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,35 (LM _{DC} 1); R _T : 13,9 min (LM _{präp} -HPLC8)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	314 (100), 283 (38), 162 (14), 153 (25)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 12,99 (1H, <i>s</i> , OH-5); 7,68 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8 Hz, 2 Hz, H-6'); 7,61 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-2'); 7,15 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-5'); 6,72 (1H, <i>s</i> , H-3); 6,55 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-6 oder H-8); 6,26 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-8 oder H-6); 3,96 (3H, <i>s</i> , OCH ₃); 3,93 (3H, <i>s</i> , OCH ₃) ppm



5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavon [Luteolin-3',4'-dimethylether] (**8**)

5.9.2 4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] (9)

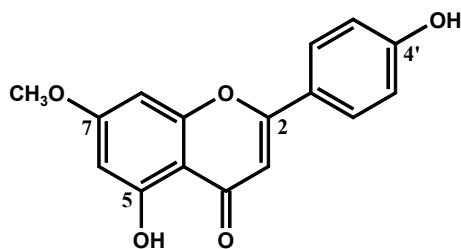
Menge:	55 mg
Eigenschaften:	gelbe Nadeln
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,38 (LM _{DC1}); R _T : 14,7 min (LM _{präp-HPLC9})
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	270 (100), 152 (21), 118 (23)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 13,02 (1H, <i>s</i> , OH-5); 7,95 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-2', H-6'); 7,03 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-3', H-5'); 6,64 (1H, <i>s</i> , H-3); 6,54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-6 oder H-8); 6,26 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-8 oder H-6) ppm



4',5,7-Trihydroxyflavon [Apigenin] (9)

5.9.3 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (10)

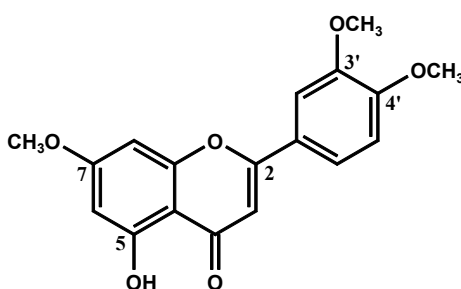
Menge:	13 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,43 (LM _{DC1}); R _T : 19,3 min (LM _{präp-HPLC9})
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	284 (100), 255 (20), 166 (8), 118 (6)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 12,99 (1H, <i>s</i> , OH-5); 7,97 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-2', H-6'); 7,03 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-3', H-5'); 6,70 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-8); 6,68 (1H, <i>s</i> , H-3); 6,33 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-6); 3,93 (3H, <i>s</i> , OCH ₃) ppm



4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon [Genkwanin] (10)

5.9.4 5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon [Luteolin-3',4',7-trimethylether] (11)

Menge:	18 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,40 (LM _{DC} 1); R _f : 0,34 (LM _{DC} 3); R _T : 15,6 min (LM _{präp} -HPLC10)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₆ O ₆
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	328 (100), 299 (9), 167 (15), 162 (10)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 12,97 (1H, s, OH-5); 7,71 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8 Hz, 2 Hz, H-6'); 7,63 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-2'); 7,16 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-5'); 6,77 (1H, <i>s</i> , H-3); 6,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-8); 6,34 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-6); 3,96 (3H, <i>s</i> , OCH ₃); 3,93 (6H, <i>s</i> , 2 x OCH ₃) ppm

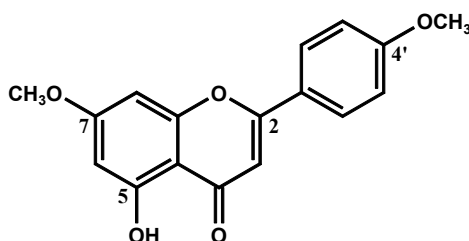


5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavon [Luteolin-3',4',7-trimethylether] (11)

5.9.5 5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavon [7-Methylacacetin] (12)

Menge:	12 mg
Eigenschaften:	gelbe Nadeln
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,42 (LM _{DC} 1); R _T : 18,8 min (LM _{präp} -HPLC10)

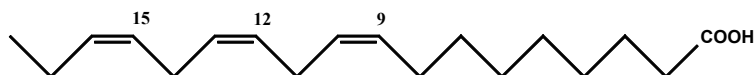
Summenformel: $C_{17}H_{14}O_5$
 EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 298 (9), 165 (4), 133 (14)
 1H -NMR (400 MHz, Aceton- D_6): δ 12,96 (1H, *s*, OH-5); 8,06 (2H, *d*, $J = 9$ Hz, H-2', H-6'); 7,14 (2H, *d*, $J = 9$ Hz, H-3', H-5'); 6,73 (1H, *s*, H-3); 6,71 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-8); 6,34 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-6); 3,94 (3H, *s*, OCH₃); 3,93 (3H, *s*, OCH₃)
 ppm



5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavon [7-Methylacacetin] (12)

5.9.6 Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [α -Linolensäure] (13)

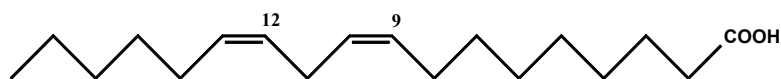
Menge: 4 mg
 Eigenschaften: farbloser Feststoff
 Chromatographische Parameter: R_f : 0,60 (LM_{DC}1)
 Summenformel: $C_{18}H_{30}O_2$
 EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 278 (6), 149 (27)
 1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ 5,39–5,28 (6H, *m*, H-9, H-10, H-12, H-13, H-15, H-16); 2,81 (4H, *t*, $J = 6$ Hz, H-11, H-14); 2,24 (2H, *brt*, $J = 7$ Hz, H-2); 2,15–2,05 (4H, *m*, H-8, H-17); 1,62 (2H, *m*); 1,35 (8H, *m*, H-4, H-5, H-6, H-7); 0,97 (3H, *t*, $J = 8$ Hz, H-18) ppm



Octadeca-9Z,12Z,15Z-triensäure [α -Linolensäure] (13)

5.9.7 Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (14)

Menge:	25 mg
Eigenschaften:	gelbliches Öl
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,53 (LM _{DC3}); R _T : 19,9 min (LM _{al-HPLC4})
Summenformel:	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	280 (2), 223 (2); 151 (4)
¹ H-NMR (400 MHz, MeOD):	δ 5,38–5,31 (4H, <i>m</i> , H-9, H-10, H-12, H-13); 2,76 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-11); 2,19 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-2); 2,06 (4H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 13 Hz, 6 Hz, H-8, H-14); 1,59 (2H, <i>brt</i> , H-3); 1,33–1,29 (14H, <i>m</i> , H-4, H-5, H-6, H-7; H-15, H-16, H-17); 0,90–0,88 (3H, <i>m</i> , H-18) ppm



Octadeca-9Z,12Z-diensäure [Linolsäure] (14)

5.10 Isolierung der Verbindungen aus aktiven Fraktionen von *Microglossa pyrifolia*

5.10.1 Aufarbeitung der oberirdischen Pflanzenteile von *M. pyrifolia* (Ernte 2000)

Die luftgetrockneten, gemahlten oberirdischen Pflanzenteile von *M. pyrifolia* (420 g) wurden viermal bei RT mit PE-EtOAc (1:1, V/V, jeweils 1 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach dem Einengen des Lösemittels lagen 38,0 g des lipophilen PE-EtOAc-Rohextrakts vor, wovon eine Probe dem antiplasmodialen Test zugeführt wurde. Der lipophile Rohextrakt erwies sich als biologisch aktiv (IC₅₀-Wert: 10,5 µg/ml [PoW] und 13,1 µg/ml [Dd2]) und wurde an einer RP-18-Säule (MPLC) aufgetrennt. Hierzu wurden 37 g des Rohextrakts, gelöst in 400 ml PE-EtOAc (1:1, V/V), auf 120 g Celite aufgezogen. Die RP-18-Säule wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen des Lösemittelgemisches MeOH-H₂O (4:6, V/V) äquilibriert. Anschließend wurde der Extrakt auf das Säulenbett aufgetragen und mit einem MeOH-H₂O-Gradienten abnehmender Polarität (4:6 bis 9:1, V/V, je 700 ml), MeOH (900 ml) und CHCl₃ (900 ml) fraktioniert. Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 8 ml/min. Das Eluat wurde

dünnschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen vereinigt, welche anschließend getestet wurden (jeweils Dd2). Fraktionen 6–8 (eluiert mit 80% und 90% MeOH, V/V) wiesen folgende biologische Aktivitäten auf:

Fraktion 6: IC₅₀-Wert: 4,3 µg/ml,

Fraktion 7: IC₅₀-Wert: 5,9 µg/ml,

Fraktion 8: IC₅₀-Wert: 2,5 µg/ml.

Fraktion 6 (50 mg) wurde mittels präparativer DC (LM_{DC}4, Detektion: UV = 254 nm) aufgereinigt, was zur Isolierung der Verbindung **15** führte. Fraktion 7 (1,2 g) gelöst in CH₂Cl₂, wurde auf 5 g Celite aufgezogen und über eine offene Kieselgelsäule (15,0 g) aufgereinigt. Nach Äquilibrierung der Säule mit CH₂Cl₂ wurde die Probe aufgetragen und folgendermaßen fraktioniert: CH₂Cl₂ (100 ml), CH₂Cl₂-MeOH (95:5, V/V, 80 ml), CH₂Cl₂-MeOH (90:10, V/V, 100 ml) und MeOH (200 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das dünnschichtchromatographisch kontrollierte Eluat wurde zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst. Aus der erhaltenen Fraktion 7A konnte mittels semipräparativer HPLC (LM_{präp}HPLC3) die Verbindung **16** isoliert werden. Fraktionen 7C und 7D wurden über präparative HPLC (LM_{präp}-HPLC13) aufgearbeitet, wobei jeweils der Naturstoff **17** erhalten wurde. Fraktion 8 (1,0 g), gelöst in MeOH, wurde auf 3 g Celite[®] aufgezogen und über eine offene Kieselgelsäule (12,0 g) aufgetrennt. Nach Äquilibrierung der Säule mit Petrolether wurde die Probe aufgetragen und mit folgendem Lösemittelgemisch steigender Polarität fraktioniert: PE-EtOAc (19:1, V/V, 200 ml, 10:1, V/V, 150 ml, 3:1, V/V, 150 ml), CH₂Cl₂-MeOH (19:1, V/V, 200 ml) und MeOH (300 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das dünnschichtchromatographisch kontrollierte Eluat wurde zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst. Aus der erhaltenen Fraktion 8D wurde mittels präparativer DC (LM_{DC}5, Detektion: Anisaldehyd-Reagenz) der Naturstoff **18** isoliert. Durch ¹H-NMR-Messung konnte ermittelt werden, dass Fraktion 8F Verbindung **14** in reiner Form enthielt. Das Schema der Fraktionierung von *M. pyrifolia* (Ernte 2000) ist in Übersicht IV dargestellt.

5.10.2 Aufarbeitung der Wurzeln von *M. pyrifolia* (Ernte 2000)

Die luftgetrockneten, gemahlene Wurzeln (35 g) wurden dreimal bei RT mit PE-EtOAc (1:1, V/V, jeweils 300 ml) über Nacht kaltextrahiert. Nach dem Einengen des Lösemittels lagen 350 mg lipophiler PE-EtOAc-Rohextrakt vor, wovon eine Probe getestet wurde. Der erhaltene Wurzelextrakt (350 mg) wurde aufgrund der antiplasmodialen Aktivität (IC₅₀-

Wert: 8,3 µg/ml [PoW] und 11,4 µg/ml [Dd2]) über eine offene Kieselgelsäule (5 g) aufgetrennt. Hierzu wurde die gesamte Probenmenge in 2 ml Petrolether gelöst und auf 1 g Celite aufgezogen. Nach Äquilibration der Säule mit Petrolether wurde die Probe aufgetragen und mit folgendem Lösemittelgemisch fraktioniert: PE–EtOAc (50:1, V/V, 250 ml, 10:1, V/V, 200 ml, 3:1, V/V, 150 ml), CH₂Cl₂–MeOH (19:1, V/V, 150 ml) und MeOH (300 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das dünn-schichtchromatographisch kontrollierte Eluat wurde zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst. Aus Fraktion 5 (eluiert mit PE–EtOAc 3:1, V/V) konnte mittels präparativer DC (LM_{DC}6, Detektion: Anisaldehyd–Reagenz) der Naturstoff **19** als Hauptkomponente isoliert werden.

5.10.3 Aufarbeitung der oberirdischen Pflanzenteile von *M. pyrifolia* (Ernte 2001)

Die luftgetrockneten, gemahlten oberirdischen Pflanzenteile (480 g) wurden viermal bei RT mit PE–EtOAc (1:1, V/V, jeweils 1 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach dem Einengen des Lösemittels lagen 32,5 g des lipophilen PE–EtOAc–Rohextrakts vor, wovon eine Probe getestet wurde. Nach Verdunsten des Lösemittels wurden 10 g des Drogenmaterials unter den gleichen Bedingungen mit MeOH (250 ml) kaltextrahiert. Der erhaltene methanolische Rohextrakt erwies sich im Testsystem als nicht aktiv. Mit dem Ziel, unpolare Inhaltsstoffe anreichern zu können, wurde der methanolische Rohextrakt dreimal mit 200 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Der erhaltene Rohextrakt aus der CHCl₃–Phase wurde dem Test zugeführt und erwies sich ebenfalls als inaktiv. Der PE–EtOAc–Rohextrakt wurde aufgrund der biologischen Aktivität (IC₅₀–Wert: 21,8 µg/ml [PoW] und 40,4 µg/ml [Dd2]) an einer RP–18–Säule (MPLC) aufgetrennt. Hierzu wurde die Probe (30 g) in 400 ml PE–EtOAc (1:1, V/V) gelöst und auf 100 g Celite aufgezogen. Nach Äquilibration mit dem zweifachen Säulenvolumen des Lösemittelgemisches MeOH–H₂O (40:60, V/V) wurde die Probe auf die Säule gegeben und mit folgendem Gradienten fraktioniert: MeOH–H₂O (4:6 bis 9:1, V/V, jeweils 700 ml), MeOH (1,5 l) und CHCl₃ (1,2 l). Die Fließgeschwindigkeit betrug 8 ml/min. Das dünn-schichtchromatographisch kontrollierte Eluat wurde zu entsprechenden Fraktionen vereinigt, welche anschließend getestet wurden (jeweils Dd2). Fraktionen 7–10 (eluiert mit 80% und 100% MeOH, V/V) wiesen eine biologische Aktivität auf :

Fraktion 7: IC₅₀–Wert: 4,1 µg/ml,

Fraktion 8: IC₅₀–Wert: 17,7 µg/ml,

Fraktion 9: IC_{50} -Wert: 18,7 $\mu\text{g/ml}$,

Fraktion 10: IC_{50} -Wert: 20,1 $\mu\text{g/ml}$.

Fraktion 7 (250 mg) wurden über eine offene Kieselgelsäule (12 g) aufgetrennt. Die gesamte Probenmenge, gelöst in PE-EtOAc (3:1, V/V, 120 ml) wurde auf 2 g Celite aufgezogen. Nach Äquilibration der Säule mit PE-EtOAc (3:1, V/V) wurde die Probe aufgetragen und mit folgendem Lösemittelgemisch fraktioniert: PE-EtOAc (3:1, V/V, 200 ml, 1:1, V/V, 200 ml), CH_2Cl_2 -MeOH (10:1, V/V, 150 ml) und MeOH (300 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das dünnschichtchromatographisch kontrollierte Eluat, wurde zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst. Aufgrund der geringen Substanzmenge wurden nur die erhaltenen Fraktionen 7C (IC_{50} -Wert: 10,1 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) und 7D (IC_{50} : 2,5 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2]) getestet. Aus Fraktion 7B konnte mittels präparativer DC (LM_{DC7} , Detektion: Anisaldehyd-Reagenz) die Verbindung **20** isoliert werden. Fraktion 7C (100 mg), gelöst in PE-EtOAc (10:1, V/V), aufgezogen auf 0,5 g Celite, wurde über eine offene Kieselgelsäule (2 g) folgendermaßen aufgetrennt: PE-EtOAc (10:1, V/V, 100 ml und 3:1, V/V, 80 ml und 1:1, V/V, 80 ml) und CH_2Cl_2 -MeOH (10:1, V/V, 80 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Durch $^1\text{H-NMR}$ -Messung konnte festgestellt werden, dass Fraktion 7C1 der Verbindung **20** entsprach. Fraktion 7C2 wurde mittels präparativer DC (LM_{DC8} , Detektion: 254 nm) aufgearbeitet, was zur Isolierung von **21** führte. Aus Fraktion 7D (30 mg) konnte durch präparative DC (LM_{DC7} unter Zugabe von 3 Tropfen HCOOH auf 40 ml Fließmittel, Detektion: 254 nm) die Verbindung **22** isoliert werden. Die Auftrennung von Fraktion 8 (4 g) erfolgte über eine offene Kieselgelsäule (40 g), die mit PE-EtOAc (10:1, V/V) äquilibriert wurde. Die Probenmenge, gelöst im gleichen Lösemittelgemisch und mit 5 g Celite vermengt, wurde auf das Säulenbett aufgetragen und wie folgt fraktioniert: PE-EtOAc (10:1, V/V, 300 ml und 3:1, V/V, 200 ml und 2,5:1, V/V, 200 ml und 1:1, V/V, 200 ml), CH_2Cl_2 -MeOH (10:1, V/V, 200 ml) und MeOH (300 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 3 ml/min. Das dünnschichtchromatographisch kontrollierte Eluat wurde zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst, welche dem Testsystem zugeführt wurden. Fraktionen 8B–8D (eluiert mit PE-EtOAc 3:1, V/V bis 1:1, V/V und CH_2Cl_2 -MeOH 10:1, V/V) erwiesen sich als aktiv (jeweils Dd2) und wurden weiter aufgetrennt. Die drei Fraktionen besaßen folgende *in-vitro*-Hemmwirkungen:

Fraktion 8B: IC_{50} -Wert: 11,9 $\mu\text{g/ml}$,

Fraktion 8C: IC_{50} -Wert: 11,3 $\mu\text{g/ml}$,

Fraktion 8D: IC_{50} -Wert: 20,8 $\mu\text{g/ml}$.

Mittels präparativer DC (LM_{DC}9, Detektion: 254 nm) wurde Fraktion 8B aufgearbeitet, wobei die Verbindungen **23** und **24** erhalten wurden. Aus Fraktion 8C konnten durch präparative DC (LM_{DC}7, Detektion: 254 nm) die Naturstoffe **17** und **25** gewonnen werden. Mit der gleichen Methode wurden die Fraktionen 8D und 8E präparativ aufgearbeitet. Aus beiden Fraktionen konnte Verbindung **17** erneut isoliert werden. Die Aufarbeitung der Fraktionen 7 und 8 des lipophilen Rohextraktes ist in Übersicht V dargestellt.

Fraktion 9 (6 g) wurde im ersten Trennungsschritt über eine offene Kieselgelsäule (60 g) aufgearbeitet. Hierzu wurde die gesamte Probenmenge mit 20 g Celite vermengt und auf die äquilibrierte Säule (PE–EtOAc, V/V, 10:1) aufgetragen. Die Fraktionierung erfolgte mit folgendem Gradienten: PE–EtOAc (10:1, V/V und 5:1, V/V, jeweils 200 ml), CH₂Cl₂–MeOH (40:1, V/V und 20:1, V/V, jeweils 250 ml) und MeOH (500 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 3 ml/min. Das dünnschichtchromatographisch kontrollierte Eluat wurde zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst, welche dem Test zugeführt wurden. Die erhaltenen Fraktionen wiesen folgende antiparasitäre Aktivität auf (jeweils PoW):

Fraktion 9B: IC₅₀–Wert: 26,7 µg/ml,

Fraktion 9C: IC₅₀–Wert: 24,3 µg/ml.

Fraktion 9B wurde mittels präparativer DC (LM_{DC}7, Detektion: Anisaldehyd–Reagenz) aufgearbeitet, wobei man die Verbindungen **26** und **27** als Gemisch isolierte. Fraktion 9C (2 g) wurde über eine offene Kieselgelsäule (21 g) getrennt. Die gesamte Probenmenge wurde mit 4 g Celite vermengt, auf die äquilibrierte Säule (PE–EtOAc, V/V, 10:1) gegeben und folgendermaßen aufgetrennt: PE–EtOAc (10:1, V/V und 5:1, V/V, jeweils 100 ml anschließend 2,5:1, V/V, 80 ml), CH₂Cl₂–MeOH (10:1, V/V, 200 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst. Die erhaltene Fraktion 9C1 wurde in Aceton gelöst. Nach Einengen des Lösemittels und Lagerung bei –5°C bildeten sich farblose Kristalle. Durch ¹H–NMR–Messung konnte festgestellt werden, dass die Kristalle einem 1:1–Gemisch der Verbindungen **27** und **28** entsprachen. Das ¹H–NMR–Spektrum der Fraktion 9C2 zeigte, dass der Naturstoff **25** als Hauptkomponente in dieser Fraktion vorlag. Fraktion 9C3 wurde mittels präparativer DC (LM_{DC}10, Detektion: 254 nm) aufgearbeitet, was zur Isolierung von **29** führte. Mit der gleichen Methode wurden aus Fraktion 9C4 die Verbindung **25** und das Zweikomponentengemisch 9C4/ A gewonnen. Mittels semipräparativer HPLC (LM_{al-HPLC}6) wurde 9C4/ A aufgetrennt und die Naturstoffe **29** und **30** konnten isoliert werden.

Fraktion 10 (1,5 g) wurde über eine offene Kieselgelsäule (18 g) getrennt. Die Probenmenge wurde mit 2 g Celite vermengt, auf die äquilibrierte Säule (PE–EtOAc, 10:1, V/V) gegeben und wie folgt fraktioniert: PE–EtOAc (10:1, V/V und 5:1, V/V, jeweils 250 ml), CH₂Cl₂–MeOH (20:1, V/V, 150 ml) und MeOH (200 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst. ¹H–NMR–Messungen zeigten, dass die Hauptfraktion 10B der Verbindung **14** entsprach. In Übersicht VI ist die Aufarbeitung der Fraktionen 9 und 10 grafisch dargestellt.

Im Anschluss wurde ein wässriger Auszug aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *M. pyrifolia* hergestellt. Hierzu wurden 20 g gemahlene Droge zu 200 ml kochendem Wasser gegeben und für 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Der Auszug wurde nach 4 h bei RT abdekantiert und für 24 h gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand (1,0 g) wurde in 5 ml H₂O gelöst und auf eine RP–18–Säule aufgetragen, welche vorher mit MeOH–H₂O (3:7, V/V) äquilibriert wurde. Die Fraktionierung wurde mit einem MeOH–H₂O–Gradienten abnehmender Polarität (3:7 bis 9:1, V/V, je 200 ml), MeOH (300 ml) und CHCl₃ (200 ml) durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das Eluat wurde in 9 Fraktionen aufgefangen, welche über Nacht gefriergetrocknet wurden. Anschließend wurden sämtliche Fraktionen getestet (jeweils Dd2), wobei sich die Fraktionen 5–8 (eluiert mit 70% bis 100% MeOH; V/V) als aktiv erwiesen und die folgende *in-vitro*–Aktivität zeigten:

Fraktion 5: IC₅₀–Wert: 24,6 µg/ml,

Fraktion 6: IC₅₀–Wert: 31,7 µg/ml,

Fraktion 7: IC₅₀–Wert: 14,7 µg/ml,

Fraktion 8: IC₅₀–Wert: 24,4 µg/ml.

Mittels ¹H–NMR– und MS–Spektren konnten in Fraktion 5 die Verbindung **8**, in Fraktion 6 die Verbindung **25** und in Fraktion 7 der Naturstoff **17** detektiert werden.

5.10.4 Aufarbeitung der Wurzeln von *M. pyrifolia* (Ernte 2001)

Die luftgetrockneten, gemahlene Wurzeln von *M. pyrifolia* (200 g) wurden viermal bei RT mit PE–EtOAc (1:1, V/V, jeweils 1 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach dem Einengen des Lösemittels lagen 2,5 g Rohextrakt vor, wovon eine Probe getestet wurde. Der Wurzelextrakt wurde aufgrund der antiplasmodialen Aktivität (IC₅₀–Wert: 17,3 µg/ml

[PoW]; 40,2 µg/ml [Dd2]) über eine offene Kieselgelsäule (65 g) aufgetrennt. Hierzu wurde die gesamte Probenmenge in 50 ml Petrolether gelöst und auf 10 g Celite aufgezogen. Nach Äquilibrierung der Säule mit Petrolether wurde die Probe aufgetragen und mit folgendem Lösemittelgemisch fraktioniert: PE (300 ml), PE–EtOAc (50:1, V/V, 250 ml und 50:5, V/V, 300 ml und 50:10, V/V, 300 ml), und MeOH (400 ml). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 2 ml/min. Das dünnschichtchromatographisch kontrollierte Eluat wurde zu entsprechenden Fraktionen zusammengefasst, welche gegenüber Dd2 getestet wurden. Die Fraktionen 4 und 5 (eluiert mit PE–EtOAc 50:10) wiesen folgende antiplasmodiale Aktivität auf:

Fraktion 4: IC₅₀–Wert: 32,5 µg/ml,

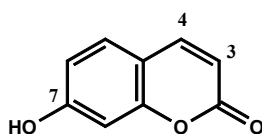
Fraktion 5: IC₅₀–Wert: 10,0 µg/ml.

Fraktion 4 wurde mit Hilfe der präparativen HPLC (LM_{präp-HPLC}14) aufgereinigt, wobei man Verbindung **31** isolierte. Aus Fraktion 5 (eluiert mit PE–EtOAc 5:1, V/V) konnte mittels präparativer DC (LM_{DC}11, Detektion: Anisaldehyd–Reagenz) der Naturstoff **19** als Hauptkomponente gewonnen werden. Das Schema der Aufarbeitung des lipophilen Wurzelextraktes von *M. pyrifolia* ist in Übersicht VII grafisch dargestellt.

5.11 Eigenschaften der isolierten Verbindungen aus *M. pyrifolia*

5.11.1 7–Hydroxycumarin [Umbelliferon] (15)

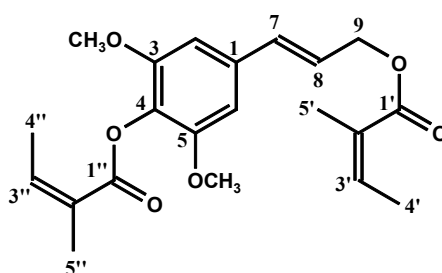
Menge:	4 mg
Eigenschaften:	farbloser Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,89 (LM _{DC} 4)
Summenformel:	C ₉ H ₆ O ₃
EI–MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	162 (100), 134 (35)
¹ H–NMR (400 MHz, Aceton–D ₆):	δ 7,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9 Hz, H–4); 7,57 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H–5); 6,91 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2 Hz, 8 Hz, H–6); 6,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H–8); 6,20 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9 Hz, H–3) ppm



7–Hydroxycumarin [Umbelliferon] (15)

5.11.2 Sinapyldiangelat (16)

Menge:	3 mg
Eigenschaften:	farbloser Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _T : 19,7 min (LM _{alHPLC3})
Summenformel:	C ₂₁ H ₂₆ O ₆
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	374 (5), 292 (12), 83 (100), 55 (46)
HR-MS, <i>m/z</i> , 80 eV:	374,17273 (C ₂₁ H ₂₆ O ₆ , berechnet für 374,17294), 292,13099 (C ₁₆ H ₂₀ O ₅ , berechnet für 292,13108), 192,07856 (C ₁₁ H ₁₂ O ₃ , berechnet für 192,07865), 83,04966 (C ₅ H ₇ O, berechnet für 83,04969)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton- <i>D</i> ₆):	δ 6,90 (2H, <i>s</i> , H-2, H-6); 6,73 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 16 Hz, H-7); 6,47 (1H, <i>td</i> , <i>J</i> = 6 Hz, 16 Hz, H-8); 6,23 (1H, <i>m</i> , H-3' oder H-3''); 6,12 (1H, <i>qq</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 7 Hz, H-3'' oder H-3'); 4,81 (2H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 6 Hz, H-9); 3,84 (6 H, <i>s</i> , OCH ₃ -3 und OCH ₃ -5); 2,20 (3H, <i>m</i> , CH ₃ -4'' oder CH ₃ -5''); 2,01 (3H, CH ₃ -4'' oder CH ₃ -5'', verdeckt vom Lösemittelpeak); 1,97 (3H, <i>dq</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 7 Hz, CH ₃ -4'); 1,90 (3H, <i>quint</i> , <i>J</i> = 1 Hz, CH ₃ -5') ppm

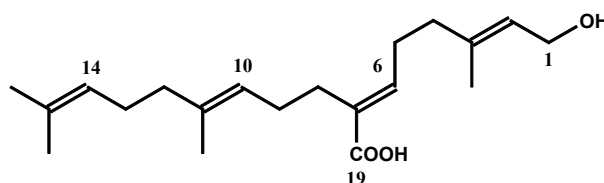


Sinapyldiangelat (16)

5.11.3 6*E*,10*E*,14*E* –Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17)

Menge:	52 mg
Eigenschaften:	dunkelgelbes Öl
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,41 (LM _{DC7}); R _T : 29,6 min (LM _{präpHPLC13});

	R_T : 29,6 min (LM _{al} -HPLC4)
Summenformel:	C ₂₀ H ₃₂ O ₃
(-)-FAB-MS, 3 kV, m/z :	319 [M-H] ⁻
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 6,78 (1H, <i>t</i> , $J = 7$ Hz, H-6); 5,42 (1H, <i>t</i> , $J = 7$ Hz, H-2); 5,19 (1H, <i>t</i> , $J = 7$ Hz, H-10); 5,11 (1H, <i>t</i> , $J = 7$ Hz, H-14); 4,09 (2H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz, H-1); 2,39–2,32 (4H, <i>m</i> , H-8, H-9); 2,17–2,12 (4H, <i>m</i> , H-4, H-5); 1,97 (2H, <i>m</i> , H-12); 2,10–2,01 (2H, H-13, verdeckt vom Lösemittelpeak); 1,67 (3H, <i>s</i> , H-20); 1,66 (3H, <i>s</i> , H-18); 1,59 (6H, <i>s</i> , H-16, H-17) ppm
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ 6,86 (1H, <i>t</i> , $J = 7$ Hz, H-6); 5,43 (1H, <i>brt</i> , $J = 7$ Hz, H-2); 5,14 (1H, <i>t</i> , $J = 7$ Hz, H-10); 5,08 (1H, <i>t</i> , $J = 7$ Hz, H-14); 4,16 (2H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz, H-1); 2,37–2,30 (4H, <i>m</i> , H-8, H-9); 2,17–2,10 (4H, <i>m</i> , H-4, H-5); 2,05 (2H, <i>brt</i> , $J = 7$ Hz, H-13); 1,97 (2H, <i>brt</i> , $J = 7$ Hz, H-12); 1,69 (3H, <i>s</i> , H-20); 1,68 (3H, <i>s</i> , H-18); 1,59 (6H, <i>s</i> , H-16, H-17) ppm



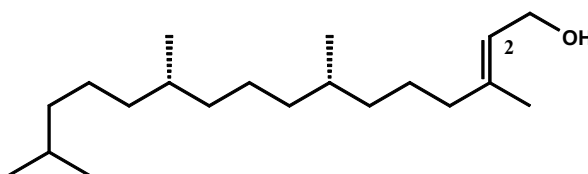
6*E*,10*E*,14*E* –Geranylgeraniol–19–carbonsäure (17)

5.11.4 2*E*-Phytol (18)

Menge:	3 mg
Eigenschaften:	farbloser Feststoff
Chromatographische Parameter:	R_f : 0,47 (LM _{DC} 5)
Summenformel:	C ₂₀ H ₄₀ O
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	296 (2), 278 (2), 196 (3), 137 (7), 123 (9), 111 (11), 95 (7), 81 (7), 71 (100), 57 (40)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 5,43 (1H, <i>dt</i> , $J = 1$ Hz, 7 Hz, H-2); 4,15 (2H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz, H-1); 1,99 (2H, H-4, verdeckt vom

Lösemittelpeak); 1,67 (3H, *s*, H-17); 1,52 (1H, *m*); 1,48–1,10 (18 H, *m*); 0,86 (12H, *d*, $J = 6$ Hz, H-16, H-18, H-19, H-20) ppm

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5,35 (1H, *dt*, $J = 1$ Hz, 7 Hz, H-2); 4,07 (2H, *d*, $J = 7$ Hz, H-1); 2,05 (2H, *t*, $J = 7$ Hz, H-4); 1,62 (3H, *s*, H-17); 1,40–1,01 (19 H, *m*); 0,84 (12H, *d*, $J = 6$ Hz, H-16, H-18, H-19, H-20) ppm



2*E*-Phytol (**18**)

5.11.5 Stigmasterol (**19**)

Menge: 7 mg

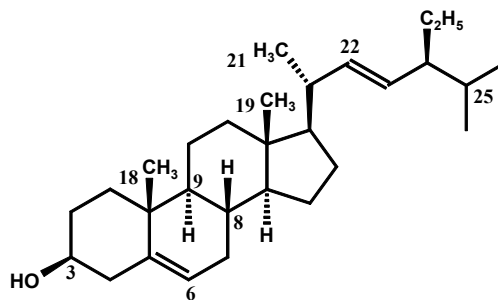
Eigenschaften: farbloser Feststoff

Chromatographische Parameter: R_f : 0,22 (LM_{DC6})

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$

EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV: 412 (40), 369 (12), 271 (60)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- D_6): δ 5,21 (1H, *dd*, $J = 8$ Hz, 15 Hz, H-22 oder H-23); 5,17 (1H, *m*, H-6); 5,09 (1H, *dd*, $J = 8$ Hz, 15 Hz, H-23 oder H-22); 3,48 (1H, *m*); 1,78–1,44 (6H, *m*); 1,38–1,22 (20H, *m*); 1,06 (3H, *d*, $J = 7$ Hz, H-21); 0,88 (6H, *d*, $J = 7$ Hz, H-26 und H-27); 0,83 (3H, *s*, H-18); 0,82 (3H, *m*, H-29); 0,60 (3H, *s*, H-19) ppm



Stigmasterol (**19**)

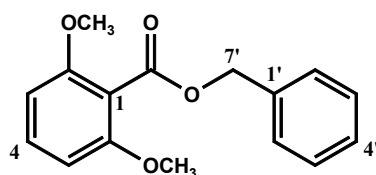
5.11.6 Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (20)

Menge:	5 mg
Eigenschaften:	farbloser Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,52 (LM _{DC} 7); R _T : 11,02 min (LM _{al} -HPLC4)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₆ O ₄
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	272 (31), 241 (2), 181 (3), 165 (100), 150 (9), 107 (14), 91 (51), 77 (9)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 7,46 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-2', H-6'); 7,38–7,34 (4H, <i>m</i> , H-4, H-3', H-4', H-5'); 6,69 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-3, H-5); 5,32 (2H, <i>s</i> , H-7'); 3,80 (6H, <i>s</i> , OCH ₃) ppm
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ 7,44 (2H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-2', H-6'); 7,36 (2H, <i>m</i> , H-3', H-5'); 7,34 (1H, <i>m</i> , H-4'); 7,32 (1H, <i>m</i> , H-4); 6,55 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-3, H-5); 5,38 (2H, <i>s</i> , H-7'); 3,80 (6H, <i>s</i> , OCH ₃) ppm

Tab. 27:

¹³C-¹H-COSY-Spektraldaten (400 MHz, MeOD, δ in ppm) von Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (20)

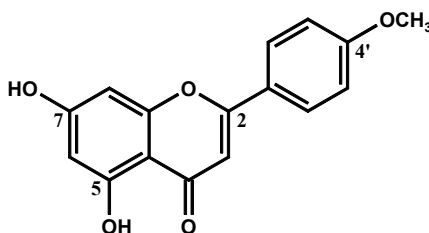
Position des Protons in ppm		Position des C-Atoms in ppm	
7,33	(2H, <i>m</i> , H-2', H-6')	127	(C-2', C-6')
7,26	(2H, <i>m</i> , H-3', H-5')	129	(C-3', C-5')
7,21	(1H, <i>m</i> , H-4')	132	(C-4')
7,20	(1H, <i>brs</i> , H-4)	128	(C-4)
6,56	(2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, H-3, H-5)	104	(C-3, C-5)
5,20	(2H, <i>s</i> , H-7')	67	(C-7')
4,16	(6H, <i>s</i> , OCH ₃)	56	(C-OCH ₃)



Benzyl-2,6-dimethoxybenzoat (20)

5.11.7 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon [Acacetin] (21)

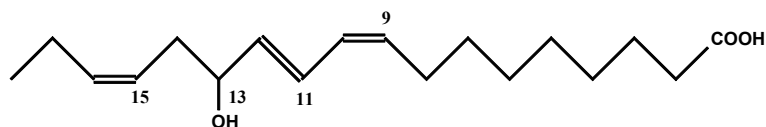
Menge:	3 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,52 (LM _{DC} 8); R _f : 0,42 (LM _{DC} 12)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	284 (100), 151 (14), 132 (31)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 12,98 (1H, <i>s</i> , OH-5); 8,03 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9 Hz, H-2', H-6'); 7,13 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9 Hz, H-3', H-5'); 6,68 (1H, <i>s</i> , H-3); 6,55 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-6 oder H-8); 6,27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-8 oder H-6); 3,95 (3H, <i>s</i> , OCH ₃) ppm



5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon [Acacetin] (21)

5.11.8 13-Hydroxy-9Z,15Z,11E-octadecatriensäure (22)

Menge:	9 mg
Eigenschaften:	farbloser Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,48 (LM _{DC} 7); R _T : 17,97 min (LM _{al-HPLC} 4)
Summenformel:	C ₁₈ H ₃₀ O ₃
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	294 (2), 225 (34), 207 (76), 69 (54)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 6,52 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10 Hz, 15 Hz, H-11); 5,96 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 10 Hz, H-10); 5,72 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6 Hz, 15 Hz, H-12); 5,50–5,31 (3H, <i>m</i> , H-9, H-15, H-16); 4,21 (1H, <i>q</i> , <i>J</i> = 6 Hz, H-13); 2,25 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 10 Hz, H-14); 2,18 (2H, <i>m</i> , H-17); 1,63–1,28 (14 H, <i>m</i>); 0,92 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-18) ppm

13-Hydroxy-9Z,15Z,11E-octadecatriensäure (**22**)

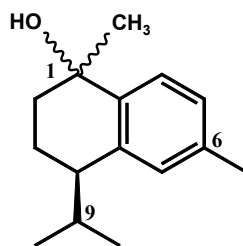
5.11.9 1-Hydroxycalamenen (**23**) und (**24**)

Menge:	12 mg
Eigenschaften:	farbloser Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,49 (LM _{DC} 9); R _f : 0,71 (LM _{DC} 7)
Summenformel:	C ₁₅ H ₂₂ O
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	218 (12), 201 (3), 176 (2), 157 (100), 141 (5), 128 (4), 115 (5), 105 (6), 91 (6), 43 (20)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	siehe Tabelle 28

Tab. 28:

Chemische Verschiebung δ (ppm) der Isomere I und II von 1-Hydroxycalamenen (23**) und (**24**)**

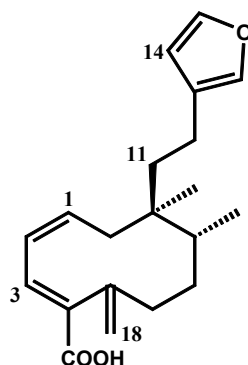
	Isomer I	Isomer II
H-8	7,49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)	7,46 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz)
H-5	7,02 (2H, <i>brs</i>)	
H-7	6,97 (2H, <i>m</i>)	
H-4	2,70 (2H, <i>m</i>)	
H-9, H-2, H-3	1,70–2,02 (10H, <i>m</i>)	
CH ₃	2,25 (6H, <i>s</i>)	
CH ₃	1,41 (3H, <i>s</i>)	1,43 (3H, <i>s</i>)
CH ₃	1,35 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)	1,30 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)
CH ₃	0,68 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)	0,76 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)



1-Hydroxycalamenen (23 und 24)

5.11.10 Strictinsäure (25)

Menge:	30 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,57 (LM _{DC} 7); R _T : 4,21 min (LM _{al-HPLC} 4)
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₆ O ₃
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	314 (6), 299 (3), 233 (3), 201 (3), 191 (4), 163 (3), 150 (15), 135 (19), 121 (12), 95 (17), 81 (8)
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 7,44 (1H, <i>brt</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-15); 7,38 (1H, <i>brs</i> , H-16); 7,24 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz, H-3); 6,39 (1H, <i>brs</i> , H-14); 6,00 (1H, <i>td</i> , <i>J</i> = 2 Hz, 12 Hz, H-2); 5,45 (1H, <i>tdd</i> , <i>J</i> = 2 Hz, 4 Hz; 12 Hz, H-1); 5,00 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2 Hz, H-18); 4,82 (1H, <i>brs</i> , H-18); 2,75 (1H, <i>m</i> , H-7); 2,44 (1H, <i>m</i> , H-7); 2,26 (1H, <i>m</i>); 2,15 (1H, <i>m</i> , H-8); 1,88 (1H, <i>m</i>); 1,58 (1H, <i>m</i>); 1,46 (1H, <i>m</i>); 0,90–0,72 (3H, <i>m</i>); 0,79 (3H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 6 Hz, H-17); 0,76 (3H, <i>s</i> , H-20) ppm
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ 7,39 (1H, <i>m</i> , H-15); 7,35 (1H, <i>brs</i> , H-16); 7,22 (1H, <i>brs</i> , H-3); 6,27 (1H, <i>brs</i> , H-14); 5,92 (1H, <i>m</i> , H-2); 5,39 (1H, <i>tdd</i> , <i>J</i> = 2 Hz, 4 Hz, 12 Hz, H-1); 5,09 (1H, <i>brs</i> , H-18); 4,87 (1H, <i>brs</i> , H-18); 2,68 (2H, <i>m</i>); 2,37 (1H, <i>m</i>); 2,11 (1H, <i>m</i>); 1,97 (1H, <i>m</i>); 1,84 (1H, <i>m</i>); 1,38–1,32 (2H, <i>m</i>); 0,88 (3H, <i>m</i>); 0,79 (3H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 6 Hz, H-17); 0,73 (3H, <i>s</i> , H-20) ppm



Strictinsäure (25)

(rel. Konfiguration)

5.11.11 10 α -Nidoresedasäure (26) und 10 β -Nidoresedasäure (27)

Menge:	57 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,62 (LM _{DC} 7); R _T : 21,54 min (LM _{al} -HPLC4)
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₆ O ₃
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	314 (11), 219 (4), 81 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	siehe Tabelle 29

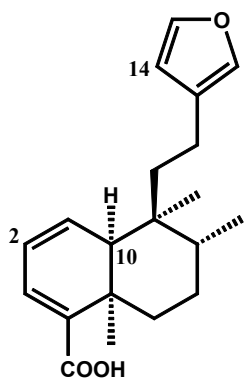
Tab. 29:

¹H-NMR-Spektraldaten (400 MHz, CDCl₃, δ in ppm) der Isomere I und II von 10 α -Nidoresedasäure (26) und 10 β -Nidoresedasäure (27)

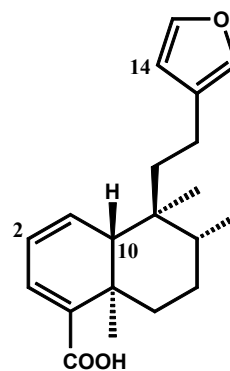
	10 α - Nidoresedasäure (26)	10 β - Nidoresedasäure (27)
H-15	7,31 (2H, <i>brs</i>)	
H-16	7,19 (2H, <i>s</i>)	
H-3	6,87 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 5 Hz)	6,93 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 5 Hz)
H-14	6,25 (1H, <i>s</i>)	6,23 (1H, <i>s</i>)
H-2	6,23–6,19 (2H, <i>m</i>)	
H-1	6,07 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =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

Tab. 29: Fortsetzung

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



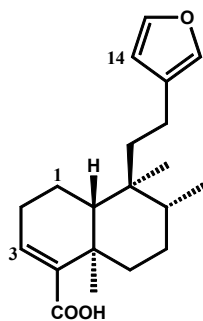
10 α -Nidoresedasäure (26)
(rel. Konfiguration)



10 β -Nidoresedasäure (27)
(rel. Konfiguration)

5.11.12 Hardwickiasäure (28)

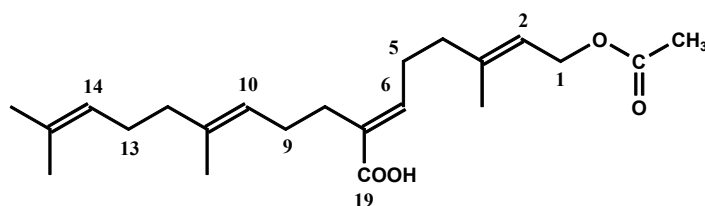
Menge:	3 mg
Eigenschaften:	gelber Feststoff
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,60 (LM _{DC} 7); R _T : 23,43 min (LM _{al} -HPLC4)
Summenformel:	C ₂₀ H ₂₆ O ₃
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	316 (8), 221 (23), 81 (100)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ 7,34 (1H, <i>brs</i> , H-15); 7,13 (1H, <i>s</i> , H-16); 6,86 (1H, <i>t</i> , $J = 3$ Hz, H-3); 6,19 (1H, <i>s</i> , H-14); 2,49–2,12 (4H, <i>m</i>); 2,35 (2H, <i>m</i> , H-2); 1,71–1,42 (4H, <i>m</i>); 1,51 (2H, <i>m</i> , H-1); 1,26 (3H, <i>s</i> , H-18); 0,86 (3H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz, H-17); 0,76 (3H, <i>s</i> , H-20) ppm

Hardwickiasäure (**28**)

(rel. Konfiguration)

5.11.13 1-Acetyl-6E,10E,14E-geranylgeraniol-19-carbonsäure (29)

Menge:	12 mg
Eigenschaften:	gelbes Öl
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,62 (LM _{DC} 10); R _T : 23,68 min (LM _{al-HPLC} 4); R _T : 12,62 min (LM _{al-HPLC} 6);
Summenformel:	C ₂₂ H ₃₄ O ₄
(-)-FAB-MS, 3 kV, <i>m/z</i> :	361 [M-H] ⁻
¹ H-NMR (400 MHz, Aceton-D ₆):	δ 6,77 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-6); 5,39 (1H, <i>tq</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 7 Hz, H-2); 5,19 (1H, <i>tq</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 7 Hz, H-10); 5,10 (1H, <i>tq</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 7 Hz, H-14); 4,59 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-1); 2,41–2,33 (4H, <i>m</i> , H-4, H-5); 2,25–2,12 (4H, <i>m</i> , H-9, H-13); 2,10–2,05 (3H, <i>s</i> , verdeckt vom Lösemittelpeak); 1,98 (4H, <i>m</i> , verdeckt vom Lösemittelpeak); 1,72 (3H, <i>s</i> , H-20); 1,66 (3H, <i>s</i> , H-18); 1,60 (3H, <i>s</i> , H-16 oder H-17); 1,59 (3H, <i>s</i> , H-17 oder H-16) ppm
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ 6,84 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-6); 5,37 (1H, <i>tq</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 7 Hz, H-2); 5,14 (1H, <i>tq</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 7 Hz, H-10); 5,09 (1H, <i>tq</i> , <i>J</i> = 1 Hz, 7 Hz, H-14); 4,59 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-1); 2,36 (4H, <i>m</i> , H-8, H-9); 2,17 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-4 oder H-5); 2,11 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-5 oder H-4); 2,05 (3H, <i>s</i> , OAc); 2,06–1,92 (4H, <i>m</i> , H-12, H-13); 1,72 (3H, <i>s</i> , H-20); 1,68 (3H, <i>s</i> , H-18); 1,60 (6H, <i>s</i> , H-16, H-17) ppm

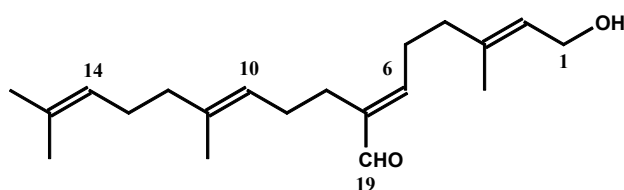
1-Acetyl-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol-19-carbonsäure (**29**)**5.11.14 19-Oxo-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**30**)**

Menge: 3 mg

Eigenschaften: gelbes Öl

Chromatographische Parameter: R_f : 0,62 (LM_{DC10}); R_T : 10,51 min ($LM_{al-HPLC6}$)Summenformel: $C_{20}H_{32}O_2$

1H -NMR (400 MHz, Aceton- D_6): δ 9,38 (1H, *s*, H-19); 6,58 (1H, *t*, $J = 7$ Hz, H-6); 5,44 (1H, *tq*, $J = 1$ Hz, 7 Hz, H-2); 5,15 (1H, *m*, H-10); 5,10 (1H, *m*, H-14); 4,09 (2H, *d*, $J = 7$ Hz, H-1); 2,54 (4H, *m*, H-8, H-9); 2,31–2,24 (4H, *m*, H-4, H-5); 2,00–1,93 (4H, *m*, H-12, H-13); 1,68 (3H, *s*, H-20); 1,66 (3H, *s*, H-18); 1,59 (3H, *s*, H-16 oder H-17); 1,58 (3H, *s*, H-17 oder H-16) ppm

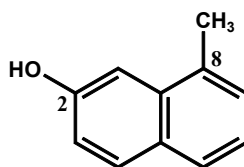
19-Oxo-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (**30**)**5.11.15 8-Methyl- β -naphthol (**31**)**

Menge: 15 mg

Eigenschaften: farblose Kristalle

Chromatographische Parameter: R_f : 0,41 (LM_{DC13}); R_T : 13,33 min ($LM_{präp-HPLC14}$)

Summenformel:	$C_{11}H_{10}O$
EI-MS, m/z (rel. Int. %), 70 eV:	158 (100), 141 (3), 128 (12)
1H -NMR (400 MHz, Aceton- D_6):	δ 8,61 (1H, <i>brs</i> , OH); 7,76 (1H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz, H-4); 7,63 (1H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz, H-5); 7,31 (1H, <i>d</i> , $J = 2$ Hz, H-1); 7,25 (1H, <i>brd</i> , $J = 8$ Hz, H-7); 7,16 (1H, <i>t</i> , $J = 8$ Hz, H-6); 7,15 (1H, <i>dd</i> , $J = 2$ Hz, 8 Hz, H-3); 2,56 (3H, <i>brs</i> , H-9) ppm
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$):	δ 7,76 (1H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz, H-4); 7,64 (1H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz, H-5); 7,29 (1H, <i>m</i> , H-7); 7,28–7,25 (1H, <i>d</i> , verdeckt vom Lösemittelpeak); 7,21 (1H, <i>m</i> , H-6); 7,10 (1H, <i>dd</i> , $J = 2$ Hz, 8 Hz, H-3); 2,61 (3H, <i>brs</i> , H-9) ppm

8-Methyl- β -naphthol (31)

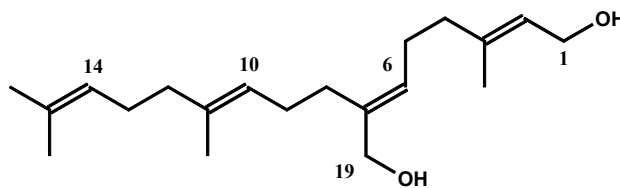
5.12 Synthese von 19-Hydroxy-6*E*,10*E*,14*E*-geranylgeraniol (32)

Die Partialsynthese wurde unter der Mitarbeit von Dipl.-Chem. T. Wiglenda in den Laboratorien des Arbeitskreises von Prof. R. Gust, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin durchgeführt.

Zu einer gerührten Suspension von 0,094 mmol (3,6 mg) $LiAlH_4$ in 15 ml abs. Diethylether wurden bei $-80^\circ C$ unter N_2 -Atmosphäre 0,094 mmol (30,0 mg) 6*E*,10*E*,14*E*-Geranylgeraniol-19-carbonsäure (17) portionsweise vorsichtig zugegeben. Man rührte zunächst noch 1h bei $-80^\circ C$ und ließ anschließend den Reaktionsansatz innerhalb von 4h auf Raumtemperatur erwärmen. Nach abgeschlossener Reduktion wurde das überschüssige $LiAlH_4$ mit Wasser unter Eiskühlung hydrolysiert. Man trennte den Niederschlag ab, welcher anschließend zweimal mit je 5 ml Diethylether gewaschen wurde und trocknete die vereinigten etherischen Phasen über Na_2SO_4 . Anschließend wurde das Lösemittel entfernt.

19-Hydroxy-6E,10E,14E-geranylgeraniol (32)

Menge:	5 mg
Eigenschaften:	gelbliches Öl
Chromatographische Parameter:	R _f : 0,58 (LM _{DC} 10); R _T : 7,65 min (LM _{al} -HPLC6)
Summenformel:	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
EI-MS, <i>m/z</i> (rel. Int. %), 70 eV:	306 (8), 288 (12), 270 (10)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ 5,43 (1H, <i>td</i> , <i>J</i> = 7 Hz, 1 Hz, H-6); 5,39 (1H, <i>td</i> , <i>J</i> = 7 Hz, 1 Hz, H-2); 5,13 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-10); 5,08 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-14); 4,16 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz, H-1); 4,04 (2H, <i>brs</i> , H-19); 2,20 (4H, <i>m</i> , H-8, H-9); 2,08–1,98 (8H, <i>m</i> , H-4, H-5, H-12, H-13); 1,69 (6H, <i>s</i> , H-18, H-20); 1,60 (6H, <i>s</i> , H-16, H-17) ppm



19-Hydroxy-6E,10E,14E-geranylgeraniol (32)

5.13 Untersuchung weiterer Pflanzendrogenextrakte**5.13.1 *Hymenodictyon floribundum* (HOCHST. & STEND.) B.L. ROB. (Rubiaceae)**

229 g gemahlene Wurzel Droge von *H. floribundum* wurden dreimal bei Raumtemperatur mit MeOH (jeweils 1 l) über Nacht kaltextrahiert. Der erhaltene Wurzelrohextrakt (75 g) wurde in 300 g Celite aufgenommen und in eine offene Kieselgelsäule gegeben, welche mit folgenden Lösemitteln in dieser Reihenfolge eluiert wurde: Cyclohexan (2 l), EtOAc (2 l), MeOH (3 l). Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 8 ml/min. Das Eluat wurde zu drei Fraktionen (Cyclohexan-, EtOAc-, und MeOH-Fraktion) vereinigt, welche anschließend dem antiplasmodialen Test zugeführt wurden (jeweils Dd2). Alle drei Fraktionen erwiesen sich als nicht aktiv.

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

190 g gemahlener Blattdroge von *I. calea* wurden sechsmal bei Raumtemperatur mit PE–EtOAc (1:1; V/V, jeweils 0,5 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach Verdunsten des Lösemittels wurde das Drogenmaterial unter den gleichen Bedingungen dreimal mit MeOH (1,5 l) kaltextrahiert. Nach Einengen des Lösemittels lagen 12 g des lipophilen PE–EtOAc–Rohextrakts und 9 g des methanolischen Rohextrakts vor. Proben beider Rohextrakte wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt. Der lipophile Rohextrakt wies eine antiparasitäre Aktivität mit IC_{50} -Werten von 5,8 $\mu\text{g/ml}$ [PoW] und 8,2 $\mu\text{g/ml}$ [Dd2] auf. Der methanolische Rohextrakt zeigte keine Hemmwirkung gegenüber dem Parasiten. Der lipophile Rohextrakt wurde an einer RP–18–Säule weiter aufgetrennt. Hierzu wurde der Rohextrakt, gelöst in 100 ml PE–EtOAc (1:1; V/V), auf 25 g Celite aufgezogen. Die RP–18–Säule (MPLC) wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen des Lösemittelgemisches MeOH–H₂O (4:6; V/V) äquilibriert. Anschließend wurde der Extrakt auf das Säulenbett aufgetragen und mit einem MeOH–H₂O–Gradienten abnehmender Polarität (4:6 bis 9:1; V/V; je 400 ml), MeOH (600 ml) und CHCl₃ (600 ml) fraktioniert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 8 ml/min. Das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen vereinigt, welche anschließend getestet wurden. Alle Fraktionen erwiesen sich als nicht aktiv. Die gemahlene Blüten (250 g) von *I. calea* wurden dreimal bei Raumtemperatur mit PE–EtOAc (1:1; V/V; jeweils 2,0 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach Verdunsten des Lösemittels wurde das Drogenmaterial unter den gleichen Bedingungen mit MeOH (1,5 l) kaltextrahiert. Nach Einengen des Lösemittels lagen 19 g des lipophilen PE–EtOAc–Rohextrakts und 10 g des methanolischen Rohextrakts vor. Proben beider Rohextrakte wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt und erwiesen sich als nicht aktiv. 10 g der gemahlene Zweigrinde von *I. calea* wurden dreimal bei Raumtemperatur mit PE–EtOAc (1:1, V/V, jeweils 100 ml) über Nacht kaltextrahiert. Nach Verdunsten des Lösemittels wurde das Drogenmaterial unter den gleichen Bedingungen mit MeOH (100 ml) kaltextrahiert. Proben beider Rohextrakte wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt und erwiesen sich als nicht aktiv. Zusätzlich wurde aus jeweils 10 g der Blätter, Blüten und Zweigrinde ein wässriger Infus hergestellt. Hierzu wurde die gemahlene Droge mit 200 ml kochendem Wasser übergossen und unter gelegentlichem Umrühren für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde abfiltriert und das Filtrat in einer

Abdampfschale bei 60°C zur Trockne eingedampft. Proben der drei Rückstände wurden dem Test zugeführt und zeigten keine antiplasmodiale Aktivität.

5.13.3 *Crotalaria laburnifolia* L. (Fabaceae)

Die gemahlene Blätter (40 g) der Pflanze wurden dreimal bei Raumtemperatur mit PE–EtOAc (1:1, V/V, jeweils 0,5 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach Verdunsten des Lösemittels wurde das Drogenmaterial unter den gleichen Bedingungen mit MeOH (0,5 l) kaltextrahiert. Proben beider Rohextrakte wurden dem antiplasmodialen Test zugeführt und erwiesen sich als nicht aktiv. 150 g der gemahlene Blüten wurden dreimal bei Raumtemperatur mit PE–EtOAc (1:1, V/V, jeweils 2,5 l) über Nacht kaltextrahiert. Nach Verdunsten des Lösemittels wurde das Drogenmaterial unter den gleichen Bedingungen mit MeOH (1,5 l) kaltextrahiert. Proben beider Rohextrakte wurden getestet und wiesen keine antiparasitäre Aktivität auf. 50 g der zermahlene Samen von *C. laburnifolia* wurden zum Entfetten für 24 Stunden in 500 ml Petrolether bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand viermal bei Raumtemperatur mit MeOH (jeweils 0,4 l) über Nacht kaltextrahiert. Die vereinten Extrakte wurden im Vakuum vollständig eingeeengt, anschließend wurde der Rückstand in 400 ml 2%iger wässriger Weinsäure–Lösung (m/V) aufgenommen (pH 2) und jeweils dreimal mit 500 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Eine Probe der erhaltenen CHCl₃–Phase wurde nach Entfernung des Lösemittels dem antiplasmodialen Test zugeführt und zeigte keine Hemmwirkung gegenüber *P. falciparum*. Zur Gewinnung der Basenfraktion wurde die wässrige Phase mit 25%iger wässriger NH₃–Lösung (V/V) auf pH 9–10 gebracht und dreimal mit je 500 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Nach der Trocknung über wasserfreiem Na₂SO₄ wurde das Lösemittel vollständig im Vakuum entfernt. Eine Probe des erhaltenen Rückstandes wurde dem Test zugeführt und zeigte keine Hemmwirkung. Um enthaltene quartäre Alkaloide anreichern zu können, wurde die wässrige Phase dreimal mit je 400 ml *n*–Butanol ausgeschüttelt. Nach Entfernen des Lösemittels wurde sowohl eine Probe des butanolischen als auch eine Probe des wässrigen Rückstandes dem Test zugeführt. Beide wiesen keine antiparasitäre Aktivität auf. Zusätzlich wurde aus jeweils 10 g der Blätter und Blüten ein wässriger Infus, wie in Kapitel 5.13.2. beschrieben, hergestellt. Proben der Rückstände wurden getestet und zeigten keine antiplasmodiale Wirkung.

5.14 Synthese der semi-synthetischen N,N' -verknüpften Ergolinoligomere

Alle getesteten semi-synthetischen N,N' -verknüpften Ergolinoligomere wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. V. Křen (Institut für Mikrobiologie, Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik Prag) synthetisiert. Die Darstellung der $N-1,N-1'$ -verknüpften Terguriddimere **1a** bis **1h** ist in der Literatur beschrieben worden (Křen *et al.*, 2002). Die Synthesen des $N-1,N-1'$ -verknüpften Pergoliddimers **3c** und des $N-6,N-6'$ -verknüpften Depropylpergoliddimers **3i** wurden ebenfalls veröffentlicht (Křen *et al.*, 2001).