

**Phytochemische Untersuchung der Blätter von
Eupatorium semialatum Benth.,
einer in Zentralamerika traditionell verwendeten
Arzneipflanze („Bacché“)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Günter Lang

aus Bonn

Düsseldorf 2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Proksch

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. C.M. Paßreiter

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2001

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. P. Proksch

am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. P. Proksch danke ich sehr herzlich für seine großzügige und wohlwollende Unterstützung meiner Arbeit und die Bereitstellung der vorbildlichen Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. C. M. Paßreiter für seine Freundschaft und vorzügliche Betreuung, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie die vielen wertvollen Anregungen, die für das Gelingen dieser Arbeit unerlässlich waren.

Herrn Prof. Dr. G. Willuhn danke ich dafür, mein besonderes Interesse für die pharmazeutische Biologie geweckt und mir die Möglichkeit eröffnet zu haben, die vorliegende Arbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf beginnen zu dürfen.

Meinen Eltern und meiner Frau Sabine

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
2	EIGENE PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	9
2.1	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON SESQUITERPENLACTONEN AUS <i>EUPATORIUM SEMIALATUM</i>	9
2.1.1	Extraktion und Fraktionierung.....	12
2.1.2	Verbindung SL1 (8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin).....	13
2.1.3	Verbindung SL2 (8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin).....	25
2.1.4	Verbindung SL3 (8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]balchanin).....	30
2.1.5	Verbindung SL4 (Trichomatolid D).....	34
2.1.6	Verbindung SL5 (8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin).....	37
2.1.7	Verbindung SL6 (8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin).....	46
2.1.8	Verbindung SL7 (8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin).....	52
2.1.9	Verbindung SL8 (8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin).....	58
2.1.10	Verbindung SL9 (8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid).....	61
2.1.11	Verbindung SL10 (8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid).....	70
2.1.12	Verbindung SL11 (3 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4 α -methoxy- 10(14),11(13)-guaidiol-12,6-olid).....	73
2.2	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON FLAVONOID-AGLYKA AUS <i>EUPATORIUM SEMIALATUM</i>	83
2.2.1	Extraktion und Fraktionierung.....	84
2.2.2	Verbindung FA1 (Hispidulin).....	85
2.2.3	Verbindung FA2 (Pectolinarigenin).....	94
2.2.4	Verbindung FA3 (Eupafolin).....	96
2.2.5	Verbindung FA4 (Desmethoxycentaureidin).....	101
2.2.6	Verbindung FA5 (Acacetin).....	106
2.2.7	Verbindung FA6 (Patuletin).....	108
2.2.8	Verbindung FA7 (Laciniatin).....	114
2.2.9	Verbindung FA8 (Mikanin).....	119
2.2.10	Verbindung FA9 (Axillarin).....	124
2.3	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON FLAVONOID-GLYKOSIDEN AUS <i>EUPATORIUM SEMIALATUM</i>	125
2.3.1	Extraktion und Fraktionierung.....	125

2.3.2	Verbindung FG1 (Eupalin).....	125
2.3.3	Verbindung FG2 (Eupalitin 3-rhamnosid-4'-glucosid).....	132
2.3.4	Verbindung FG3 (Eupalitin 3-glucosid).....	140
2.3.5	Verbindung FG4 (Eupalitin 3-galactosid).....	146
2.3.6	Verbindung FG5 (Eupatolin).....	150
2.3.7	Verbindung FG6 (6-Methoxykaempferol 3-glucosid).....	157
2.3.8	Verbindung FG7 (6-Methoxykaempferol 3-galactosid).....	162
2.3.9	Verbindung FG8 (6-Methoxykaempferol 3-rhamnosid).....	168
2.3.10	Verbindung FG9 (Patuletin 3-galactosid).....	172
2.3.11	Verbindung FG10 (Patuletin 3-rhamnosid).....	179
2.3.12	Verbindung FG11 (Patuletin 3-glucosid).....	185
2.3.13	Erkenntnisse zur Fragmentierung von 6-Hydroxykaempferol-Dimethylethern bei der LC-MS.....	190
2.4	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON KAFFEOYL-CHINASÄUREN AUS <i>EUPATORIUM SEMIALATUM</i>	193
2.4.1	Extraktion und Fraktionierung.....	193
2.4.2	Verbindung KC1 (Chlorogensäuremethylester).....	194
2.4.3	Verbindung KC2 (Kryptochlorogensäuremethylester).....	205
2.4.4	Verbindung KC3 (Neochlorogensäuremethylester).....	207
2.4.5	Verbindung KC4 (Isochlorogensäure b).....	209
2.4.6	Verbindung KC5 (Isochlorogensäure b-methylester).....	215
2.4.7	Verbindung KC6 (Isochlorogensäure a-methylester).....	219
2.4.8	Verbindung KC7 (Isochlorogensäure c).....	223
2.4.9	Verbindung KC8 (Isochlorogensäure c-methylester).....	225
2.5	EXTRAKTION UND IDENTIFIZIERUNG VON PYRROLIZIDIN-ALKALOIDEN UND MONOTERPENEN AUS <i>EUPATORIUM SEMIALATUM</i>	228
2.5.1	Extraktion.....	230
2.5.2	Identifizierung der Pyrrolizidinalkaloide PA1 – PA5 (Tussilagin, Isotussilagin, Neotussilagin, Neoisotussilagin und Pyrrolidin-2-essigsäuremethylester).....	231
2.5.3	Identifizierung der beiden Monoterpene MO1 und MO2 (<i>trans</i> -Terpin und <i>trans</i> -Sobrerol).....	237
2.6	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG WEITERER VERBINDUNGEN AUS <i>EUPATORIUM SEMIALATUM</i>	239
2.6.1	Extraktion und Fraktionierung.....	239
2.6.2	Verbindung SE1 (11-Cinnamoyloxyoplopanon).....	239
2.6.3	Verbindung TR1 (Oleanolsäure).....	247
2.6.4	Verbindung CU1 (Aesculin).....	252

3	EIGENE PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	257
3.1	MALARIA – EINE GEIßEL DER MENSCHHEIT.....	257
3.2	BESTIMMUNG DER ANTIPLASMODIALEN AKTIVITÄT VON SEKUNDÄR-STOFFEN AUS DEM DICHLORMETHAN-EXTRAKT VON <i>E. SEMIALATUM</i>	266
3.2.1	Der pLDH-Test (Parasiten-Lactatdehydrogenase-Test).....	266
3.2.2	Ergebnisse.....	269
4	DISKUSSION	273
5	ZUSAMMENFASSUNG	293
6	EXPERIMENTELLER TEIL	295
6.1	ALLGEMEINES.....	295
6.2	CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN.....	295
6.2.1	Dünnschicht-Chromatographie (DC).....	295
6.2.2	Säulenchromatographie (SC).....	298
6.2.3	Niederdruck-Flüssigchromatographie (LPLC).....	300
6.2.4	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC).....	301
6.2.5	Gaschromatographie (GC).....	302
6.3	SPEKTROSKOPISCHE VERFAHREN.....	303
6.3.1	Optische Drehung.....	303
6.3.2	IR-Spektroskopie.....	303
6.3.3	UV-Spektroskopie.....	303
6.3.4	Massenspektrometrie (MS).....	304
6.3.5	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR).....	305
6.4	GEKOPPELTE VERFAHREN.....	305
6.4.1	GC-MS.....	305
6.4.2	LC-MS.....	306
6.5	ISOLIERUNG DER INHALTSSTOFFE AUS <i>EUPATORIUM SEMIALATUM</i>	308
6.5.1	Herkunft des Drogenmaterials.....	308
6.5.2	Gewinnung der Rohextrakte.....	308
6.5.3	Fraktionierung des Dichlormethan-Extraktes.....	308
6.5.3.1	Auftrennung der Fraktion D-II.....	309
6.5.3.2	Auftrennung der Fraktion D-IV.....	310
6.5.4	Isolierung und analytische Daten der Sesquiterpenlactone und anderer terpenoider Verbindungen aus dem Dichlormethan-Extrakt.....	311
6.5.4.1	Verbindung SL1 (8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin).....	311
6.5.4.2	Verbindung SL2 (8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin).....	312
6.5.4.3	Verbindung SL3 (8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]balchanin).....	312

6.5.4.4	Verbindung SL4 (Trichomatolid D).....	313
6.5.4.5	Verbindung SL5 (8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin).....	314
6.5.4.6	Verbindung SL6 (8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin).....	315
6.5.4.7	Verbindung SL7 (8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin).....	315
6.5.4.8	Verbindung SL8 (8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin).....	316
6.5.4.9	Verbindung SL9 (8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid).....	317
6.5.4.10	Verbindung SL10 (8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid)	317
6.5.4.11	Verbindung SL11 (3 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4 α -methoxy- 10(14),11(13)-guaadien-12,6-olid).....	318
6.5.4.12	Verbindung SE1 (11-Cinnamoyloxyoplopanon).....	319
6.5.4.13	Verbindung TR1 (Oleanolsäure).....	319
6.5.5	Isolierung und analytische Daten der Flavonoid-Aglyka.....	320
6.5.5.1	Verbindung FA1 (Hispidulin).....	320
6.5.5.2	Verbindung FA2 (Pectolinarigenin).....	321
6.5.5.3	Verbindung FA3 (Eupafolin).....	321
6.5.5.4	Verbindung FA4 (Desmethoxycentaureidin).....	321
6.5.5.5	Verbindung FA5 (Acacetin).....	322
6.5.5.6	Verbindung FA6 (Patuletin).....	322
6.5.5.7	Verbindung FA7 (Laciniatin).....	323
6.5.5.8	Verbindung FA8 (Mikanin).....	323
6.5.5.9	Verbindung FA9 (Axillarin).....	323
6.5.6	Fraktionierung des Methanol-Extraktes.....	324
6.5.6.1	Auftrennung der Fraktion M-II.....	324
6.5.6.2	Auftrennung der Fraktion M-IV.....	325
6.5.6.3	Auftrennung der Fraktion M-V.....	325
6.5.6.4	Auftrennung der Fraktion M-VII.....	326
6.5.6.5	Auftrennung der Fraktion M-VIII.....	326
6.5.7	Isolierung und analytische Daten der Flavonoid-Glykoside und Kaffeoyl- Chinasäuren sowie eines Coumarin-Glykosids aus dem Methanol-Extrakt.....	327
6.5.7.1	Verbindung FG1 (Eupalin).....	327
6.5.7.2	Verbindung FG2 (Eupalitin 3-rhamnosid-4'-glucosid).....	327
6.5.7.3	Verbindung FG3 (Eupalitin 3-glucosid).....	328
6.5.7.4	Verbindung FG4 (Eupalitin 3-galactosid).....	328
6.5.7.5	Verbindung FG5 (Eupatolin).....	329
6.5.7.6	Verbindung FG6 (6-Methoxykaempferol 3-glucosid).....	329
6.5.7.7	Verbindung FG7 (6-Methoxykaempferol 3-galactosid).....	330
6.5.7.8	Verbindung FG8 (6-Methoxykaempferol 3-rhamnosid).....	330
6.5.7.9	Verbindung FG9 (Patuletin 3-galactosid).....	331
6.5.7.10	Verbindung FG10 (Patuletin 3-rhamnosid).....	331
6.5.7.11	Verbindung FG11 (Patuletin 3-glucosid).....	332
6.5.7.12	Verbindung KC1 (Chlorogensäuremethylester).....	332
6.5.7.13	Verbindung KC2 (Kryptochlorogensäuremethylester).....	333
6.5.7.14	Verbindung KC3 (Neochlorogensäuremethylester).....	333
6.5.7.15	Verbindung KC4 (Isochlorogensäure b).....	334
6.5.7.16	Verbindung KC5 (Isochlorogensäure b-methylester).....	334
6.5.7.17	Verbindung KC6 (Isochlorogensäure a-methylester).....	335

6.5.7.18	Verbindung KC7 (Isochlorogensäure c).....	336
6.5.7.19	Verbindung KC8 (Isochlorogensäure c-methylester).....	336
6.5.7.20	Verbindung CU1 (Aesculin).....	337
6.5.8	Aufreinigung der 140 g-Portion des Methanol-Extraktes zum Nachweis der Pyrrolizidin-Alkaloide.....	337
6.5.9	Analytische Daten der Pyrrolizidin-Alkaloide aus Fraktion I und der in Fraktion II vorliegenden Monoterpene.....	338
6.6	PHARMAKOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN.....	341
6.6.1	Allgemeines.....	341
6.6.2	Reagenzien und Mischungen.....	341
6.6.3	Herkunft der Parasiten-Isolate.....	342
6.6.4	Gewinnung des Blut-Serums.....	342
6.6.5	Aufbereitung der Erythrozyten.....	342
6.6.6	Kultivierung der Plasmodien.....	342
6.6.7	Blutaustriche und Zählung der Parasiten.....	343
6.6.8	Durchführung des modifizierten pLDH-Assays.....	343
6.6.9	Berechnung der IC ₅₀	344
6.6.10	Statistischer Vergleich der Mittelwerte.....	344
7	LITERATUR	345

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Ageratina</i>
ANOVA	Analysis of Variance
APAD	3-Acetylpyridinadenindinucleotid
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
ATP	Adenosintriphosphat
CI	Chemical Ionisation
CID	Collision Induced Dissociation
COSY	Correlated Spectroscopy
DADI	Direct Analysis of Daughter Ions
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DI	Direct Inlet
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	<i>Eupatorium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Kopplung zwischen GC und MS
HETCOR	Heteronuclear Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IC	Inhibitory Concentration
IR	infrarot
LC-MS	Kopplung zwischen HPLC und MS
LPLC	Niederdruck-Flüssigchromatographie
M _r	Relative Molekülmasse
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
P.	<i>Plasmodium</i>
PA	Pyrrolizidin-Alkaloide
p _f LDH	<i>Plasmodium falciparum</i> Lactatdehydrogenase
pLDH-Test	Parasiten-Lactatdehydrogenase-Test
RDA	Retro-Diels-Alder
R _f	Retentionsfaktor
RP	Reversed Phase = Umkehrphase
R _t	Retentionszeit
SC	Offene Säulen-Chromatographie

SL	Sesquiterpenlactone
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TMS	Tetramethylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
VIS	visible (sichtbar)

Zur besseren Orientierung besitzt jede Verbindungs-Nummer in dieser Arbeit ein Präfix, welches die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Naturstoffgruppe anzeigt:

CU	Coumarine
FA	Flavonoid-Aglyka
FG	Flavonoid-Glykoside
KC	Kaffeoyl-Chinasäuren
MO	Monoterpene
PA	Pyrrolizidin-Alkaloide und strukturell verwandte Substanzen
SE	Sesquiterpene
SL	Sesquiterpenlactone
TR	Triterpene

1 Einleitung und Problemstellung

Die Familie der Asteraceae repräsentiert mit ihren 14 Triben und den mehr als 20.000 bekannten Arten eine der formenreichsten Verwandtschaftsgruppen innerhalb der bedecktsamigen Pflanzen. Die Gattung *Eupatorium* wird in die Tribus Eupatorieae, Subtribus Eupatoriinae, eingeordnet [KING und ROBINSON, 1987]. Der Ursprung der von Linné für den in Europa beheimateten Wasserdost (*Eupatorium cannabinum* L.) eingeführten Gattungsbezeichnung ist nicht genau bekannt. Manche Autoren vertreten die Auffassung, dass er von der alten Form „Hepatorium“ herrührt, mit der auf die Verwendung des Krautes bei Lebererkrankungen angespielt wird [WOERDENBAG, 1986]. Die Botaniker King und Robinson gehen dagegen davon aus, dass die Bezeichnung eine Ehrung des Pontischen Königs Mithridates Eupator (132 – 163 n. Chr.) darstellt. In Überlieferungen heißt es, dieser antike Herrscher habe eine *Eupatorium*-Art in die Medizin eingeführt [KING und ROBINSON, 1987].

Vertreter der Eupatorieae findet man vor allem in Mexiko sowie Zentral- und Südamerika. Einige Genera kommen auch in Nordamerika vor, während die Verbreitung in der alten Welt sehr beschränkt ist. Aus Europa ist lediglich *Eupatorium cannabinum* bekannt [KING und ROBINSON, 1987].



Bild 1.1: Diese Aufnahme von *E. semialatum* entstand bei Purulhá in der Baja Verapaz (Guatemala) unmittelbar vor dem Schneiden der in dieser Arbeit untersuchten Blätter

Guatemala und die angrenzenden Areale in Mexico und Belize besitzen sowohl von der Fülle der vorkommenden Arten als auch von der Menge der Individuen die reichsten Bestände an Vertretern der Eupatorieae in der Welt. Man begegnet den in Guatemala heimischen Arten in großer Zahl nach der Regenzeit (November bis Januar). Die meisten von ihnen gedeihen in Gebieten, in denen sich trockene und feuchte Vegetationsperioden abwechseln. Dies trifft besonders auf das westliche Hochland von Guatemala zu. Einige Spezialisten besiedeln jedoch ausschließlich die humiden montanen Regionen oder das feuchte Tiefland an der Atlantikküste [WILLIAMS, 1975].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Spezies *Eupatorium semialatum* Benth. wächst in Guatemala in regenreichen Dickichten oder Mischwäldern mit Eichen und Kiefern in Höhen zwischen 1000 und 3300 m über dem Meeresspiegel [CÁCERES, 1996; MORTON, 1981; NASH und WILLIAMS, 1976]. Das für die eigenen Untersuchungen verwendete Drogenmaterial der von den Einheimischen u.a. „Bacché“ genannten Pflanze stammt aus den Nebelwäldern des Hochlandes Alta Verapaz (siehe Bild 1.2, S. 2). *E. semialatum*, im Jahre 1840 erstmals von BENTHAM beschrieben, ist ein 1,5 bis 6 Meter hoher Strauch mit zahlreichen hellrosa bis weiß gefärbten Infloreszenzen (siehe Bild 1.1, S. 1). Zur Blütezeit verströmen die Blüten einen intensiven Duft. Die Laubblätter tragen auf ihrer Unterseite kleine punktförmige Drüsen.

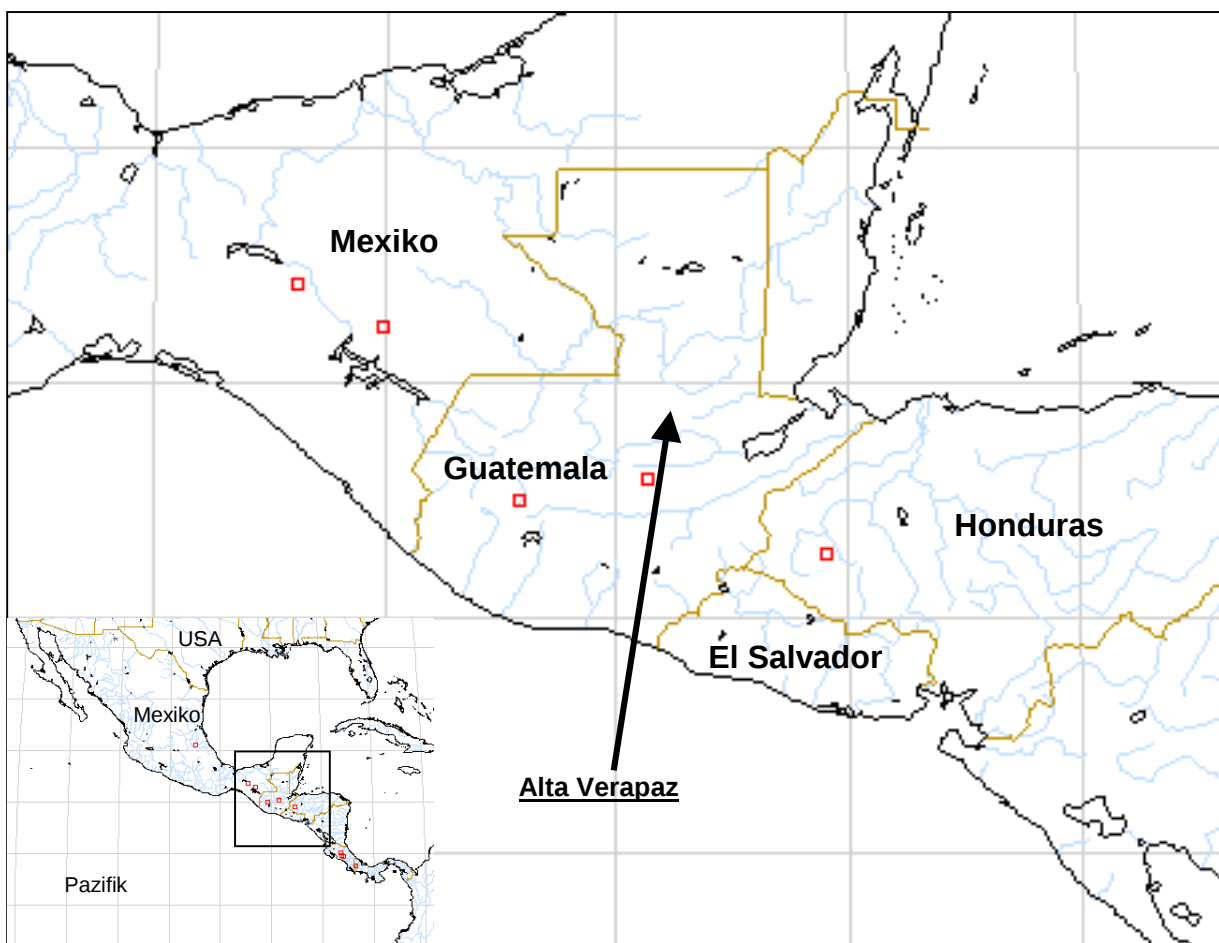


Bild 1.2: Herkunft des Drogenmaterials; das Quadrat in der kleinen Karte von Mittelamerika markiert den Ausschnitt der Detailkarte von Guatemala und den angrenzenden Ländern

In der Volksmedizin von Guatemala spielen die dort heimischen Arzneipflanzen eine große Rolle bei der Behandlung vieler verschiedener Krankheiten. Das bitter schmeckende Dekokt aus den nach der Blüte gesammelten Blättern von *E. semialatum* wird insbesondere von den Bewohnern des Distrikts Alta Verapaz zur Behandlung von Malaria, gastrointestinalen Beschwerden (Amöbiasis, Diarrhoe und Colitis), Schmerz verschiedener Genese, Erkrankungen des Blutes und der Niere, Hepatitis, Husten und Keuchhusten verwendet. Darüber hinaus wird berichtet, dass es bei der Linderung von Koliken in der Veterinär-Medizin gut wirksam ist [CÁCERES, 1996; DIESELDORFF, 1977; MEDINILLA und DE GARCÍA, 1978; MEJÍA, 1922; MORTON, 1981; NASH und WILLIAMS, 1976; SUTHERLAND, 1986]. Einige dieser Indikationen entsprechen damit weitgehend denen der häufig verwendeten Arzneipflanze *Neurolaena lobata* (L.) R.Br., einer ebenfalls in Guatemala heimischen Asteraceae. Somit erscheint es nicht verwunderlich, dass *E. semialatum* in der Alta Verapaz als Ersatz für eventuell nicht verfügbare *Neurolaena lobata*-Blätter eingesetzt wird [MEDINILLA und DE GARCÍA, 1978].

Die Systematik der Eupatorieae ist von mehreren Botanikern sehr intensiv untersucht und in Folge konkurrierender Interpretationen des verfügbaren Herbarmaterials kontrovers diskutiert worden. Insbesondere die Stellung einiger *Eupatorium*-Arten im taxonomischen Kontext der Eupatorieae bereitet nach wie vor Schwierigkeiten, da etliche Gattungsbezeichnungen existieren, von denen noch unklar ist, ob es sich um Synonyme für dieselbe Art oder um verschiedene Spezies handelt. So vertraten King und Robinson die Auffassung, dass *E. ligustrinum* eigentlich eine *Ageratina*-Spezies (*Ageratina ligustrina* (DC.) R. King & H. Robinson) aus der Subtribus Oxylobinae darstellt [KING und ROBINSON, 1970a]. Als weitere Synonyme für *A. ligustrina* nannten sie in ihrer später erschienenen Monographie über die Tribus Eupatorieae neben *E. biceps* Klotzsch ex Vatke, *E. erythropappum* B. Robinson, *E. glabellum* Hort. Ex Sieber & Voss, *E. ligustrinum* DC., *E. micranthum* Less., *E. myriadenium* Schauer, *E. odoratissimum* Hort. Ex Sieber & Voss und *E. weinmannianum* Regel & Koern. auch die in dieser Arbeit behandelte Spezies *E. semialatum* Benth. [ROBINSON und KING, 1985].

Der Botaniker Williams dagegen betrachtete *E. semialatum* Benth. schon vor Erscheinen der Monographie von King und Robinson als eigenständige Art, die nicht mit *E. ligustrinum* bzw. *A. ligustrina* identisch ist. Er ging davon aus, dass *E. ligustrinum* eine nordmexikanische Art repräsentiert, die sich deutlich von der in Guatemala heimischen Spezies *E. semialatum* unterscheidet [NASH und WILLIAMS, 1976; WILLIAMS, 1975].

Neben den von King und Robinson genannten Synonymen für *E. semialatum* existieren in der Literatur noch weitere als synonym erachtete Bezeichnungen: *A. caeciliae* (B.L. Rob.) King H. Rob., *A. plethadenia* King & Robinson, *E. caeciliae* B.L. Rob., *E. plethadenium* Standl. & Steyerl. und *E. vetularum* Standl. & Steyerl. [NASH und WILLIAMS, 1976; TURNER, 1997; WILLIAMS, 1975].

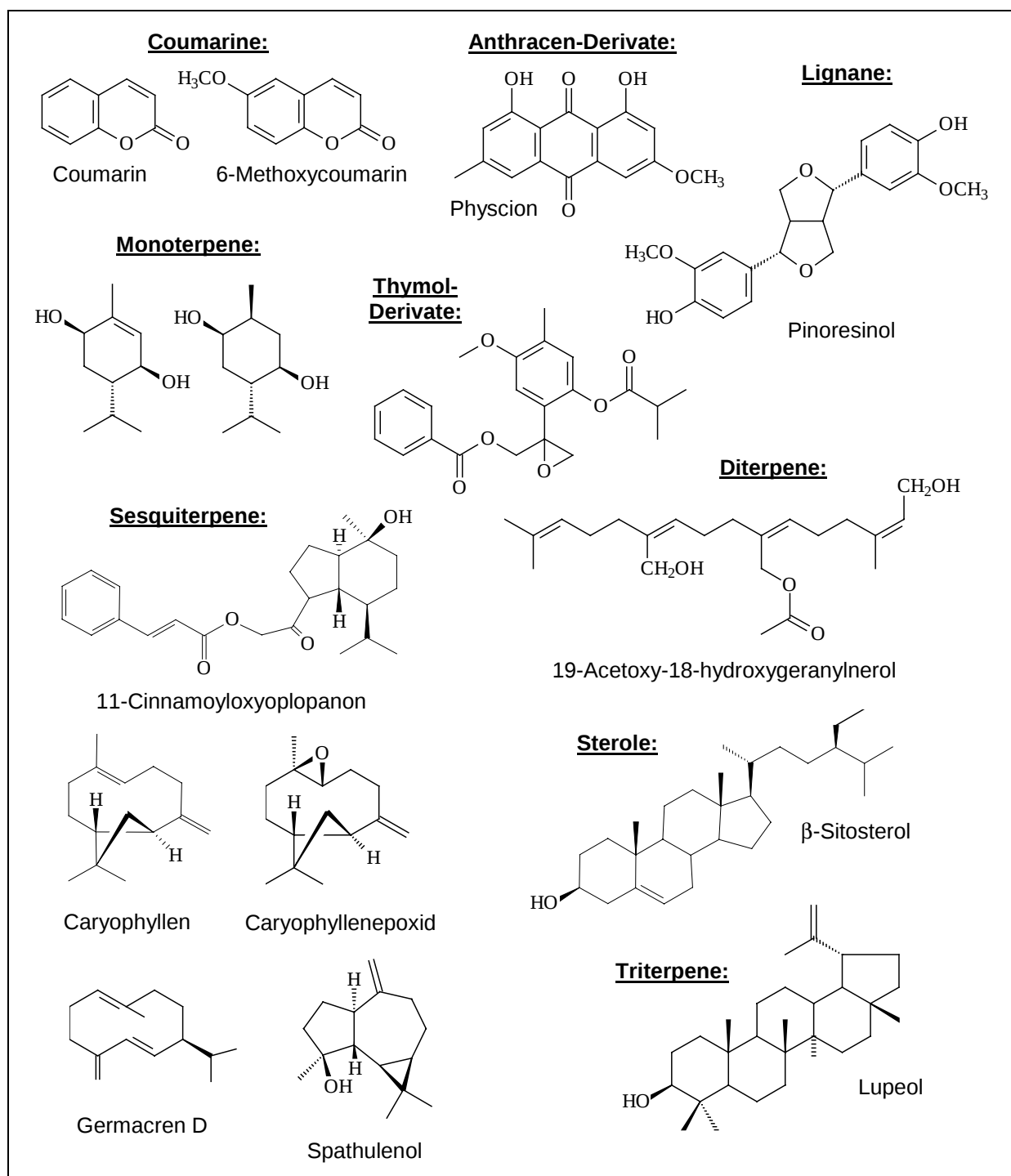


Bild 1.3: Sekundärstoffe aus den als identisch mit *E. semialatum* angesehenen Arten *A. ligustrina*, *E. erythropappum*, *E. ligustrinum* und *E. micranthum* (Flavonoide siehe Bild 1.4, S. 5; Sesquiterpenlactone siehe Bild 1.5, S. 6)

Für einen Teil der angeblich mit *E. semialatum* identischen Spezies existieren Publikationen über die Sekundärstoffführung. Es handelt sich um *A. ligustrina*, *E. erythropappum*, *E. ligustrinum* und *E. micranthum*. Danach konnten die aliphatischen Verbindungen Docosanol, 5-Hydroxytiglinsäure und Tetracosanol [ROJAS et al., 1988; SAGAREISHVILI, 1980; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988], Coumarin und 6-Methoxycoumarin [SAGAREISHVILI, 1980; TALAPATRA et al., 1985], das Anthracen-Derivat Physcion (zweifelhaft) [TALAPATRA et al., 1985], das Lignan Pinoresinol [ROJAS et al., 1988; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988],

β -Sitosterin [TALAPATRA et al., 1985], zwei Monoterpene vom *p*-Menthan-Typ [TALAPATRA et al., 1985], ein Epoxythymolester [BOHLMANN et al., 1977b], die Sesquiterpene 11-Cinnamoyloxyoplopanon, β -Caryophyllen, β -Caryophyllenepoxid, Germacren D und Spathulenol [BOHLMANN et al., 1977b; ROJAS et al., 1988; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988], das offenkettige Diterpen 19-Acetoxy-18-hydroxygeranylnerol [TAMAYO-CASTILLO et al., 1988] und das Triterpen Lupeol nachgewiesen werden [ROJAS et al., 1988; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988] (siehe Bild 1.3, S. 4).

An Flavonoid-Derivaten fanden sich das Flavanol 7-*O*-Methylaromadendrin [SAGAREISHVILI, 1985], die Flavanol-Glykoside Eupathronosid, Glucoferid und Micranthosid [RODRÍGUEZ et al., 1974; SAGAREISHVILI et al., 1981; TALAPATRA et al., 1985], das Flavon Cirsimaritin [ROJAS et al., 1988; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988], die Flavonole Kaempferol-5-methylether und Rhamnocitrin [ROJAS et al., 1988; SAGAREISHVILI, 1985; TALAPATRA et al., 1985; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988] sowie die beiden Flavanol-Glykoside Eupalin und Eupatolin [QUIJANO et al., 1970] (siehe Bild 1.4, S. 5).

Flavanol-Derivate:

<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>	<u>Verbindung</u>
H	CH ₃	H	7- <i>O</i> -Methylaromadendrin
β -Glu	CH ₃	H	Eupathronosid
H	β -Glu	CH ₃	Glucoferid
β -Glu	CH ₃	β -Glu	Micranthosid

Flavon- und Flavanol-Derivate:

<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>	<u>R₄</u>	<u>R₅</u>	<u>Verbindung</u>
H	H	OCH ₃	CH ₃	H	Cirsimaritin
OH	CH ₃	H	H	H	Kaempferol-5-methylether
OH	H	H	CH ₃	H	Rhamnocitrin
O- α -Rha	H	OCH ₃	CH ₃	H	Eupalin
O- α -Rha	H	OCH ₃	CH ₃	OH	Eupatolin

Bild 1.4: Flavonoide aus den als identisch mit *E. semialatum* angesehenen Arten *A. ligustrina*, *E. erythropappum*, *E. ligustrinum* und *E. micranthum* (Sesquiterpenlactone siehe Bild 1.5, S. 6; andere Sekundärstoffe siehe Bild 1.3, S. 4)

Darüber hinaus konnten neben den beiden Guaianoliden 8 β -Hydroxykauniolid und Ligustrin [ROJAS et al., 1988; ROMO et al., 1968; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988] fünf Sesquiterpenlactone vom Germacrolid- und eines vom Heliangolid-Typ isoliert werden [ROJAS et al., 1988; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988] (siehe Bild 1.5, S. 6).

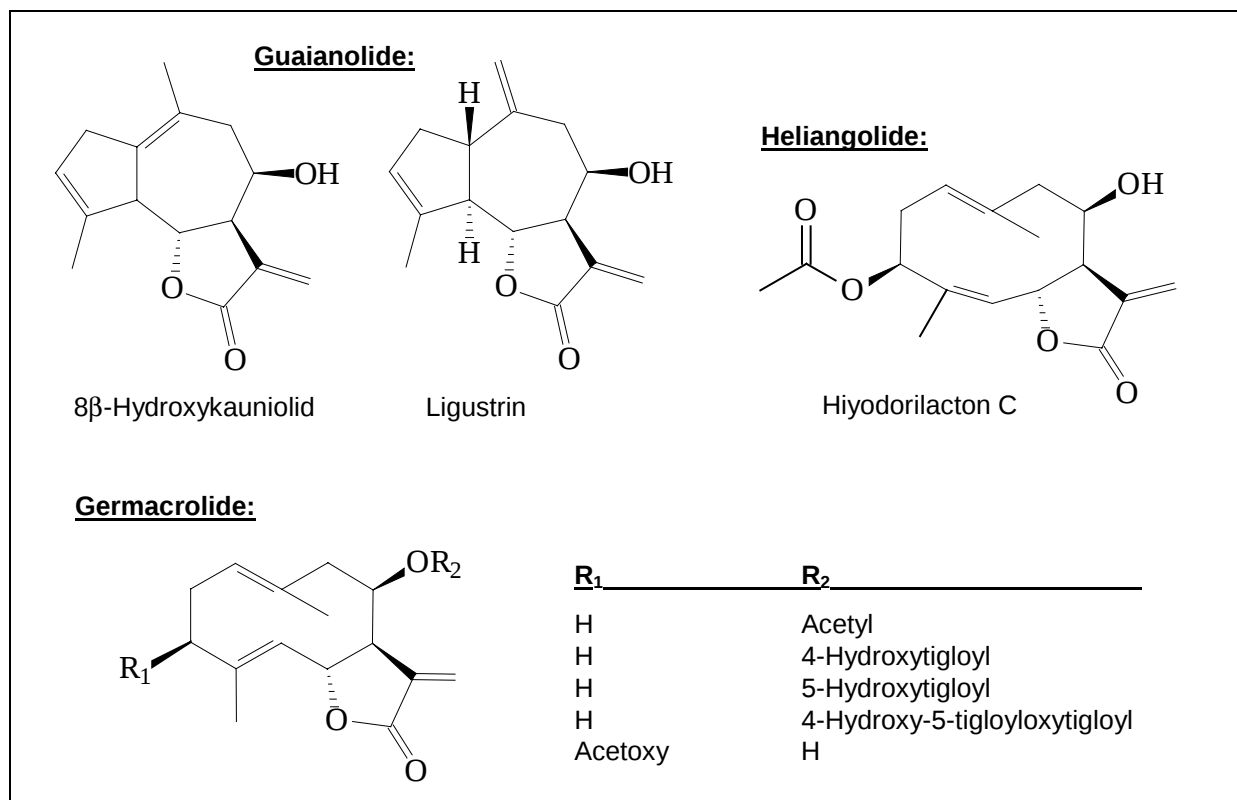


Bild 1.5: Sesquiterpenlactone aus den als identisch mit *E. semialatum* angesehenen Arten *A. ligustrina* und *E. ligustrinum* (Flavonoide siehe Bild 1.4, S. 5; andere Sekundärstoffe siehe Bild 1.3, S. 4)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Arzneipflanze *E. semialatum*. Bisher wurde das Blattmaterial dieser Pflanze noch nicht phytochemisch untersucht. Mit der hier durchgeführten Analyse soll zunächst überprüft werden, ob die Blätter von *E. semialatum* alle oder zumindest einen Teil der bereits für die als synonym angesehenen Arten beschriebenen Inhaltsstoffe enthalten. Dadurch könnten wichtige chemotaxonomische Informationen über diese Pflanze gewonnen werden, die möglicherweise zur Klärung der oben angesprochenen Probleme führen. Besonders interessant sind dabei die Sesquiterpenlactone und die Flavonoide, da beide Stoffgruppen weit verbreitet und bereits viele Überlegungen zur Chemotaxonomie an Hand dieser Sekundärstoffe angestellt worden sind [HARBORNE et al., 1975; SEAMAN, 1982]. Gleichzeitig dient diese Untersuchung der Identifizierung potentieller Wirkstoffe von *E. semialatum*. Auch in diesem Zusammenhang sind die Sesquiterpenlactone besonders zu beachten, da auch andere *Eupatorium*-Spezies solche Verbindungen enthalten und diese dort als Wirksubstanzen identifiziert werden konnten [WOERDENBAG, 1993]. Dies gilt auch für andere, ebenso wie *E. semialatum* gegen Malaria eingesetzte Arzneipflanzen aus anderen Triben der Asteraceae, wie z.B. *Artemisia annua* und *Neurolaena lobata*, deren Sesquiterpenlactone *in vitro* bzw. bei *Artemisia annua* auch *in vivo* starke antiplasmodiale Aktivität gezeigt hatten [FRANÇOIS et al., 1996; MESHNICK et al., 1996] (siehe Kap. 3.1, S. 257 und Bild 3.7, S. 262).

Da Asteraceae im allgemeinen und Vertreter der Eupatorieae im besonderen Pyrrolizidin-Alkaloide enthalten können, von denen Verbindungen mit einer $\Delta^{1,2}$ -Doppelbindung hepato- und nephrotoxisch sind, sollten Arzneidroge, die innerlich angewendet werden, auf das Vorkommen dieser toxischen Alkaloide untersucht werden [RÖDER, 1995; WOERDENBAG, 1993]. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher, auch dieser Frage nachzugehen.

Um potentielle Wirkstoffe in den Blättern von *E. semialatum* zu finden, sollen die aus dem Extrakt isolierten Hauptkomponenten angesichts der volksmedizinischen Verwendung der Pflanze bei Malariaerkrankungen in einem *in vitro*-Assay auf ihre mögliche Wirkung gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* getestet werden [CÁCERES, 1996].

2 Eigene phytochemische Untersuchungen

2.1 Isolierung und Identifizierung von Sesquiterpenlactonen aus *Eupatorium semialatum*

Das Vorkommen der Sesquiterpenlactone (SL) konzentriert sich auf die Pflanzenfamilie der Asteraceae, zur der bekannte Heilpflanzen wie Arnika, Kamille, Schafgarbe oder Wermut gehören, die u.a. aufgrund ihres Gehaltes an SL eingesetzt werden. SL kommen jedoch auch in Vertretern anderer Familien der Samenpflanzen wie auch in Lebermosen, Ständerpilzen, Algen und Meeresorganismen vor. Insgesamt sind bisher mehr als 3000 Verbindungen bekannt [HÄNSEL et al., 1999; WOERDENBAG, 1986].

Die Biosynthese aller SL geht von Farnesylpyrophosphat aus. Dieses zyklisiert unter Abspaltung des Pyrophosphat-Restes zum Germacra-1(10),4-dien-Kation, welches dann mehrfach oxidiert wird. Nach der Oxidation des Kohlenstoffatoms an Position 12 zur Carbonsäure kann sich mit Hydroxylgruppen an C-6 oder C-8 unter Wasseraustritt der Lactonring bilden (siehe Bild 2.1, S. 9) [SEAMAN, 1982; FISCHER et al., 1979].

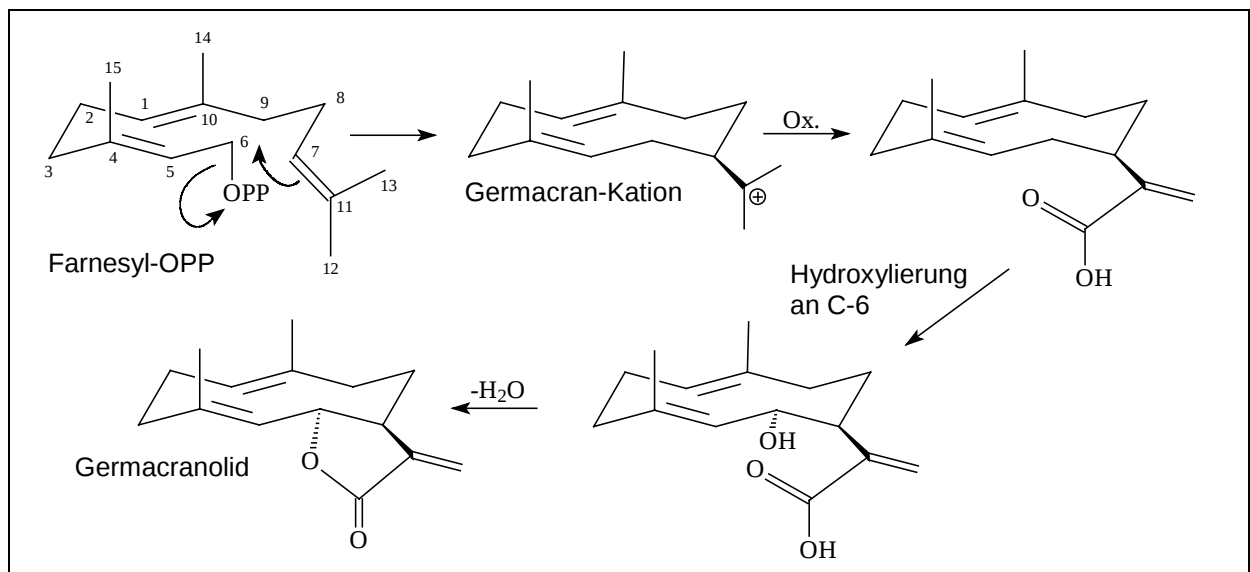


Bild 2.1: Biogenese der Germacranolide

In den meisten Fällen werden dabei α -Methylen- γ -Lacton-Gruppierungen gebildet. Das durch den Schluß des Lactonringes entstandene Molekül ist der Grundtyp der bizyklischen **Germacranolide**. In Abhängigkeit von der Konfiguration der beiden Doppelbindungen (C-1, C-10 und C-4, C-5) unterscheidet man vier Arten von Germacranoliden: Die Germacrolide (*trans, trans*), die Melampolide (*cis, trans*), die Heliangolide (*trans, cis*) und die *cis, cis*-Germacranolide (*cis, cis*). Von den Germacranoliden leiten sich durch Sekundärreaktionen alle anderen SL-Typen ab. So gehen etwa die trizyklischen **Eudesmanolide** über einen weiteren Zyklisierungsschritt aus einem 1,10-Epoxygermacrolid hervor (siehe Bild 2.2, S. 10) [SEAMAN, 1982; FISCHER et al., 1979].

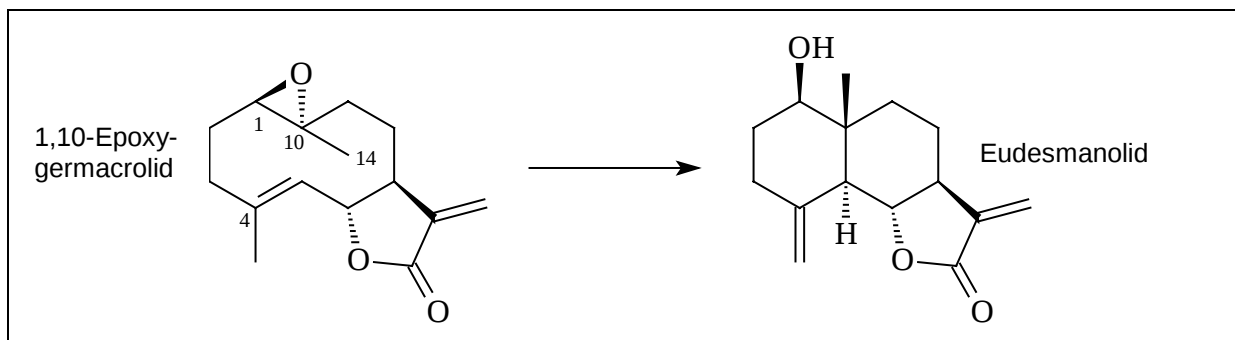


Bild 2.2: Biosynthese der Eudesmanolide

Ausgehend von einem Germacranolid- oder Melampolid-4,5-epoxid gelangt man nach dem Mechanismus einer Markownikow-Zyklisierung zu den **Guaianoliden** (siehe Bild 2.3, S. 10). Die beiden Ringe des zu Grunde liegenden Guaian-Carbozyklus können *cis* oder *trans* verknüpft sein, die Mehrheit der natürlich vorkommenden Guaianolide zeigt allerdings die *cis*-Anellierung. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die *trans*-Guaianolide ein Intermediat auf dem Weg zu den weiter verbreiteten Helenanoliden darstellen und die Biosynthese im Normalfall nicht auf dieser Zwischenstufe stehenbleibt [SEAMAN, 1982; FISCHER et al., 1979].

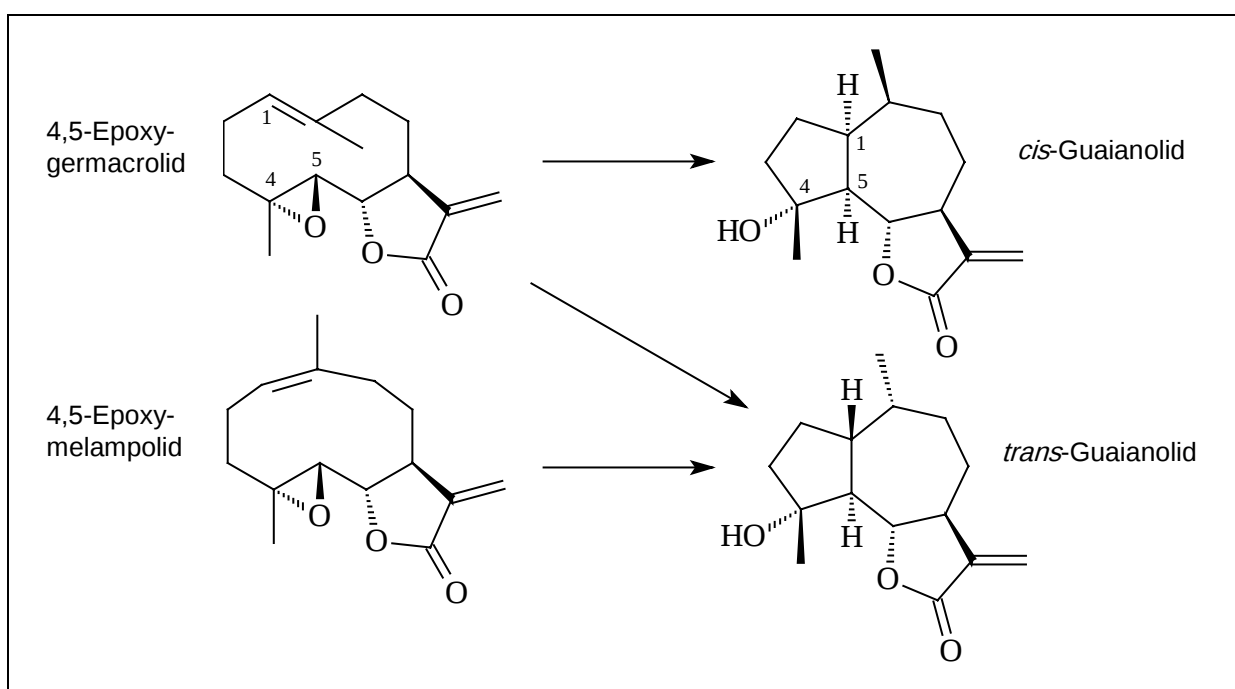


Bild 2.3: Biosynthese der Guaianolide

Das SL-Grundgerüst kann in vielfältiger Weise substituiert und umgestaltet werden. Dazu kommen im weiteren Verlauf der metabolischen Abwandlung der Substanzen häufig noch Veretherungen und Veresterungen.

Ein gemeinsames sensorisches Merkmal der SL ist ihr bitterer Geschmack, der durch den Lactonring verursacht wird. Das Spektrum der übrigen pharmakologischen Effekte ist sehr breit. Im Blickpunkt des pharmazeutischen Interesses stehen antimikrobielle, antiphlogistische, antitumorale und antihyperlipidämische Wirkungen [HÄNSEL et al., 1999].

Leider wird der breite Einsatz der SL meist durch ihre Cytotoxizität und ihr allergenes Potential limitiert. Das gemeinsame Auftreten von erwünschten und unerwünschten Effekten liegt im Haupt-Wirkmechanismus der Substanzen begründet (siehe Bild 2.4, S. 11). Sie wirken nämlich als unspezifische Alkylantien, indem sie im Sinne einer Michael-Addition nukleophile Zentren (vornehmlich SH-Gruppen) in den Aminosäuren von Enzymen oder in der Erbsubstanz angreifen. Es kommt so zur Bildung von kovalenten Konjugaten zwischen den molekularen Targets und den SL. Auf diese Weise können Mono- oder auch Bis-Addukte gebildet werden [FISCHER et al., 1979; HÄNSEL et al., 1999; SEAMAN, 1982].

Vor allem die bifunktionellen SL wirken stark antiphlogistisch. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass durch Verknüpfung zweier Cystein-Reste im Bereich der DNA-bindenden Region der p65-Untereinheit des Transskriptions-Faktors NF- κ B die Funktionsfähigkeit des gesamten Transskriptions-Faktors beeinträchtigt wird [BORK et al., 1997; LYß et al., 1997]. Durch die Inaktivierung dieses Schalters für verschiedene Gene der schnellen Immunantwort wird dem Organismus die Möglichkeit genommen, mit pro-inflammatorischen Mediatoren wie Cytokinen, Interleukinen, Metaboliten der Arachidonsäure-Kaskade oder reaktiven Radikalen eine Entzündungsreaktion aufrecht zu erhalten. Dies scheint jedoch nicht für alle SL zuzutreffen, da SL der Schafgarbe keine NF- κ B-Wirkung besitzen, obwohl diese Verbindungen in anderen *in vitro*- und *in vivo*-Tests starke antiphlogistische Wirkung gezeigt hatten [LYß et al., 2000].

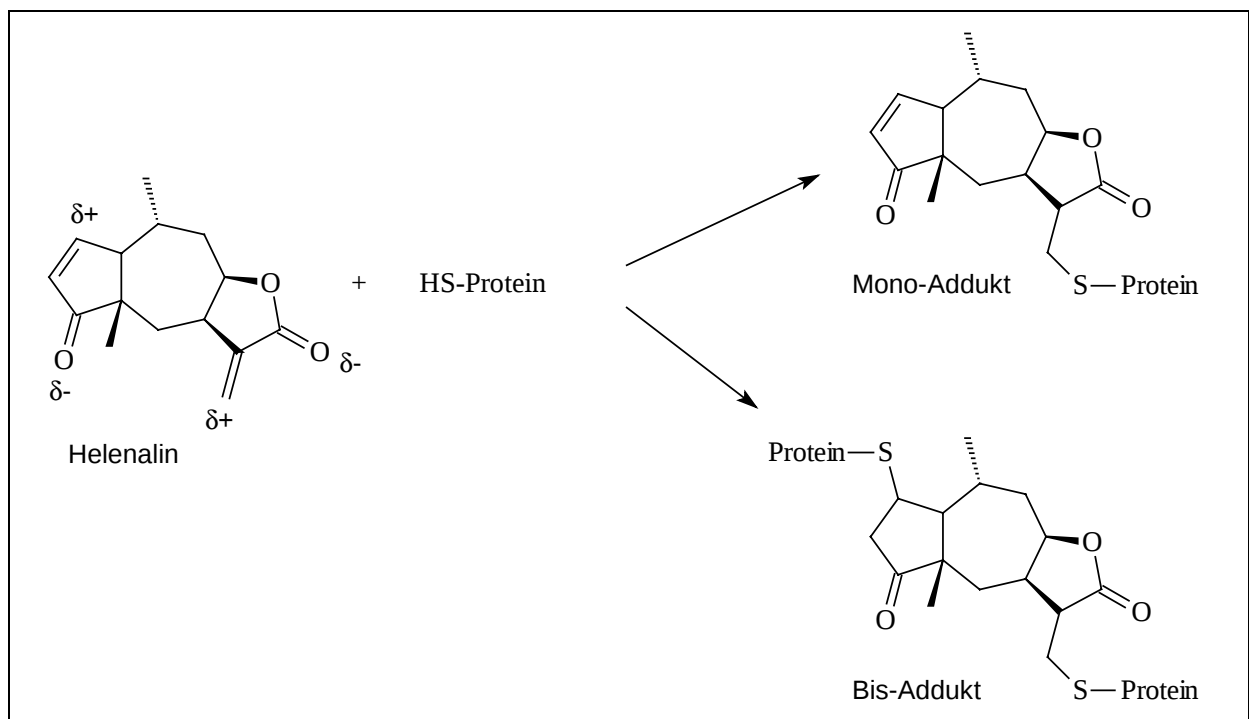


Bild 2.4: Entstehung des Vollantigens bei der SL-induzierten Kontaktdermatitis am Beispiel von Helenalin [HÄNSEL et al., 1999]

Die antimikrobielle Wirkung wird mit einer Hemmung von bakteriellen Schlüsselenzymen, die in der Cytoplasmamembran der Mikroorganismen lokalisiert sind, erklärt. Was die zytostatische Wirkung betrifft, geht man von der Alkylierung von Enzymen aus, die in die Regulation der Zellteilung involviert sind. Bei den durch SL häufig ausgelösten Kontaktdermatitiden fungiert das SL als Hapten, welches durch Adduktbildung mit

epidermalen Proteinen das Vollantigen bildet. Dieser SL-Proteinkomplex ist der Ausgangspunkt einer Kaskade von Immunreaktionen, die im klinischen Bild einer Zell-vermittelten Allergie vom Typ IV endet [HÄNSEL et al., 1999; IVIE und WITZEL, 1983; PICMAN, 1986].

Bei den toxischen Effekten der SL spielt nicht nur die beschriebene Alkylierung eine Rolle, vielmehr kommt bei verschiedenen toxischen SL den substanzspezifischen Wirkungen eine weit höhere Bedeutung zu. Beispiele sind das aus der Apiaceae *Thapsia garganica* isolierte Thapsigargin oder die Picrotaxane und seco-Prezizaane aus *Illicium*-Arten. Thapsigargin entfaltet seine hautreizende und Tumor-promovierende Wirkung durch die Bindung an eine bestimmte Klasse von Ca^{2+} -transportierenden Enzymen, die für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase in praktisch allen Säugetier-Zellen verantwortlich sind. Die Picrotaxane und seco-Prezizaane sind nicht-kompetitive Antagonisten an GABA_A -Rezeptor-assoziierten Chloridkanälen, welche die postsynaptische inhibitorische Regulation der neuronalen Aktivität in fast allen Regionen des Gehirns und des Rückenmarks vermitteln. Diese SL wirken damit neurotoxisch [SCHMIDT, 1999].

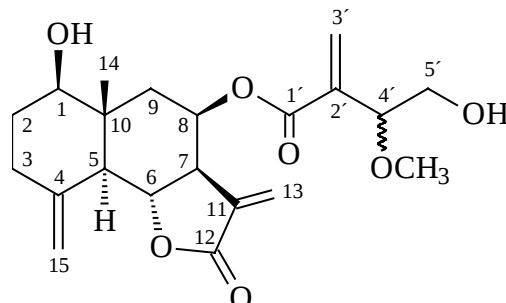
2.1.1 Extraktion und Fraktionierung

725,96 g getrocknete und pulverisierte Blätter von *Eupatorium semialatum* Benth. wurden mit Dichlormethan und anschließend mit Methanol erschöpfend in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Es resultierten 81 g Dichlormethan- und 180 g Methanol-Extrakt (siehe Kap. 6.5.2, S. 308).

Um Zuordnungsprobleme zu vermeiden, tragen die Bezeichnungen der aus den beiden Stammextrakten hervorgegangenen Fraktionen entweder das Präfix „D“ für Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes oder das Präfix „M“ für Unterfraktionen des Methanol-Extraktes.

Zur Abtrennung lipophiler Begleitstoffe (Fettsäuren, Lipide, Chlorophyll etc.) wurde der Dichlormethan-Extrakt mit Methanol ausgezogen und lieferte 36,86 g eines grünen Extraktes von sirupöser Konsistenz (siehe Kap. 6.5.3, S. 308). Der Methanol-lösliche Anteil des Dichlormethan-Extraktes wurde in 120 ml Methanol suspendiert und in sechs Portionen gleichen Volumens aufgeteilt. Ein Teil wurde zurückgestellt, während die anderen fünf Portionen nacheinander an Sephadex LH-20 SC mit Methanol als Eluens aufgetrennt wurden. Aus dieser Grobreinigung resultierten fünf Fraktionen, von denen zwei nach Vorversuchen (DC, GC und GC-MS) Terpene (D-II) bzw. Flavonoid-Aglyka (D-IV) enthielten. Nach weiterer Auftrennung von Fraktion D-II durch SC und semipräparative HPLC (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309) konnten die Sesquiterpenlactone **SL1** – **SL11** isoliert werden.

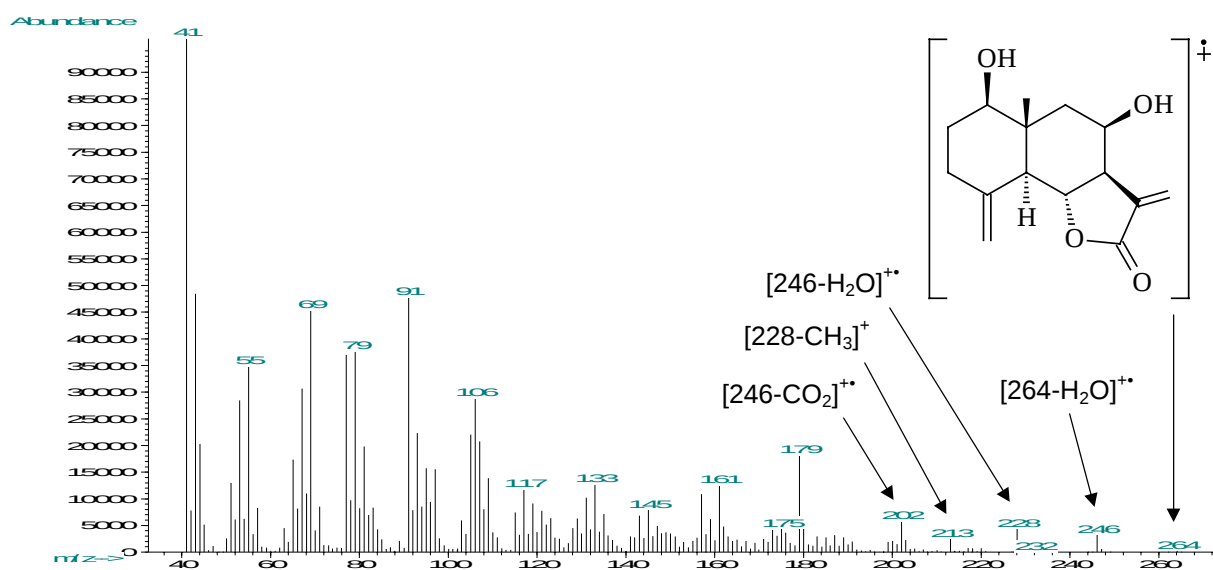
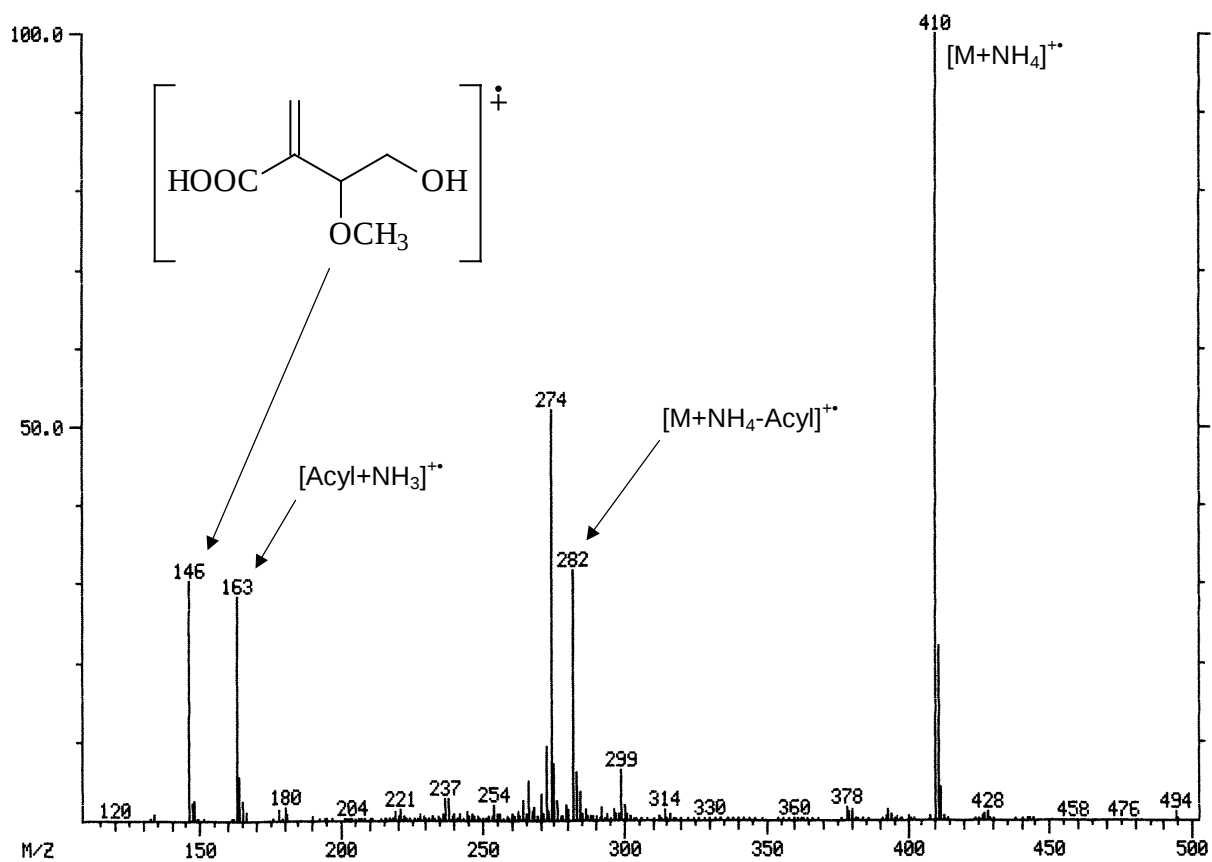
**2.1.2 8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin =
1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-4(15),11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL1)**

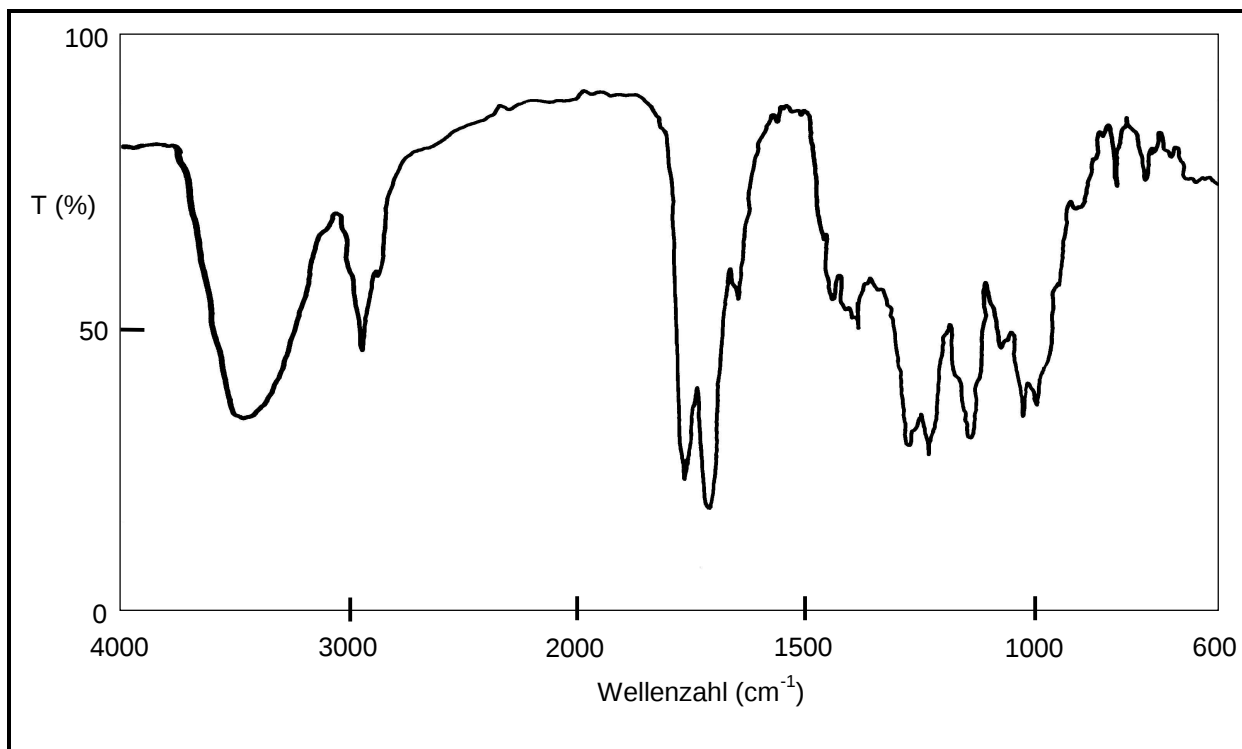


Nach der Aufarbeitung der Fraktion D-II mittels SC und semipräparativer HPLC fielen 4 mg von Verbindung **SL1** als farblose, gummiartige Masse an (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Auf der DC-Folie zeigte **SL1** nach Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz eine blauviolette Farbe.

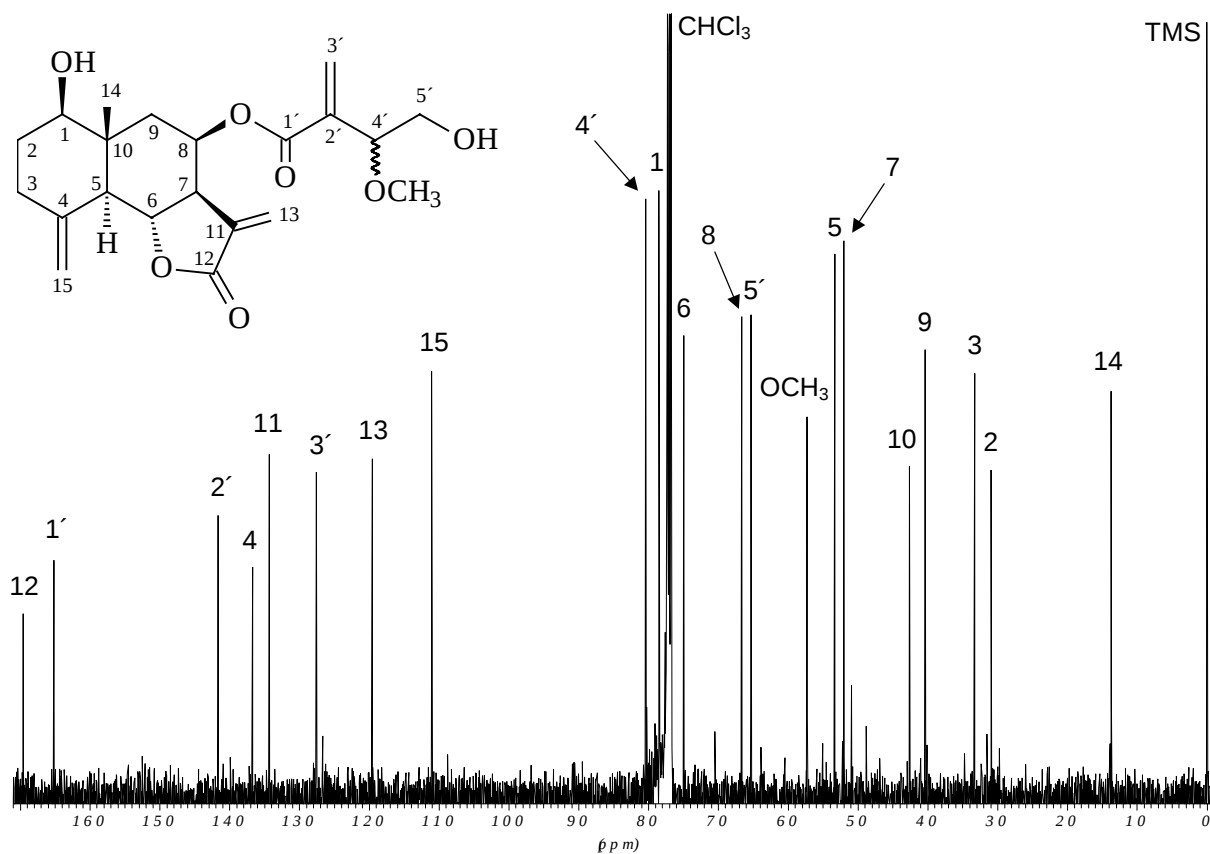
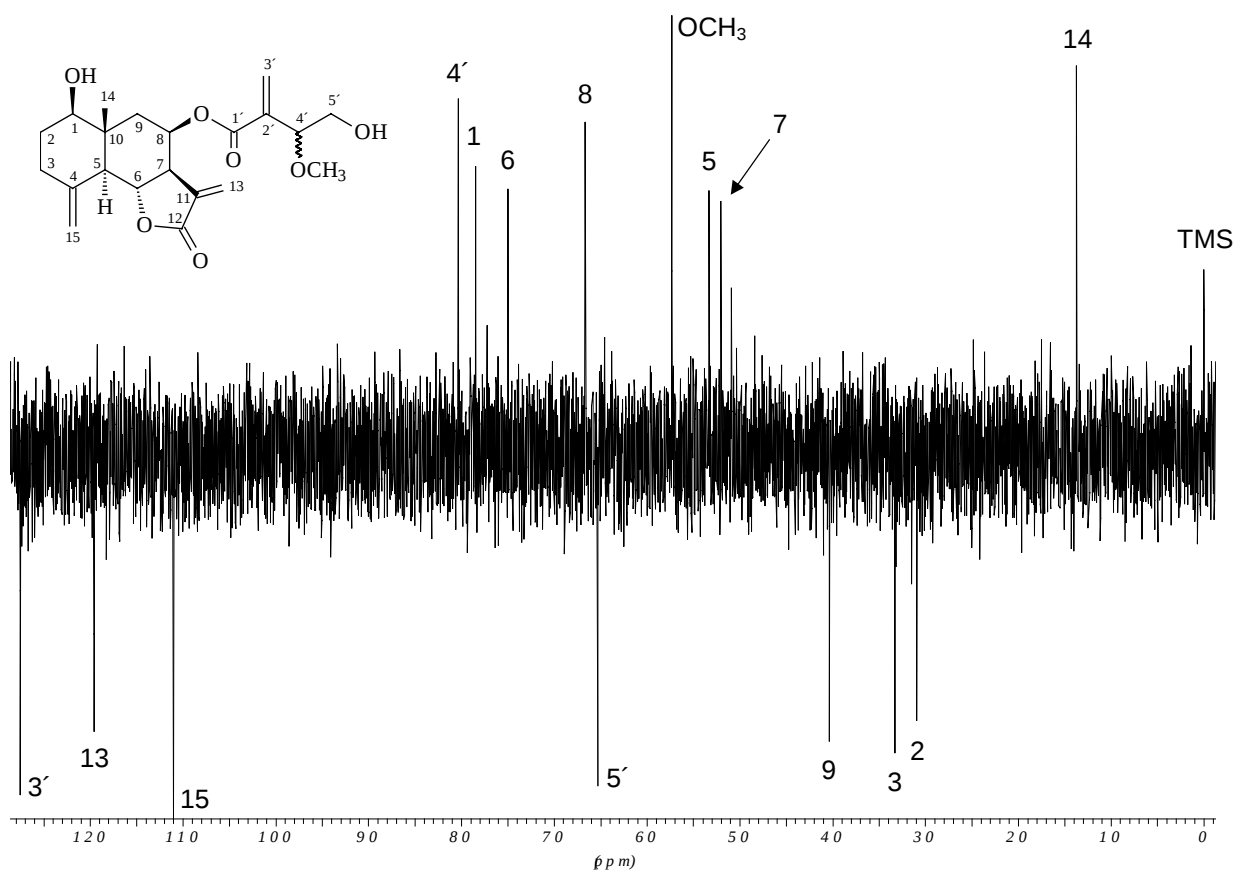
Das durch GC-MS-Kopplung aufgenommene EI-MS-Spektrum zeigte das schwerste Fragment bei m/z 264 (siehe Bild 2.5, S. 14). Das Auftreten dieses Bruchstückes in Verbindung mit den leichteren Fragmenten bei m/z 246 und 228 war ein erstes Indiz dafür, dass es sich bei **SL1** um ein Sesquiterpenlacton handeln könnte [HEYWOOD et al., 1977; SCHMIDT, 1994]. Im EI-Massenspektrum wurden keine Fragmente für kurzkettige Carbonsäuren gefunden, wie dies bei vielen SL der Fall ist. Das bedeutet, dass im GC-MS nur der Sesquiterpenlactonalkohol detektiert wurde. Das Molekulargewicht von **SL1** wurde durch das ebenfalls aufgenommene DCI-Spektrum bestimmt (siehe Bild 2.6, S. 14). Hier wurde das Pseudomolekülion ($[M+NH_4]^{+}$) bei m/z 410 registriert. Das Molekulargewicht von **SL1** beträgt damit 392 amu. Es muß sich demnach bei **SL1** um den Ester eines Sesquiterpenlactonalkohols handeln, der möglicherweise schon unter der thermischen Belastung im Injektor des GC gespalten wird, so dass im GC-MS-Spektrum lediglich die Alkoholkomponente detektiert wird.

Im IR-Spektrum erkennt man eine breite OH-Valenzschwingung im Bereich zwischen 3500 und 3600 cm^{-1} (siehe Bild 2.7, S. 15). Ein Hinweis auf das Vorliegen eines Lactons ist die Absorptionsbande bei 1765 cm^{-1} . Die Banden bei 1719 und 1650 cm^{-1} deuten darauf hin, dass eine konjugierte Esterfunktion im Molekül enthalten ist. Die schwache Bande bei 1650 cm^{-1} ist typisch für die C=C-Valenzschwingung von Methylengruppen [RÜCKER et al., 1992].

Bild 2.5: GC-EI-MS-Spektrum von *SL1*Bild 2.6: DCI-MS-Spektrum von *SL1*

Bild 2.7: IR-Spektrum von Verbindung **SL1**Tabelle 2.1: NMR-Daten von Verbindung **SL1** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL1	C	SL1	DEPT
1	3.53 <i>dd</i> (4.4, 11.3)	1	78.45	CH
2eq	1.84 <i>m</i>	2	30.92	CH ₂
ax	1.60 <i>m</i>	3	33.26	CH ₂
3eq	2.36 <i>ddd</i> (1.9, 5.0, 13.9)	4	136.69	C
ax	2.15 <i>dd</i> (5.0, 13.9)	5	53.31	CH
5	2.27 <i>d</i> (10.7)	6	74.94	CH
6	4.52 <i>t</i> (11.1)	7	51.99	CH
7	2.86 <i>ddd</i> (3.2, 5., 7, 11.1)	8	66.64	CH
8	5.85 <i>dd</i> (2.5, 5.7)	9	40.32	CH ₂
9eq	2.42 <i>dd</i> (2.5, 15.1)	10	42.57	C
ax	1.66 <i>dd</i> (3.8, 15.1)	11	134.32	C
13	6.16 <i>d</i> (3.2)	12	169.54	C
	5.45 <i>d</i> (3.2)	13	119.56	CH ₂
14	1.00 <i>s</i>	14	13.68	CH ₃
15	5.04 <i>s</i>	15	110.00	CH ₂
	4.97 <i>s</i>	1'	165.14	C
3'	6.31 <i>s</i>	2'	141.61	C
	5.94 <i>s</i>	3'	127.51	CH ₂
4'	4.21 <i>dd</i> (2.5, 6.9)	4'	80.33	CH
5'	3.69 <i>m</i>	5'	65.30	CH ₂
	3.48 <i>dd</i> (7.3, 11.5)	OCH ₃	57.29	CH ₃
OCH ₃	3.33 <i>s</i>			

Bild 2.8: ¹³C NMR-Spektrum von **SL1** (125 MHz, CDCl₃, TMS)Bild 2.9: DEPT-Spektrum von **SL1** (125 MHz, CDCl₃, TMS)

Das Protonen-breitbandenkoppelte ^{13}C NMR-Spektrum (siehe Bild 2.8, S. 16) zeigt die Signale für einundzwanzig Kohlenstoffatome, bei denen es sich nach dem DEPT-Experiment (siehe Bild 2.9, S. 16) um 7 Methin-, 6 Methylen-, 2 Methyl- und 6 quartäre C-Atome handelt. Die Signale bei 134.32 (C-11), 169.54 (C-12) und 119.56 ppm (C-13) sind charakteristisch für die Kohlenstoffe einer α -Methylen- γ -Lacton-Struktur, wie sie bei vielen SL zu finden ist [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995]. Das Signal eines quartären Kohlenstoffes bei 165.14 ppm (C-1') liegt im Erwartungs-Bereich der Carbonyl-Kohlenstoffe veresterter Carbonsäuren. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei **SL1** um den Ester eines SL-Alkohols handelt [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995].

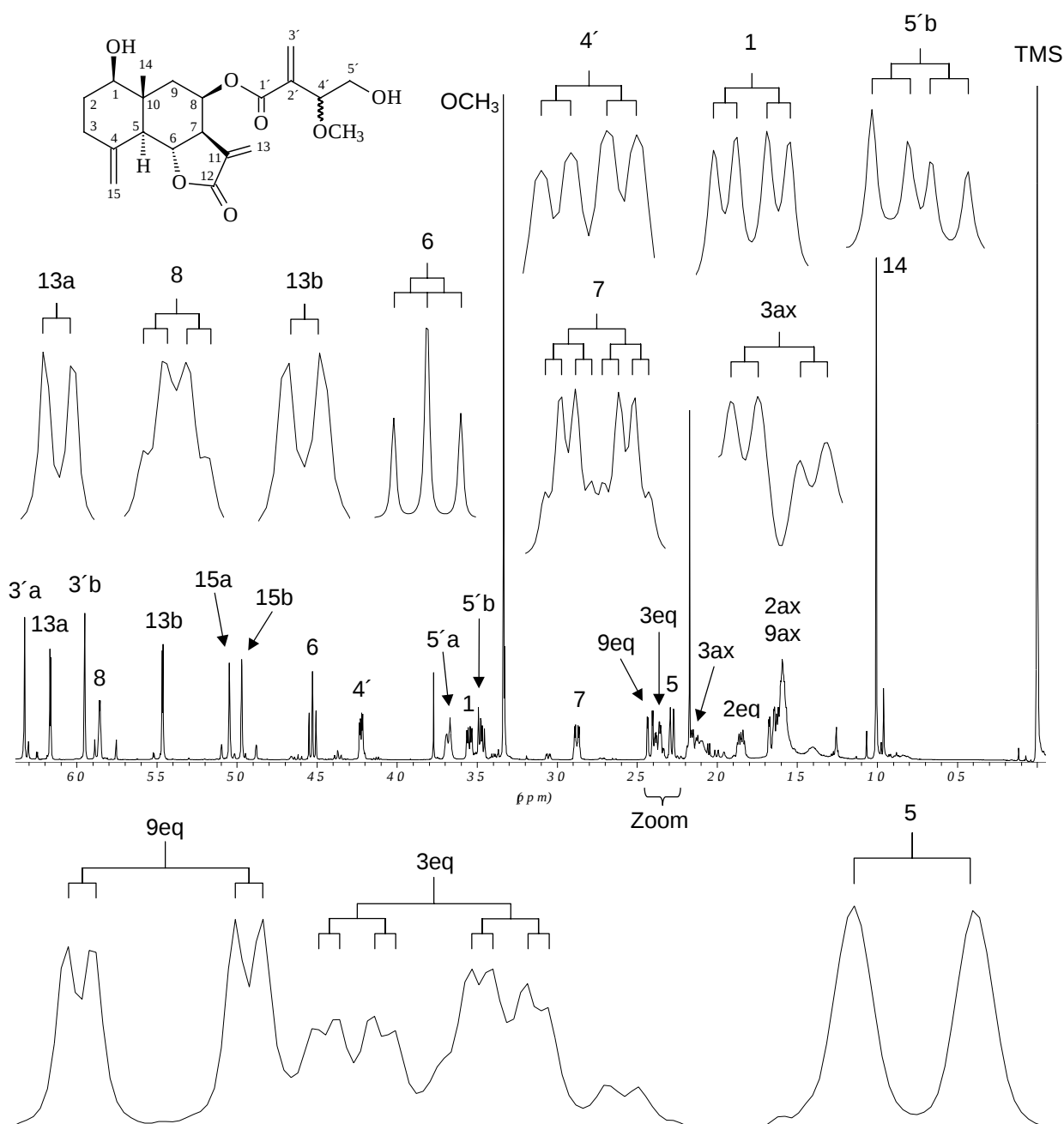


Bild 2.10: ^1H NMR-Spektrum von **SL1** (500 MHz, CDCl_3 , TMS); der untere Teil gibt den Spektrenbereich zwischen 2.25 und 2.45 ppm wider

Das Protonenspektrum von **SL1** enthält neben komplexen Resonanzen im Hochfeldbereich einige isolierte Signale im tieferen Feld (siehe Bild 2.10, S. 17). Dazu gehören die beiden benachbarten breiten Singulets bei 4.97 und 5.04 ppm (H-15). Solche Signale sind typisch für exozyklische Methylengruppen, wie sie bei Sesquiterpen- und Diterpenderivaten häufig gefunden werden [HEYWOOD et al., 1977; HOENEISEN et al., 1980]. Im COSY-Spektrum (siehe Bild 2.11, S. 19) erkennt man für beide Protonen schwache allylische Kopplungen mit einem Methinproton bei 2.27 ppm (H-5) und einem Proton einer Methylengruppe (2.15 ppm, H-3ax). Ergebnisse des Arbeitskreises um Ferdinand Bohlmann zeigen, dass bei SL mit der gerade beschriebenen Partialstruktur das Methylenproton bei höherem Feld axial und das bei tieferem Feld equatorial orientiert ist. Bei den beiden Protonen einer mit der Methylengruppe an Position 3 koppelnden weiteren Methylengruppe (1.60 und 1.84 ppm, H-2ax und H-2eq) verhält es sich genauso [BOHLMANN et al., 1983; HOENEISEN et al., 1980]. Beide Protonen an C-2 zeigen im COSY-Spektrum eine Interaktion mit einem Proton, welches ein *dd*-Signal bei 3.53 ppm liefert (H-1). Eine der beiden Kopplungskonstanten für H-1 beträgt 11.3 Hz. Hieraus geht hervor, dass das zugehörige Wasserstoffatom axial an den Ring gebunden ist, da der Betrag der Kopplungskonstanten eine diaxiale Kopplung mit H-2ax anzeigt. Die chemische Verschiebung von H-1 läßt es plausibel erscheinen, dass der zugehörige Kohlenstoff (C-1) Sauerstoff-substituiert ist, und zwar mit einer nicht veresterten, freien OH-Gruppe. Diese muß auf Grund der vorher angestellten Überlegungen eine equatoriale Position einnehmen.

Verfolgt man die Sequenz der Spin-Kopplungen, ausgehend von der Exomethylengruppe, in der anderen Richtung weiter, so gelangt man zunächst durch allylische Kopplung zu dem bereits erwähnten Dublett bei 2.27 ppm (H-5). Dieses Proton koppelt mit einem weiteren Proton bei 4.52 ppm (H-6). Die Kopplungskonstante in Höhe von 10.7 ppm spricht für eine *trans*-diaxiale Kopplung dieser beiden Protonen. Im COSY-Spektrum koppelt H-6 mit einem weiteren axial stehenden Proton (H-7), das bei 2.86 ppm ein isoliertes *dd*-Signal liefert. Dieses zeigt noch weitere Kopplungen, nämlich mit einem Dublett von Dubletts bei 5.85 ppm (H-8) und mit zwei Dubletts bei 5.45 und 6.16 ppm (H-13). Die chemische Verschiebung dieser Signale ist charakteristisch für die Exomethylenprotonen eines α -Methylen- γ -Lactonringes, der *trans* mit dem SL-Grundgerüst verknüpft ist [BOHLMANN et al., 1983; BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995; HOENEISEN et al., 1980].

Das Proton an C-7 koppelt, wie oben schon erwähnt, mit einem Methinproton (H-8), welches ein *dd*-Signal bei 5.85 ppm hervorruft. Aufgrund der Kopplungskonstanten von 5.7 Hz muß H-8 äquatorial orientiert sein [HESSE et al., 1995]. Die Lage dieses Signals und die des korrespondierenden Kohlenstoffatoms (C-8) bei 66.64 ppm deuten darauf hin, dass das C-Atom mit einer Esterseitenkette verbunden ist [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995; YOSHIOKA et al., 1973]. H-8 zeigt im COSY-Spektrum zwei weitere Kopplungen mit einer Methylengruppe (H-9). Diese beiden Protonen kommen bei einer chemischen Verschiebung von 1.66 und 2.42 ppm zur Resonanz. Nach Untersuchungen aus dem Arbeitskreis um Ferdinand Bohlmann ist dabei das stärker abgeschirmte Proton equatorial ausgerichtet (H-9eq) [HOENEISEN et al., 1980]. Mit der Methylengruppe reißt die Sequenz der vicinalen Kopplungen ab, so dass das nächste C-Atom quartär sein muß. Weitere Konnektivitäten lassen sich aus dem HMBC-Spektrum ablesen (siehe Bild 2.13, S. 21). Es besteht hier eine 2J -Kopplung zwischen den Methylenprotonen (H-9) und einem quartären Kohlenstoff bei

42.57 ppm (C-10). Dieser Kohlenstoff zeigt über eine weitere 2J -Kopplung eine Wechselwirkung mit einer Methylgruppe bei 13.68 ppm (H-14). Die beiden weiteren longrange-Kopplungen von H-14 betreffen bekannte Spinsysteme: Die erste 3J -Kopplung besteht mit einem Signal bei 53.31 ppm. Wegen des Kreuzsignals mit H-5 im HMQC-Spektrum muß es sich um das C-5 handeln (siehe Bild 2.12, S. 20). Die zweite 3J -Kopplung führt zu einem Kohlenstoff bei 78.45 ppm, welcher auf Grund seiner Lage im ^{13}C NMR-Spektrum eine freie OH-Gruppe tragen muß. Eine entsprechende Interaktion im HMQC-Spektrum beweist, dass es sich um das hydroxylierte C-1 handeln muß. Die beschriebene Verkettung der Signale und Spinsysteme ist bei einem SL nur mit einem Grundkörper vom Eudesmanolid-Typ vereinbar.

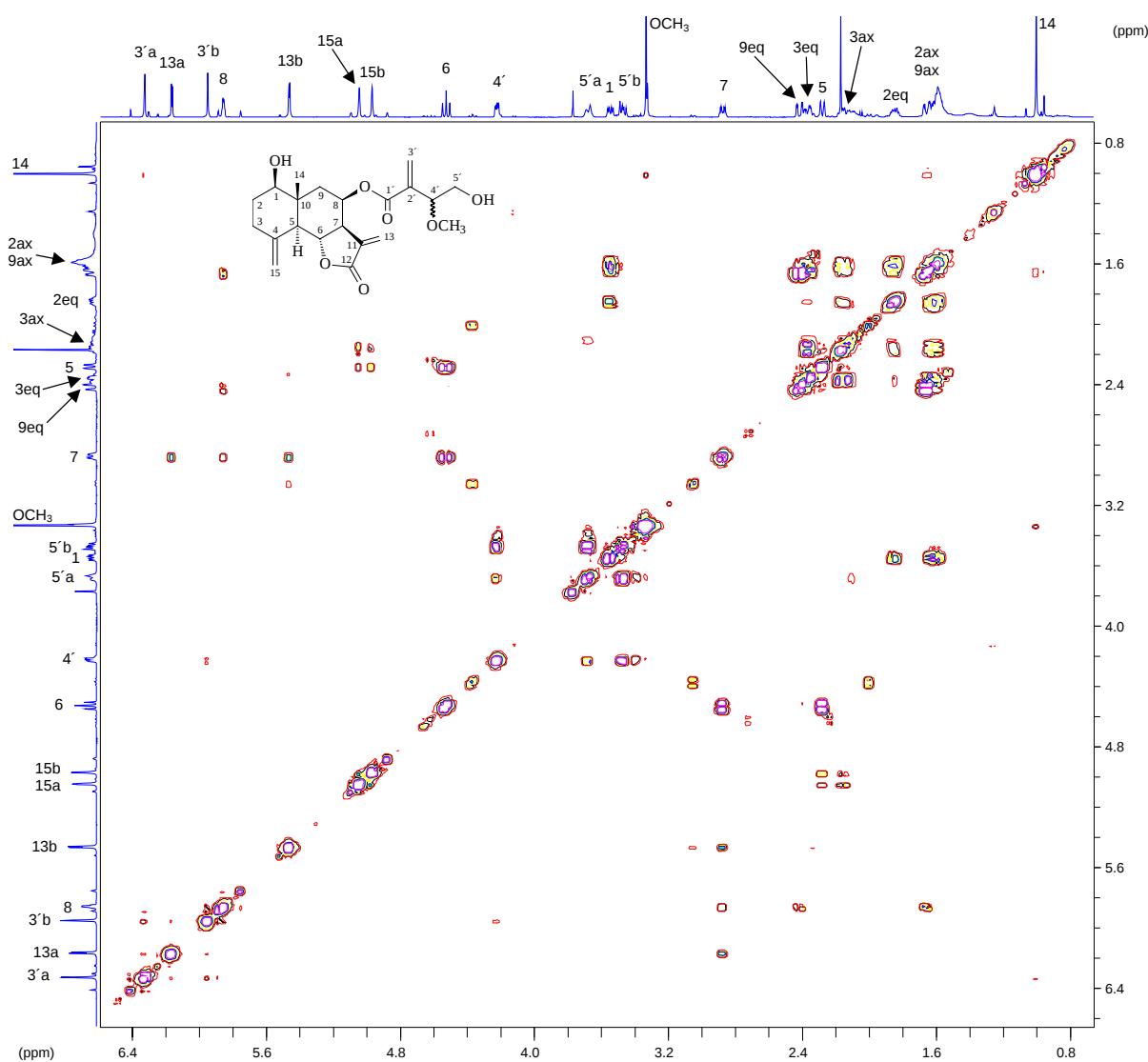


Bild 2.11: COSY-Spektrum von **SL1** (500 MHz, $CDCl_3$, TMS)

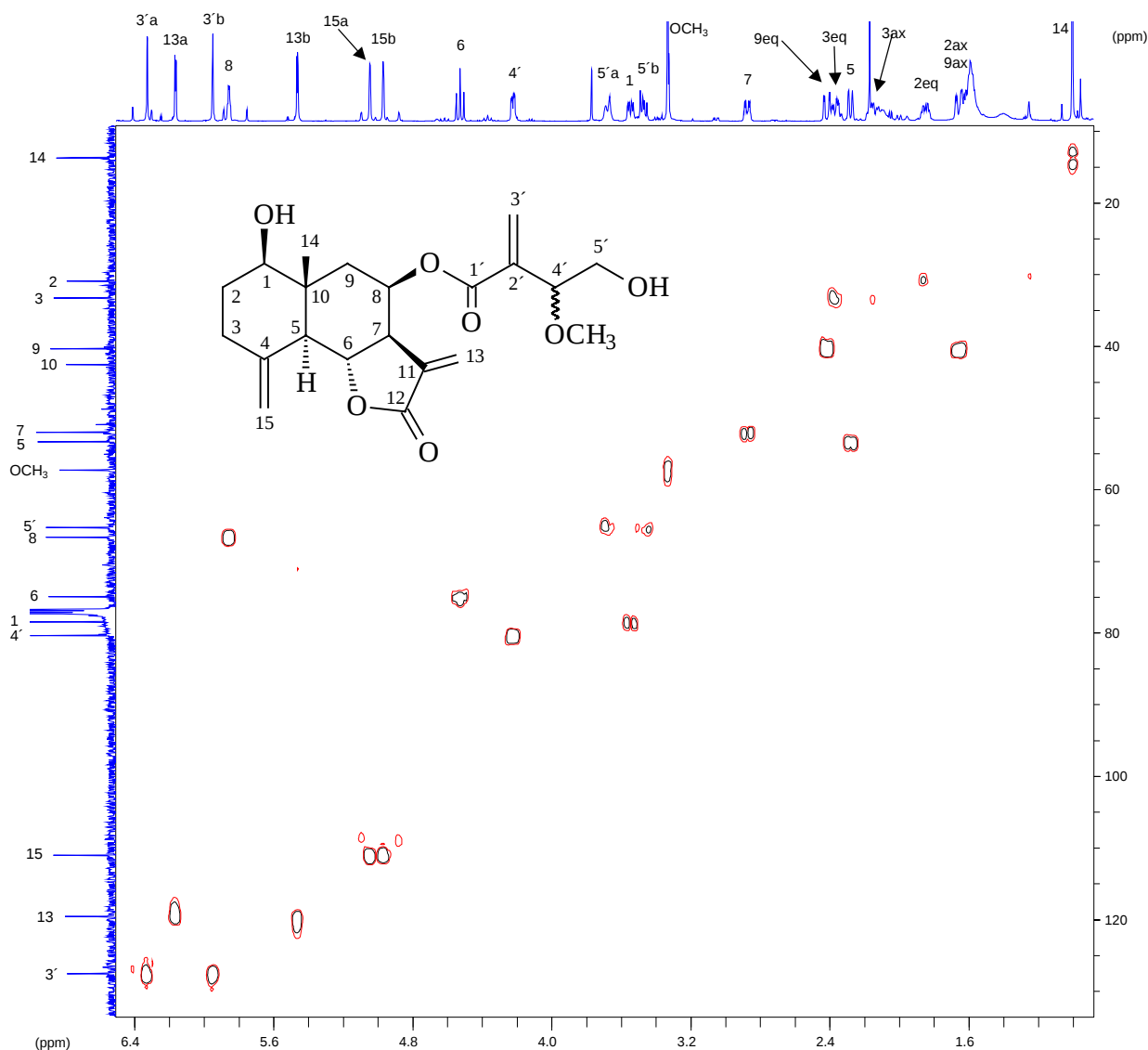


Bild 2.12: HMQC-Spektrum von Verbindung **SL1** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Ordnet man mit Hilfe des HMQC- und des HMBC-Spektrums dem Eudesmanolid-Alkohol die zugehörigen Kohlenstoffe zu, so bleiben sechs Signale übrig, die der mit der Hydroxylfunktion an C-8 veresterten Carbonsäure zuzuordnen sind. Bei dieser Säure handelt es sich um eine 2-substituierte Acrylsäure. Die Signale der Exomethylenprotonen liegen bei 5.94 und 6.31 ppm (H-3'). Diese zeigen im HMBC-Spektrum eine ^3J -Kopplung mit einem Methinkohlenstoff bei 80.33 ppm (C-4'). Aus dem COSY-Spektrum ist ersichtlich, dass das zugehörige Proton (H-4') mit den beiden Protonen einer Methylengruppe koppelt. Die zugehörigen Signale bei 3.48 und 3.69 ppm (H-5') liegen im Erwartungsbereich der Protonen von alkoholisch substituierten Kohlenstoffatomen [HESSE et al., 1995]. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem noch nicht identifizierten Substituenten der Methylengruppe um eine Hydroxylfunktion handelt.

C-4' besitzt noch einen weiteren Substituenten. Im HMBC-Spektrum existiert eine ^3J -Kopplung zwischen dem Signal von C-4' und einem 3-Protonen-Singulett bei 3.33 ppm. Dieses Singulett interagiert im HMQC-Spektrum mit einem Signal bei 57.29 ppm. Die chemischen Verschiebungen sprechen eindeutig für eine Methoxygruppe [BUDEŠÍNSKÝ und

ŠAMAN, 1995; HESSE et al., 1995]. Damit handelt es sich bei der mit der axialen Hydroxylgruppe des SL's veresterten Säure um (2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acrylsäure. Die Kernresonanz-spektroskopischen Meßdaten stehen im Einklang mit Angaben aus der Literatur [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1987].

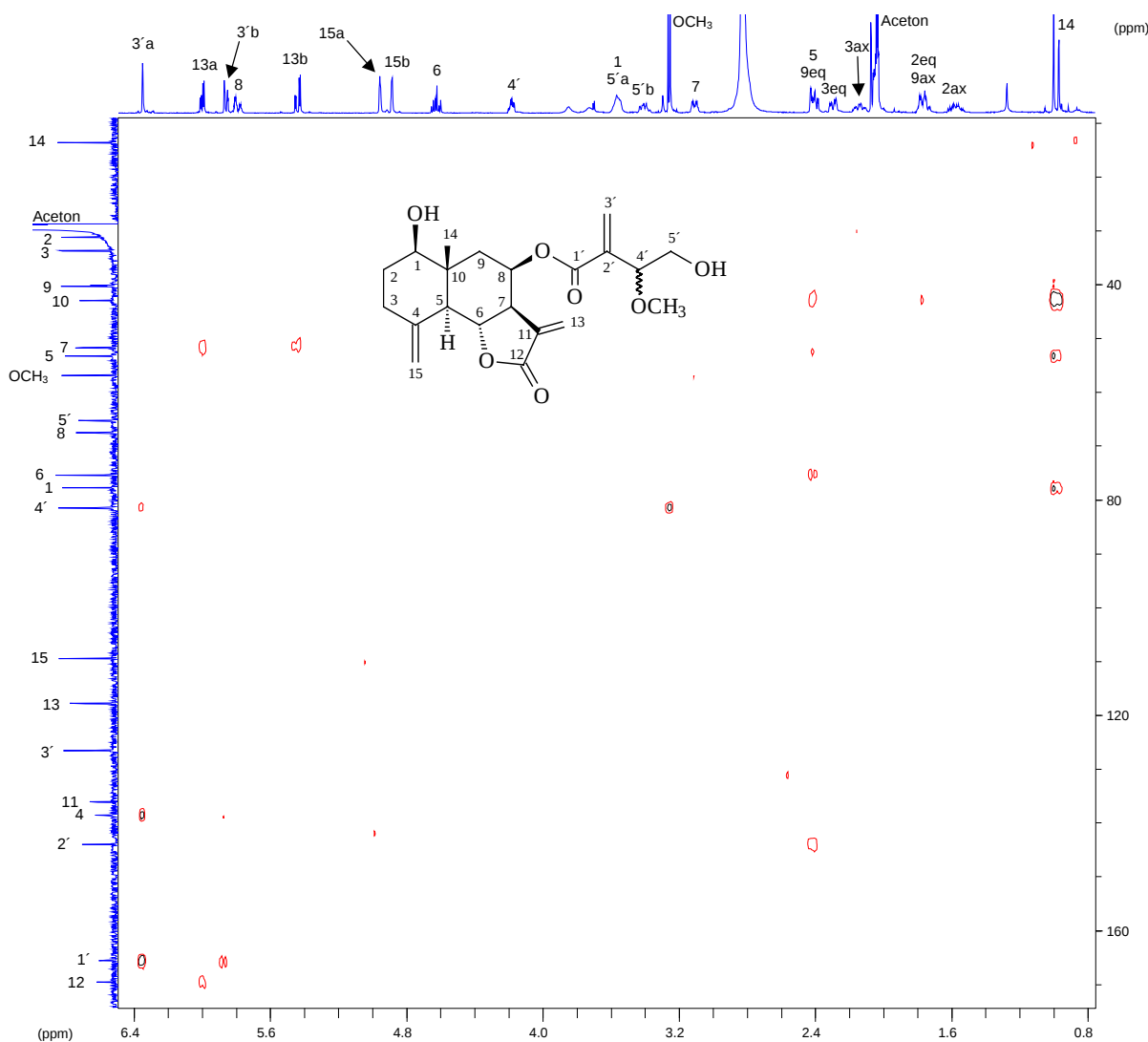


Bild 2.13: HMBC-Spektrum des Gemisches aus **SL1** und **SL2** (500 bzw. 125 MHz, Aceton- d_6 , TMS); wegen der höheren Masse des Gemisches ist dieses Spektrum besser und damit aussagekräftiger als die entsprechenden Spektren der Einzelsubstanzen

Legt man die gängige Bezeichnungsweise bei Eudesmanoliden zu Grunde, so lassen sich die Ergebnisse aus den NMR-Spektren folgendermaßen rekapitulieren: Das C-1 ist mit einer Hydroxylgruppe substituiert und die 2-substituierte Acrylsäure ist mit einer OH-Gruppe an C-8 verestert. Das C-15 ist zur Exomethylengruppe oxidiert, das 12,6-Lacton *trans*-konfiguriert. Demnach handelt es sich bei **SL1** um 8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin (= 1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-4(15),11(13)-eudesmadien-12,6-olid). Die Richtigkeit der vicinalen Protonenkopplungen und die Zugehörigkeit der einzelnen Signale zu bestimmten Spinsystemen wurde durch selektive Spinentkoppelungs-Experimente überprüft. Dabei wurde bei Betrachtung eines bestimmten

Protons während der Messung das Signal eines Kopplungspartners durch Einstrahlung eines Störsignals ausgelöscht. Vereinfachte sich die Multiplizität des interessierenden Protonensignals, so konnte die Kopplung als bewiesen angesehen werden. Darüber hinaus konnten durch dieses Verfahren der gezielten Eliminierung von Kopplungen die einzelnen Kopplungskonstanten sukzessive eindeutig den verursachenden Kopplungspartnern zugeordnet werden.

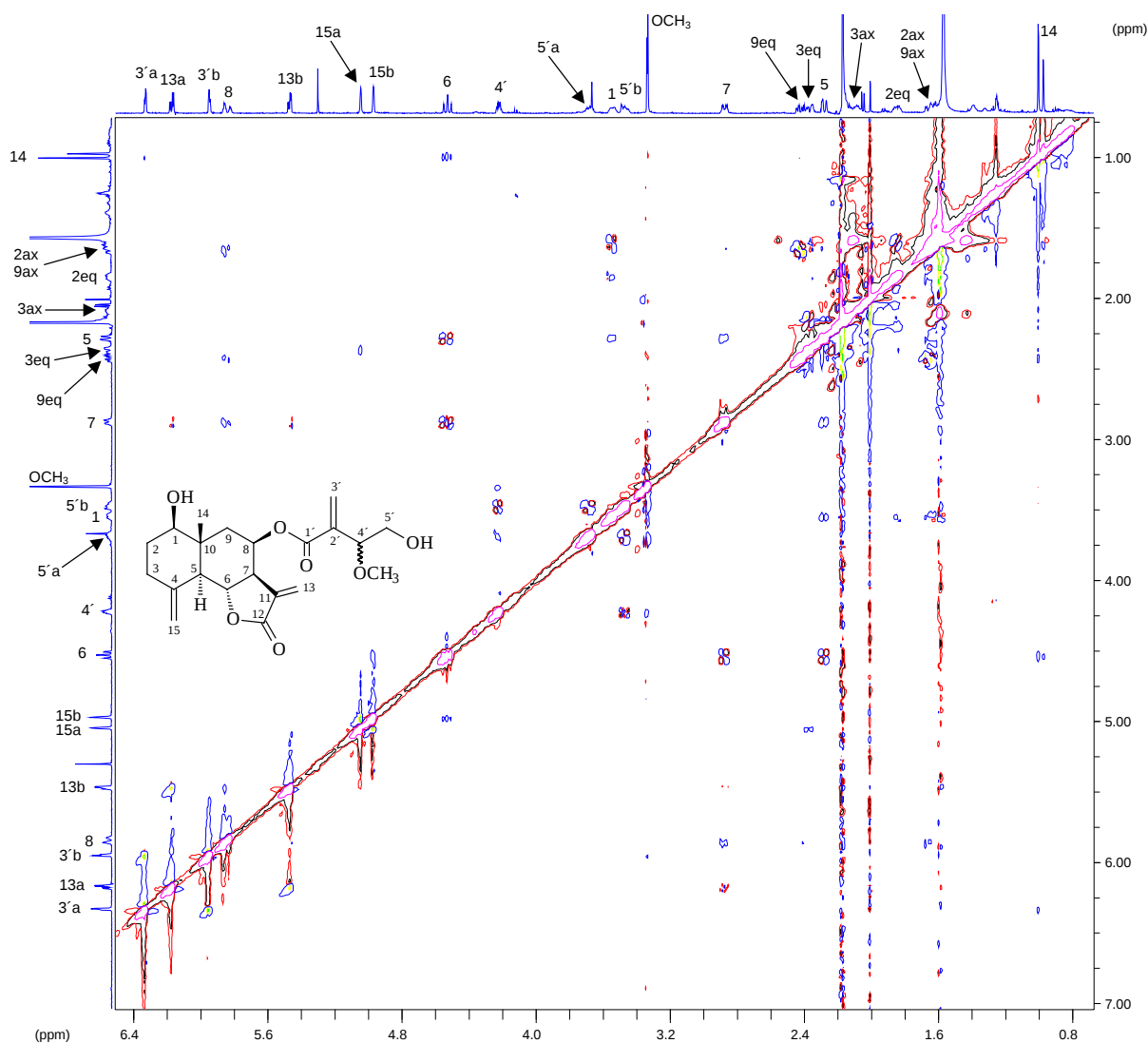


Bild 2.14: NOESY-Spektrum des Gemisches aus **SL1** und **SL2** (500 MHz, CDCl_3 , TMS); wegen der höheren Masse des Gemisches ist dieses Spektrum besser und damit aussagekräftiger als die entsprechenden Spektren der Einzel-Substanzen; neben den echten NOE-Korrelationen sind auch TOCSY-Artefakte im Spektrum enthalten

Vor diesem Hintergrund lassen sich nun auch die Massen-Spektren besser interpretieren: Das aus dem DCI-MS-Spektrum ablesbare Molekulargewicht von **SL1** steht im Einklang mit den NMR-Ergebnissen (siehe Bild 2.6, S. 14). Selbst unter den schonenden Aufnahmebedingungen dieses Spektrums kommt es zur Spaltung von **SL1**. Dies kann aus mehreren Peaks gefolgert werden: Das Kation mit m/z 282 ist ein Clusterion, bestehend aus dem Sesquiterpenlactonalkohol und einem Ammonium-Ion. Die Fragmente mit 146 und 163 amu stehen für das Acyl der Säure bzw. den Cluster mit Ammoniak. Das EI-MS-Spektrum

dokumentiert ausschließlich die Fragmentierung des Sesquiterpenlactonalkohols. Mehrere Peaks im Massenbereich über 200 units belegen die Eliminierung von 2 Molekülen Wasser (m/z 246 und m/z 228), einem Methylradikal (m/z 213) und einem Molekül Kohlendioxid (m/z 202) aus dem SL-Grundkörper.

Bezüglich der relativen Konfiguration des Moleküls ist bekannt, dass bei 6,7-*trans*-Eudesmanoliden der modifizierte Isopropylrest an C-7 aus biogenetischen Gründen equatorial über die Ringebene des Decalin-Systems orientiert ist [FISCHER et al., 1979]. Die lactonisierte OH-Gruppe an C-6 ist auch equatorial angeordnet, allerdings unter die Ringebene. Daraus folgt die *trans*-diaxiale Anordnung der Protonen an C-6 und C-7, die schon aus den Kopplungskonstanten abgeleitet werden konnte. Da H-6 auch mit H-5 *trans*-diaxial koppelt, muß sich das Proton an Position 5 unterhalb der Ringebene befinden. Dies steht in Einklang mit dem Shift des zugehörigen Kohlenstoffatoms [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995]. Betrachtet man die chemische Verschiebung des C-1 von 1-Hydroxyeudesmanoliden in Deuteriochloroform, so liegt sie bei α -Hydroxy-Gruppen bei etwa 72 ppm und bei β -Hydroxy-Gruppen über 75 ppm. Somit spricht der aus dem ^{13}C NMR-Spektrum von **SL1** entnehmbare Wert von 78.45 ppm eindeutig für eine β -ständige OH-Gruppe. Ein weiteres Indiz ist die Signallage von C-14 bei 13.68 ppm. Bei einer α -OH-Gruppe an C-1 wäre das Signal bei einer deutlich höheren chemischen Verschiebung (ca. 18 ppm) zu finden [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995]. Da aus den Kopplungskonstanten von H-1 hervorgeht, dass dieses Atom axial angeordnet ist, muß die β -OH-Gruppe equatorial positioniert sein. Bewiesen wird dieser Schluß durch ein Kreuzsignal zwischen H-1 und H-5 im NOESY-Spektrum: Beide Atome stehen axial unter der Ringebene und zeigen eine deutliche NOE-Wechselwirkung (siehe Bild 2.14, S. 22). Aus der Anordnung der Substituenten an C-1 und C-5 geht außerdem die Verknüpfung der Ringe A und B hervor. Nur eine *trans*-Anellierung, bei der die beiden verknüpften Cyclohexanringe in der energetisch günstigen Sessel-Konformation vorliegen, ist mit den Meßdaten vereinbar. Dieses Ergebnis konnte durch den Bau eines dreidimensionalen Molekülmodells erhärtet werden und steht im Einklang mit Untersuchungen zur Stereochemie von *cis*- und *trans*-Eudesmanoliden [HOLUB et al., 1986]. Der B-Ring des *trans*-Decalin-Systems von **SL1** liegt danach in der $^5\text{C}^8$ -Konformation vor.

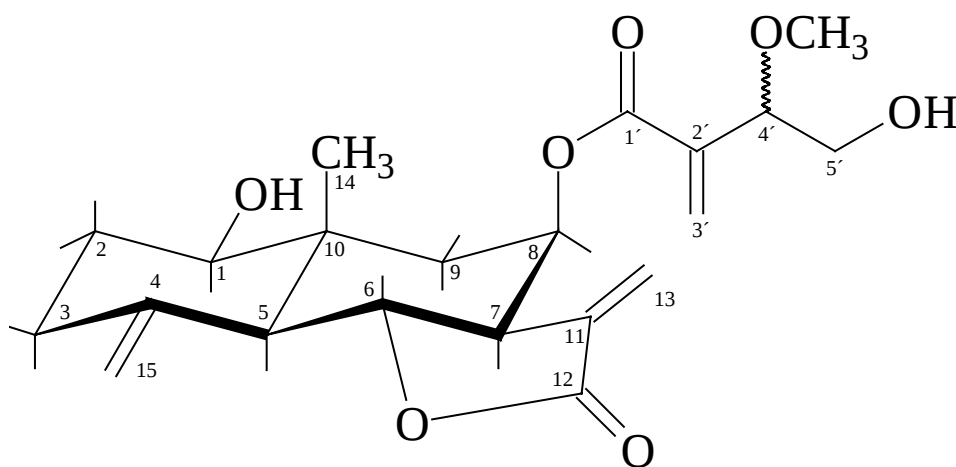
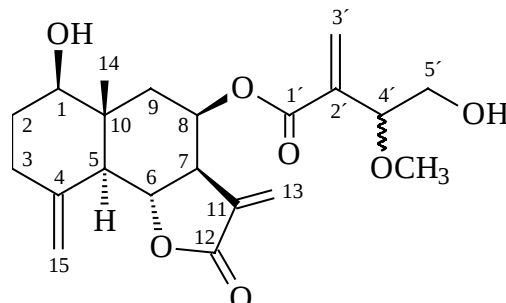


Bild 2.15: Konformationsformel von **SL1**

Aus der *trans*-Annelierung folgt auch die Orientierung der angulären Methylgruppe an C-10. Sie ist axial über der Ringebene angeordnet. Dies wird durch einen deutlichen NOE-Effekt mit dem ebenfalls axial über der Ringebene positionierten H-6 untermauert. Wie bereits angedeutet, befindet sich das H-7 axial unter der Ringebene. Da es mit dem H-8 eine axial-equatoriale Kopplung liefert, muß das H-8 equatorial unter die Ringebene ausgerichtet sein. Das Kreuzsignal dieses Protons mit H-7 und den beiden Protonen an C-9 kann als Bestätigung dieser Strukturinformation angesehen werden, da ein axial über der Ringebene stehendes 8-Proton weder einen NOE-Effekt mit dem axialen H-7 noch einen NOE-Effekt mit dem axial ausgerichteten Proton der 9-Methylengruppe ergeben hätte. Das Fazit aller stereochemischen Erkenntnisse wird mit der Konformationsformel von **SL1** widergegeben (siehe Bild 2.15, S. 23).

Für die Genera *Ageratina* und *Eupatorium* liegen zwar einige wenige Belege von mit dem Reynosin verwandten Eudesmanoliden vor, es handelt sich jedoch durchweg um relativ einfache Strukturen ohne Hydroxylgruppen an C-1 und/oder C-8 und demzufolge natürlich auch ohne Esterseitenkette [BOHLMANN et al., 1977a; GONZÁLEZ et al., 1985a und 1985b]. Die unveretherte Säure wurde schon als Bestandteil eines Germacranolids aus *E. mikanoides* identifiziert [HERZ et al., 1980]. Der Substanz **SL1** sehr ähnliche Verbindungen konnten aus *Calea trichomata* und *Zexmenia*-Arten (beide Tribus Heliantheae, Asteraceae) isoliert werden [BOHLMANN und LONITZ, 1978; OBER et al., 1984]. Da keine der bislang bekannten Substanzen vollständig mit **SL1** übereinstimmt, ist die Verbindung als neuer Naturstoff einzustufen.

**2.1.3 8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin =
1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-4(15),11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL2)**

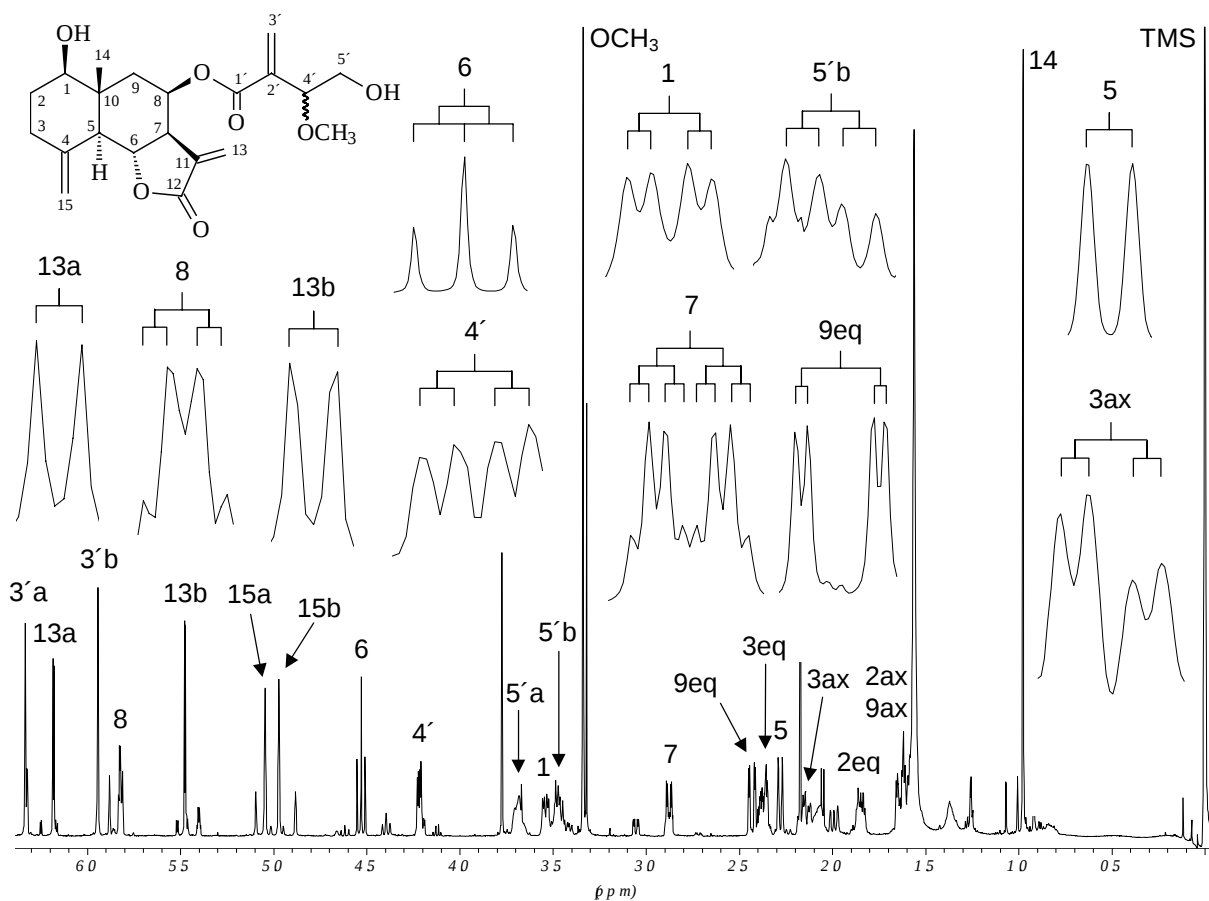
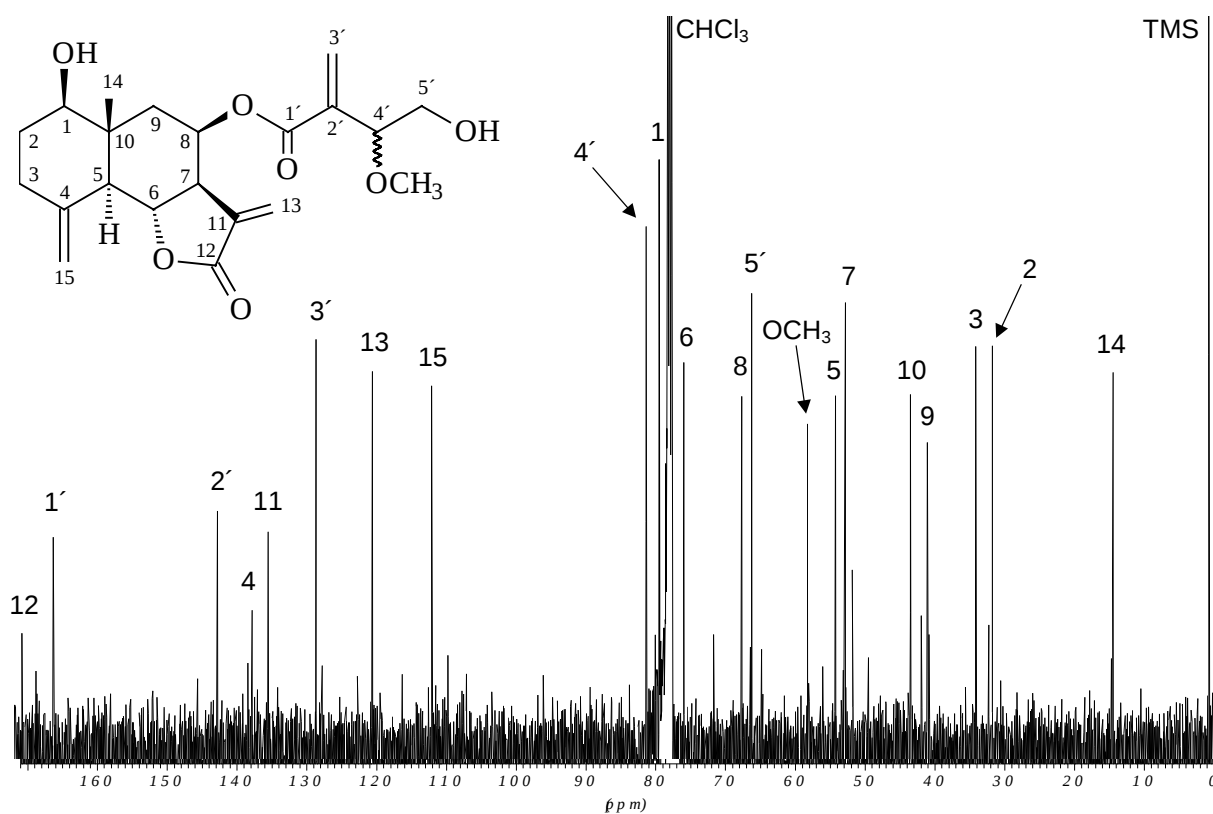


Ebenso wie **SL1** wurde **SL2** aus Fraktion D-II mit Hilfe von SC und semipräparativer HPLC isoliert. Die Ausbeute betrug 2 mg (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309).

Nicht nur Aussehen und Detektionsverhalten von **SL2** waren mit dem von **SL1** identisch, auch die DC- R_f -Werte und GC-Retentionszeiten sowie die IR-, EI-MS-, DCI-MS- und zweidimensionalen NMR-Spektren stimmten überein.

Tabelle 2.2: NMR-Daten von Verbindung **SL2** (500 bzw. 125 MHz, $CDCl_3$, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL2	C	SL2	DEPT
1	3.53 <i>dd</i> (4.4, 11.3)	1	78.45	CH
2eq	1.84 <i>m</i>	2	30.90	CH ₂
ax	1.60 <i>m</i>	3	33.26	CH ₂
3eq	2.36 <i>ddd</i> (1.9, 5.0, 13.9)	4	136.71	C
ax	2.15 <i>dd</i> (5.0, 13.9)	5	53.31	CH
5	2.27 <i>d</i> (10.7)	6	74.99	CH
6	4.52 <i>t</i> (11.1)	7	51.92	CH
7	2.86 <i>ddd</i> (3.2, 5.7, 11.1)	8	66.73	CH
8	5.82 <i>dd</i> (2.5, 5.7)	9	40.20	CH ₂
9eq	2.43 <i>dd</i> (2.5, 15.1)	10	42.57	C
ax	1.66 <i>dd</i> (3.8, 15.1)	11	134.32	C
13	6.17 <i>d</i> (3.2)	12	169.54	C
	5.46 <i>d</i> (3.2)	13	119.47	CH ₂
14	0.98 <i>s</i>	14	13.68	CH ₃
15	5.04 <i>s</i>	15	109.97	CH ₂
	4.97 <i>s</i>	1'	165.09	C
3'	6.32 <i>s</i>	2'	141.61	C
	5.93 <i>s</i>	3'	127.54	CH ₂
4'	4.21 <i>dd</i> (2.5, 6.9)	4'	80.33	CH
5'	3.69 <i>m</i>	5'	65.26	CH ₂
	3.48 <i>dd</i> (7.3, 11.5)	OCH ₃	57.31	CH ₃
OCH ₃	3.34 <i>s</i>			

Bild 2.16: ^1H NMR-Spektrum von **SL2** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)Bild 2.17: ^{13}C NMR-Spektrum von **SL2** (125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Die eindimensionalen NMR-Spektren beider Substanzen zeigen auch im Vergleich eine große Ähnlichkeit miteinander, dennoch existieren graduelle Abweichungen (vergl. Bild 2.10, S. 17 und Bild 2.8, S. 16 mit Bild 2.16, S. 26 und Bild 2.17, S. 26). Diese Unterschiede sind so gering (max. 0.03 ppm im ^1H NMR- und max. 0.12 ppm im ^{13}C NMR-Spektrum), dass erst durch die Aufnahme eines Gemisches deutlich wurde, welche Signale sich signifikant unterscheiden. Die Abweichungen beschränken sich auf die der Ansatzstelle der Esterkette benachbarten Atome. Im Protonenspektrum betrifft dies vor allem H-8, im ^{13}C NMR-Spektrum sind insbesondere die Kohlenstoffe C-6 bis C-9, C-13 und C-1' betroffen (vergl. Tabelle 2.1, S. 15 und Tabelle 2.2, S. 25). Berücksichtigt man neben diesen geringen Unterschieden die Tatsache, dass bei beiden Komponenten des Gemisches identische Kopplungskonstanten gefunden werden und im Gas-Chromatogramm des Gemisches (siehe Bild 2.18, S. 27) nur ein Peak erscheint, so kann dies nur bedeuten, dass die SL-Komponente von **SL1** mit der von **SL2** identisch sein muß.

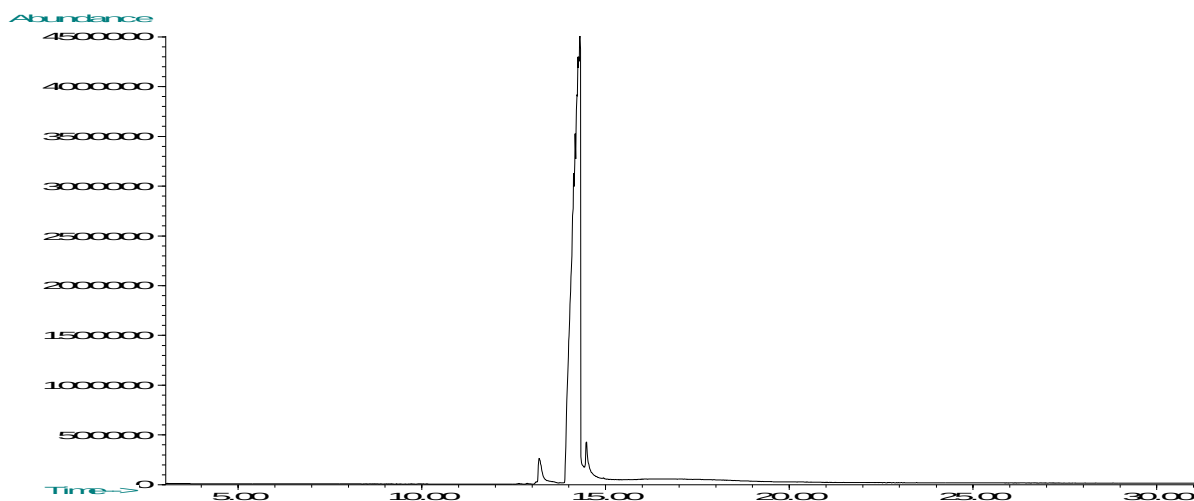


Bild 2.18: Gas-Chromatogramm des Gemisches aus **SL1** und **SL2**

Der Unterschied zwischen beiden Verbindungen muß demnach in der Seitenkette zu finden sein. Er kann jedoch nur die Stereochemie betreffen, da die NMR-Daten Abweichungen in der Konstitution ausschließen. Damit bleibt als einzige Möglichkeit der Differenzierung zwischen **SL1** und **SL2** die absolute Konfiguration an C-4', des einzigen chiralen Kohlenstoffatoms der Säure. Bei **SL1** ist demnach der Sesquiterpenlactonalkohol mit dem einen Enantiomer der Säure verestert, im Falle von **SL2** wurde die Esterbindung jedoch mit dem optischen Antipoden der Säure von **SL1** geknüpft (siehe Bild 2.21, S. 29). Ein sich in den chemischen Verschiebungen widerspiegelnder Unterschied zwischen beiden Verbindungen ergibt sich nur dadurch, dass die primär durch ihre Shifts und Kopplungskonstanten nicht unterscheidbaren enantiomeren Säuren durch die Veresterung mit identischen, aber optisch aktiven Alkoholen in eine diastereomere Umgebung versetzt werden. Somit kann auch **SL2** als 8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin (= 1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-4(15),11(13)-eudesmadien-12,6-olid) bezeichnet werden. Die Verbindung **SL2** stellt wie **SL1** einen neuen Naturstoff dar. Zum Vorkommen von Reynosin-Derivaten siehe die Ausführungen am Ende des Kap. 2.1.2., S. 23.

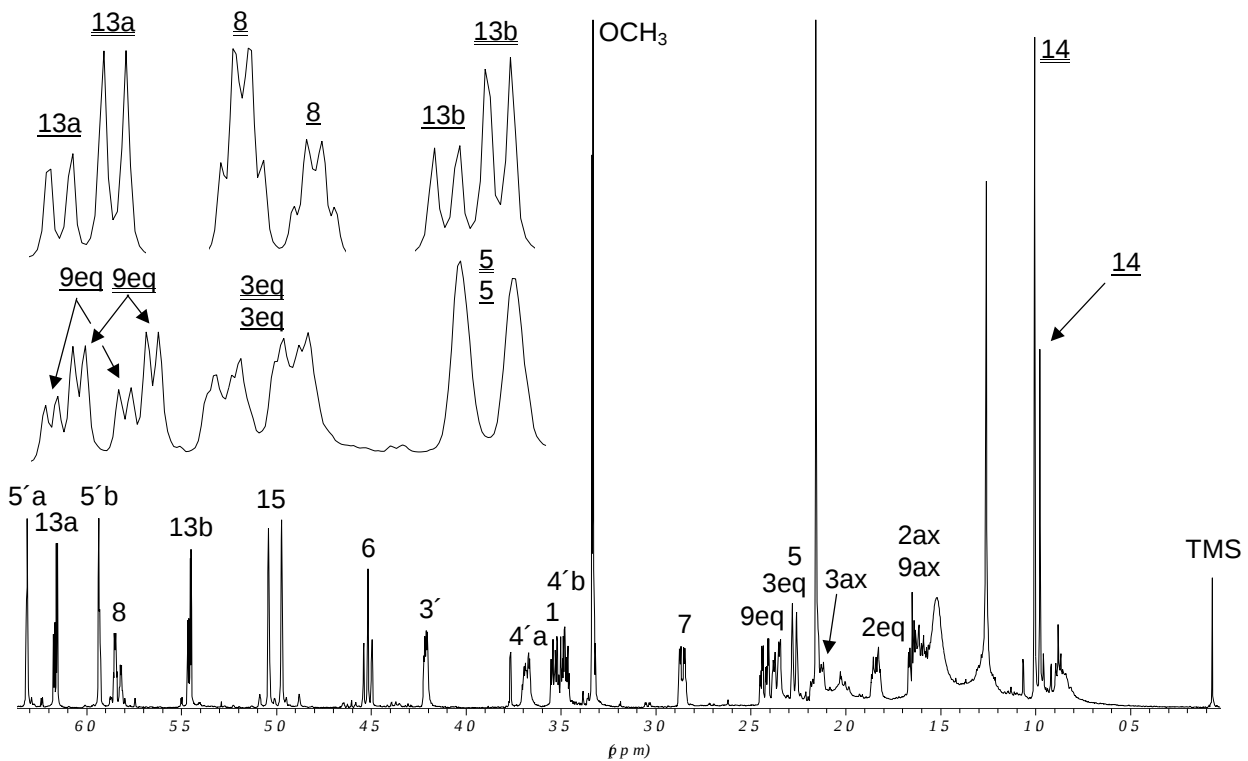


Bild 2.19: ^1H NMR-Spektrum des Gemisches von **SL1** und **SL2** (500 MHz, CDCl_3 , TMS); bei den vergrößerten Signalen gehören die unterstrichenen Signale zu **SL1**, die doppelt unterstrichenen Signale zu **SL2**

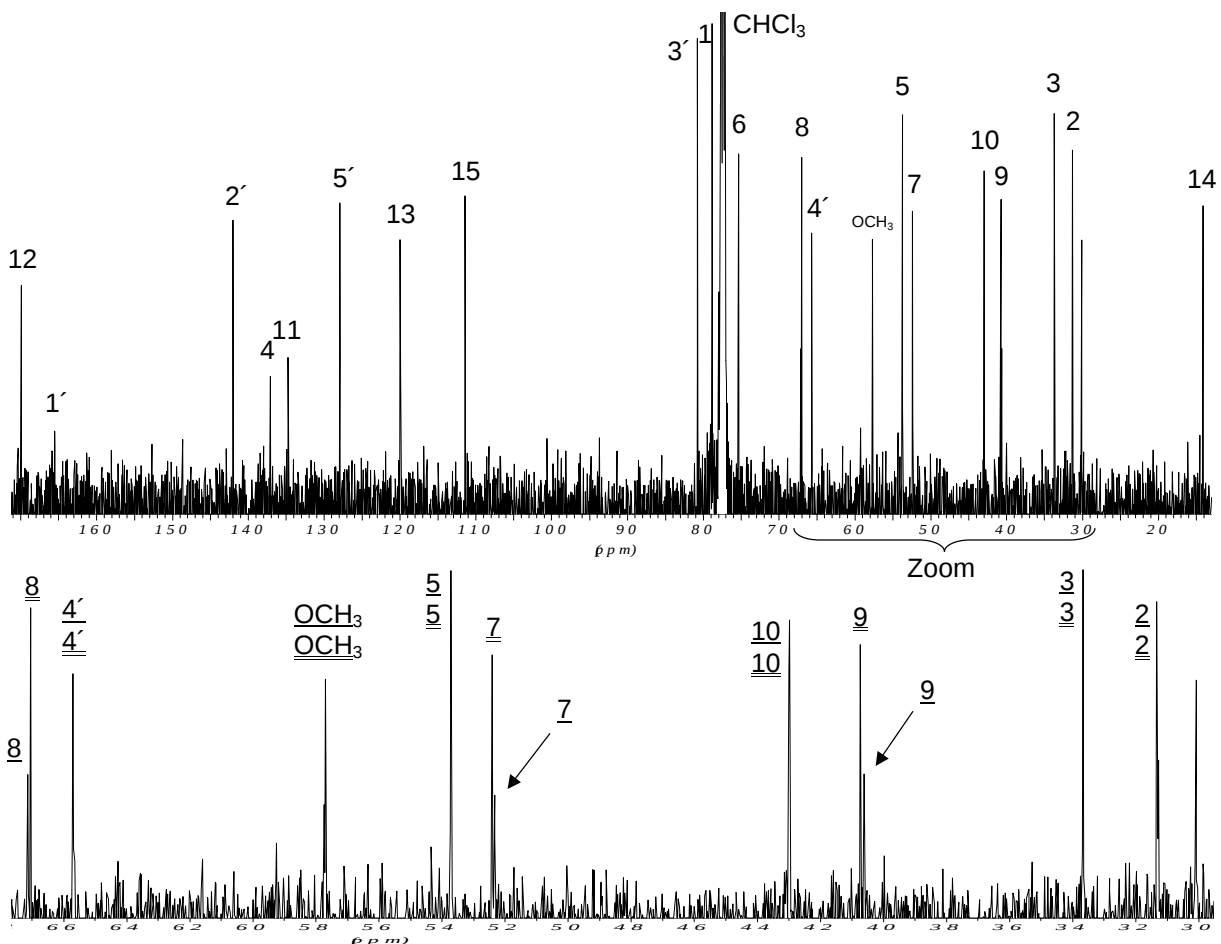


Bild 2.20: ^{13}C NMR-Spektrum des Gemisches von **SL1** und **SL2** (125 MHz, CDCl_3 , TMS); was die Unterstreichungen im vergrößerten Spektren-Teil angeht, gilt dasselbe wie bei Bild 2.19

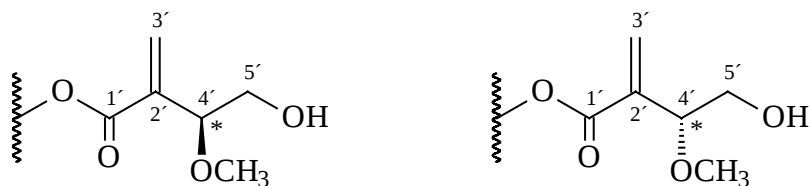


Bild 2.21: Die beiden enantiomeren Carbonsäuren aus der Esterseitenkette von **SL1** bzw. **SL2**; die eindeutige Zuordnung zu den beiden Verbindung war an Hand des vorliegenden Datenmaterials nicht möglich

Weder **SL1** noch **SL2** konnten kristallisiert werden, so dass leider keine Röntgen-Strukturdaten gewonnen werden konnten. Es kann daher keine Entscheidung gefällt werden, welches Säuren-Enantiomer nun bei den beiden SL jeweils vorkommt. Dies wird durch die gestrichelte Darstellung der Valenz zwischen C-4' und der Methoxygruppe bei den Strukturformeln berücksichtigt.

Die Existenz der α -Methoxyalkohol-Gruppe in der Säureseitenkette von **SL1** bzw. **SL2** legte die Vermutung nahe, dass diese funktionelle Gruppe während der Aufarbeitung des Extraktes durch die Spaltung eines hypothetischen, genuin vorliegenden Epoxidringes mit Methanol entstanden war (siehe Bild 2.22, S. 29). Um dies zu überprüfen, wurde aus 100 g getrockneten Blättern von *E. semialatum* mit der Soxhlet-Methode ein Aceton-Extrakt hergestellt und dieser mit Hilfe der HPLC (Methode HPLC-5) untersucht. Unter denselben Bedingungen wurde auch das reine Gemisch aus **SL1** und **SL2** chromatographiert. Da im Chromatogramm des Extraktes bei derselben Retentionszeit wie im Chromatogramm des Gemisches ein Doppelpeak erschien und darüber hinaus die zugehörigen UV-Spektren identisch waren, ist davon auszugehen, dass **SL1** und **SL2** genuin in der Pflanze vorkommen und keine durch den Kontakt mit Methanol entstandenen Artefakte darstellen.

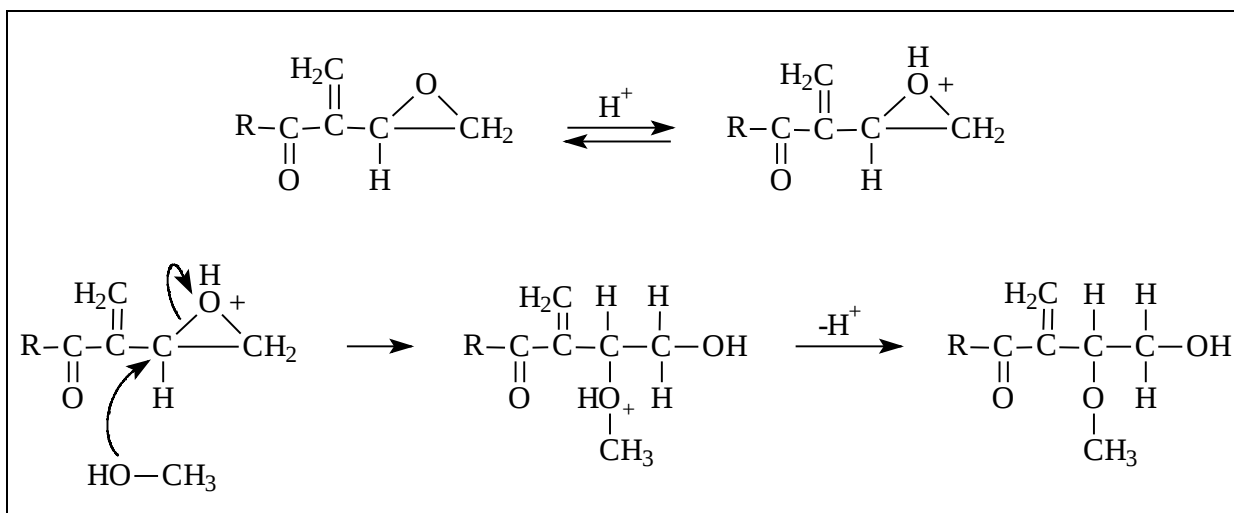
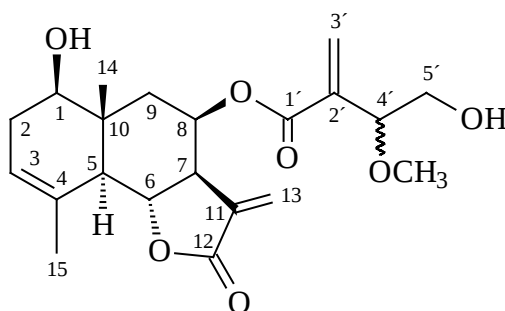


Bild 2.22: Hypothetische Epoxid-Methanolyse in der Säureseitenkette von **SL1** bzw. **SL2**

**2.1.4 8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]balchanin =
1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-3,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL3)**



Bei Verbindung **SL3** handelt es sich um eine farblose Substanz von gummiartiger Konsistenz, die mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühareagenz auf der DC-Folie unter Blauviolett-Färbung reagiert. Nach Aufarbeitung der Fraktion D-II (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309) konnten 3 mg isoliert werden.

Im IR-Spektrum finden sich Absorptionsbanden für die OH-Valenzschwingung (3611 cm^{-1}), die C-H-Valenzschwingung (2940 cm^{-1}), für zwei C=O-Valenzschwingungen (γ -Lacton bei 1778 cm^{-1} und konjugierter Ester bei 1721 cm^{-1}) und für eine C=C-Valenzschwingung (1650 cm^{-1}). Dies deutet auf ein SL hin, welches mit einer α,β -ungesättigten Carbonsäure verestert ist. Damit zeigt das IR-Spektrum eine enge strukturelle Verwandtschaft von **SL3** mit **SL1** bzw. **SL2** an.

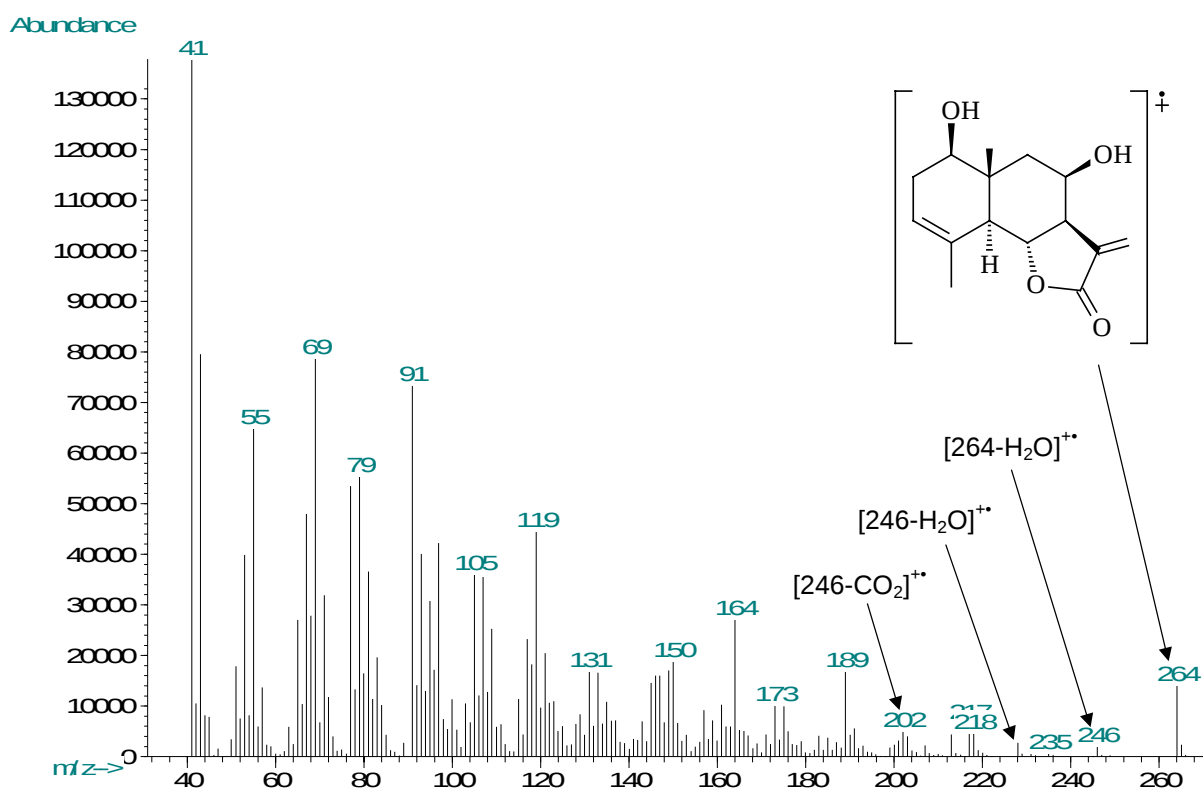


Bild 2.23: EI-MS-Spektrum von Verbindung **SL3**

Im EI-MS-Spektrum von **SL3** (siehe Bild 2.23, S. 30) finden sich die von **SL1** bzw. **SL2** bekannten Fragmente. Dies sind neben den Ionen im unteren Massenbereich insbesondere die Schlüsselbruchstücke bei m/z 264 [SL-Alkohol]⁺, 246 [264-H₂O]⁺, 228 [246-H₂O]⁺, 213 [228-CH₃]⁺ und 202 [246-CO₂]⁺. Trotz dieser großen Ähnlichkeit der Spektren sind graduelle Unterschiede im Hinblick auf die relativen Signalintensitäten zu beobachten. Beispiele sind das Radikalkation des SL-Alkohols bei m/z 264 sowie die Ionen bei m/z 189 und m/z 164, die im Spektrum von **SL3** eine deutlich höhere relative Signalintensität aufweisen als in den Spektren von **SL1** und **SL2**. Somit müssen trotz enger struktureller Verwandtschaft Unterschiede in der Konstitution zwischen **SL3** und **SL1** bzw. **SL2** existieren.

Tabelle 2.3: NMR-Daten von Verbindung **SL3** (500 bzw. 125 MHz, Aceton-d₆, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL3	C	SL3	DEPT
1	3.66 <i>dd</i> (4.5, 11.2)	1	74.85	CH
2eq	2.28 <i>m</i>	2	32.07	CH ₂
ax	1.96 <i>m</i>	3	122.31	CH
3	5.35 <i>m</i>	4	133.32	C
5	2.55 <i>d</i> (9.5)	5	51.15	CH
6	4.52 <i>t</i> (10.7)	6	77.60	CH
7	3.06 <i>m</i>	7	53.18	CH
8	5.80 <i>dd</i> (3.2, 5.7)	8	67.42	CH
9eq	2.37 <i>dd</i> (2.5, 15.1)	9	39.30	CH ₂
ax	1.71 <i>dd</i> (3.2, 15.1)	10	40.88	C
13	5.99 <i>d</i> (3.2)	11	138.53	C
	5.41 <i>d</i> (3.2)	12	169.42	C
14	1.07 <i>s</i>	13	117.75	CH ₂
15	1.83 <i>s</i>	14	13.80	CH ₃
3'	6.35 <i>s</i>	15	22.76	CH ₃
	5.87 <i>s</i>	1'	165.59	C
4'	4.18 <i>dd</i> (3.2, 6.9)	2'	145.28	C
5'	3.57 <i>m</i>	3'	126.63	CH ₂
	3.40 <i>m</i>	4'	81.42	CH
OCH ₃	3.29 <i>s</i>	5'	65.22	CH ₂
		OCH ₃	56.82	CH ₃

Im ¹H NMR-Spektrum von **SL3** finden sich zwanzig Signale für achtundzwanzig Protonen. Damit wurden im Vergleich mit **SL1** bzw. **SL2** bei gleicher Protonen-Zahl zwei Signale weniger aufgezeichnet. Es fällt auf, dass alle von den ¹H NMR-Spektren von **SL1** und **SL2** bekannten Signale bis auf die beiden Singulets der 15-Exomethylengruppe und die beiden Multipletts der Methylenprotonen an C-3 vorhanden sind (vergl. Tabelle 2.1, S. 15 und Tabelle 2.3, S. 31). An Stelle dieser Signale findet sich ein Multiplett für ein Proton bei 5.35 ppm und ein 3-Protonen-Singulett bei 1.83 ppm. Bei den übrigen Signalen beobachtet man bei den mit dem A-Ring des SL's assoziierten Protonen gegenüber den entsprechenden Signalen im Spektrum von **SL1** deutliche Tieffeld-Verschiebungen. Die Beträge reichen von + 0.13 ppm (H-1), über + 0.28 ppm (H-5) und + 0.36 ppm (H-2ax) bis zu + 0.44 ppm (H-2eq). Hinzu kommt, dass bei **SL3** der Betrag der Kopplungskonstanten von H-5 um 1.2 Hz geringer

ist als die Frequenz der entsprechenden Kopplung bei **SL1**. Im Hinblick auf die Signallagen der übrigen Protonen bestehen keine signifikanten Abweichungen gegenüber den beiden anderen bereits diskutierten SL. Daraus folgt, dass bei **SL3** die Doppelbindung des A-Ringes endozyklisch angeordnet sein muß und im Gegensatz zu **SL1** und **SL2** zwischen C-3 und C-4 lokalisiert ist, während bezüglich der Konstitution der übrigen Atome des Moleküls keine Unterschiede zu den anderen beiden SL bestehen. Hierfür sprechen auch die Signallagen des im Falle von **SL3** sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffes an Position 3 (122.31 ppm) und des sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffes an Position 15 im ^{13}C NMR-Spektrum (siehe Bild 2.24, S. 32). Die gemessenen Shiftwerte stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten für $\Delta^{3,4}$ -Eudesmanolide überein [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995; HERZ und KULANTHAIVEL, 1983; ZDERO et al., 1991].

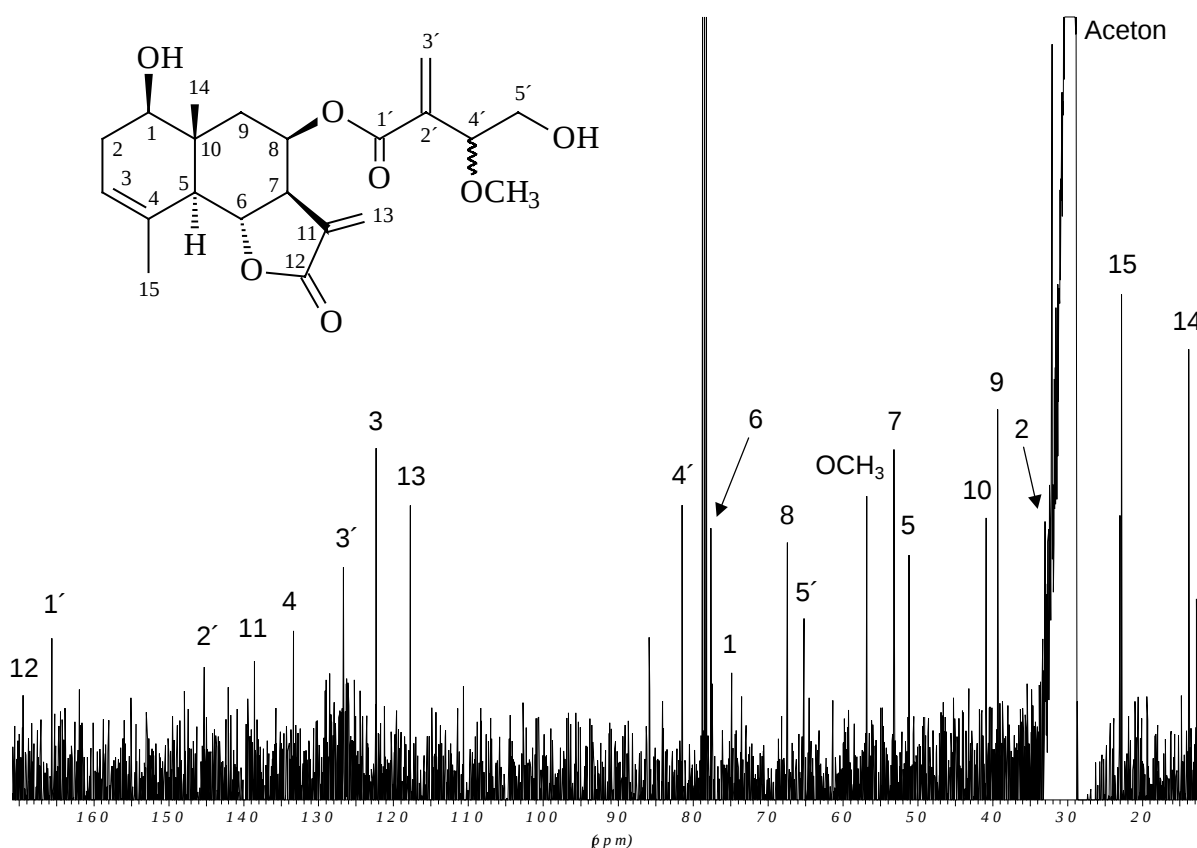


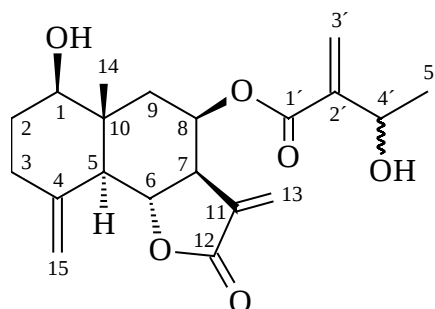
Bild 2.24: ^{13}C NMR-Spektrum von **SL3** (125 MHz, Aceton- d_6 , TMS)

Es handelt sich somit bei **SL3** um 1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-3,11(13)-eudesmadien-12,6-olid (= 8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]balchanin). Für die Substanz existierten bis zum Beginn dieser Arbeit keine Belege in der Literatur. **SL3** ist damit als neuer Naturstoff aufzufassen. Die SL-Komponente der Verbindung ist unter dem Namen 8 β -Hydroxybalchanin bekannt. Aus Drogenmaterial der Genera *Ageratina* und *Eupatorium* konnten zwar einige mit dem Balchanin verwandte Verbindungen isoliert werden, es handelt sich jedoch durchweg um sehr einfache Moleküle ohne Hydroxylgruppen und Säurereste [BOHLMANN et al., 1977a; GONZÁLEZ et al., 1985a und 1985b].

Der Erstfund eines 8-Hydroxybalchanins gelang aus den oberirdischen Teilen der Asteraceae *Leucanthemella serotina* [HOLUB et al., 1982]. Verwandte Verbindungen sind z.B. noch für die Compositen *Chamaemelum fuscatum* [DE PASCUAL TERESA et al., 1986], *Liatris laevigata* [HERZ und KULANTHAIVEL, 1983] und *Tithonia rotundifolia* [BOHLMANN et al., 1981; PÉREZ C. et al., 1984] sowie die Magnoliaceae *Liriodendron tulipifera* [DOSKOTCH et al., 1975] beschrieben worden.

In Analogie zu der auf S. 29 beschriebenen Vorgehensweise konnte auch für Verbindung **SL3** gezeigt werden, dass es sich bei ihr nicht um ein bei der Aufarbeitung mit Methanol entstandenes Artefakt handelt.

2.1.5 Trichomatolid D = 8 β -[2-(1-Hydroxyethyl)acryloyloxy]reynosin (Verbindung SL4)



Substanz **SL4** fiel bei der Auftrennung der Fraktion D-II in einer Ausbeute von etwa 1 mg im Gemisch mit **SL1** an (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Aussehen und Detektionsverhalten waren mit dem von **SL1** bis **SL3** identisch.

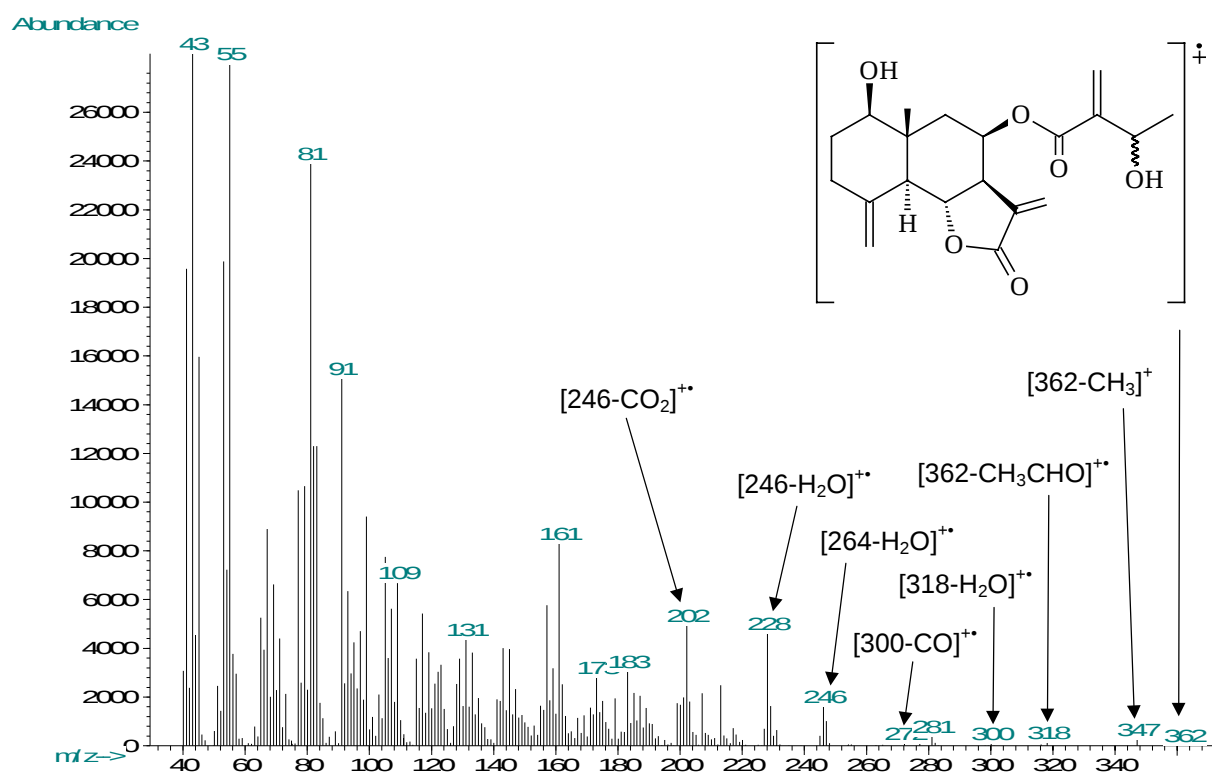


Bild 2.25: EI-MS-Spektrum von Verbindung **SL4**

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Verbindungen ist bei **SL4** der Molpeak (m/z 362) im EI-MS-Spektrum zu erkennen (siehe Bild 2.25, S. 34). Dies wird durch das Quasimolekülion bei m/z 380 im DCI-MS-Spektrum bestätigt. Somit besitzt **SL4** eine um 30 amu geringere Masse als die isomeren Verbindungen **SL1** – **SL3**. Neben der Abspaltung eines Methylradikals (m/z 347) kommt es zur sukzessiven Elimination der Neutralkomplexe Acetaldehyd (m/z 318), Wasser (m/z 300) und Kohlenmonoxid (m/z 272) aus dem Molekülion. Wie bei den drei bisher behandelten SL findet sich auch im EI-MS-Spektrum von **SL4** sowohl ein Ion mit einer Masse von 264 amu als auch die daraus hervorgehenden Spezies mit den Massen 246, 228, 213 und 202 amu. Dies deutet darauf hin, dass auch **SL4**

als Grundkörper einen SL-Alkohol mit ähnlicher Substitution wie bei **SL1** bis **SL3** besitzt und ebenso wie diese drei Substanzen mit einer Carbonsäure verestert ist. Außerdem lässt sich aus dieser Beobachtung ableiten, dass die im Gegensatz zu den anderen angesprochenen SL um 30 amu geringere Gesamtmasse von **SL4** auf eine anders aufgebaute Esterseitenkette zurückgeht. Die aus der Fragmentierung des SL-Alkohols von **SL4** hervorgehenden Ionen erscheinen zwar auch in den EI-MS-Spektren von **SL1** – **SL3**, jedoch gibt es deutliche Unterschiede im Hinblick auf deren relative Intensitäten (vergl. Bild 2.25, S. 34 mit Bild 2.5, S. 14 und Bild 2.23, S. 30). So ist bei **SL4** die Intensität des Ions bei m/z 264, welches dem SL-Alkohol zuzuordnen ist, sehr gering, während die Ionen mit einer Masse von 246, 228 und 202 amu mit einer im Vergleich deutlich höheren Intensität erscheinen. Auch im unteren Massenbereich des EI-MS-Spektrums von **SL4** fallen einige Ionen auf, deren relative Intensitäten signifikant höher sind als bei **SL1** bis **SL3**. Als Beispiele sind die Teilchen mit den Massen 43, 55 und 81 amu zu nennen. Es ist anzunehmen, dass diese Abweichungen darauf beruhen, dass im Falle von **SL4** unter EI-Bedingungen das Gesamtmolekül fragmentiert, werden in den entsprechenden Spektren von **SL1** bis **SL3** lediglich der Zerfall des SL-Alkohols dokumentiert ist.

Tabelle 2.4: ^1H NMR-Daten der Verbindung **SL4** (500 MHz, CDCl_3 , TMS) im Vergleich zu Angaben für *Trichomatolid D*: $^1\text{OBER et al., 1984}$ (200 MHz, CDCl_3 , TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL4	Trichomatolid D¹
1	3.54 <i>m</i>	3.54 <i>dd</i> (4.8, 11.2)
2eq	1.85 <i>m</i>	1.20 – 1.90 (überlagert)
ax	1.62 <i>m</i>	
3eq	2.37 <i>m</i>	1.20 – 1.90 (überlagert)
ax	2.17 <i>m</i>	
5	2.28 <i>d</i> (10.7)	2.28 <i>brd</i> (11.0)
6	4.53 <i>t</i> (11.1)	4.53 <i>dd</i> (11.0)
7	2.88 <i>ddd</i> (3.2, 5., 7, 11.1)	2.88 <i>dq</i> (3.0, 11.0)
8	5.85 <i>dd</i> (2.5, 3.2)	5.84 <i>brt</i> (3.0)
9eq	2.43 <i>m</i>	2.42 <i>dd</i> (2.5, 15.5)
ax	1.66 <i>m</i>	1.64 <i>dd</i> (4.0, 15.5)
13	6.17 <i>d</i> (3.2)	6.17 <i>d</i> (3.0)
	5.48 <i>d</i> (3.2)	5.47 <i>d</i> (3.0)
14	0.98 <i>s</i>	0.99 <i>s</i>
15	5.05 <i>s</i>	5.04 <i>brs</i>
	4.97 <i>s</i>	4.97 <i>brs</i>
3'	6.13 <i>s</i>	6.13 <i>brs</i>
	5.88 <i>s</i>	5.88 <i>brs</i>
4'	4.63 <i>t</i> (6.3)	4.61 <i>q</i> (6.8)
5'	1.38 <i>d</i> (6.3)	1.38 <i>d</i> (6.8)

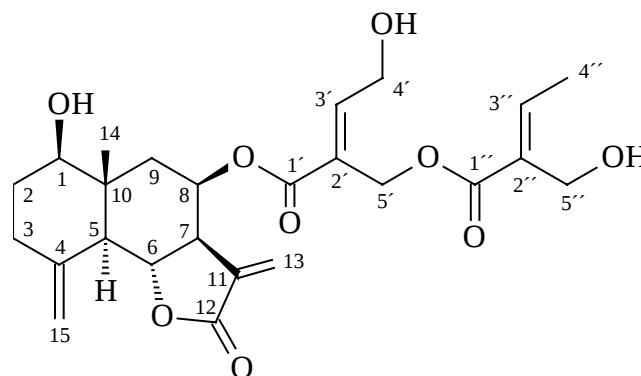
Vergleicht man die Protonen-Shifts von H-1 bis H-15 der Substanzen **SL1** und **SL2** mit den Daten von **SL4**, so erkennt man keine nennenswerten Unterschiede (vergl. Tabelle 2.1, S. 15 und Tabelle 2.4, S. 36). Abweichungen finden sich nur für die Signale der Säureseitenkette: Hier erscheint statt der beiden Ein-Protonen-Multipletts für die $\text{CH}_2\text{-OH}$ -Gruppe bei 3.48 und 3.69 ppm ein Dublett für die drei äquivalenten Protonen einer Methylgruppe bei 1.38 ppm. Zusätzlich ist das Singulett für die Methoxygruppe an C-4' bei 3.33 ppm verschwunden. Das

Signal von H-4' ist gegenüber **SL1** bis **SL3** um mehr als 0.40 ppm zu tieferem Feld verschoben (4.63 ppm). Daraus folgt, dass bei **SL4** die OH-Gruppe an C-4' nicht mehr methyliert ist. Die freie alkoholische Funktion an C-4' wirkt sich auf den Shift von H-4' durch eine stärkere Tieffeld-Verschiebung aus. Die Signallagen der Exomethylenprotonen an C-3' sind gegenüber **SL1** bis **SL3** zwar auch verlagert, jedoch nur in vergleichsweise geringem Ausmaß. Somit handelt es sich bei **SL4** um 8 β -[2-(1-Hydroxyethyl)-acryloyloxy]reynosin [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995].

Die Identität konnte durch die Übereinstimmung mit den Meßdaten von OBER et al. (1984) verifiziert werden. Die Verfasser der genannten Publikation hatten **SL4** neben nahe verwandten Estern aus Pflanzenmaterial der Heliantheae *Calea trichomata* isoliert und der Verbindung den Namen „Trichomatolid D“ gegeben. Da Ober und seinen Mitarbeitern nur ein 200 MHz-Gerät für ihre NMR-Messungen zur Verfügung stand, war es ihnen nicht möglich, die Signallagen der überlagerten Methylenprotonen an C-2 und C-3 sowie verschiedene Kopplungskonstanten genau zu ermitteln. Diese Lücke konnte mit den eigenen 500 MHz-Daten geschlossen werden.

Was das Vorkommen von Eudesmanoliden in den Species *Ageratina* und *Eupatorium* angeht, sei auf die Ausführungen in Kap. 2.1.2, S. 23 verwiesen. Aus einer anderen Gattung der Tribus Heliantheae – *Zexmenia phyllocephala* – konnte eine dem Trichomatolid D strukturell sehr nahe stehende Verbindung isoliert werden. Sie besitzt dieselbe Konstitution, allerdings sind die Hydroxylgruppe an C-1 und die Esterkette an C-8 α -ständig mit dem Decalin-System des SL's verknüpft [BOHLMANN und LONITZ, 1978]. Die Asteraceae *Tithonia rotundifolia* zählt ebenfalls zur Tribus der Heliantheae. Aus einem Extrakt dieser Pflanze wurden 8 β -Hydroxybalchanin- und 8 β -Hydroxymagnolialid-Derivate gewonnen, die mit derselben C-5-Säure verestert sind wie **SL4** [PÉREZ C. et al., 1984].

**2.1.6 8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin =
1 β -Hydroxy-8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4(15),11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL5)**



Die farblose und gummiartige Substanz **SL5** konnte in einer Ausbeute von 29 mg aus Fraktion D-II isoliert werden (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühareagenz ergab sich bei der DC eine blauviolette Färbung.

Das IR-Spektrum von **SL5** zeigt die schon von **SL1** bis **SL3** bekannten Absorptionsbanden für die OH-Valenzschwingung (3411 cm^{-1}), die C-H-Valenzschwingung (2944 cm^{-1}), für zwei C=O-Valenzschwingungen (γ -Lacton bei 1765 cm^{-1} und konjugierter Ester bei 1709 cm^{-1}) und für eine C=C-Valenzschwingung (1650 cm^{-1}). Somit sollte es sich auch bei **SL5** um ein hydroxyliertes SL handeln, welches mit einer α,β -ungesättigten Carbonsäure verestert ist.

Das EI-MS-Spektrum von **SL5** ist mit dem von **SL1** identisch. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass die beiden Substanzen mit dem 8 β -Hydroxyreynosin denselben Grundkörper besitzen.

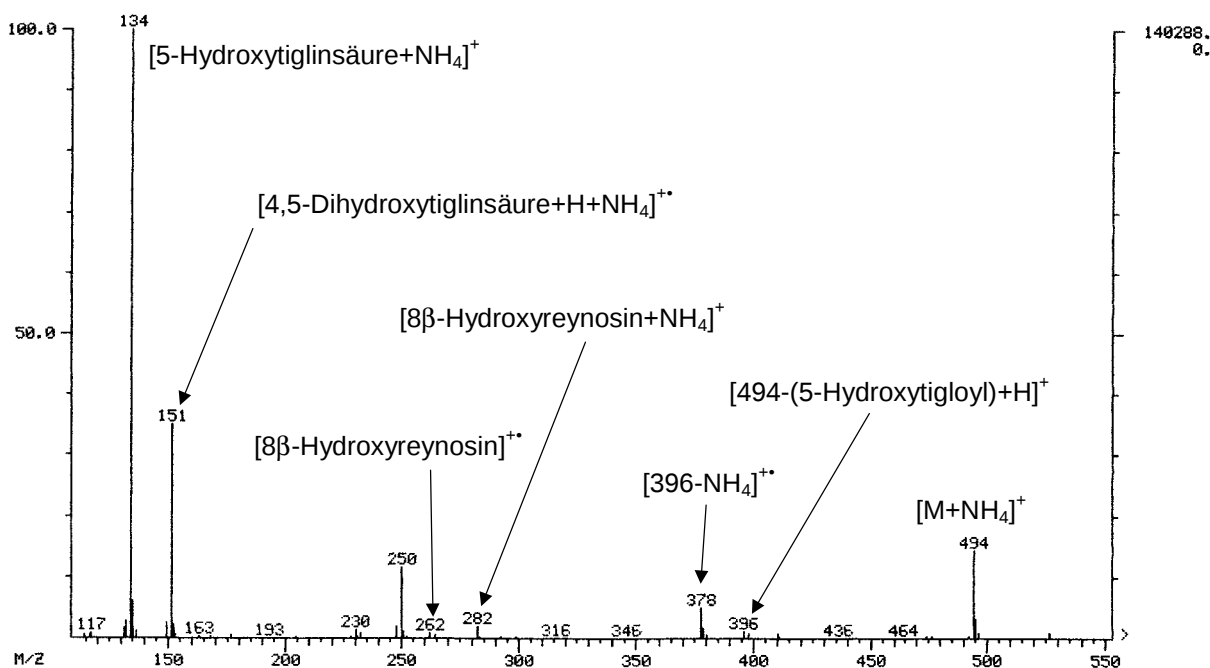


Bild 2.26: DCI-MS-Spektrum von **SL5**

Dem DCI-MS-Spektrum von **SL5** lässt sich dagegen entnehmen, dass das Molekulargewicht der Substanz mit 476 g/mol deutlich über dem der bisher behandelten Eudesmanolide liegt (siehe Bild 2.26, S. 37). Das Quasimolekülion verliert nach Aufnahme eines Wasserstoffatoms unter Entstehung eines Kations mit der Masse 396 units ein Fragment mit der Masse 99 amu. Dieses Fragment findet sich im unteren Massenbereich als Clusterion bei m/z 117 wieder. Das korrespondierende Ion liefert in Form des Clusters bei m/z 134 den Basispeak des Spektrums. Die Abspaltung dieses Restes stellt jedoch nur den ersten Zwischenschritt auf dem Weg zur Bildung des Radikalkations bei m/z 264 dar, welches dem unveresterten SL-Grundkörper 8 β -Hydroxyreynosin zuzuordnen ist (vergl. Bild 2.5, S. 14). Im Zuge der Entstehung des Ions wird noch ein zweiter Rest abgespalten. Das zugehörige Fragment besitzt eine Masse von 132 amu und ist damit genauso schwer wie das dem Clusterion bei m/z 151 zu Grunde liegende Molekül. Die Massen der beiden mit dem SL-Grundkörper verknüpften Reste deuten auf mono- bzw. dihydroxylierte α,β -ungesättigte C₅-Säuren hin, die schon als Komponenten anderer SL-Ester beschrieben wurden [BOHLMANN et al., 1985c; BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1987].

Tabelle 2.5: NMR-Daten von Verbindung **SL5** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL5	C	SL5	DEPT
1	3.52 <i>dd</i> (4.5, 11.4)	1	78.36	CH
2eq	1.83 <i>m</i>	2	30.93	CH ₂
ax	1.59 <i>ddd</i> (5.0, 12.0, 13.2)	3	33.32	CH ₂
3eq	2.35 <i>m</i>	4	141.89	C
ax	2.13 <i>m</i>	5	53.32	CH
5	2.27 <i>d</i> (10.7)	6	75.11	CH
6	4.54 <i>t</i> (10.7)	7	51.92	CH
7	2.88 <i>ddd</i> (3.2, 5.7, 10.7)	8	67.14	CH
8	5.85 <i>dd</i> (2.5, 3.8)	9	40.26	CH ₂
9eq	2.38 <i>dd</i> (2.5, 15.1)	10	42.67	C
ax	1.64 <i>dd</i> (3.8, 15.1)	11	134.23	C
13	6.10 <i>d</i> (3.2)	12	169.78	C
	5.47 <i>d</i> (3.2)	13	119.74	CH ₂
14	0.96 <i>s</i>	14	13.73	CH ₃
15	5.03 <i>s</i>	15	110.76	CH ₂
	4.93 <i>s</i>	1'	165.47	C
3'	7.06 <i>t</i> (5.7)	2'	126.97	C
4'	4.48 <i>d</i> (5.7)	3'	147.62	CH
5'	4.96 <i>s</i>	4'	59.28	CH ₂
3''	6.92 <i>q</i> (6.9)	5'	58.12	CH ₂
4''	1.91 <i>d</i> (6.9)	1''	167.16	C
5''	4.30 <i>s</i>	2''	131.49	C
		3''	142.52	CH
		4''	14.36	CH ₃
		5''	56.42	CH ₂

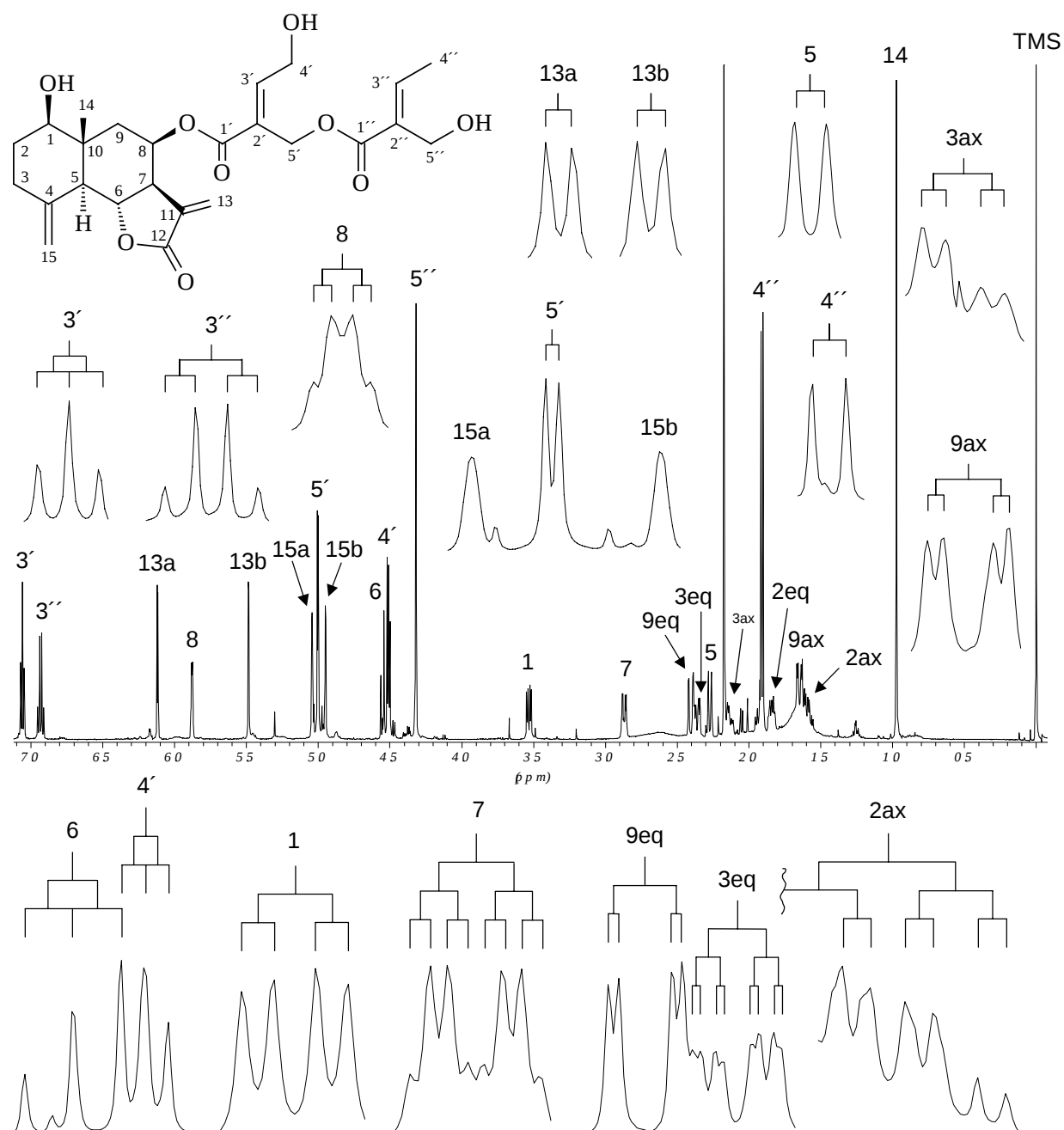
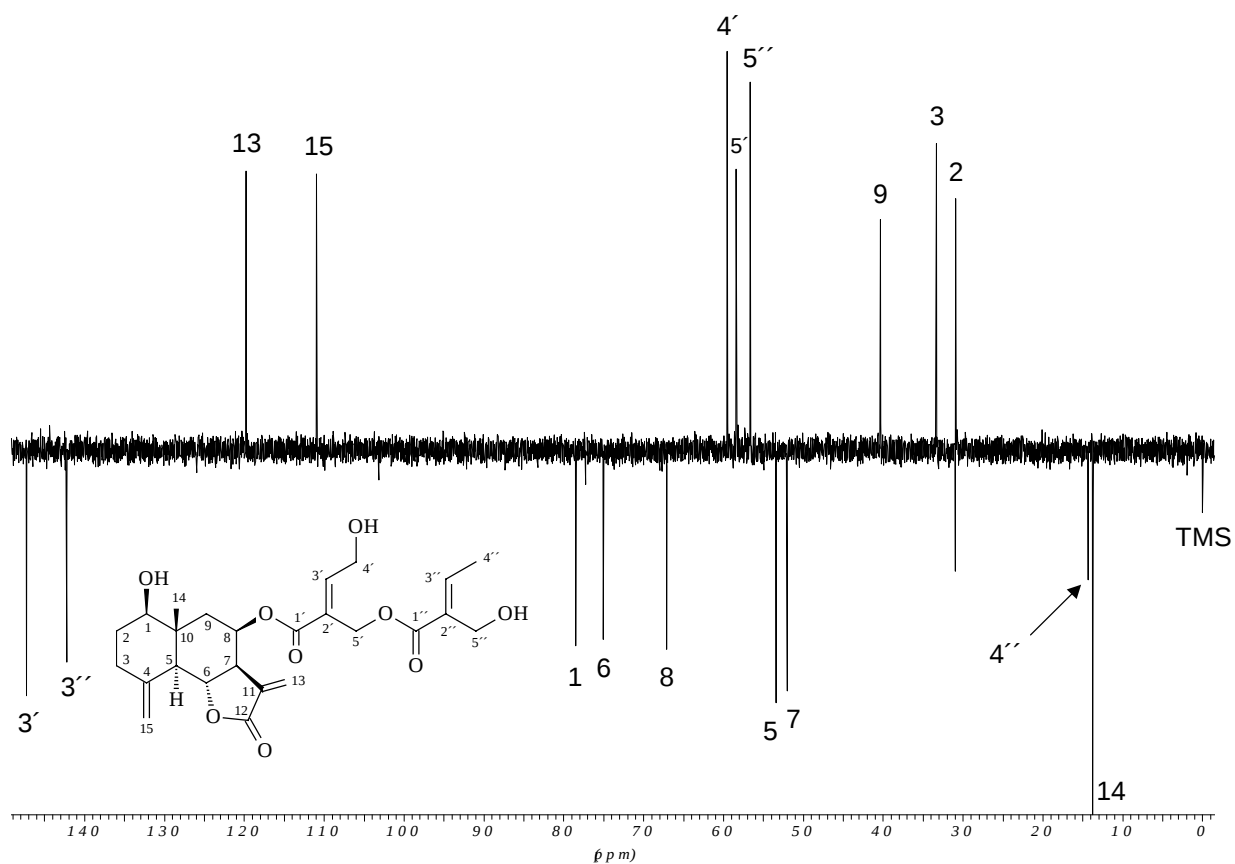
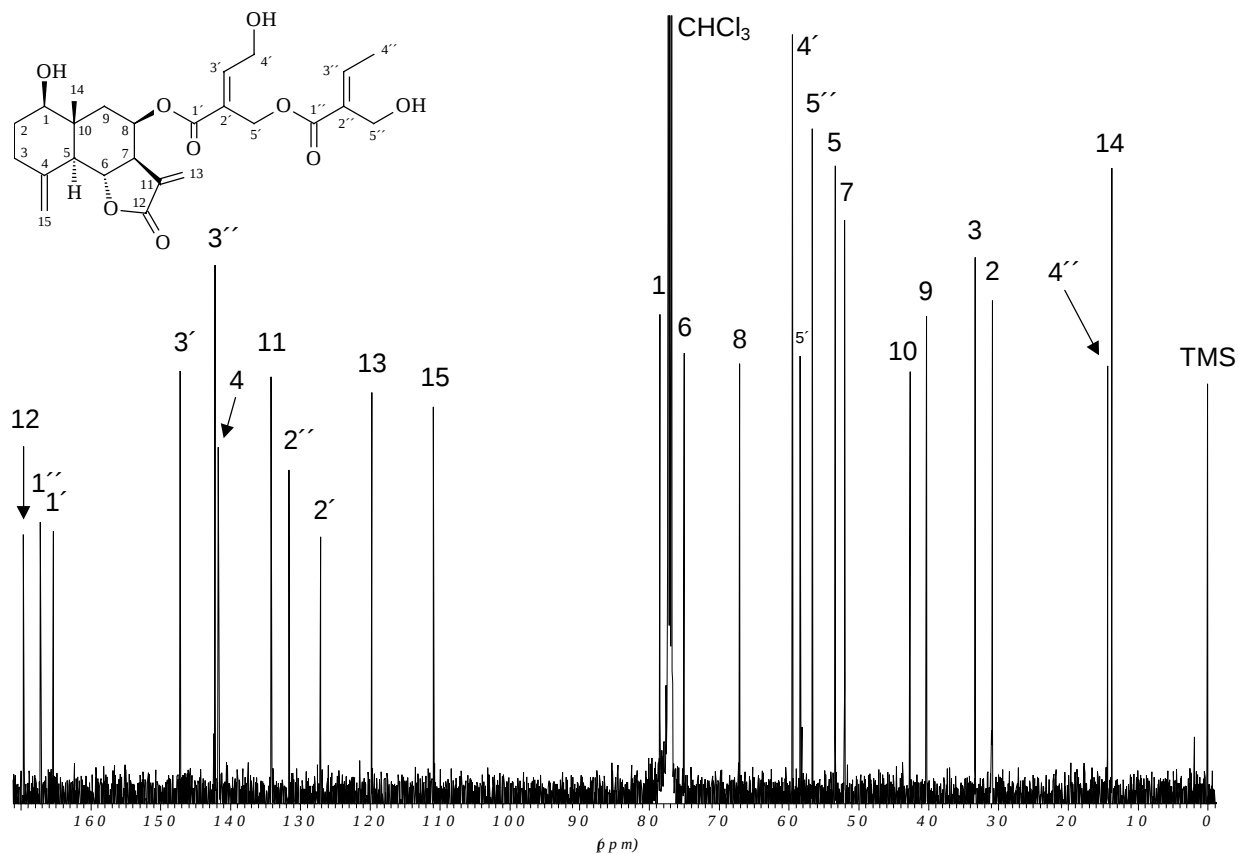


Bild 2.27: ^1H NMR-Spektrum von **SL5** (500 MHz, CDCl_3 , TMS); der untere Teil zeigt einige komplexere Signale in vergrößerter Darstellung



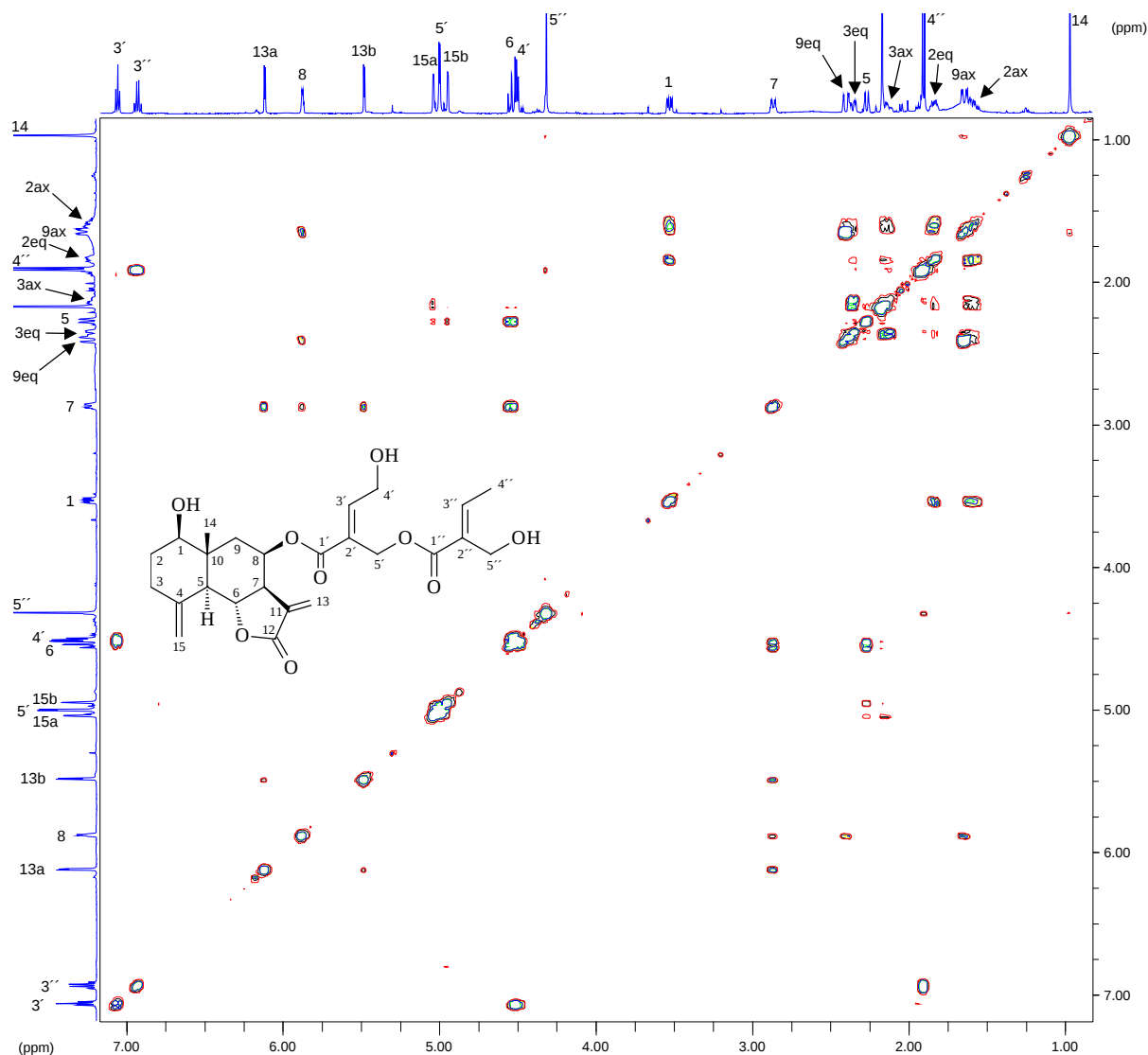


Bild 2.30: COSY-Spektrum von **SL5** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

Zur Klärung der Struktur von **SL5** wurden Protonen- und Kohlenstoffspektren aufgenommen (siehe Bild 2.27, S. 39 und Bild 2.28, S. 40). Der Vergleich der erhaltenen Spektren mit denen von **SL1** und **SL2** zeigt eindeutig, dass bei **SL5** der gleiche Sesquiterpenlactonalkohol zu Grunde liegt wie bei **SL1** und **SL2** (vergl. Bild 2.27, S. 39 und Bild 2.28, S. 40 mit Bild 2.10, S. 17 und Bild 2.8, S. 16). Da auch die Shifts von H-1, C-1, H-8 und C-8 übereinstimmen, muß **SL5** wie **SL1** und **SL2** über die OH-Gruppe an Position 8 verestert sein. Darüber hinaus finden sich im ^1H NMR-Spektrum sechs weitere Signale: Ein Triplet und ein Quartett für jeweils ein Proton bei 7.06 (H-3') bzw. 6.92 ppm (H-3''), ein Dublett bei 4.48 ppm (H-4') und zwei Singulett bei 4.96 (H-5') bzw. 4.30 ppm (H-5'') für jeweils zwei Protonen und ein Dublett für drei Protonen bei 1.91 ppm (H-4''). Für das Signal bei 6.92 ppm (H-3'') existiert ein Kreuzsignal mit dem Dublett bei 1.91 ppm (H-4''). Die restlichen beiden Signale der Seitenketten-Protonen bei 4.96 ppm (H-5') und 4.30 ppm (H-5'') besitzen im COSY-Spektrum jedoch keine Kopplungspartner.

Im ^{13}C NMR-Spektrum von **SL5** sind wie bei **SL1** und **SL2** fünfzehn Kohlenstoffsignale für 8 β -Hydroxyreynosin zu finden. Daneben treten noch zehn weitere Signale auf. Wie sich aus dem DEPT- (siehe Bild 2.29, S. 40) und dem HMQC-Spektrum (siehe Bild 2.31, S. 42)

entnehmen lässt, verteilen sich die zehn Kohlenstoffatome auf zwei Ester-Carbonyle (167.16 und 165.47 ppm), drei CH₂OR-Gruppen (59.28, 58.12 und 56.42 ppm), zwei Methingruppen an Doppelbindung (147.62 und 142.52 ppm), zwei quartäre Kohlenstoffe an Doppelbindung (131.49 und 126.97 ppm) sowie eine Methylgruppe (14.36 ppm) [HESSE et al., 1995]. Die Existenz von zwei Ester-Carbonylen und die Gesamtzahl der C-Atome der Seitenkette (zehn) erhärten die aus dem DCI-MS-Spektrum abgeleitete Vermutung, dass bei **SL5** der SL-Grundkörper mit zwei C₅-Säuren verestert ist.

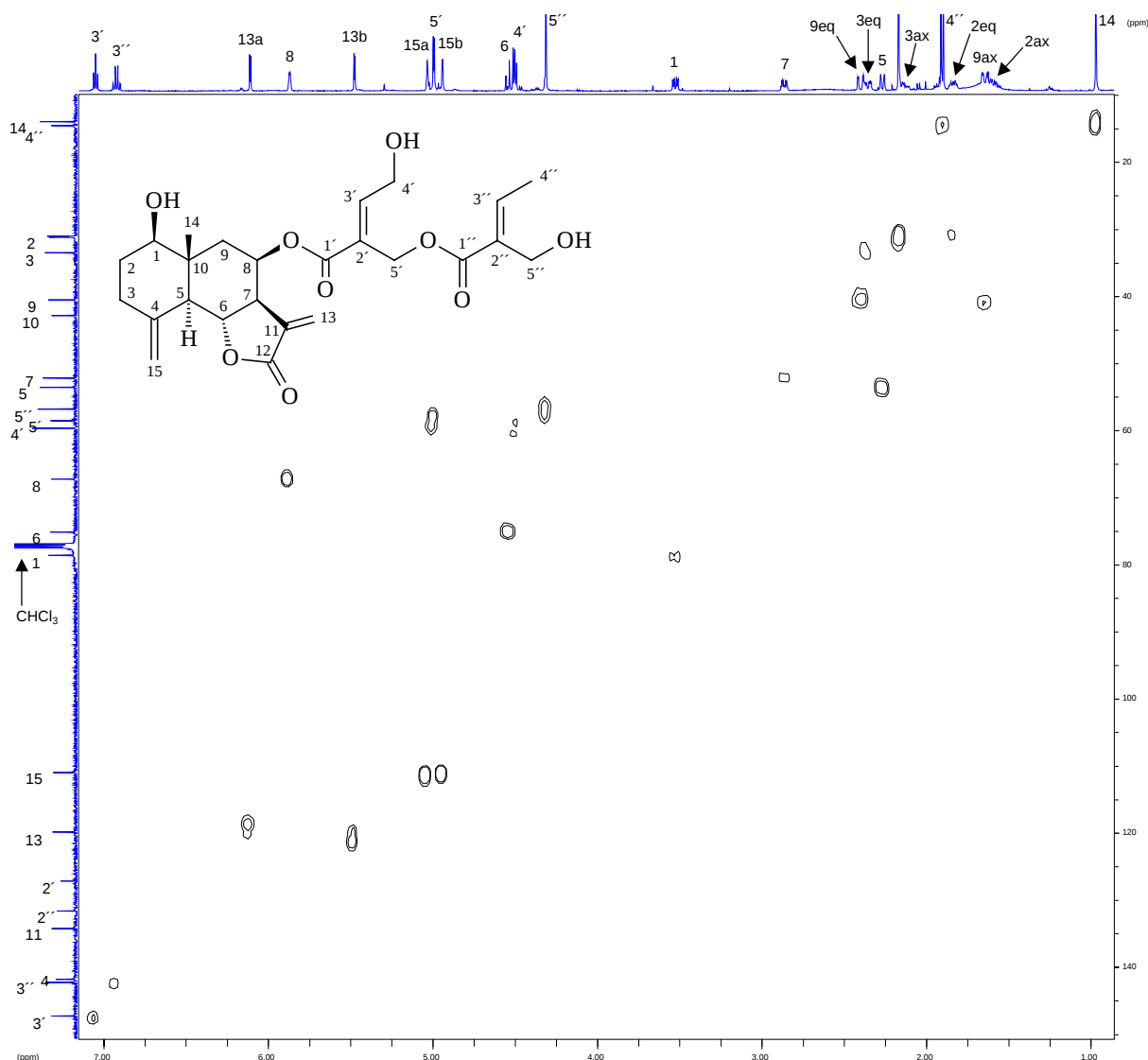


Bild 2.31: HMQC-Spektrum von Substanz **SL5** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS)

Im HMBC-Spektrum (siehe Bild 2.32, S. 43) erkennt man eine longrange-Korrelation zwischen dem Signal von H-8 und dem Kohlenstoffsignal bei 165.47 ppm. Damit ist das zugehörige C-Atom der Carbonyl-Gruppe der ersten der beiden mit dem SL verknüpften Carbonsäuren zuzuordnen (C-1'). Das Signal von C-1' koppelt im HMBC-Spektrum noch mit zwei weiteren Signalen: Einem Triplet für ein Proton bei 7.06 ppm (H-3') und einem Singulett für zwei Protonen bei 4.96 ppm (H-5'). Die Lage des Signals bei 7.06 ppm (H-3') in Verbindung mit dem Shift des korrespondierenden Kohlenstoffsignals bei 147.62 ppm (C-3') deutet auf eine Methingruppe an einer Doppelbindung hin [HESSE et al., 1995]. Das

Protonensignal (H-3') zeigt im COSY-Spektrum (siehe Bild 2.30, S. 41) eine Kopplung mit dem Dublett für zwei Protonen bei 4.48 ppm (H-4'). Dieses Signal besitzt keine weiteren Kopplungspartner. Berücksichtigt man daneben den Betrag des Protonenshifts (4.48 ppm) und den des zugehörigen Kohlenstoffsignals bei 59.28 ppm (C-4'), so müssen die Signale zu einer Methylengruppe mit einer freien Hydroxylfunktion gehören [HESSE et al., 1995]. Dem dritten longrange-Kopplungspartner von C-1', d. h. dem Singulett für zwei Protonen bei 4.96 ppm (H-5'), ist nach dem C,H-Korrelations-Spektrum das Kohlenstoffsignal bei 58.12 ppm (C-5') zuzuordnen. Der Shift des Kohlenstoffsignals spricht für eine Sauerstoff-Substitution. Das Signal der korrespondierenden Methylenprotonen liegt mit 4.96 ppm um etwa 0.5 ppm ins tiefere Feld verschoben als das Protonensignal der CH₂OH-Gruppe an Position 4'. Diese Tieffeld-Verschiebung spricht dafür, dass das Sauerstoffatom der CH₂OR-Gruppe an Position 5' verestert ist [HESSE et al., 1995].

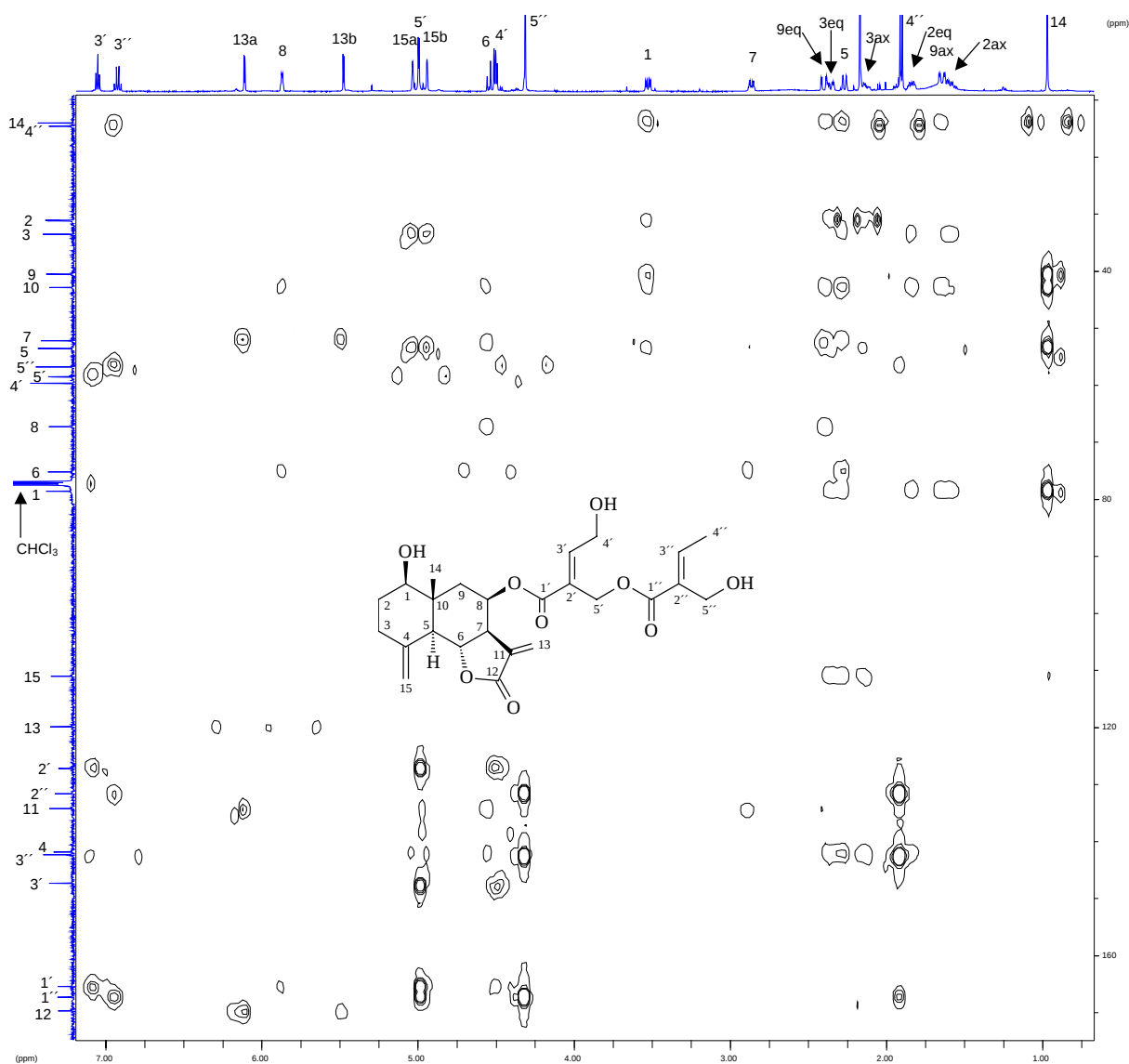


Bild 2.32: HMBC-Spektrum der Verbindung **SL5** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS)

Da das Signal der H-5'-Methylenprotonen als Singulett erscheint und im COSY-Spektrum demnach keine Crosspeaks besitzt, muß sich zwischen der zugehörigen Methylengruppe (C-5') und dem Carbonyl-Kohlenstoff, mit dem eine longrange-Kopplung besteht (C-3'), ein quartäres Kohlenstoffatom befinden. Hierfür kommt nur das Signal bei 126.97 ppm (C-2') in Frage, da es im HMBC-Spektrum neben einer ^3J -Kopplung mit dem Dublett für H-4' je eine ^2J -Kopplung mit den Signalen für H-3' und H-5' besitzt. Der Betrag der chemischen Verschiebung des Signals für C-2' deutet auf einen sp^2 -hybridisierten Kohlenstoff an einer Doppelbindung hin [HESSE et al., 1995]. Diese Doppelbindung muß zwischen C-2' und C-3' verlaufen. Somit handelt es sich bei der ersten der beiden mit dem SL-Grundgerüst veresterten Carbonsäuren entweder um 4,5-Dihydroxyangelika- oder um 4,5-Dihydroxytiglinsäure.

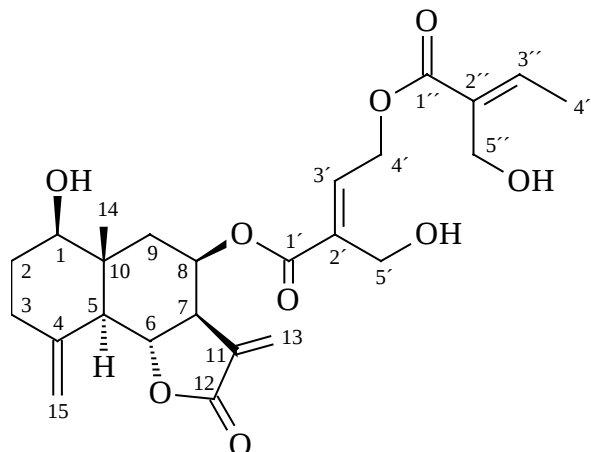
Die Verbindung zur zweiten C₅-Säure ergibt sich aus der dem HMBC-Spektrum entnehmbaren ^3J -Kopplung zwischen den Methylenprotonen an C-5' und dem noch nicht zugeordneten Signal einer Ester-Carbonylfunktion bei 167.16 ppm (C-1''). Wie bei der ersten Säure zeigt auch das Signal von C-1'' zwei weitere ^3J -Kopplungen. Die eine Kopplung besteht mit dem Quartett für ein Proton bei 6.92 ppm (H-3''), die andere mit dem Singulett für zwei Protonen bei 4.30 ppm (H-5''). Mit Hilfe des HMQC-Spektrums lassen sich die Shiftwerte der korrespondierenden Kohlenstoffe ermitteln: 142.52 ppm (C-3'') und 56.42 ppm (C-5''). Ein Vergleich der Shifts von H-5'' und C-5'' mit den δ -Werten der entsprechenden Signale der ersten Säure zeigt, dass auch die Methylengruppe an Position 5'' einen Sauerstoff-Substituenten besitzen muß. Aus der gegenüber dem Wert für H-5' um 0.66 ppm kleineren chemischen Verschiebung des Signals für H-5'' läßt sich jedoch ableiten, dass die Hydroxylgruppe an C-5'' frei sein muß [HESSE et al., 1995]. Wie bei der ersten Säure besitzt das Signal von H-5'' im COSY-Spektrum keinen Kopplungspartner. Dafür existiert im HMBC-Spektrum eine Kopplung mit dem Signal eines quartären Kohlenstoffes an einer Doppelbindung bei 131.49 ppm (C-2''), welches seinerseits über zwei Bindungen mit H-3'' koppelt. Hieraus folgt, dass auch bei der zweiten Säure zwischen einem quartären Kohlenstoff an Position 2'' und dem C-Atom an Position 3'' eine Doppelbindung verläuft. Das Signal des Methinprotons bei 6.92 ppm (H-3'') zeigt im COSY-Spektrum eine Kopplung mit einem weiteren Signal, und zwar mit dem Dublett für drei Protonen bei 1.91 ppm (H-4''). Dieses Signal besitzt im HMQC-Spektrum einen Crosspeak mit dem Kohlenstoffsignal bei 14.36 ppm (C-4''). Somit befindet sich im Gegensatz zur ersten Säure an Position 4'' eine Methylgruppe. Bei der zweiten C₅-Säure handelt es sich demnach entweder um 5-Hydroxytyglin- oder 5-Hydroxyangelikasäure.

Zu klären bleibt somit noch die Stereochemie an den Doppelbindungen beider Säuren, da jeweils die Konfiguration der Angelika- (*Z*) oder Tiglinsäure (*E*) vorliegen kann. Was die zweite Säure betrifft, lassen sich die beiden Isomere eindeutig an Hand der in der Literatur angegebenen Shifts von H-3'', H-4'' und C-5'' unterscheiden. Sie betragen für die veresterte 5-Hydroxyangelikasäure: 6.43 ppm (H-3''), 2.02 ppm (H-4'') und 64.0 ppm (C-5'') [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995; HERZ et al., 1980]. Demgegenüber beobachtet man bei der veresterten 5-Hydroxytyglinsäure signifikante Hochfeld-Verschiebungen der Signale für H-3'' (6.86 ppm) und H-4'' (1.93 ppm) sowie eine deutliche Tieffeld-Verschiebung des Signals für C-5'' (56.49 ppm) [HERZ et al., 1979]. Die eigenen Meßwerte für H-3'' (6.92 ppm), H-4'' (1.91 ppm) und C-5'' (56.42 ppm) sprechen somit unzweifelhaft für die 5-Hydroxytyglinsäure.

als zweite Säure. Die Zuordnung der ersten Säure gelingt durch den charakteristischen Unterschied des ^{13}C NMR-Shifts von C-5'. Er beträgt nach Literatur-Angaben bei der 5-O-veresterten 4,5-Dihydroxytiglinsäure 58.0 ppm [FANG und MABRY, 1988], während er sich bei der 5-O-veresterten 4,5-Dihydroxyangelikasäure auf 65.6 ppm beläuft [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1987]. Der eigene Meßwert spricht damit eindeutig für die 4,5-Dihydroxytiglinsäure als erste Säure der Seitenkette. Die gesamte Seitenkette, also der 4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy-Rest, wurde bereits als Bestandteil von Germacranoliden aus *A. cronquistii* und *Eupatoriastrum nelsonii* beschrieben [BOHLMANN et al., 1985c; MELEK et al. 1985]. Die Shiftwerte für die Protonen- und Kohlenstoffsignale der Seitenkette von **SL5** stimmen mit den angegebenen Daten sehr gut überein.

Somit kann geschlossen werden, dass es sich bei **SL5** um 8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin handelt. Wie weiter oben beschrieben, sind die Einzelkomponenten von **SL5**, d.h. das 8 β -Hydroxyreynosin (siehe Kap. 2.1.2, S. 23) und die beiden verknüpften Carbonsäuren, schon seit längerem bekannt. In der bei **SL5** verwirklichten Kombination handelt es sich jedoch um einen bisher nicht bekannten Ester.

**2.1.7 8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin =
1 β -Hydroxy-8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4(15),11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL6)**



Verbindung **SL6** fiel bei der Aufarbeitung von Fraktion D-II in einer Ausbeute von 5 mg an (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Wie **SL1** – **SL5** war auch **SL6** farblos und besaß eine gummiartige Konsistenz.

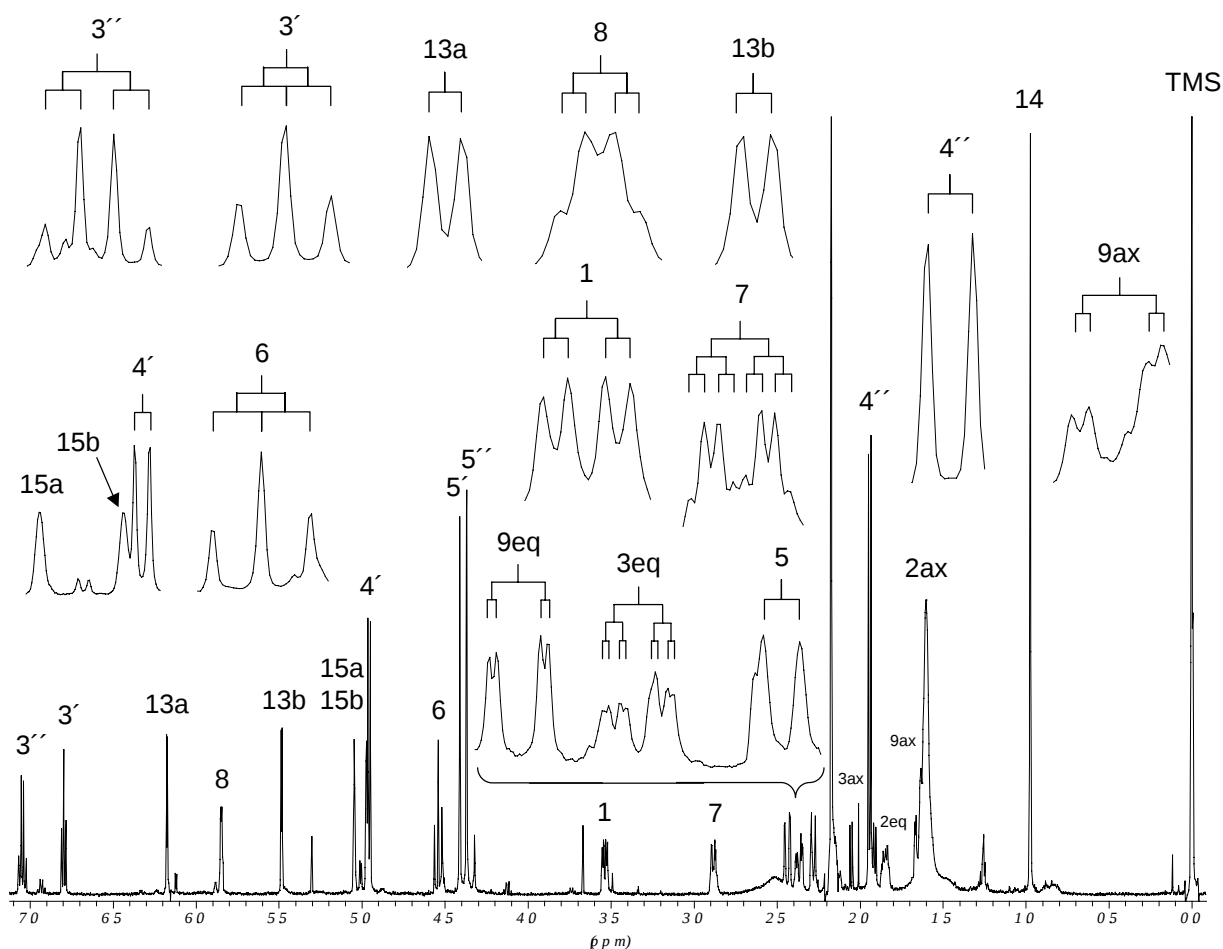


Bild 2.33: ^1H NMR-Spektrum von **SL6** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

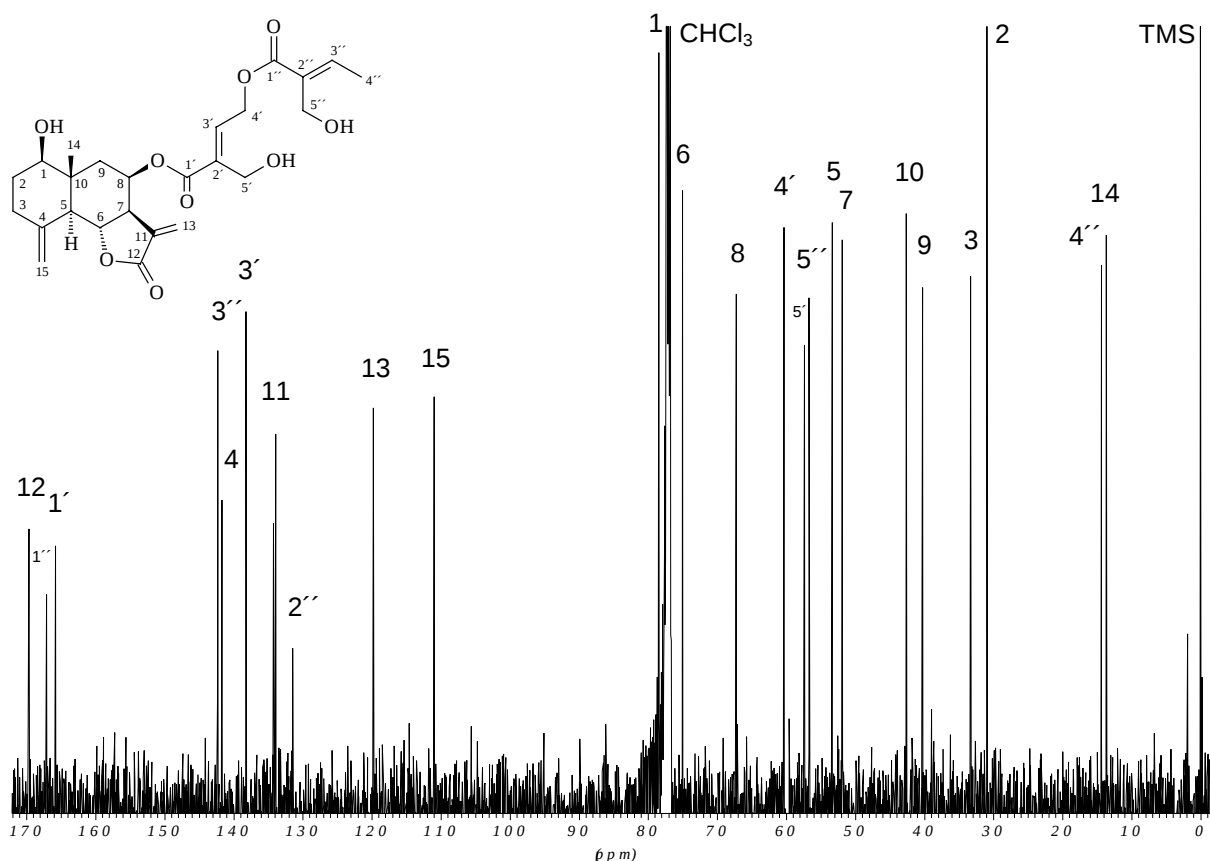
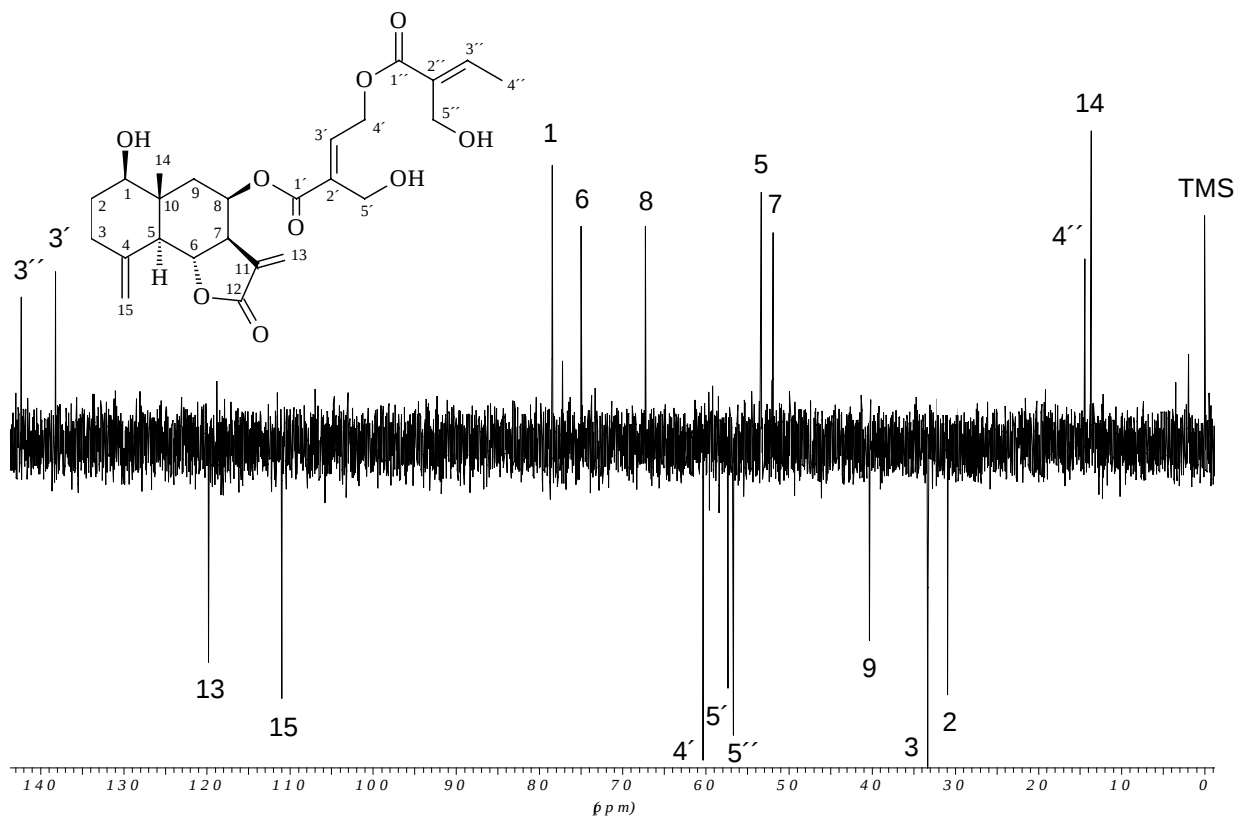
Bild 2.34: ^{13}C NMR-Spektrum von **SL6** (125 MHz, CDCl_3 , TMS)Bild 2.35: DEPT-Spektrum von Verbindung **SL6** (125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Tabelle 2.6: NMR-Daten von Verbindung **SL6** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL6	C	SL6	DEPT
1	3.53 <i>dd</i> (4.5, 11.4)	1	78.47	CH
2eq	1.86 <i>m</i>	2	30.88	CH ₂
ax	1.60 <i>m</i>	3	33.30	CH ₂
3eq	2.37 <i>m</i>	4	141.66	C
ax	2.14 <i>m</i>	5	53.35	CH
5	2.28 <i>d</i> (10.7)	6	74.99	CH
6	4.54 <i>t</i> (10.7)	7	51.90	CH
7	2.88 <i>ddd</i> (3.2, 5.7, 10.7)	8	67.23	CH
8	5.84 <i>dd</i> (2.5, 3.8)	9	40.29	CH ₂
9eq	2.43 <i>dd</i> (2.5, 15.1)	10	42.62	C
ax	1.65 <i>dd</i> (3.8, 15.1)	11	134.22	C
13	6.10 <i>d</i> (3.2)	12	169.61	C
	5.48 <i>d</i> (3.2)	13	119.77	CH ₂
14	0.97 <i>s</i>	14	13.67	CH ₃
15	5.04 <i>s</i>	15	111.01	CH ₂
	4.97 <i>s</i>	1'	165.77	C
3'	6.80 <i>t</i> (6.3)	2'	127.30	C
4'	4.95 <i>d</i> (6.3)	3'	138.22	CH
5'	4.41 <i>s</i>	4'	60.32	CH ₂
3''	7.05 <i>q</i> (6.9)	5'	57.35	CH ₂
4''	1.94 <i>d</i> (6.9)	1''	167.25	C
5''	4.37 <i>s</i>	2''	131.59	C
		3''	142.31	CH
		4''	14.39	CH ₃
		5''	56.69	CH ₂

SL6 zeigt bei der DC in verschiedenen Fließmittel-Systemen gleich Laufhöhe wie **SL5**. Der Farbton der Reaktionsprodukte ist nach Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure jedoch etwas rötlicher als bei **SL5**. Da **SL6** bei der GC auch dieselbe Retentionszeit wie **SL5** besitzt und die korrespondierenden Massenspektren praktisch identisch sind, liegt die Vermutung nahe, dass **SL6** auch ein Derivat des 8 β -Hydroxyreynosins darstellt, das ebenso wie **SL1** bis **SL5** im Injektor gespalten wird. Das DCI-Spektrum von **SL6** zeigt, dass die Substanz mit einer Masse von 458 amu genauso schwer ist wie **SL5**. Die beiden SL sollten daher Isomere sein, die sich vermutlich nur in der Säureseitenkette unterscheiden.

Die Annahme, dass sich auch **SL6** vom 8 β -Hydroxyreynosin ableitet, wird durch die Protonen- und Kohlenstoff-Shifts bestätigt (vergl. Tabelle 2.5, S. 38 mit Tabelle 2.6, S. 48). Da sich auch hier die Lagen der Signale für H-1 und H-8 bzw. C-1 und C-8 sowie deren Nachbaratome nicht verändert haben, muß auch bei **SL6** die Estergruppe an C-8 lokalisiert sein. Eine Betrachtung der ¹³C NMR-Daten zeigt, dass sich auch die Shifts der zweiten Säure (C-1'' - C-5'') bei **SL5** und **SL6** nicht nennenswert unterscheiden. Die Shiftdifferenzen bei den Protonen (H-3'' - H-5'') sind ebenfalls nur gering. Es muß sich demnach auch hier um 5-Hydroxytiglinsäure handeln. Die an das SL gebundene Säure zeigt jedoch eine Hochfeld-Verschiebung der Signale für C-3' (138.22 ppm gegenüber 147.62 ppm bei **SL5**), C-5' (57.35 ppm gegenüber 58.12 ppm bei **SL5**), H-3' (6.80 ppm gegenüber 7.06 ppm bei **SL5**)

und H-5' (4.41 ppm gegenüber 4.96 ppm bei **SL5**) sowie eine Tieffeld-Verschiebung der Signale für C-4' (60.32 ppm gegenüber 59.28 ppm bei **SL5**) und H-4' (4.95 ppm gegenüber 4.48 ppm bei **SL5**). Im Protonenspektrum von **SL6** haben somit die Signale von H-3' und H-3'' bzw. H-4' und H-5' im Vergleich zu **SL5** ihre Positionen getauscht (vergl. Bild 2.33, S. 46 mit Bild 2.27, S. 39). Dies bedeutet, dass diese Säure im Gegensatz zu Verbindung **SL5** entweder eine Doppelbindung in der (Z)-Konfiguration besitzt oder an C-4' verestert ist. Von den beiden Möglichkeiten kommt allerdings angesichts der Shiftwerte nur die Veresterung der C-4'-OH-Gruppe in Betracht. Wäre die erste Säure von **SL6** ein Angelikasäure-Derivat, müsste der Shift des Signals für C-3' die 140 ppm-Marke überschreiten und der des Signals für C-5' bei etwa 65 ppm liegen, also fast 8 ppm über dem gemessenen Wert [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995]. Es handelt somit bei **SL6** um 8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin. Eine Literaturrecherche ergab, dass es sich bei **SL6** genau wie bei **SL5** um einen bisher nicht beschriebenen neuen Ester des 8 β -Hydroxyreynosins handelt.

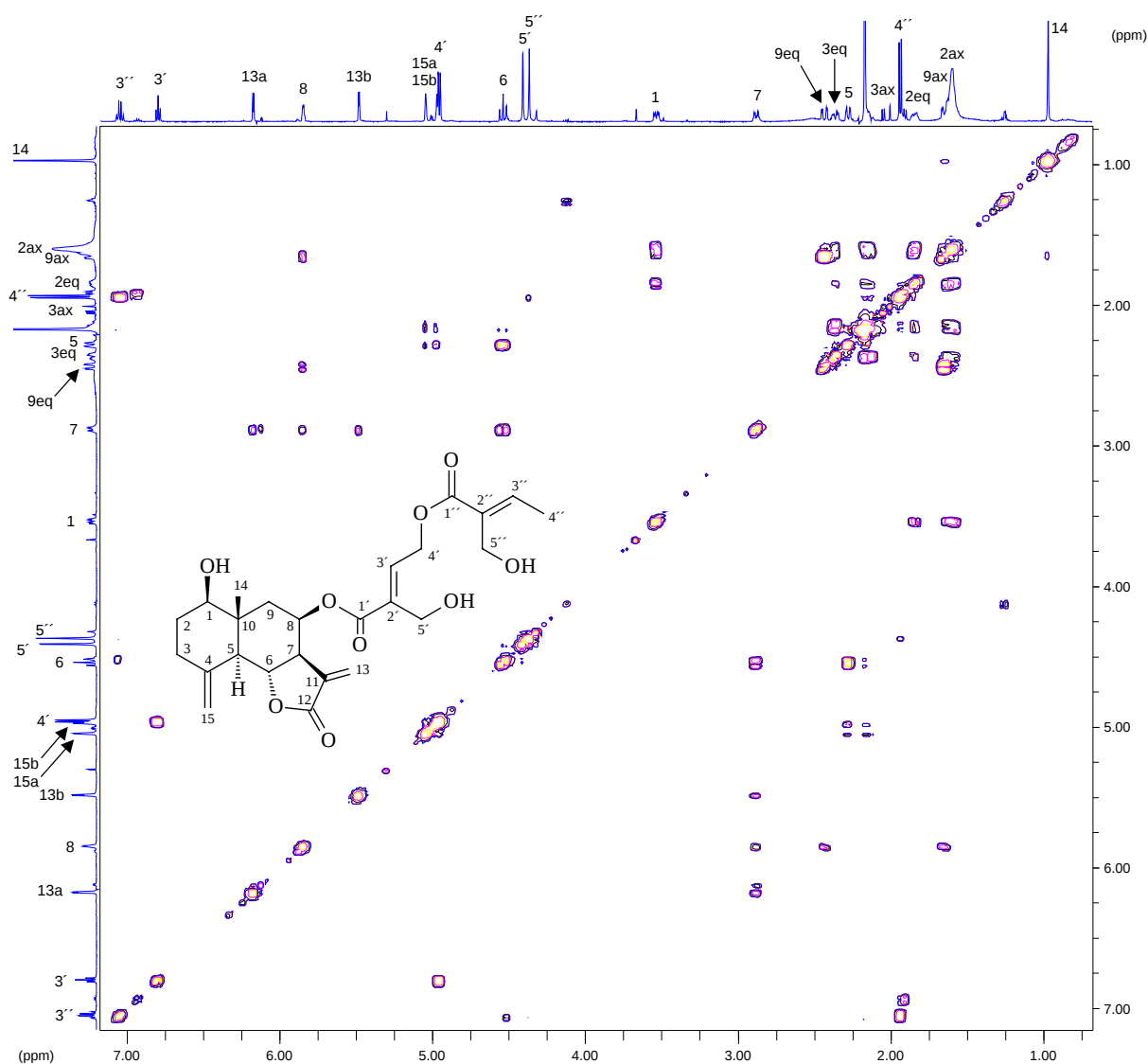


Bild 2.36: COSY-Spektrum von **SL6** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

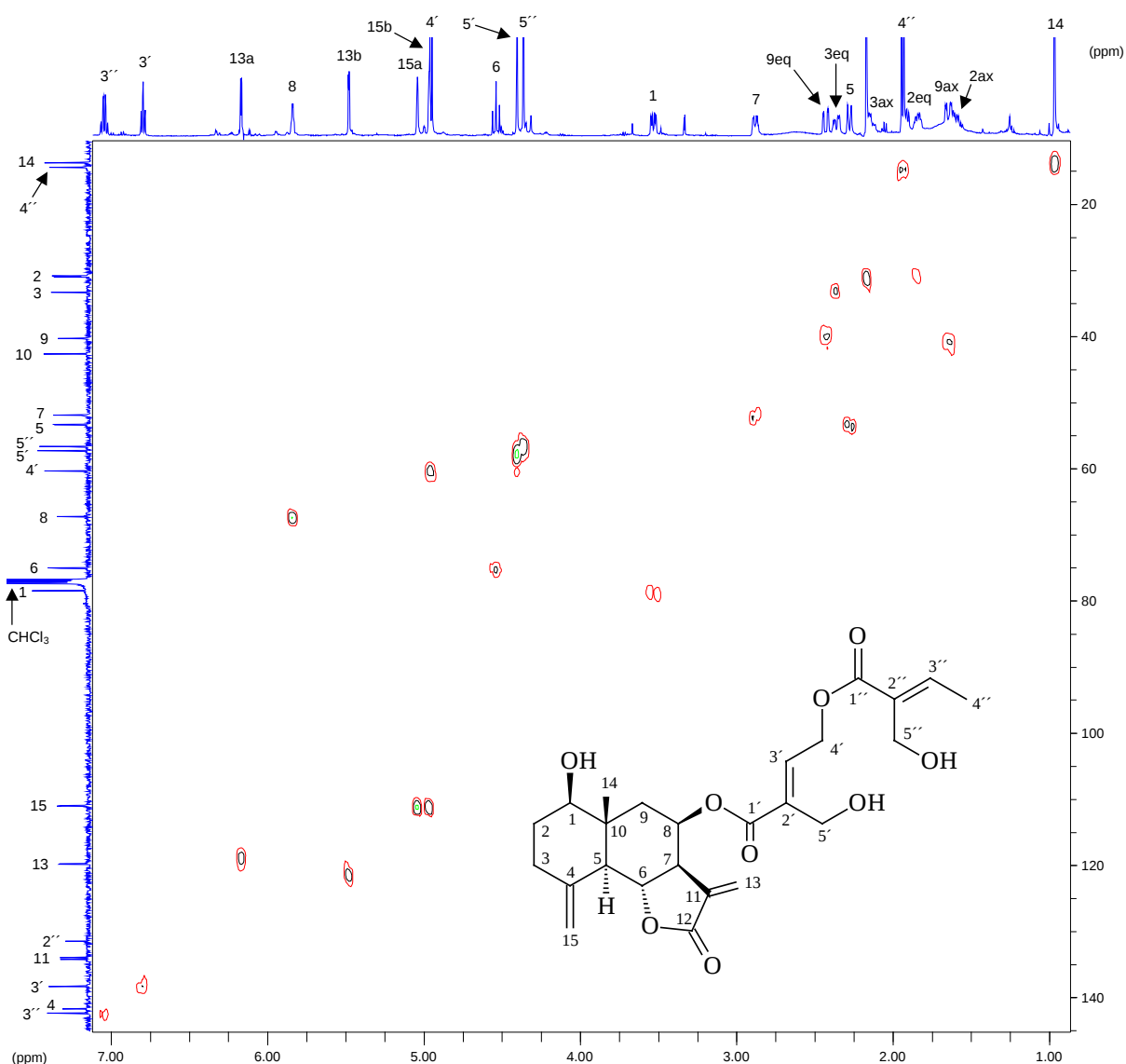


Bild 2.37: HMQC-Spektrum von Substanz **SL6** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Da sich **SL6** nur durch die Stellung der zweiten Säure von **SL5** unterscheidet, ergab sich die Frage, ob die Substanz ein Artefakt von **SL5** darstellt oder ob beide Substanzen genuin im Pflanzenmaterial vorliegen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden mehrere Monate nach der Aufnahme der NMR-Spektren, die zur Identifizierung von **SL5** und **SL6** geführt hatten, erneut jeweils ein ^1H - und ein ^{13}C NMR-Spektrum aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass beide Substanzen unverändert vorlagen und die Spektren nach wie vor die Signale von jeweils nur einer reinen Substanz zeigten. Damit ist bewiesen, dass **SL5** und **SL6** nicht durch einfache Umlagerung auseinander hervorgehen. Es erscheint somit sehr wahrscheinlich, dass beide Stellungsisomere genuin in der Pflanze vorkommen.

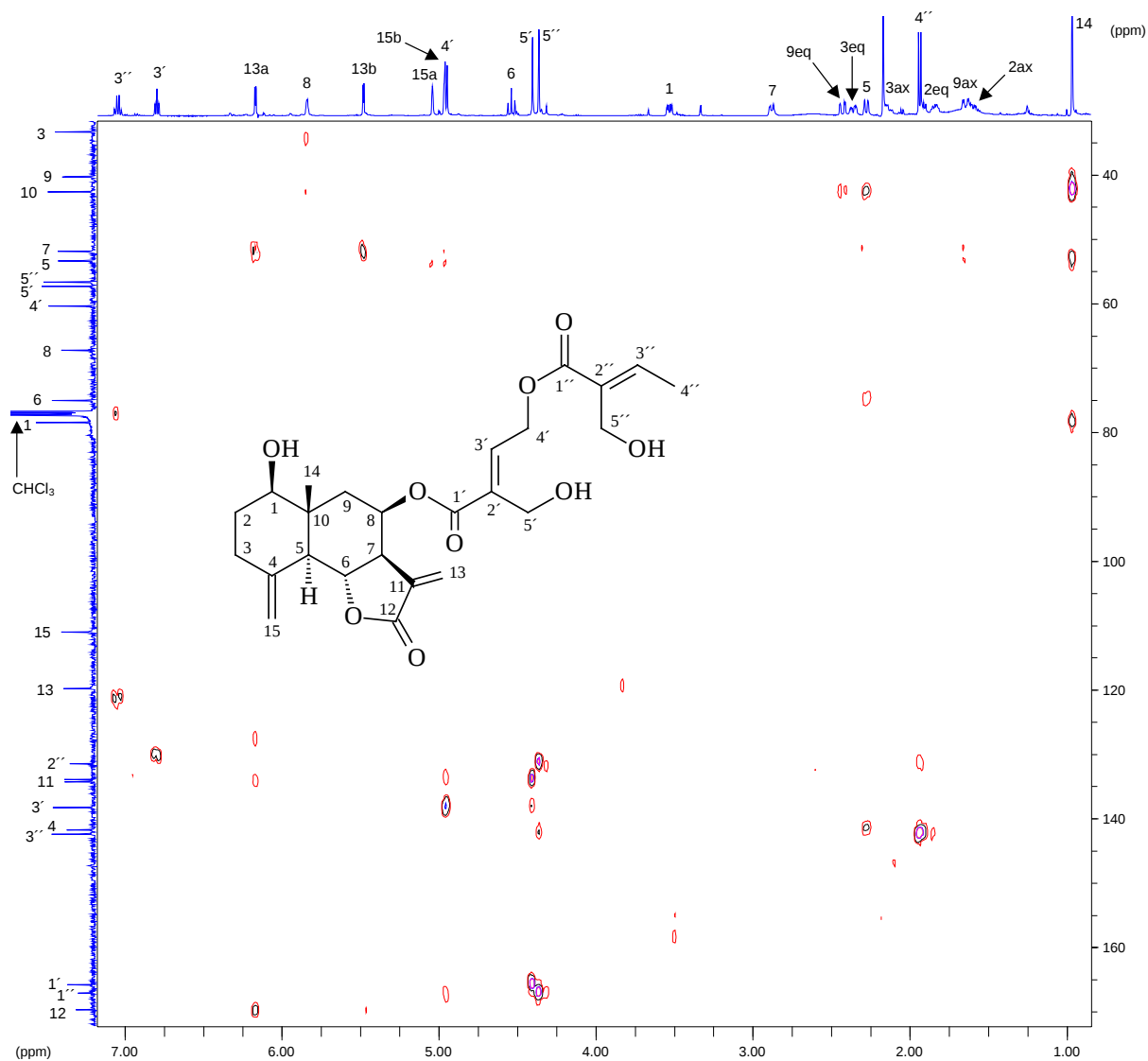
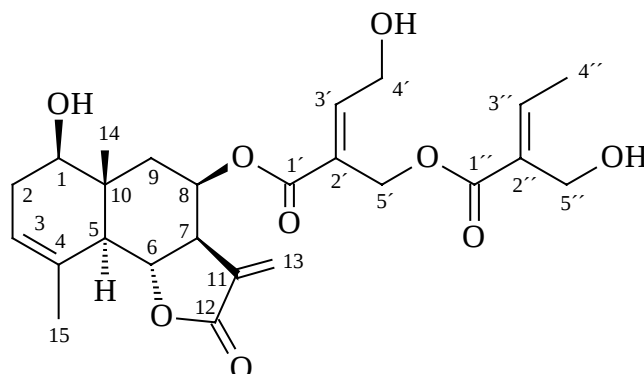


Bild 2.38: HMBC-Spektrum von Verbindung **SL6** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS)

**2.1.8 8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin =
1 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-3,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL7)**



Die Verbindung **SL7** konnte aus Fraktion D-II in einer Ausbeute von 4 mg rein gewonnen werden (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Die Substanz war transparent und besaß gummiartige Konsistenz.

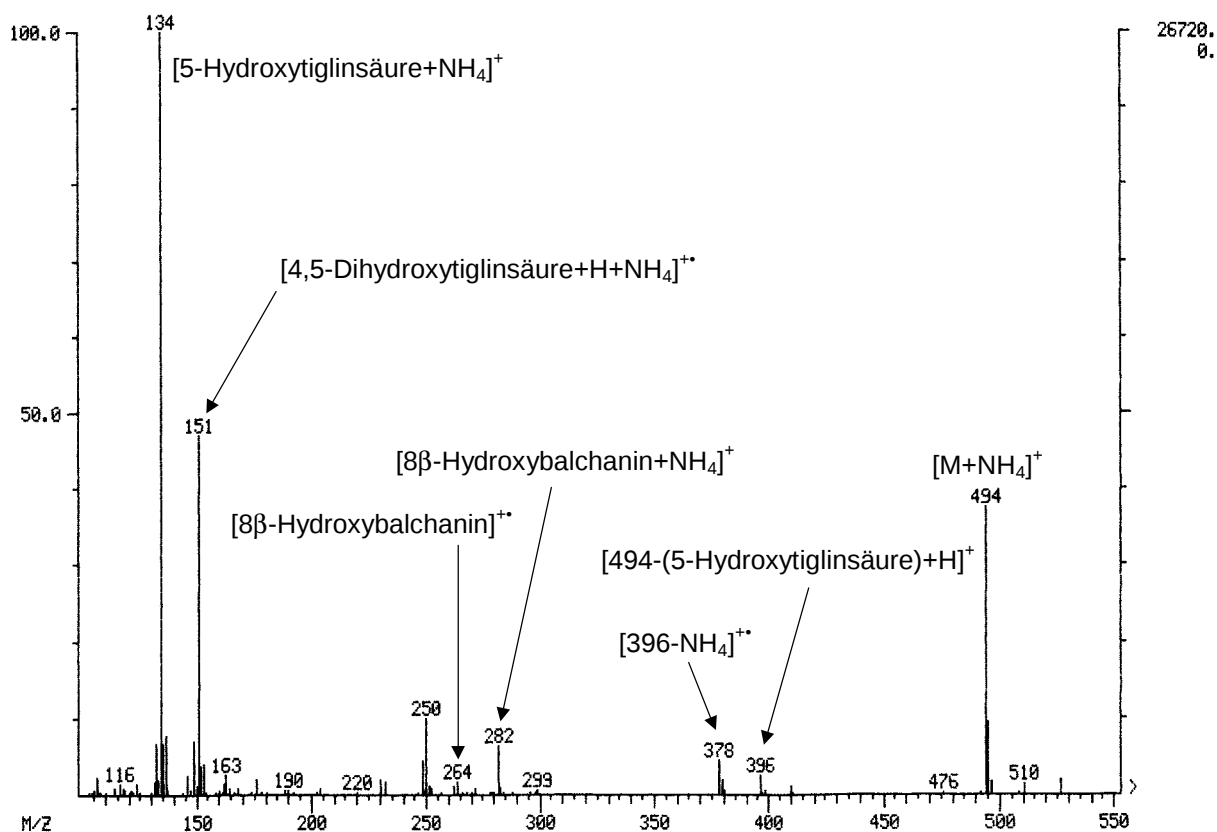


Bild 2.39: DCI-MS-Spektrum von Verbindung **SL7**

SL7 stimmt hinsichtlich der R_f -Werte bei der DC in verschiedenen Fließmittel-Systemen sowie der Färbung nach der Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure mit **SL5** überein.

Die im IR-Spektrum von **SL7** aufgezeichneten Schwingungsbanden sprechen für die von den Substanzen **SL1** bis **SL6** bekannten funktionellen Gruppen. Neben der breiten Bande für

die OH-Valenz (3411 cm^{-1}) sind das die Banden für die CH-Valenz (2944 cm^{-1}), das γ -Lacton (1765 cm^{-1}), den konjugierten Ester (1709 cm^{-1}) sowie die Doppelbindung (1650 cm^{-1}).

Das DCI-MS-Spektrum von **SL7** zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem von **SL5** (vergl. Bild 2.26, S. 37 mit Bild 2.39, S. 52). Alle im Spektrum von **SL5** auftretenden Ionen finden sich auch im Spektrum von **SL7**: Dies sind neben dem Pseudomolekülion bei m/z 494 die durch Abspaltung der Säurereste entstehenden Fragmente bei m/z 396, 378, 282 und 264 sowie die mit den Säuren korrelierenden Fragmente bei m/z 151, 134 und 117. Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, dass geringe Unterschiede im Hinblick auf die relativen Intensitäten der Fragmente bestehen. Berücksichtigt man vor diesem Hintergrund die Tatsache, dass die EI-MS-Spektren von **SL5** und **SL3** identisch sind, so liegt die Vermutung nahe, dass **SL7** mit dem 8β -Hydroxybalchanin dasselbe Grundgerüst wie **SL3** besitzt und im Hinblick auf die Esterseitenkette der Substanz **SL5** ähnlich ist.

Tabelle 2.7: NMR-Daten von Verbindung **SL7** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL7	C	SL7	DEPT
1	3.68 <i>dd</i> (6.9, 9.5)	1	75.67	CH
2eq	2.42 <i>m</i>	2	32.93	CH ₂
ax	1.96 <i>m</i>	3	121.54	CH
3	5.37 <i>bs</i>	4	133.07	C
5	2.45 <i>d</i> (11.4)	5	51.34	CH
6	4.45 <i>t</i> (11.4)	6	77.17	CH
7	2.82 <i>ddd</i> (3.2, 5.7, 11.4)	7	53.49	CH
8	5.88 <i>dd</i> (2.5, 3.8)	8	67.02	CH
9eq	2.38 <i>dd</i> (2.5, 15.1)	9	39.30	CH ₂
ax	1.60 <i>dd</i> (3.8, 15.1)	10	40.63	C
13	6.11 <i>d</i> (3.2)	11	133.92	C
	5.46 <i>d</i> (3.2)	12	169.72	C
14	1.05 <i>s</i>	13	119.54	CH ₂
15	1.89 <i>bs</i>	14	12.94	CH ₃
3'	7.05 <i>t</i> (5.7)	15	23.27	CH ₃
4'	4.50 <i>d</i> (5.7)	1'	165.38	C
5'	5.00 <i>d</i> (12.0)	2'	127.19	C
3''	6.93 <i>q</i> (6.9)	3'	147.11	CH
4''	1.91 <i>d</i> (6.9)	4'	59.52	CH ₂
5''	4.32 <i>s</i>	5'	58.37	CH ₂
		1''	167.24	C
		2''	131.58	C
		3''	142.19	CH
		4''	14.30	CH ₃
		5''	56.65	CH ₂

Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden verschiedene NMR-Spektren aufgenommen. Das ^1H NMR-Spektrum (siehe Bild 2.40, S. 54) zeigt zwanzig Signale für neunundzwanzig Protonen eines Eudesmanolids mit freier OH-Gruppe an Position 1 und einer Ester-Kette an Position 8. Vierzehn dieser Signale zeigen im Hinblick auf ihre δ -Werte und Kopplungskonstanten eine hohe Übereinstimmung mit den Signalen für den SL-Grundkörper

von **SL3** (8 β -Hydroxybalchanin). Die Shifts und Multiplizitäten der Signale für H-2 (2 H, 2.42 und 1.96 ppm), H-3 (1 H, 5.37 ppm), H-5 (1 H, 2.45 ppm) und H-15 (3 H, 1.89 ppm) von **SL7** belegen im Vergleich mit den Daten der entsprechenden Signale von **SL3** den Verlauf der Doppelbindung des A-Ringes von Position 2 nach Position 3. Leichte Abweichungen zwischen den Shifts der Signale für H-7, H-8, H-9 und H-13 der beiden Verbindungen deuten auf den Einfluß unterschiedlicher Esterseitenketten hin. Die sechs im Protonenspektrum von **SL7** noch nicht zugeordneten Signale für elf Protonen sind der Seitenkette zuzuordnen. Die Shiftwerte und Kopplungskonstanten dieser Signale stimmen mit denen der Esterseitenkette von Verbindung **SL5** überein. Daraus folgt, dass auch **SL7** an Position 8 einen 4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy-Rest besitzt.

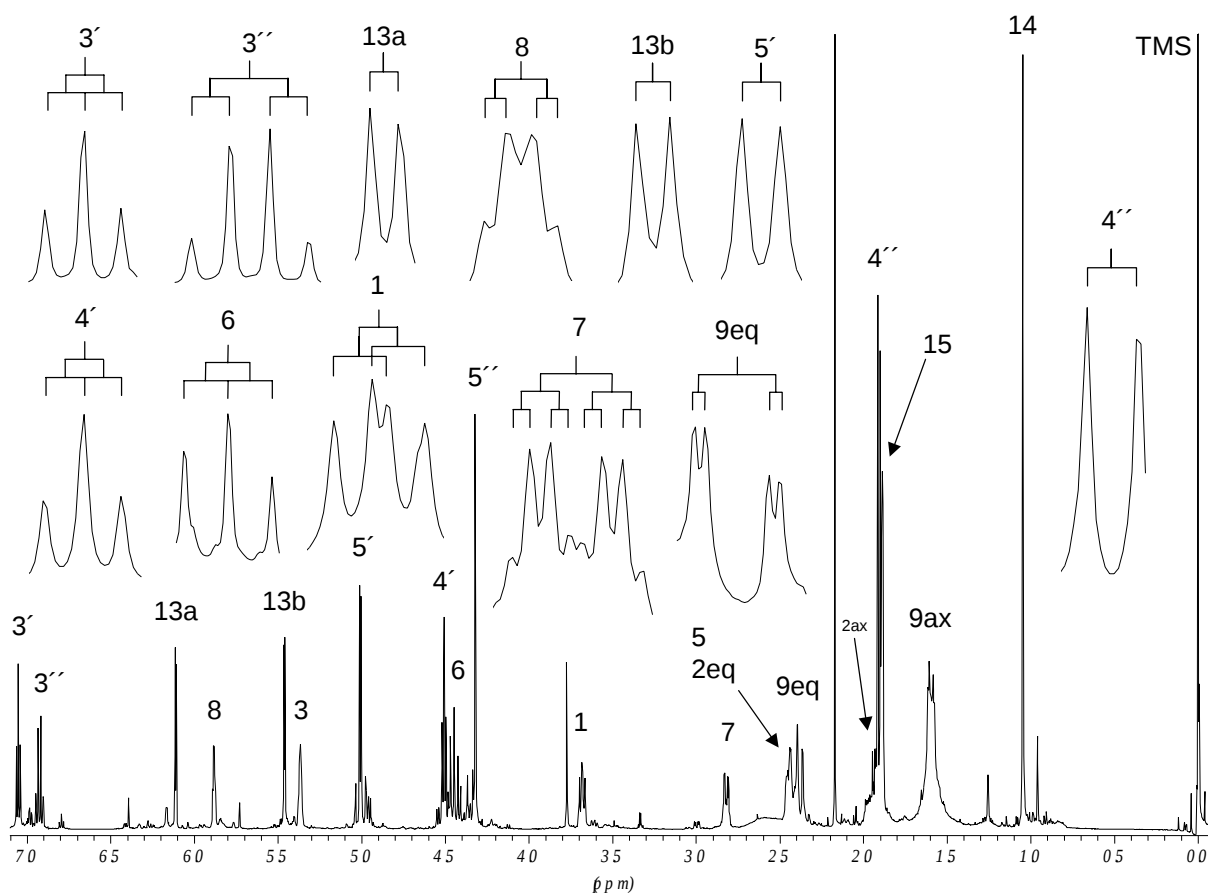
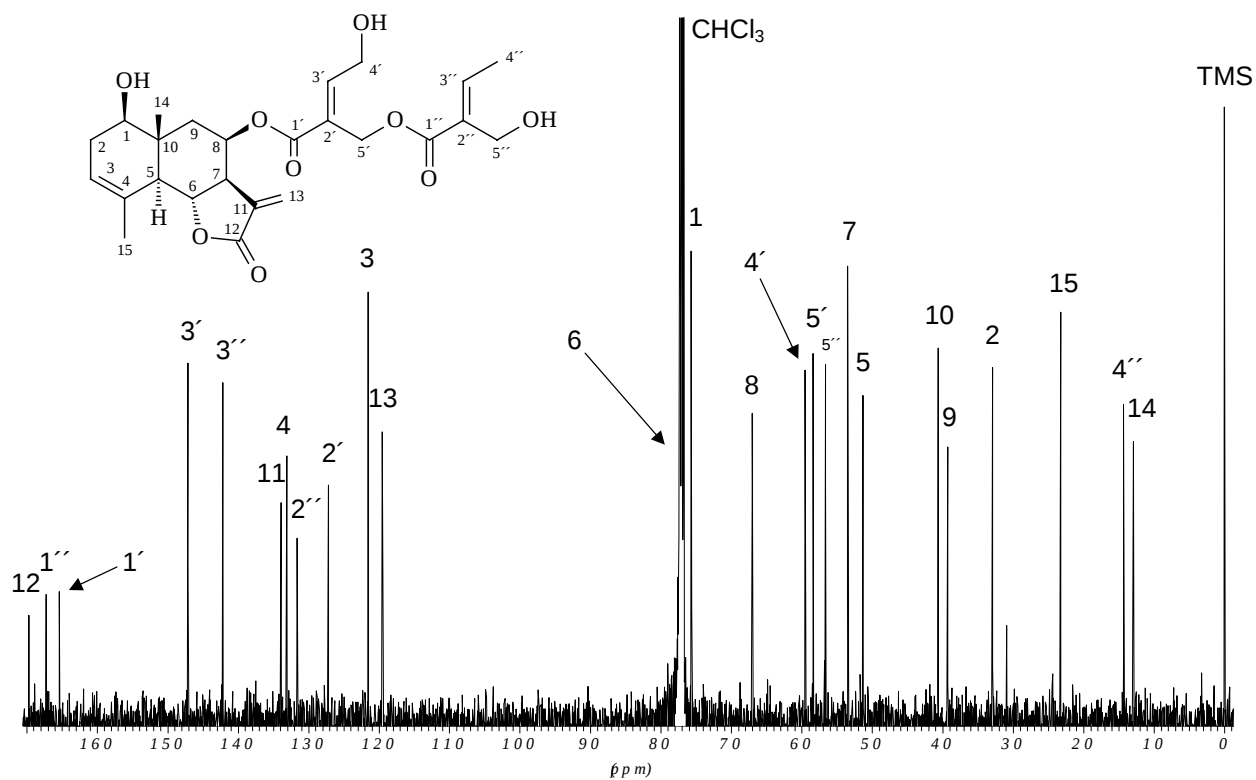
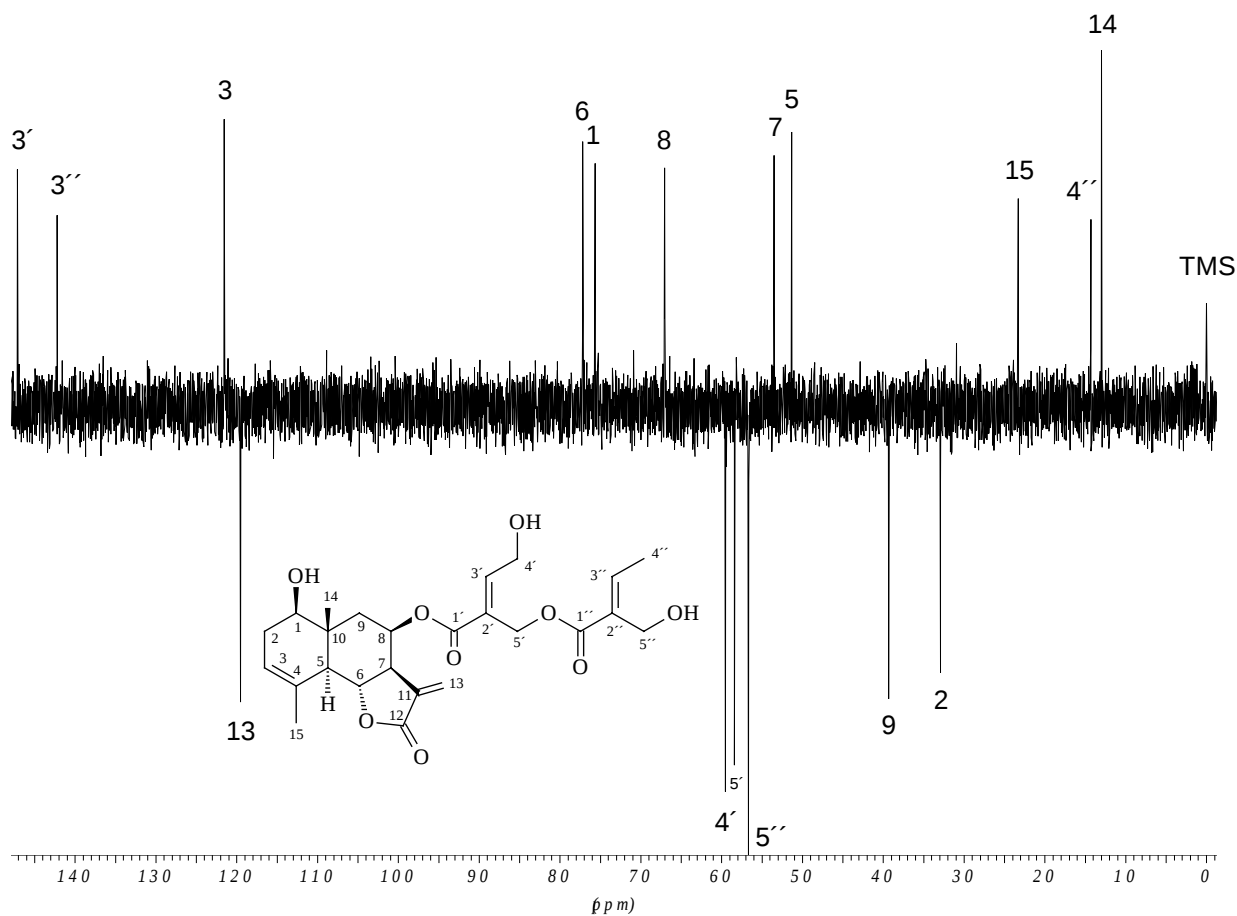
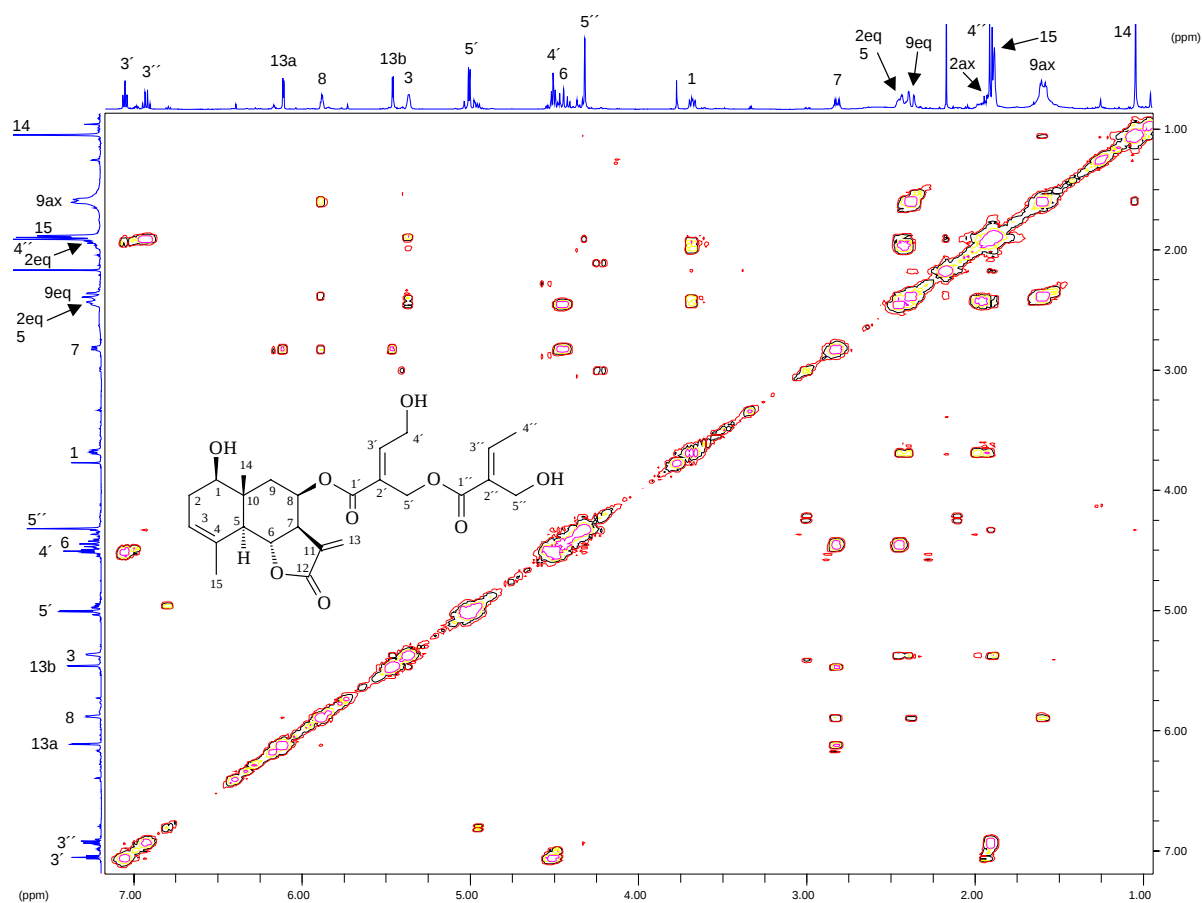
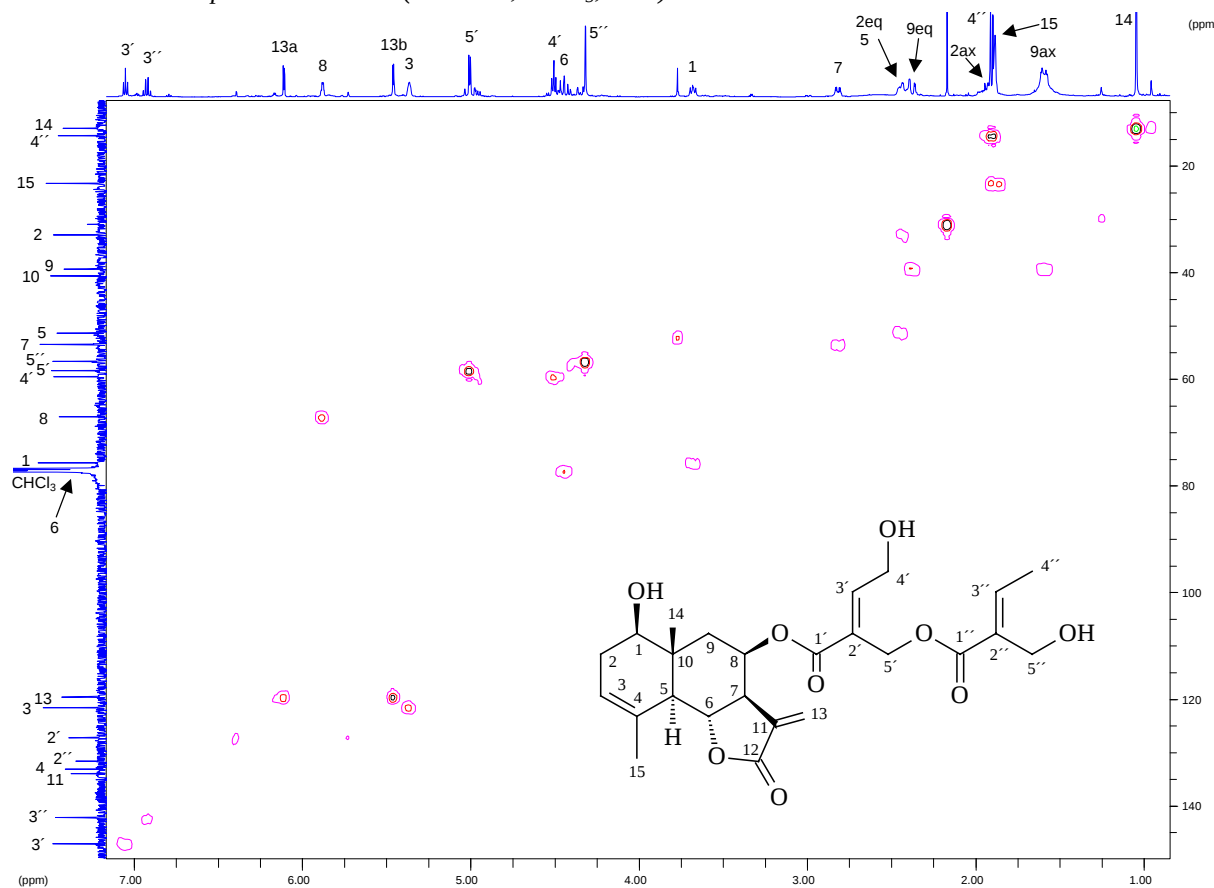


Bild 2.40: ^1H NMR-Spektrum von **SL7** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

Die Befunde aus den ^1H NMR-Daten werden durch das ^{13}C NMR-Spektrum (siehe Bild 2.41, S. 55) bestätigt. Es enthält die Signale von fünfundzwanzig Kohlenstoffatomen. Wie sich aus dem Vergleich mit dem DEPT- (siehe Bild 2.42, S. 55) und dem HMQC-Spektrum (siehe Bild 2.44, S. 56) ergibt, verteilen sie sich auf drei Methyl-, sechs Methylen-, acht Methin- und acht quartäre Kohlenstoffe. Die δ -Werte von fünfzehn Signalen bewegen sich im Bereich der Shifts für die Kohlenstoffe des an Position 8 veresterten 8 β -Hydroxybalchanins, des SL-Grundkörpers von Verbindung **SL3** (vergl. Tabelle 2.3, S. 31 mit Tabelle 2.7, S. 53). Relevante Abweichungen betreffen lediglich die Signale für C-11 (133.92 ppm bei **SL7** gegenüber 138.53 ppm bei **SL3**) und C-13 (119.54 ppm bei **SL7** gegenüber 117.75 ppm bei **SL3**).

Bild 2.41: ¹³C NMR-Spektrum von **SL7** (125 MHz, CDCl₃, TMS)Bild 2.42: DEPT-Spektrum von Verbindung **SL7** (125 MHz, CDCl₃, TMS)

Bild 2.43: COSY-Spektrum von **SL7** (500 MHz, CDCl₃, TMS)Bild 2.44: HMQC-Spektrum von Substanz **SL7** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS)

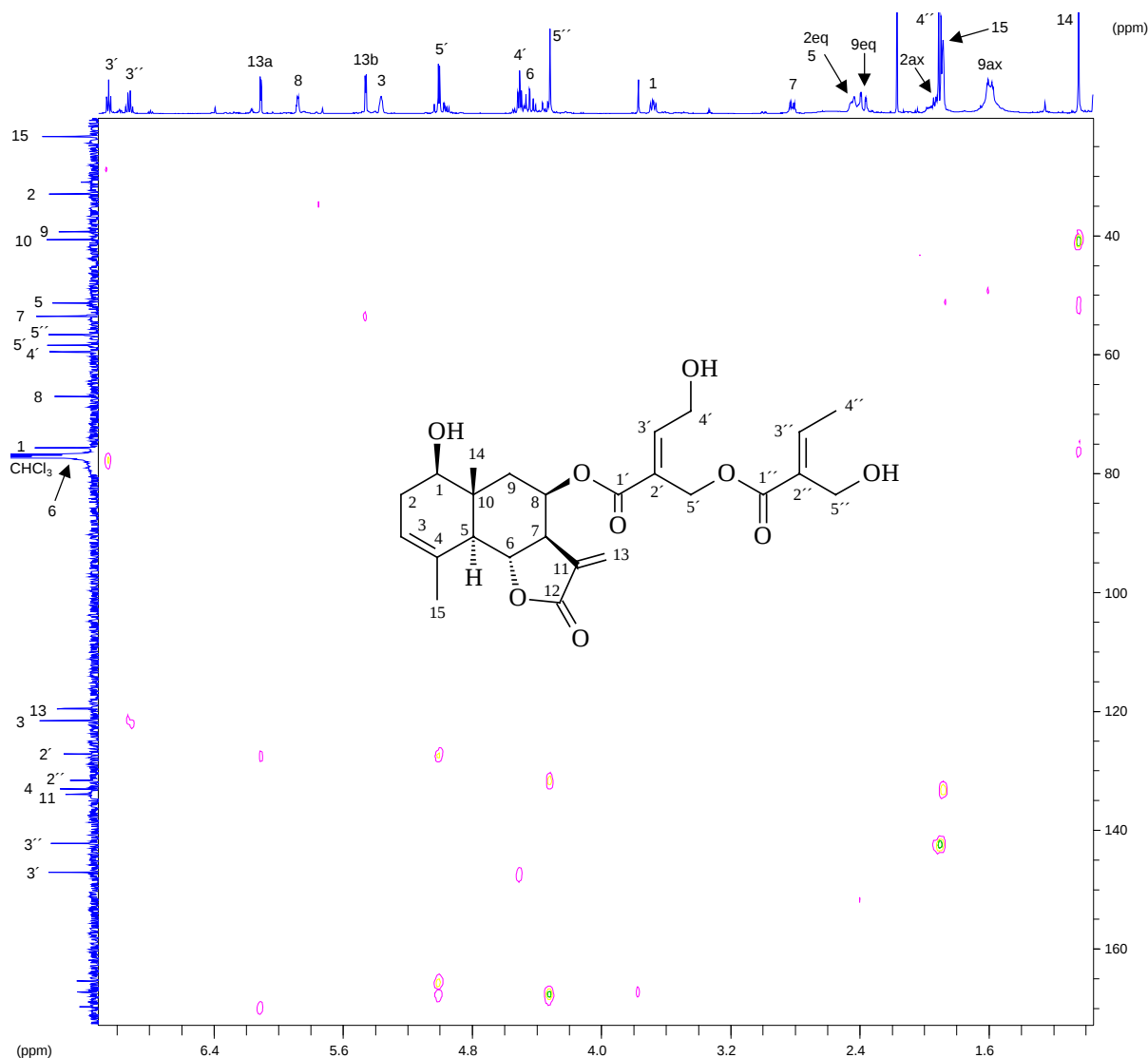
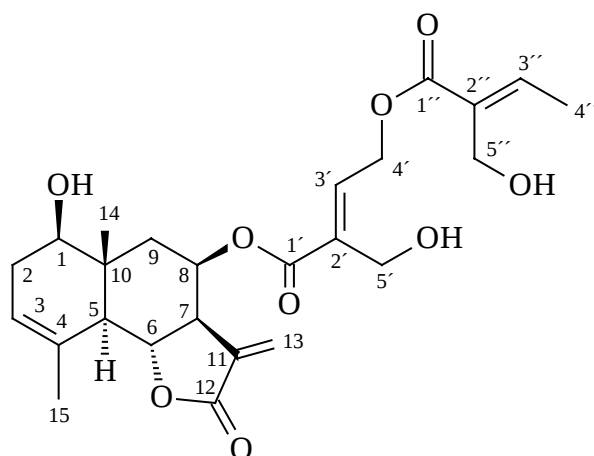


Bild 2.45: HMBC-Spektrum von Verbindung **SL7** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Da diese Atome der Säurekette direkt benachbart sind, deutet dies, wie schon bei den oben diskutierten verlagerten Shifts für die Protonen H-7, H-8, H-9 und H-13, auf den Effekt einer bei **SL7** gegenüber **SL3** abweichenden Seitenkette hin. Auch der Vergleich der Shifts der restlichen zehn Signale von **SL7**, die zur Seitenkette gehören müssen, mit den entsprechenden Signalen von **SL5** zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung. Dies bekräftigt den schon aus den Shifts der korrespondierenden Protonensignale gezogenen Schluß, dass **SL7** mit dem 4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy-Rest dieselbe Seitenkette besitzt wie **SL5**.

Somit muß es sich bei **SL7** um 8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin handeln. Dieses Resultat steht auch im Einklang mit den Signal-Interaktionen im HMBC-Spektrum der Verbindung (siehe Bild 2.45, S. 57). **SL7** stellt damit einen weiteren, bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannten Ester des 8 β -Hydroxybalchanins dar.

**2.1.9 8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin =
1 β -Hydroxy-8 β -[5-hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-3,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL8)**



Die gummiartige und farblose Substanz **SL8** fiel bei der Aufarbeitung von Fraktion D-II in einer Ausbeute von 1 mg an (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Die Verbindung ergab nach der Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz ein Reaktionsprodukt von grau-violetter Farbe.

Tabelle 2.8: NMR-Daten von Verbindung **SL8** (500 MHz, CDCl₃, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL8
1	3.69 <i>m</i>
2eq	2.41 <i>m</i>
ax	1.98 <i>m</i>
3	5.37 <i>bs</i>
5	2.47 <i>d</i> (11.4)
6	4.46 <i>t</i> (11.4)
7	2.83 <i>ddd</i> (3.2, 5.7, 11.4)
8	5.89 <i>dd</i> (2.5, 3.8)
9eq	2.41 <i>dd</i> (2.5, 15.1)
ax	1.61 <i>dd</i> (3.8, 15.1)
13	6.17 <i>d</i> (3.2) 5.46 <i>d</i> (3.2)
14	1.05 <i>s</i>
15	1.90 <i>bs</i>
3'	6.79 <i>t</i> (6.3)
4'	4.95 <i>d</i> (6.3)
5'	4.37 <i>s</i>
3''	7.05 <i>t</i> (6.9)
4''	1.94 <i>d</i> (6.9)
5''	4.36 <i>s</i>

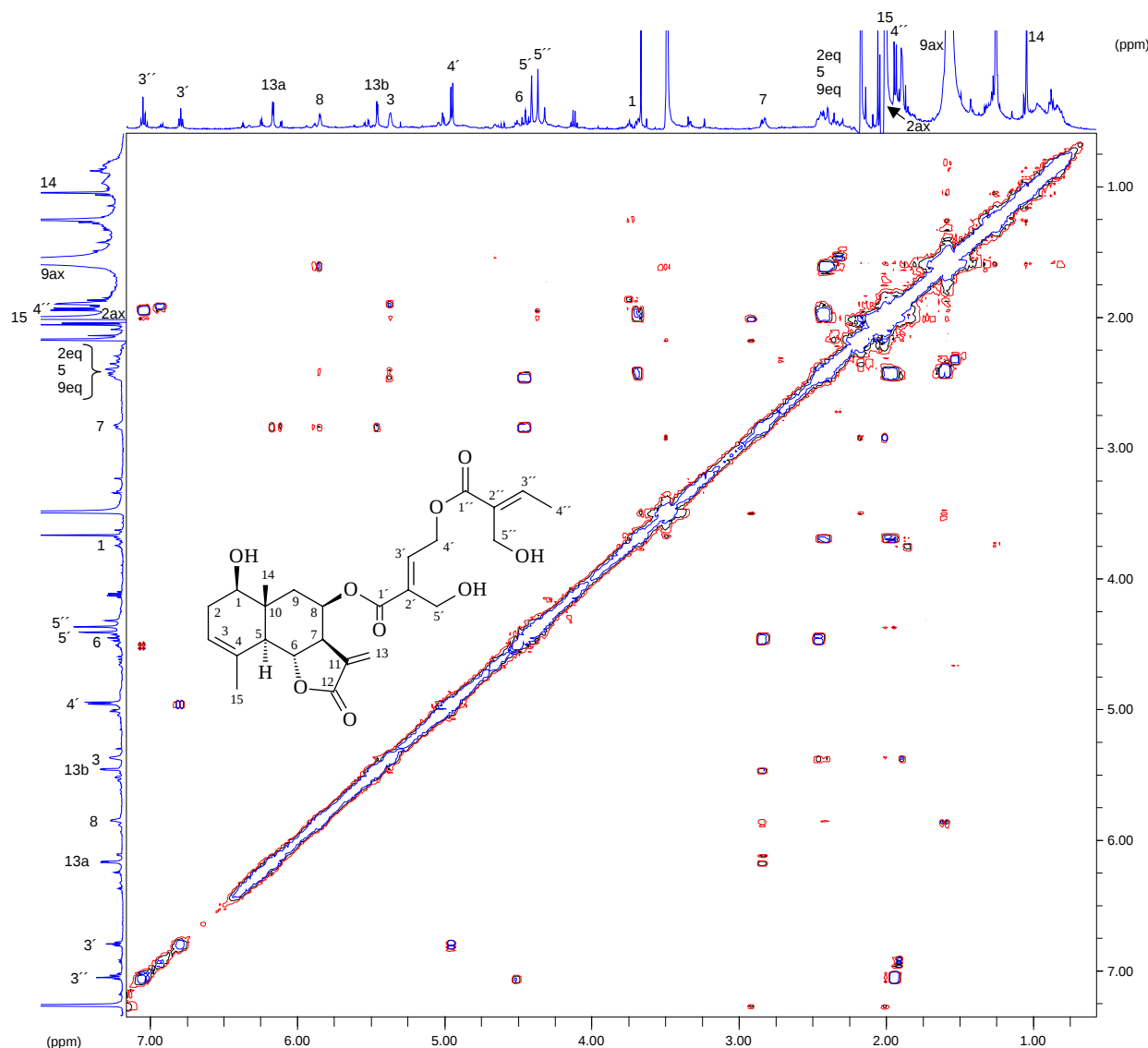


Bild 2.46: COSY-Spektrum von **SL8** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

Im IR-Spektrum von **SL8** finden sich die von den anderen bisher diskutierten Eudesmanoliden bekannten Valenzbanden bei 3460 cm^{-1} (Hydroxyl-Valenz), 2939 cm^{-1} (CH-Valenz), 1763 cm^{-1} (Carbonyl-Valenz eines γ -Lactons), 1711 cm^{-1} (Carbonyl-Valenz eines α,β -ungesättigten Esters) und 1647 cm^{-1} (Doppelbindungs-Valenz).

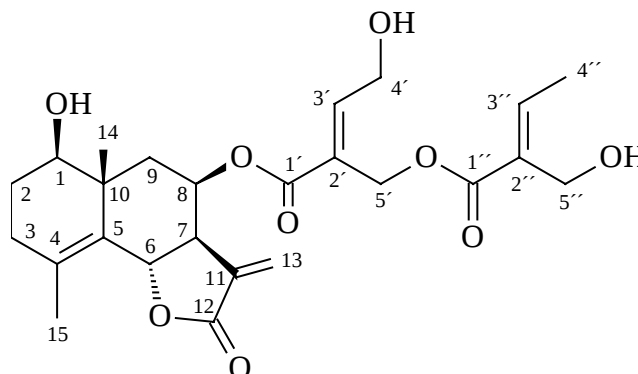
Das EI-MS-Spektrum von **SL8** ist mit dem von **SL3** und **SL7** identisch. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass **SL8** mit dem 8β -Hydroxybalchanin dasselbe Grundgerüst wie **SL3** und **SL7** besitzt. Da das DCI-MS-Spektrum dieselbe Fragmentierung zeigt wie die entsprechenden Spektren der Substanzen **SL5**- **SL7**, sollte es sich auch der SL-Grundkörper von **SL8** mit zwei ungesättigten und hydroxylierten C_5 -Säuren verestert sein. Da im GC-EI-MS-Spektrum nur die Fragmentierung des SL-Grundgerüsts widergegeben wird, wird wohl auch **SL8** während der Injektion thermisch in seine Komponenten (SL-Alkohol und Säurerest) zerlegt.

Das ^1H NMR-Spektrum von **SL8** zeigt wie das entsprechende Spektrum von **SL7** zwanzig Signale für neunundzwanzig Protonen. Vierzehn dieser Signale stimmen hinsichtlich der Shiftwerte und Kopplungskonstanten mit den vierzehn Signalen der SL-Komponente von **SL7**

(8 β -Hydroxybalchanin) überein (vergl. Tabelle 2.7, S. 53 mit Tabelle 2.8, S. 58). Die übrigen sechs Signale sind dagegen von ihren Shifts und Kopplungskonstanten mit den Signalen der Säurekette von **SL6** identisch (vergl. Tabelle 2.6, S. 48 mit Tabelle 2.8, S. 58).

Hieraus läßt sich ableiten, im Falle von **SL8** das SL-Grundgerüst von **SL7** mit der von **SL6** bekannten Säureseitenkette verbunden ist. Es muß daher bei **SL8** um 8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin handeln. Auch **SL8** wurde vor den eigenen, an Drogenmaterial von *E. semialatum* angestellten Untersuchungen, nicht in der Literatur beschrieben. Die Substanz stellt damit einen weiteren neuen Ester des 8 β -Hydroxybalchanins dar.

**2.1.10 8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid =
1 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL9)**



Die von der gummiartigen und farblosen Substanz **SL9** erhaltene Substanzmenge betrug 2 mg. Sie konnte durch SC und semipräparative HPLC aus Fraktion D-II gewonnen werden (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Auf der DC-Folie färbte sie sich nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen blauviolett.

Das IR-Spektrum von **SL9** zeigt Absorptionsbanden für die von den Substanzen **SL1** – **SL8** bekannten funktionellen Gruppen. Man findet Banden für die OH- (3502 cm^{-1}), die CH- (2927 cm^{-1}), die C=O (1766 und 1718 cm^{-1}) und die C=C-Valenzschwingung (1637 cm^{-1}). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei **SL9** um ein den Verbindungen **SL1** – **SL8** strukturell nahe stehendes SL handelt.

Dieser Eindruck wird durch das DCI-MS-Spektrum bestätigt (siehe Bild 2.47, S. 62). Es zeigt die von den Substanzen **SL5** – **SL8** bekannten Peaks: Den Molpeak bei m/z 494, die aus der Abspaltung der Carbonsäuren der Seitenkette entstehenden Fragmente bei m/z 396, 378 und 282 sowie die Clusterionen der 4,5-Dihydroxy- und der 5-Hydroxytiglinsäure bei m/z 151 und 134. Somit besteht für **SL9** hinsichtlich des Molgewichts und der Seitenkette eine besonders nahe Verwandtschaft mit **SL5** – **SL8**.

Das EI-MS-Spektrum von **SL9** dagegen zeigt ein von den bisher in dieser Arbeit behandelten SL abweichendes Fragmentierungsmuster des Grundkörpers (siehe Bild 2.48, S. 62). So wird z.B. der SL-Alkohol nicht detektiert, vielmehr stellt das durch Elimination von einem Molekül Wasser aus diesem Molekül hervorgehende Radikalkation bei m/z 246 das massereichste detektierte Teilchen dar. Hinzu kommt, dass im EI-MS-Spektrum von **SL9** im Gegensatz zu den analogen Spektren von **SL1** – **SL8** die Ionen mit den Massen 153 amu und 135 amu eine viel höhere relative Intensität besitzen. Ein weiterer auffälliger Unterschied ist die bei **SL9** jeweils höhere Intensität des massereicheren Teilchens bei den Paaren mit 107/105 amu, 93/91 amu und 43/41 amu. Damit sollte sich zumindest der Sesquiterpenlactonalkohol von **SL9** von denen der Verbindungen **SL1** bis **SL8** unterscheiden.

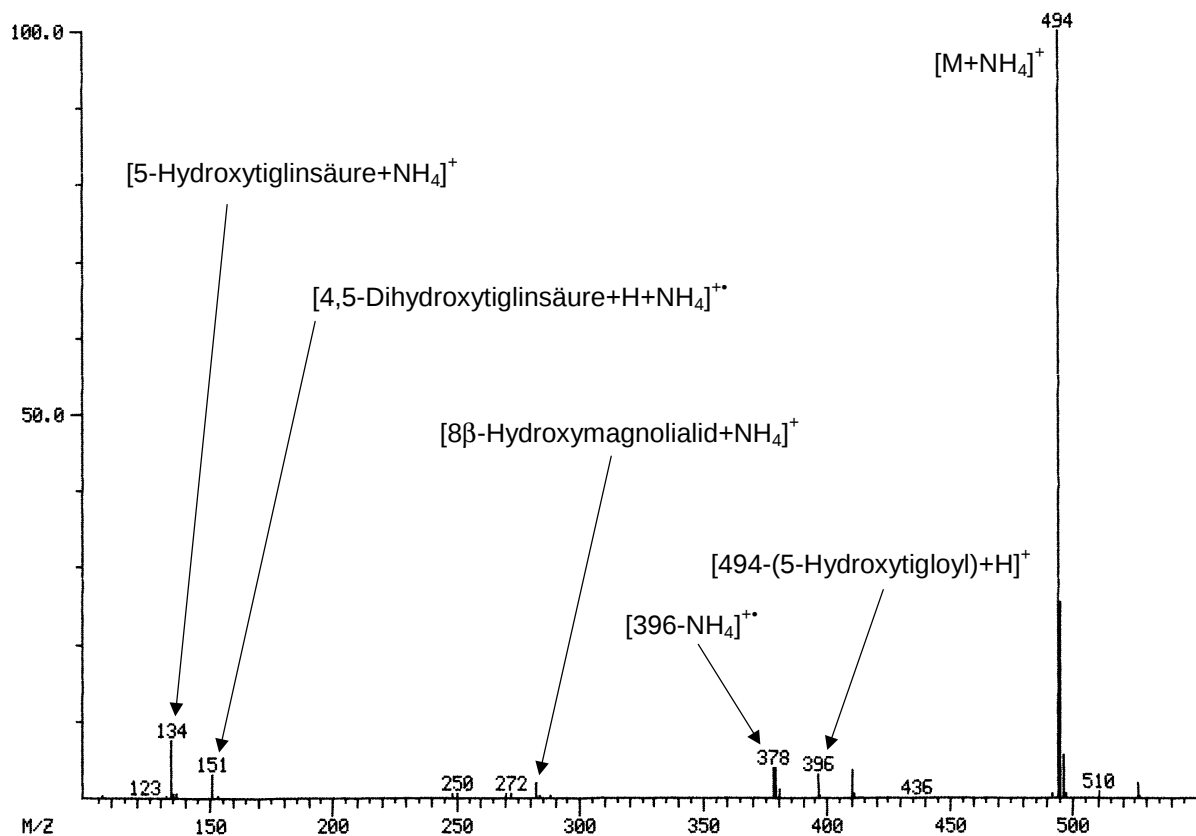
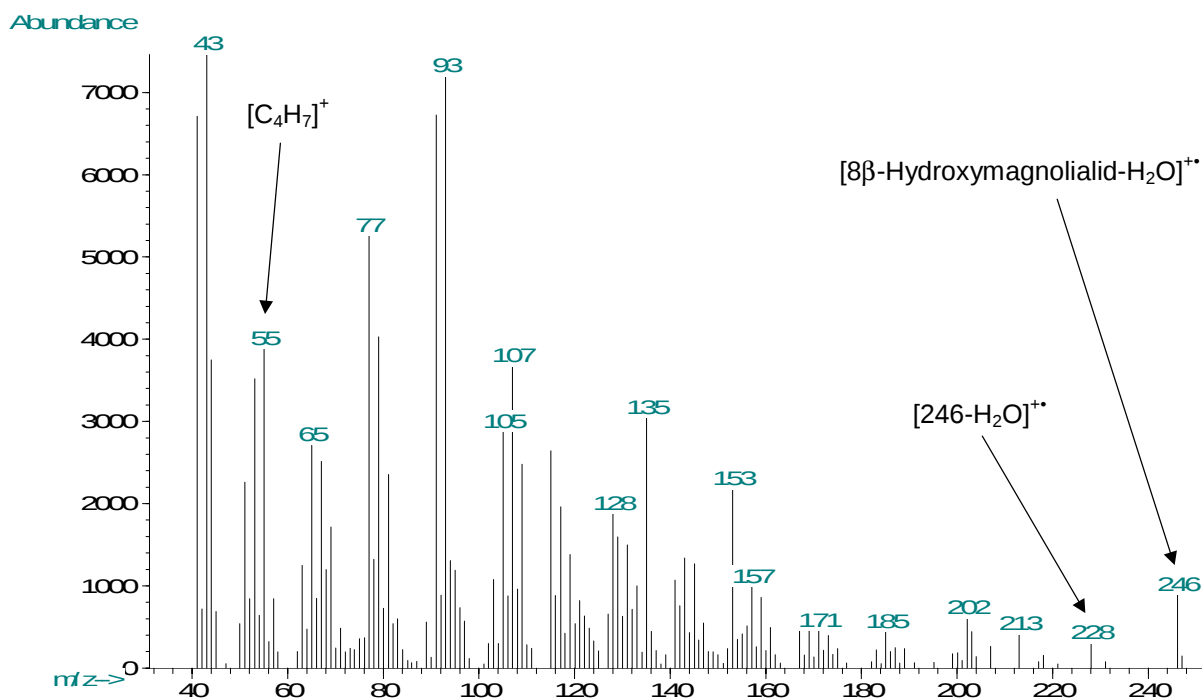
Bild 2.47: DCI-MS-Spektrum von Verbindung **SL9**Bild 2.48: EI-MS-Spektrum von **SL9**

Tabelle 2.9: NMR-Daten von Verbindung **SL9** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL9	C	SL9	DEPT
1	3.56 <i>dd</i> (3.8, 12.0)	1	77.98	CH
2eq	2.06 <i>m</i>	2	26.75	CH ₂
ax	1.76 <i>ddd</i> (5.0, 12.0, 13.2)	3	33.16	CH ₂
3eq	2.23 <i>m</i>	4	127.19	C
ax	1.80 <i>m</i>	5	128.23	C
6	5.13 <i>d</i> (12.0)	6	77.54	CH
7	2.95 <i>ddd</i> (3.2, 5.7, 12.0)	7	51.72	CH
8	5.89 <i>dd</i> (2.5, 3.8)	8	67.55	CH
9eq	2.41 <i>dd</i> (2.5, 15.1)	9	42.83	CH ₂
ax	1.65 <i>dd</i> (3.8, 15.1)	10	41.78	C
13	6.18 <i>d</i> (3.2)	11	133.82	C
	5.54 <i>d</i> (3.2)	12	169.32	C
14	1.24 <i>s</i>	13	121.17	CH ₂
15	1.89 <i>bs</i>	14	20.88	CH ₃
3'	7.05 <i>t</i> (5.7)	15	19.51	CH ₃
4'	4.50 <i>d</i> (5.7)	1'	165.38	C
5'	5.03 <i>d</i> (12.0)	2'	127.13	C
	4.99 <i>d</i> (12.0)	3'	147.20	CH
3''	6.92 <i>dd</i> (6.9)	4'	59.56	CH ₂
4''	1.91 <i>d</i> (6.9)	5'	58.33	CH ₂
5''	4.32 <i>s</i>	1''	167.27	C
		2''	131.56	C
		3''	142.23	CH
		4''	14.32	CH ₃
		5''	56.67	CH ₂

Das ¹H NMR-Spektrum von **SL9** zeigt einundzwanzig Signale für neunundzwanzig Protonen (siehe Bild 2.49, S. 64). Was die Anzahl der Protonen angeht, stimmt **SL9** mit den Substanzen **SL5** bis **SL8** überein. Eine weitere Übereinstimmung findet sich mit den Signalen bei 7.05 ppm (H-3'), 4.50 ppm (H-4'), 5.03 bzw. 4.99 ppm (H-5'), 6.92 ppm (H-3''), 1.91 ppm (H-4'') und 4.32 ppm (H-5''). Sie sind hinsichtlich der Shifts und Kopplungskonstanten mit den Signalen des 4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy-Restes der Substanzen **SL5** und **SL7** identisch. Diese Tatsache paßt zu den aus dem DCI-Spektrum gewonnenen Informationen. Die restlichen vierzehn Signale des ¹H NMR-Spektrums sind dem SL-Grundkörper von **SL9** zuzuordnen. Die chemischen Verschiebungen der Signale und ihre Kopplungskonstanten sprechen zwar für eine partielle Verwandtschaft des Grundkörpers von **SL9** mit den beiden bei **SL1** bis **SL8** vorkommenden Grundgerüsten (8 β -Hydroxyreynosin bzw. 8 β -Hydroxybalchanin), dennoch existieren deutliche Unterschiede.

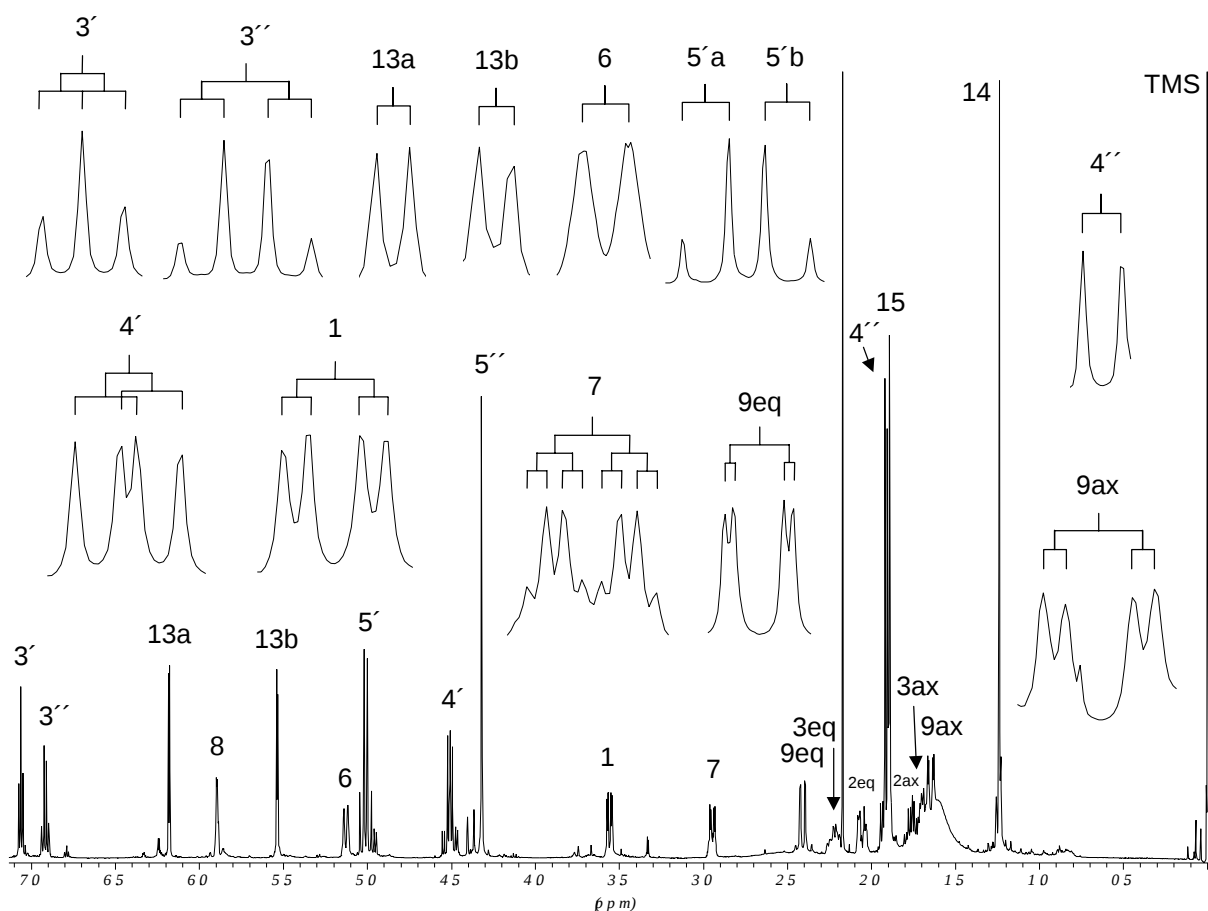
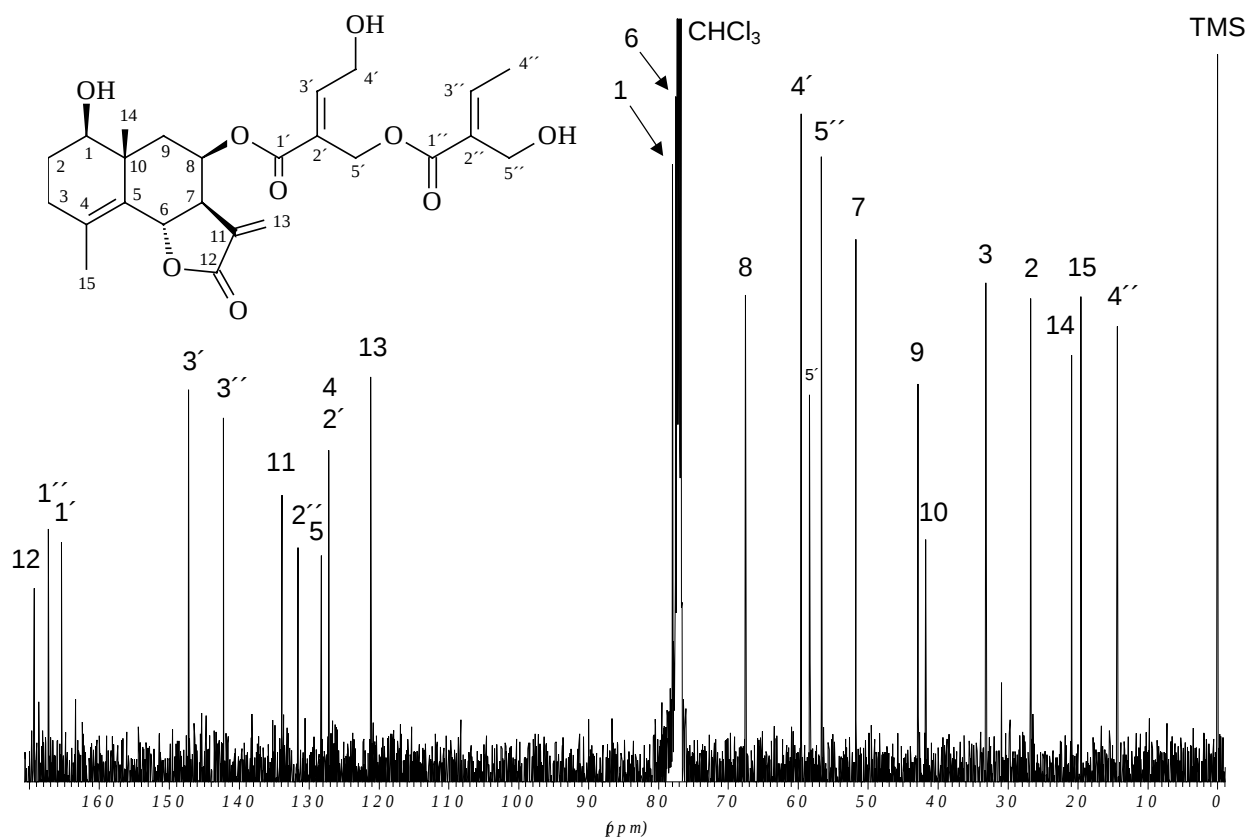
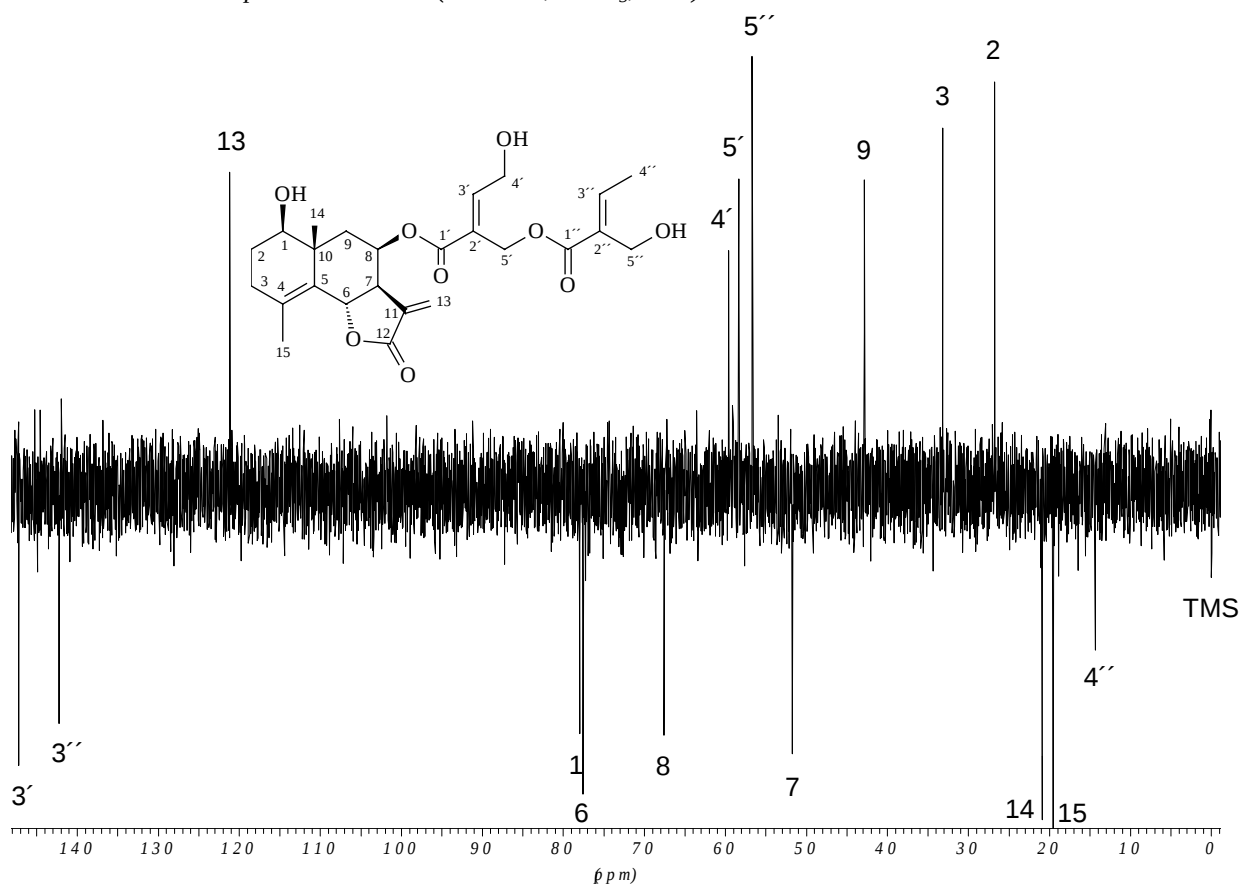


Bild 2.49: ^1H NMR-Spektrum von **SL9** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

So fehlt im Protonenspektrum von **SL9** das Signal für H-5. Das Signal für H-6 ist nicht mehr wie bei **SL1** – **SL8** zum Triplett, sondern nur zum Dublett aufgespalten. Im COSY-Spektrum liefert es dementsprechend nur noch die Kopplung mit H-7. Mit dieser Signalveränderung geht ein Tieffeld-Shift einher: Während das Signal für H-6 in den ^1H NMR-Spektren von **SL1** – **SL8** im Bereich um 4.5 ppm zu finden war, liegt es nun bei 5.13 ppm. Dies spricht für eine Konstitutionsänderung in direkter Nachbarschaft von H-6, die sich in einer Entschirmung dieses Protons äußert. Wie bei **SL1** – **SL8** stellt bei **SL9** das Signal von H-6 das eine Ende einer Sequenz vicinal miteinander koppelnder Protonen dar (H-6 bis H-9). Die Signale für H-7, H-8 und H-9 erscheinen bei den von **SL1** – **SL8** bekannten Shiftwerten und weisen auch dieselben Kopplungskonstanten auf. Damit sollte die chemische Umgebung dieser Atome mit der bei den Substanzen **SL1** – **SL8** übereinstimmen. Eine deutliche Signalverlagerung findet sich erst wieder bei dem Singulett der Methylprotonen an Position 14. Das Signal ist gegenüber den anderen bisher diskutierten SL ins tiefere Feld verschoben (1.24 ppm gegenüber 0.96 – 1.07 ppm). Das Signal für H-1 findet sich bei **SL9** bei 3.56 ppm. Diese chemische Verschiebung wurde auch bei den entsprechenden Signalen der Verbindungen **SL1**, **SL2**, **SL4**, **SL5** und **SL6** gefunden. Von diesen Substanzen ist auch die Kopplungssequenz bekannt, die mit dem Proton an Position 1 ihren Ausgang nimmt. Es koppelt vicinal mit den Protonen einer Methylengruppe (H-2), welche ihrerseits mit zwei weiteren Methylenprotonen koppeln (H-3). Die Shiftwerte der vier Methylenprotonen von **SL9** weichen allerdings von den Shifts der analogen Protonen der eben genannten Substanzen ab. Dies ist ein weiteres Indiz für eine strukturelle Abweichung im A-Ring von **SL9**.

Bild 2.50: ¹³C NMR-Spektrum von **SL9** (125 MHz, CDCl₃, TMS)Bild 2.51: DEPT-Spektrum von Verbindung **SL9** (125 MHz, CDCl₃, TMS)

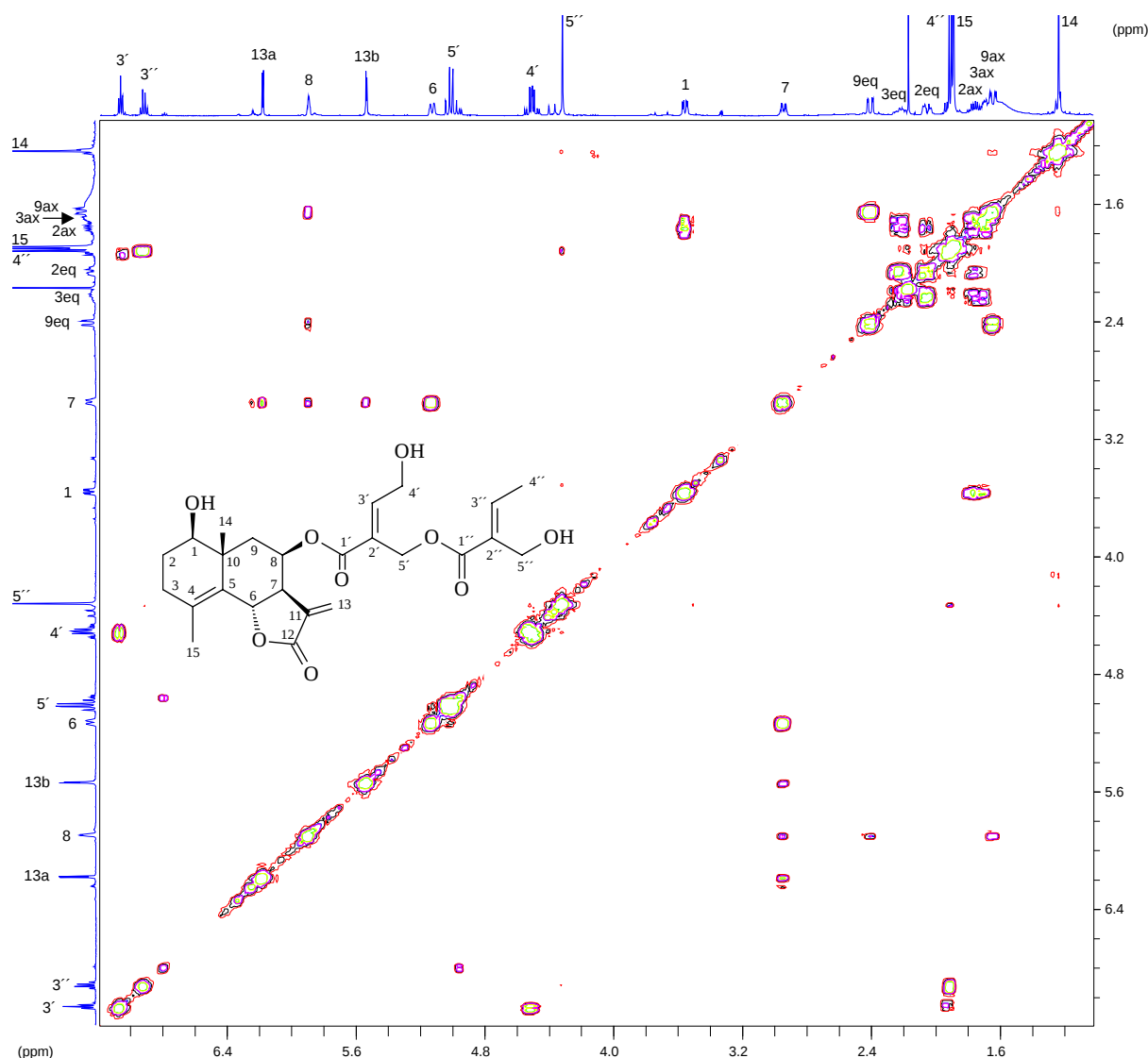


Bild 2.52: COSY-Spektrum von **SL9** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

Für die Protonen an Position 15 findet sich im Spektrum von **SL9** ein Singulett für drei Protonen bei 1.89 ppm. Dieser Shift ist typisch für eine Methylgruppe an einer Doppelbindung [HESSE et al., 1995]. Ein vergleichbares Signal findet sich in den Spektren von **SL3**, **SL7** und **SL8**. Bei diesen Substanzen verläuft die Doppelbindung zwischen den Atomen C-3 und C-4. Da sich bei **SL9** an Position 3 eine Methylengruppe befindet, muß die Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 verlaufen. Dies steht im Einklang mit dem Fehlen des Signals von H-5, der Aufspaltung des Signals für H-6 zum Dublett und den leichten Shiftveränderungen der Signale für H-2, H-3 und H-14.

Im ^{13}C NMR-Spektrum (siehe Bild 2.50, S. 65) erkennt man fünfundzwanzig Signale. Nach dem Vergleich mit dem DEPT- (siehe Bild 2.51, S. 65) und dem HMQC-Spektrum (siehe Bild 2.53, S. 68) handelt es sich um neun quartäre, sechs Methin-, sieben Methylen- und drei Methylkohlenstoffe. Zehn dieser Signale sind der Säurekette zuzuordnen und bestätigen den aus den entsprechenden Protonenshifts abgeleiteten Befund, dass es sich um den von **SL5** und **SL7** bekannten 4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy-Rest handelt (vergl.

Tabelle 2.9, S. 63 mit Tabelle 2.5, S. 38 und Tabelle 2.7, S. 53). Die restlichen fünfzehn Signale gehören zu den Kohlenstoffen des SL-Grundgerüsts. Hiervon lassen sich die Signale für C-1 – C-4 und C-6 – C-15 an Hand der Korrelations-Spektren und in Analogie zu den NMR-Daten von **SL1** – **SL8** leicht zuordnen. Es verbleiben die Signale für die beiden quartären Kohlenstoffe C-4 und C-5. Das Signal für C-5 findet sich bei 128.23 ppm, da es im HMBC-Spektrum jeweils eine ^3J -Kopplung mit den Methylprotonen an C-14 und den Methylprotonen an C-15 besitzt. Für das Signal bei 127.19 ppm findet man im HMBC-Spektrum dagegen einen Crosspeak für eine ^2J -Kopplung mit den Methylprotonen an C-15 und einen weiteren Crosspeak für eine ^3J -Kopplung mit H-6. Das Signal muß demnach dem C-4 zugeordnet werden. Die δ -Werte der Signale für C-4 und C-5 stehen im Einklang mit den in der Literatur verfügbaren Daten für quartäre Kohlenstoffe an einer Doppelbindung [HESSE et al., 1995]. Dies beweist die aus den Protonendaten abgeleitete Doppelbindung zwischen C-4 und C-5. Wie oben beschrieben, wirkt sich die Verlagerung der Doppelbindung gegenüber den Substanzen **SL1** – **SL8** auch in geringem Maße auf die Shifts der Nachbaratome aus. Da hiervon jedoch die Signallagen der Signale für H-1, C-1, H-8 und C-8 nicht betroffen sind, muß wie bei **SL1** bis **SL8** die 1- β -OH-Gruppe von **SL9** frei vorliegen, während die 8- β -OH-Gruppe mit der erwähnten Säurekette verestert ist.

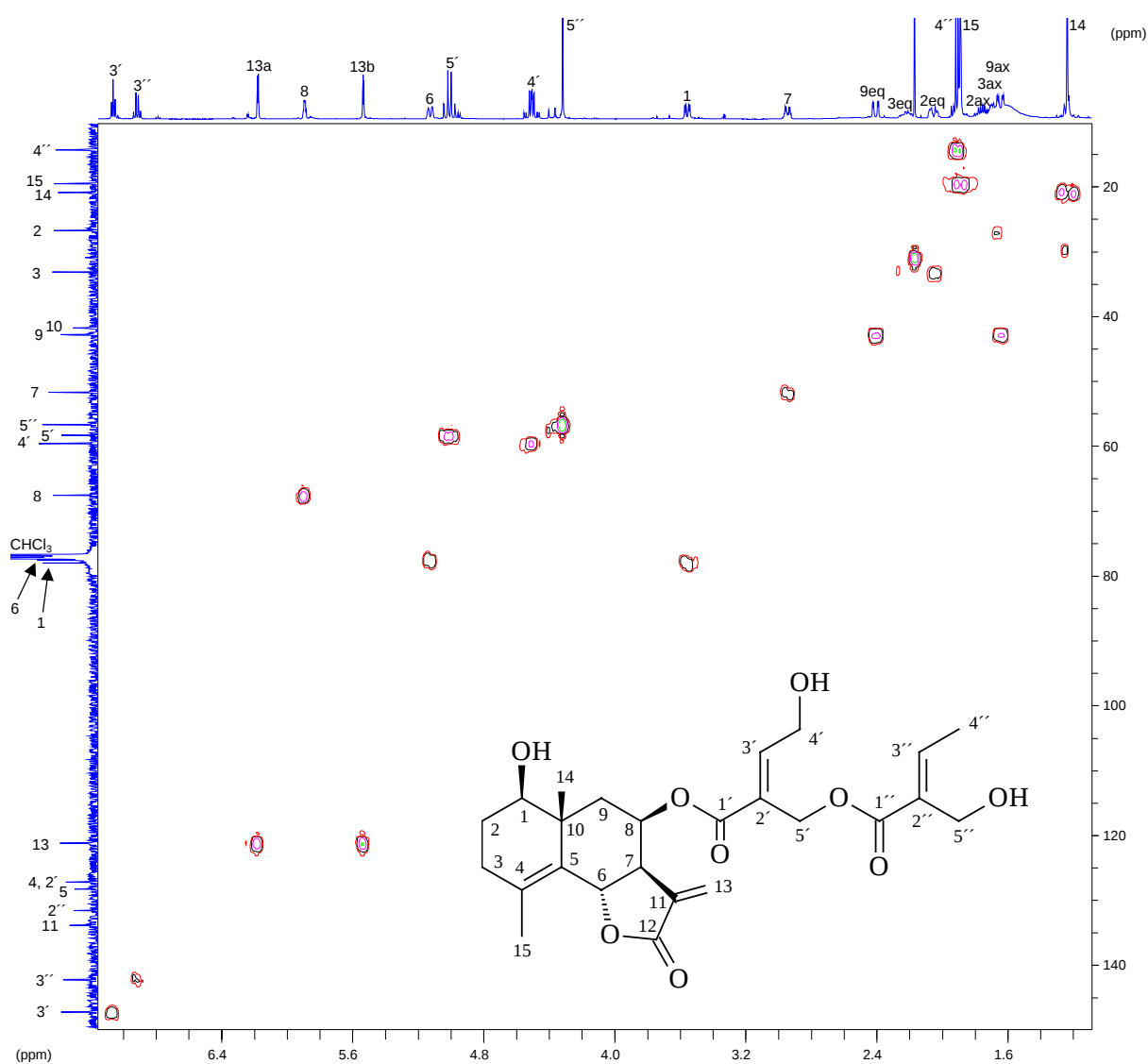


Bild 2.53: HMQC-Spektrum von Substanz **SL9** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS)

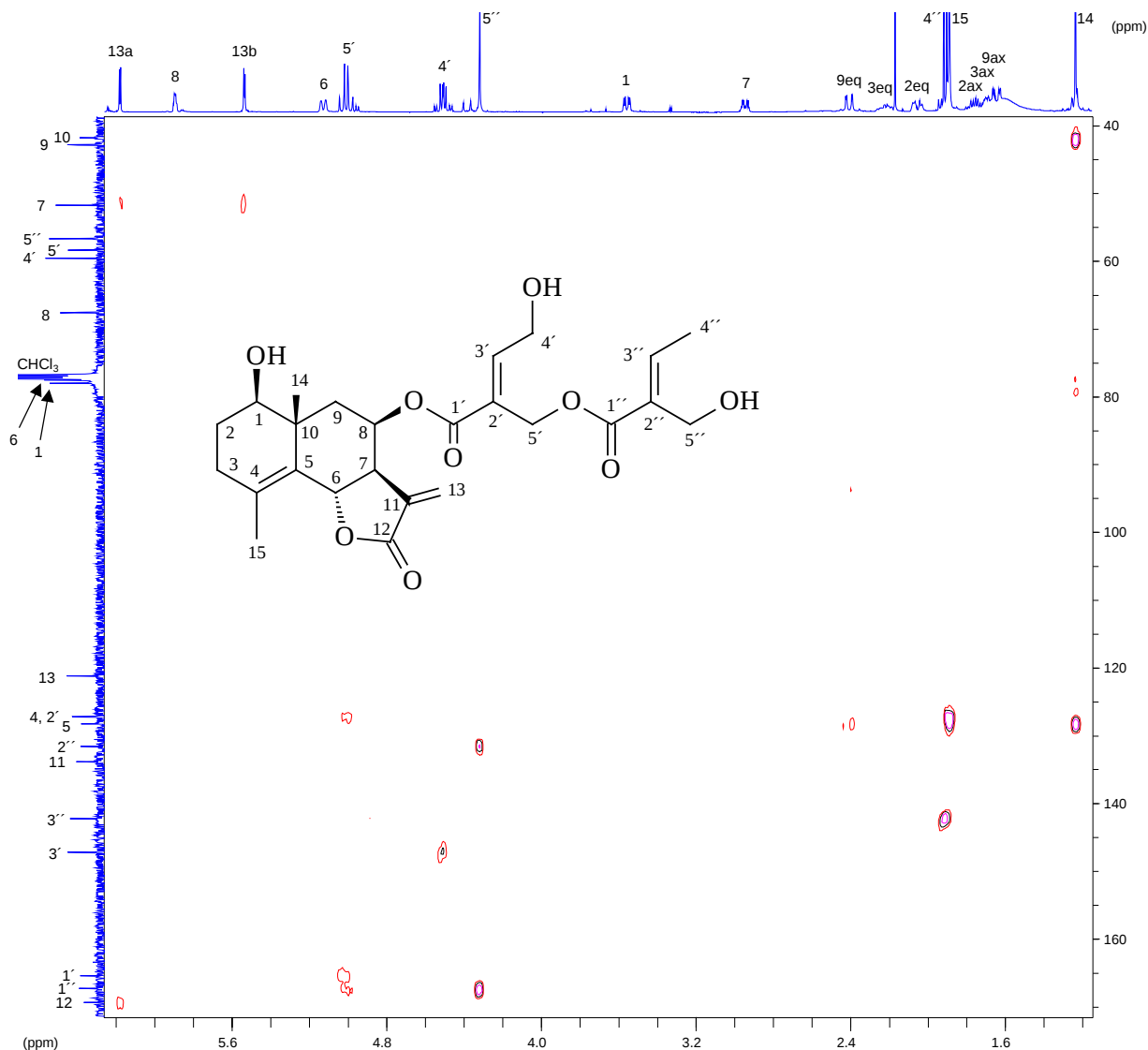
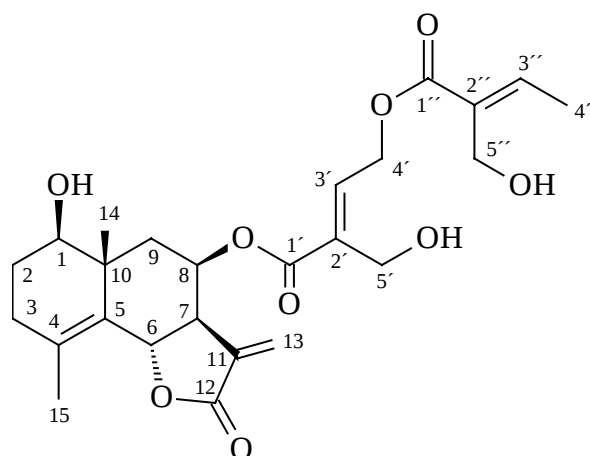


Bild 2.54: HMBC-Spektrum von Verbindung **SL9** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Es handelt sich demnach bei **SL9** um 1 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxy-tigloyloxy)tigloyloxy]-4,11(13)-eudesmadien-12,6-olid. Das Grundgerüst ist auch unter der Bezeichnung 8 β -Hydroxymagnolialid bekannt. In der Literatur verfügbare Daten von 8 β -Estern dieser Substanz stimmen gut mit den eigenen Meßdaten überein [BOHLMANN et al., 1981; BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995; DOSKOTCH et al., 1975; HERZ und KULANTHAIVEL, 1983; PÉREZ C. et al., 1984]. Diese Ester konnten aus Vertretern zweier Familien der Dicotyledonae isoliert werden. Es handelt es sich um die beiden Asteraceae *Liatris laevigata* [HERZ und KULANTHAIVEL, 1983] und *Tithonia rotundifolia* [BOHLMANN et al., 1981; PÉREZ C. et al., 1984] sowie die Magnoliaceae *Liriodendron tulipifera* [DOSKOTCH et al., 1975]. Wie die strukturell nahe verwandten Substanzen **SL5** – **SL8** repräsentiert **SL9** einen neuen Naturstoff.

**2.1.11 8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid =
1 β -Hydroxy-8 β -[5-hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid (Verbindung SL10)**



Die Ausbeute an der gummiartigen und farblosen Verbindung **SL10** belief sich auf etwa 1 mg. Sie fiel bei der Aufarbeitung von Fraktion D-II an (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühareagenz ergab sie ein grauviolett gefärbtes Reaktionsprodukt.

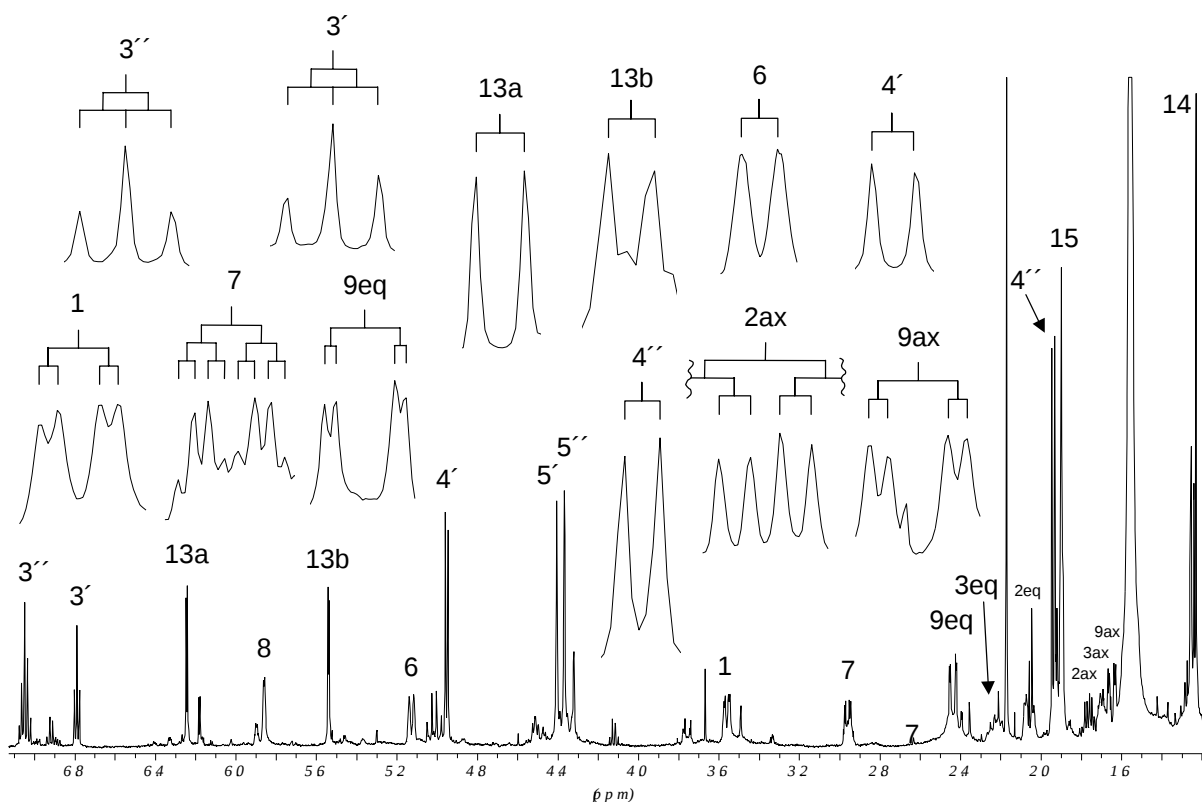
Die spektroskopischen Daten von **SL10** lassen die Ähnlichkeit dieser Verbindung zu den bisher besprochenen SL erkennen. So treten im IR-Spektrum die von **SL1** – **SL9** bekannten Banden bei 3485 cm^{-1} (OH-Valenz), 2932 cm^{-1} (CH-Valenz), 1764 cm^{-1} (C=O-Valenz für ein γ -Lacton), 1715 cm^{-1} (C=O-Valenz für einen konjugierten Ester) und 1645 cm^{-1} (C=C-Valenz) auf.

Das DCI-Spektrum zeigt wie bei **SL5** – **SL9** den Pseudomolpeak bei m/z 494, die charakteristischen Fragmente bei m/z 396 $[494-(5\text{-Hydroxytigloyl})+\text{H}]^+$, 378 $[396-\text{NH}_4]^+$, 282 $[8\beta\text{-Hydroxymagnolialid}+\text{NH}_4]^+$ und 264 $[8\beta\text{-Hydroxymagnolialid}]^+$ sowie die bekannten Clusterionen für die hydroxylierten C₅-Säuren bei m/z 151 $[4,5\text{-Dihydroxytiglinsäure}+\text{H}+\text{NH}_4]^+$ und 134 $[5\text{-Hydroxytiglinsäure}+\text{NH}_4]^+$. Somit stimmt die Fragmentierung mit der von **SL5** – **SL9** überein, es existieren lediglich Abweichungen hinsichtlich der relativen Intensitäten der Fragmentionen.

Das GC-EI-MS-Spektrum von **SL10** ist mit dem von **SL9** identisch. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass **SL10** ebenfalls das 8 β -Hydroxymagnolialid als Grundkörper besitzt. Die Massendifferenz zwischen dem schwersten im EI-MS-Spektrum detektierten Teilchen bei m/z 246 $[8\beta\text{-Hydroxymagnolialid}-\text{H}_2\text{O}]^+$ und der des im DCI-Spektrum detektierten Pseudomolekülions bei m/z 494 spricht auch im Falle von **SL10** für die Abspaltung der Esterkette während der GC.

Tabelle 2.10: NMR-Daten von Verbindung **SL10** (500 MHz, CDCl_3 , TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

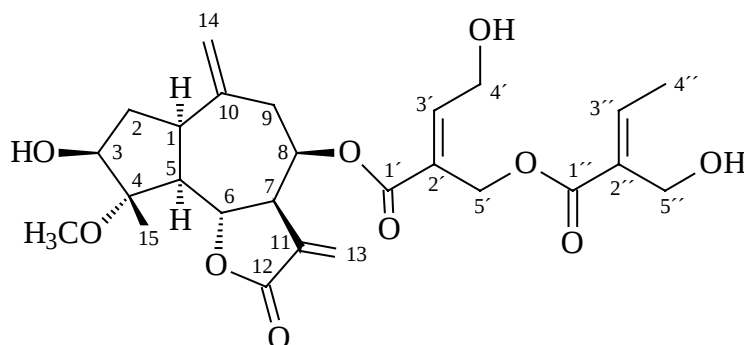
H	SL10
1	3.56 <i>dd</i> (3.8, 12.0)
2eq	2.06 <i>m</i>
ax	1.76 <i>ddd</i> (5.0, 12.0, 13.2)
3eq	2.23 <i>m</i>
ax	1.70 <i>m</i>
6	5.13 <i>d</i> (12.0)
7	2.96 <i>ddd</i> (3.2, 5.7, 12.0)
8	5.86 <i>dd</i> (2.5, 3.8)
9eq	2.44 <i>dd</i> (2.5, 15.1)
ax	1.65 <i>dd</i> (3.8, 15.1)
13	6.24 <i>d</i> (3.2)
	5.54 <i>d</i> (3.2)
14	1.23 <i>bs</i>
15	1.90 <i>bs</i>
3'	6.79 <i>t</i> (6.3)
4'	4.95 <i>d</i> (6.3)
5'	4.40 <i>s</i>
3''	7.05 <i>t</i> (6.9)
4''	1.94 <i>d</i> (6.9)
5''	4.37 <i>s</i>

Bild 2.55: ^1H NMR-Spektrum von **SL10** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

Im ^1H NMR-Spektrum von **SL10** finden sich zwanzig Signale für neunundzwanzig Protonen (siehe Bild 2.55, S. 71). Vierzehn dieser Signale stimmen sowohl hinsichtlich der chemischen Verschiebungen als auch im Hinblick auf die Kopplungskonstanten mit den Signalen für den Grundkörper von **SL9** überein (vergl. Tabelle 2.9, S. 63 mit Tabelle 2.10, S. 71). Die restlichen sechs Signale für elf Protonen sind der Seitenkette zuzuordnen. Sie sind in Bezug auf die Shiftwerte und die Kopplungskonstanten mit den Signalen der Säureseitenkette von **SL6** bzw. **SL8** identisch (vergl. Tabelle 2.8, S. 58 mit Tabelle 2.10, S. 71). Hieraus folgt, dass es sich bei **SL10** um 8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid handelt. Dass die Veresterung an Position 8 erfolgte, ergibt sich aus den Signallagen der Signale für H-1 (3.56 ppm) und H-8 (5.86 ppm). Wäre die OH-Gruppe an Position 1 verestert, müsste das Signal für H-1 im tieferen Feld und das Signal für H-8 im höheren Feld liegen.

Bei **SL10** handelt es sich um einen bislang nicht beschriebenen Ester des 8 β -Hydroxymagnolialids. Was das Vorkommen des SL-Grundkörpers im Pflanzenreich angeht, sei auf die Ausführungen am Ende von Kap. 2.1.10, S. 69, verwiesen.

2.1.12 3 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4 α -methoxy-10(14),11(13)-guaïadien-12,6-olid (Verbindung SL11)



Substanz **SL11** wurde aus Fraktion D-II isoliert und fiel als farblose Substanz in einer Ausbeute von 6 mg an (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309).

Im Gegensatz zu den anderen SL erschien **SL11** auf der DC-Folie als fluoreszierende Bande, die nach der Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz nur eine schwache Rosafärbung ergab.

Im IR-Spektrum tritt auch hier eine Bande bei 1763 cm^{-1} auf, die ein typisches Indiz für den γ -Lactonring ist. Neben dieser Bande finden sich auch die von **SL1** bis **SL10** bekannten Schwingungsbanden für die OH- (3476 cm^{-1}), die CH- (2941 cm^{-1}), die C=O (1714 cm^{-1}) und C=C-Valenz (1648 cm^{-1}) [RÜCKER, 1992].

Die Aufnahme eines DCI-MS-Spektrums mit Ammoniak als Reaktantgas lieferte den Pseudomolpeak bei m/z 524 (siehe Bild 2.56, S. 74). Damit beträgt das wahre Molekulargewicht von **SL11** 506 g/mol. Die Verbindung besitzt folglich eine höhere Masse als **SL1** – **SL10**. Bei m/z 134 und m/z 151 finden sich die Fragmente für die von **SL5** bis **SL10** bekannten hydroxylierten Tiglinsäuren der Esterseitenkette. In Analogie zu diesen Substanzen findet sich bei **SL11** ein Fragment bei m/z 312 $[\text{SL}+\text{NH}_4]^+$, welches dem postulierten SL-Alkohol nach Abspaltung der Seitenkette zuzuschreiben ist. Im EI-MS-Spektrum (siehe Bild 2.57, S. 74), dessen Fragmentierungsmuster deutlich von dem der bereits diskutierten SL abweicht, liegt der Molpeak dementsprechend bei m/z 294. Daraus folgt zum einen, dass die im Vergleich mit **SL1** – **SL10** höhere molare Masse von **SL11** auf einer schwereren SL-Komponente beruht. Zum anderen wird auch hier die Seitenkette auf Grund der Thermolabilität während der GC abgespalten, so dass nur noch der SL-Alkohol detektiert wird. Das zugehörige Radikalkation spaltet sukzessive Methanol und Wasser ab, die resultierenden Radikalspezies finden sich bei m/z 262 und m/z 244. Das bedeutet, dass **SL11** neben der alkoholischen Funktion eine Methoxygruppe besitzen muß.

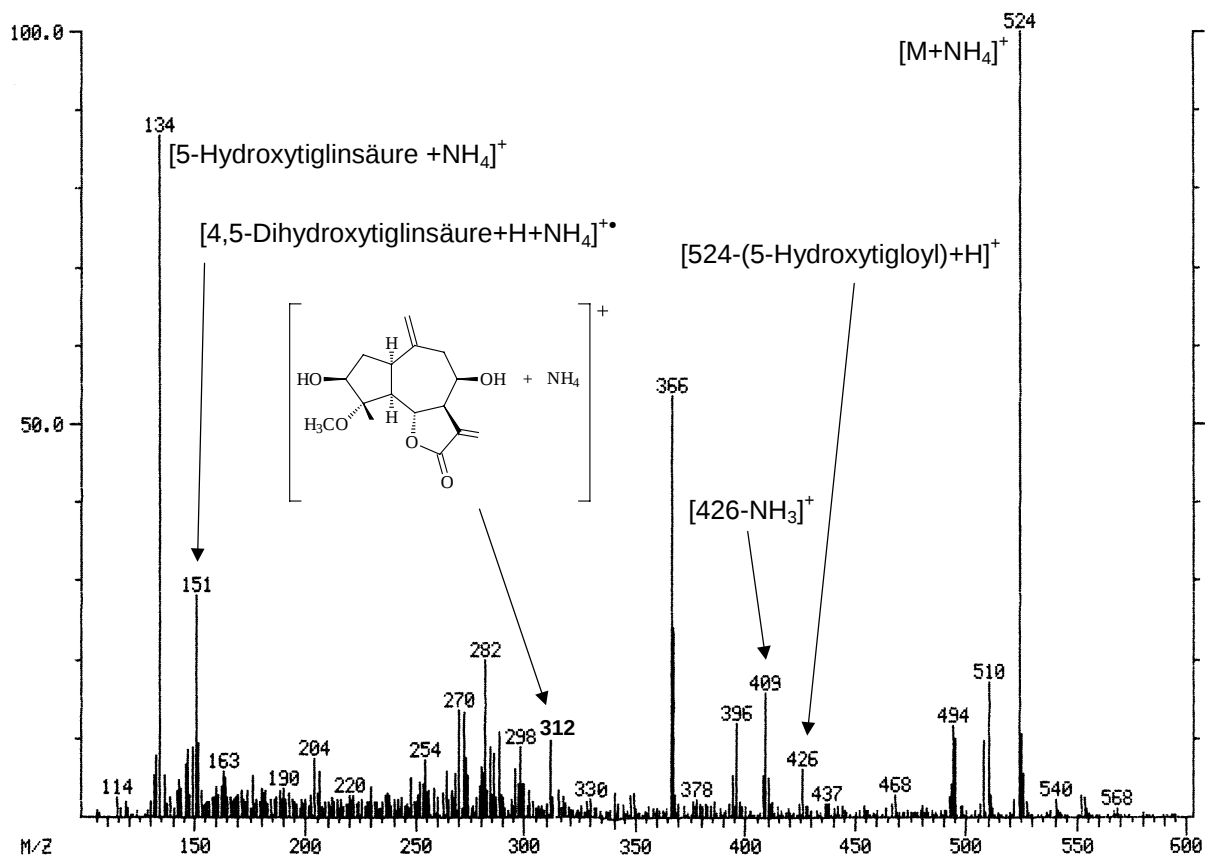
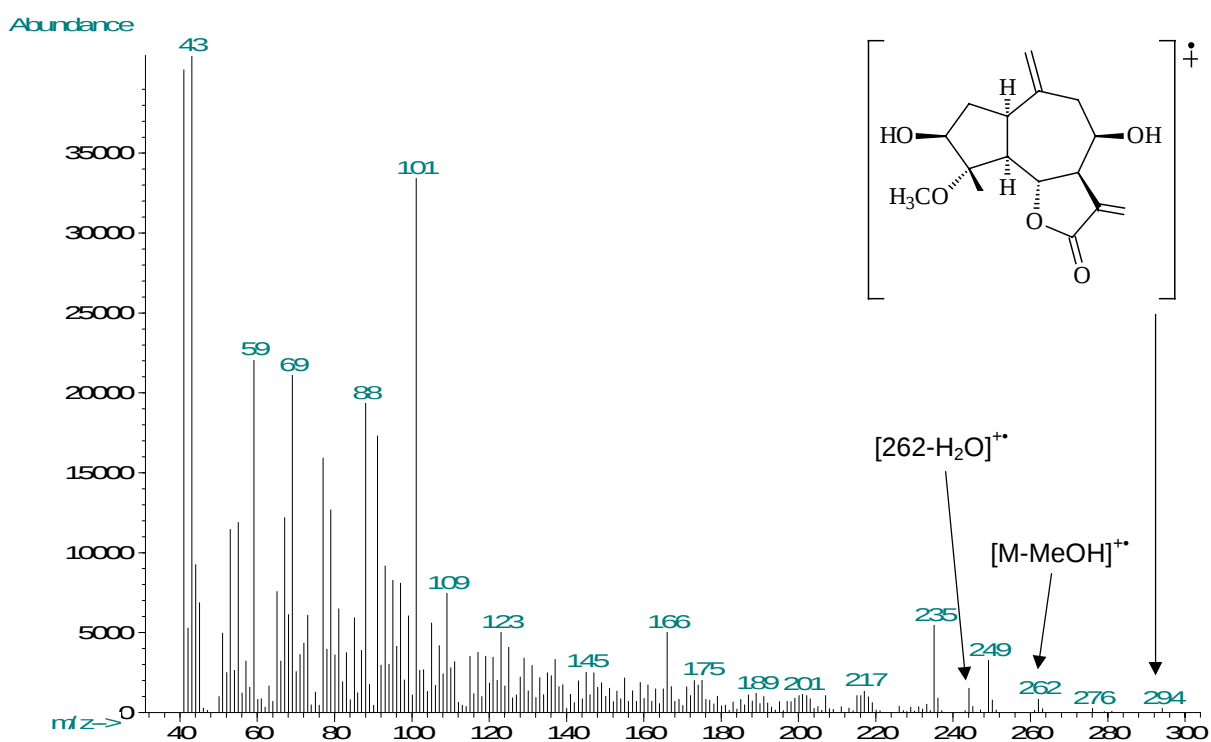
Bild 2.56: DCI-MS-Spektrum von *SL11*Bild 2.57: EI-MS-Spektrum von *SL11*

Tabelle 2.11: NMR-Daten von Verbindung **SL11** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS); * = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SL11	C	SL11	DEPT
1	3.08 m	1	43.84	CH
2 β	2.33 m	2	36.47	CH ₂
α	1.80 dd (8.2, 13.9)	3	76.11*	CH
3	4.26 d (3.8)	4	86.16	C
5	2.44 t (11.4)	5	53.72	CH
6	4.84 dd (9.5, 11.4)	6	76.52*	CH
7	3.08 m	7	50.38	CH
8	5.65 dd (3.8, 5.7)	8	67.60	CH
9 β	2.79 dd (3.8, 13.9)	9	43.84	CH ₂
α	2.29 dd (3.8, 13.9)	10	141.43	C
13	6.22 d (3.2)	11	135.06	C
	5.55 d (3.2)	12	169.61	C
14	5.09 s	13	121.57	CH ₂
	4.89 s	14	116.41	CH ₂
15	1.50 s	15	16.91	CH ₃
3'	7.05 t (6.3)	1'	165.36	C
4'	4.49 dd (6.3, 13.9)	2'	127.12	C
5'	5.06 d (12.0)	3'	147.13	CH
	4.88 d (12.0)	4'	59.62	CH ₂
3''	6.90 dd (6.9)	5'	58.28	CH ₂
4''	1.92 d (6.9)	1''	167.40	C
5''	4.31 s	2''	131.52	C
OCH ₃	3.26 s	3''	142.11	CH
		4''	14.32	CH ₃
		5''	56.68	CH ₂
		OCH ₃	49.92	CH ₃

Das ¹³C NMR-Spektrum (siehe Bild 2.59, S. 77) zeigt die Signale für sechsundzwanzig Kohlenstoffatome. Aus dem DEPT- (siehe Bild 2.60, S. 78) und dem HMQC-Spektrum (siehe Bild 2.62, S. 80) lässt sich ableiten, dass die Signale sich auf acht quartäre, acht Methin-, sieben Methylen- und drei Methylkohlenstoffe verteilen. Zehn dieser Signale (C-1' - C-5', C-1'' - C-5'') sind hinsichtlich ihrer Shiftwerte mit den Signalen der Seitenkette von **SL5**, **SL7** und **SL9** identisch (vergl. z.B. Tabelle 2.5, S. 38 mit Tabelle 2.11, S. 75). Dies untermauert die aus dem DCI-MS-Spektrum abgeleitete Vermutung, dass **SL11** dieselbe Esterkette besitzt wie die drei genannten Verbindungen. Das Signal für einen Methylkohlenstoff bei 49.92 ppm (OCH₃) deutet von seiner chemischen Verschiebung her auf das C-Atom einer Methoxygruppe hin [HESSE et al., 1995]. Die verbliebenen fünfzehn Signale sind damit dem SL-Grundkörper zuzuordnen.

Das ¹H NMR-Spektrum (siehe Bild 2.58, S. 76) zeigt dreiundzwanzig Signale für einunddreißig Protonen. Sieben dieser Signale stimmen mit den Signalen für die Protonen der Seitenkette von **SL5**, **SL7** und **SL9** überein (vergl. z.B. Tabelle 2.5, S. 38 mit Tabelle 2.11, S. 75). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass auch **SL11** den 4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy-Rest besitzt. Das Singulett für drei Protonen bei 3.26 ppm ist von den Substanzen **SL1** – **SL3** bekannt: Es handelt sich um das Signal für die drei Protonen

einer Methoxygruppe [HESSE et al., 1995]. Bei Betrachtung der restlichen fünfzehn Signale erkennt man jedoch deutliche Unterschiede zu allen bisher diskutierten SL: So findet sich neben den für die Exomethylenprotonen eines Lactonringes typischen Signalen bei 6.22 und 5.55 ppm (H-13a und H-13b) zwei weitere Signale für Exomethylenprotonen im höheren Feld, und zwar bei 5.09 und 4.89 ppm (H-14a und H-14b). Bei den Verbindungen **SL1** – **SL8** fand sich das Signal für H-5 als Dublett im Bereich zwischen 2.27 und 2.55 ppm. An Stelle eines solchen Dubletts liegt im Spektrum von **SL11** bei 2.44 ppm ein Triplett für ein Proton (H-5). Das Signal für H-6 erschien in den Spektren von **SL1** – **SL8** als Triplett im Bereich zwischen 4.45 und 4.54 ppm. Statt dessen trifft man im Protonenspektrum von **SL11** bei 4.84 ppm auf ein Signal für ein Proton, welches zum Dublett vom Dublett aufgespalten ist (H-6). Das Signal für die H-14-Methylgruppe, welches in den Spektren von **SL1** – **SL10** zwischen 0.96 und 1.24 ppm zu finden ist, fehlt im Spektrum von **SL11**. Hier trifft man dafür auf ein Singulett für drei Protonen bei 1.50 ppm (H-15).

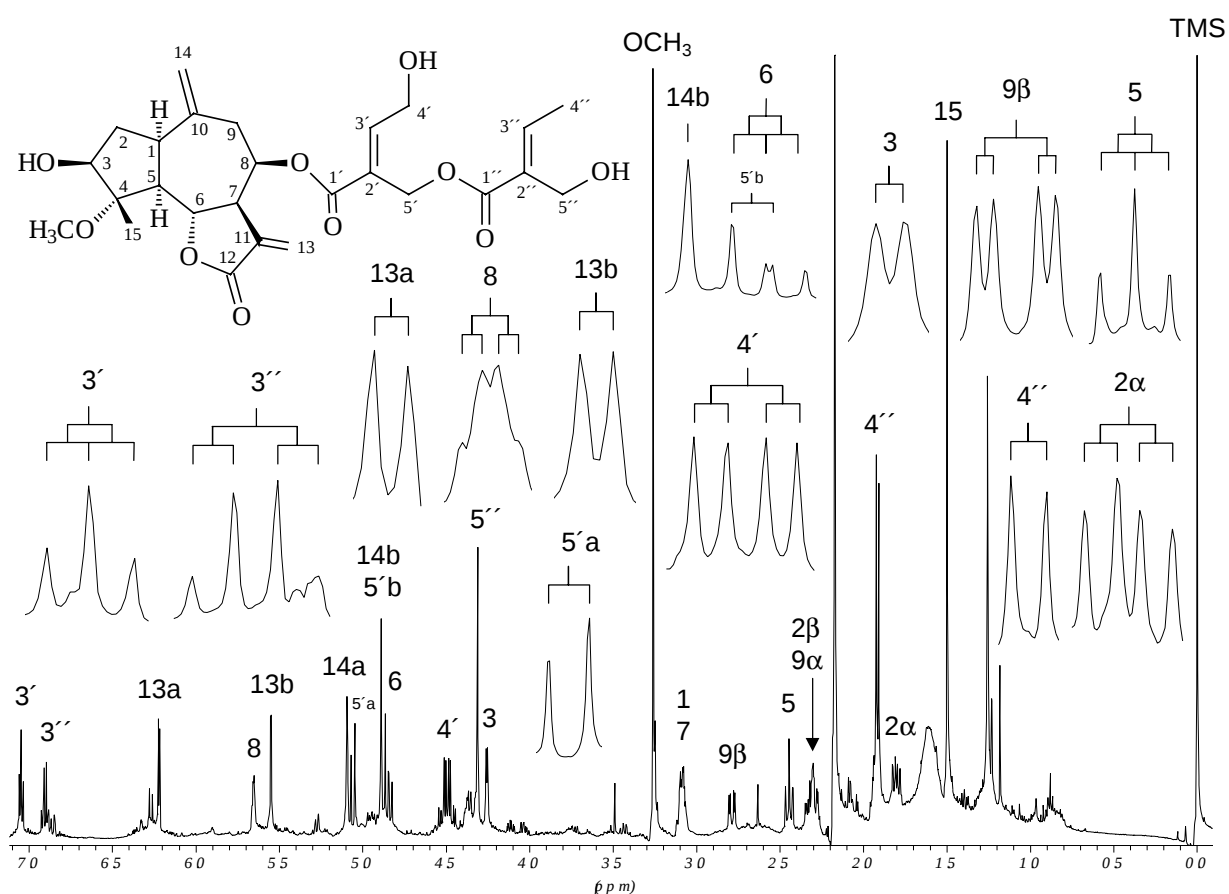


Bild 2.58: ^1H NMR-Spektrum von **SL11** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

Die beiden Signale für die Exomethylenprotonen des Lactonringes bei 6.22 und 5.55 ppm (H-13a und H-13b) zeigen im COSY-Spektrum (siehe Bild 2.61, S. 79) eine Kopplung mit einem überlagerten Signal für ein Proton bei 3.08 ppm (H-7). Dieses Signal besitzt zwei weitere Kopplungspartner, nämlich ein *dd*-Signal für ein Proton bei 5.65 ppm (H-8) und ein weiteres *dd*-Signal für ein Proton bei 4.84 ppm (H-6). Das Signal bei 5.65 ppm (H-8) zeigt Kopplungen mit den Signalen für die beiden Protonen einer Methylengruppe bei 2.79 ppm (H-9 β) und 2.29 ppm (H-9 α), die auch geminal miteinander koppeln. An dieser Stelle reißt die Kette der vicinalen Kopplungen ab. Das bereits erwähnte Signal bei 4.84 ppm (H-6)

besitzt als zweiten Kopplungspartner ein Signal für ein Proton bei 2.44 ppm (H-5), welches zum Triplet aufgespalten ist. Dieses Triplet zeigt wiederum eine Interaktion mit einem durch das Multiplett von H-7 überlagerten Signal für ein Proton bei 3.08 ppm (H-1). Dieses Signal koppelt mit den beiden Signalen einer Methylengruppe bei 2.33 ppm (H-2 β) und 1.80 ppm (H-2 α), welche auch geminal miteinander koppeln. Von diesen beiden Signalen koppelt dasjenige im tieferen Feld (H-2 β) mit einem Dublett für ein Proton bei 4.26 ppm (H-3). Die chemische Verschiebung dieses Signals spricht dafür, dass das zugehörige Kohlenstoffatom noch mit einer Hydroxylgruppe substituiert ist [HESSE et al., 1995]. Hiermit endet die Sequenz vicinaler Kopplungen.

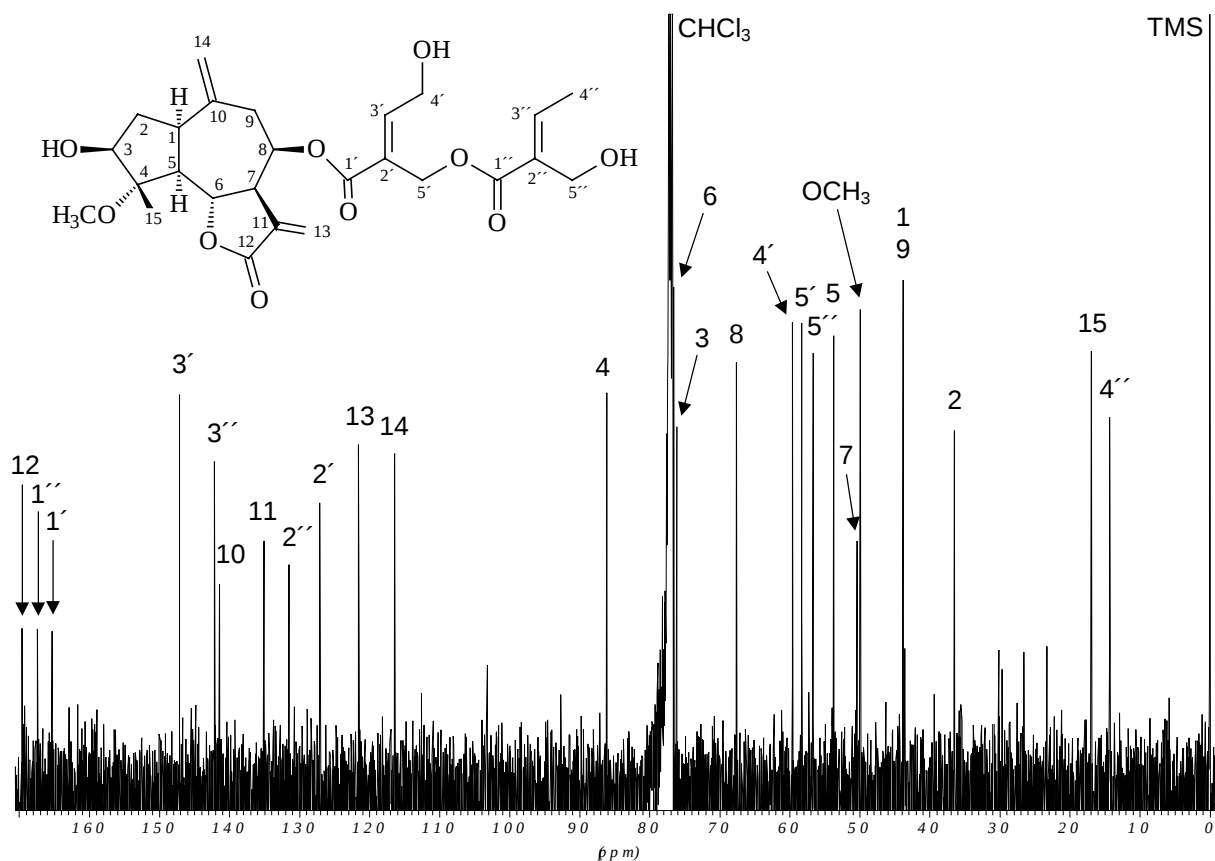


Bild 2.59: ^{13}C NMR-Spektrum von **SL11** (125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Die chemischen Verschiebungen der Signale für die mit den angesprochenen Protonen korrespondierenden Kohlenstoffe ergeben sich aus dem HMQC-Spektrum (siehe Bild 2.62, S. 80): 43.84 ppm (C-1), 36.47 ppm (C-2), 76.11 ppm (C-3), 53.72 ppm (C-5), 76.52 ppm (C-6), 50.38 ppm (C-7), 67.60 ppm (C-8), 43.84 ppm (C-9), 121.57 ppm (C-13) und 116.41 ppm (C-14).

Im HMBC-Spektrum (siehe Bild 2.63, S. 81) zeigen die beiden zur einer Methin- und einer Methylengruppe gehörigen Signale bei 43.84 ppm (C-1 und C-9) eine ^3J -Kopplung mit den Exomethylenprotonen bei 5.09 und 4.89 ppm (H-14). Die Signale für die Methylenprotonen bei 2.79 ppm (H-9 β) und 2.29 ppm (H-9 α) liefern eine ^2J -Kopplung mit dem Signal eines quartären Kohlenstoffes bei 141.43 ppm (C-10). Dieses Signal zeigt zusätzlich noch eine ^3J -Kopplung, und zwar mit dem Signal des Methinprotons bei 2.44 ppm (H-5).

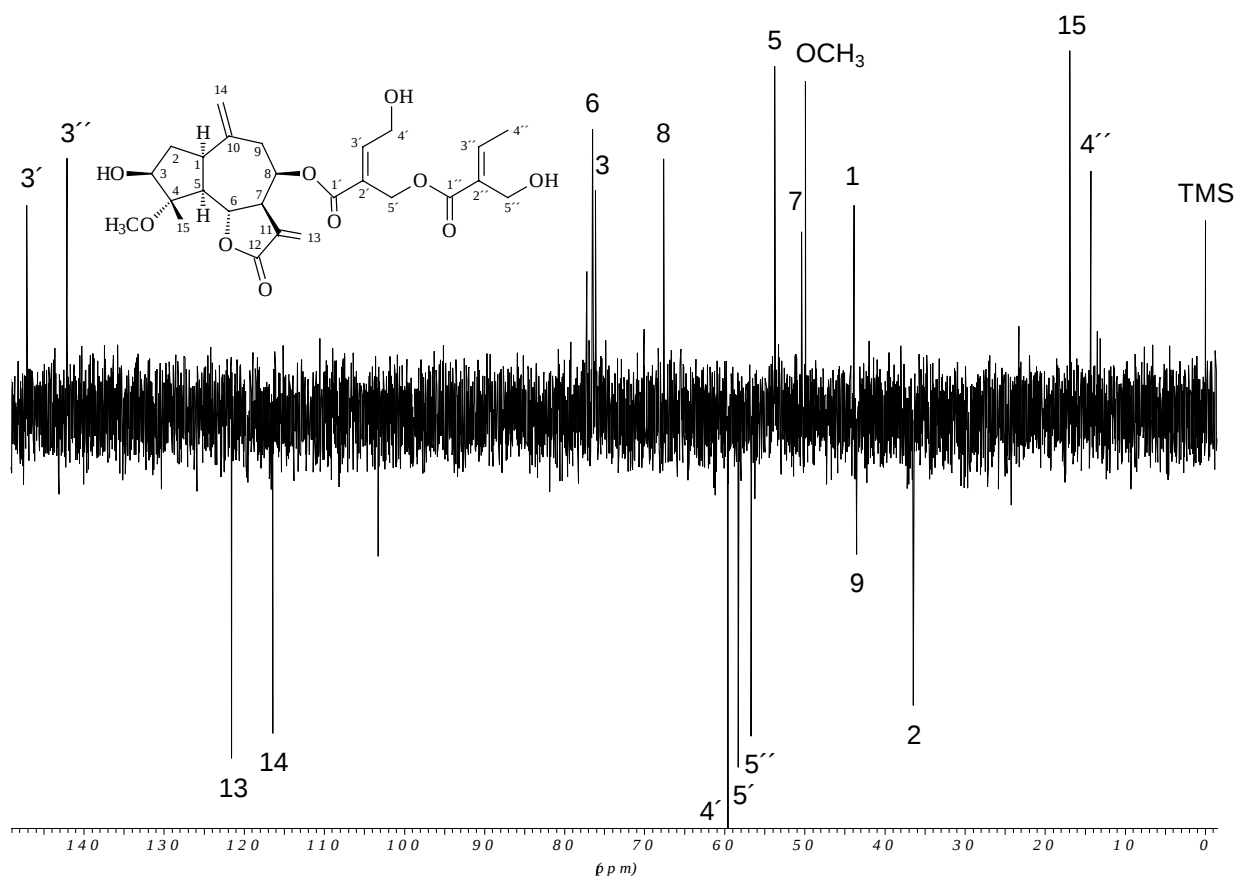


Bild 2.60: DEPT-Spektrum von Verbindung **SL11** (125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Aus diesen Kopplungen kann geschlossen werden, dass sich zwischen der Methin- (C-1) und der Methylengruppe (C-9) ein quartärer Kohlenstoff befindet. Dieses Atom ist mit der zweiten Exomethylengruppe (C-14) des Moleküls über eine Doppelbindung verbunden. Hieraus wiederum folgt, dass die Atome an den Positionen 5 bis 10 zu einem carbozyklischen Ring mit sieben Kohlenstoffatomen gehören. Die Kohlenstoffe an den Positionen 6 und 7 gehören neben diesem Cycloheptanring auch dem Exomethylen- γ -Lactonring der Verbindung an. Aus den δ -Werten für C-8 und H-8 lässt sich schließen, dass sich an dieser Position ein Sauerstoffhaltiger Substituent befinden muß. Die relativ starke Tieffeld-Verschiebung des Signals für H-8 und der Shift des korrespondierenden Kohlenstoffsignals ($\delta = 67.60$ ppm) sprechen für einen Acyloxy-Rest [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995; HESSE et al., 1995]. Dies macht es wahrscheinlich, dass die bekannte Säureseitenkette mit dem Kohlenstoffatom an Position 8 verknüpft ist. Hierfür spricht auch die Lage des Signals für C-8 im Vergleich mit Angaben aus der Literatur für strukturell ähnliche Substanzen [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995].

Ein weiterer Ringschluß lässt sich aus der ^3J -Kopplung zwischen dem Signal für einen Methinkohlenstoff bei 76.11 ppm (C-3) und dem Signal für H-5 bei 2.44 ppm ableiten. Zwischen beiden Molekülpositionen muß sich demnach ein quartärer Kohlenstoff befinden. Hierbei kann es sich nur um das Signal bei 86.16 ppm (C-4) handeln, da es das einzige noch nicht zugeordnete Signal für einen quartären Kohlenstoff darstellt und im HMBC-Spektrum eine ^3J -Kopplung mit dem Methylenproton bei 1.80 ppm (H-2 α) besteht. Das Signal des quartären C-Atoms zeigt noch zwei weitere longrange-Kopplungen: Eine ^2J -Kopplung mit dem Signal für drei Methylprotonen bei 1.50 ppm (H-15) und eine ^3J -Kopplung mit dem

Signal der Methoxygruppe bei 3.26 ppm. Die Methylprotonen bei 1.50 ppm korrespondieren im HMQC-Spektrum mit dem Kohlenstoffsignal bei 16.91 ppm (C-15). Somit konnten alle Signale aus dem ^1H NMR- und dem ^{13}C NMR-Spektrum zugeordnet werden. Der angesprochene zweite Ring besitzt fünf Glieder. Aus der Art der Verknüpfung dieses Fünf-Ringes mit dem bereits identifizierten Siebenring folgt, dass es sich bei **SL11** um ein trizyklisches SL vom Guaianolid-Typ handelt. Dies steht im Einklang mit dem aus der Summenformel $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$ berechneten Doppelbindungsäquivalent. Dieser Parameter errechnet sich für Verbindungen vom Typ $\text{C}_a\text{H}_b\text{O}_c$ nach der Formel: $\text{DB} = 0,5 (2a + 2 - b)$ und läßt Rückschlüsse auf die Anzahl der Doppelbindungen und Ringschlüsse in einem Molekül zu. Im konkreten Fall ergibt sich demnach: $\text{DB} = 0,5 (52 + 2 - 34) = 10$. Dieser Wert erlaubt nach Abzug der sieben im Molekül vorkommenden Doppelbindungen den Schluß auf die Existenz von drei carbozyklischen Ringen.

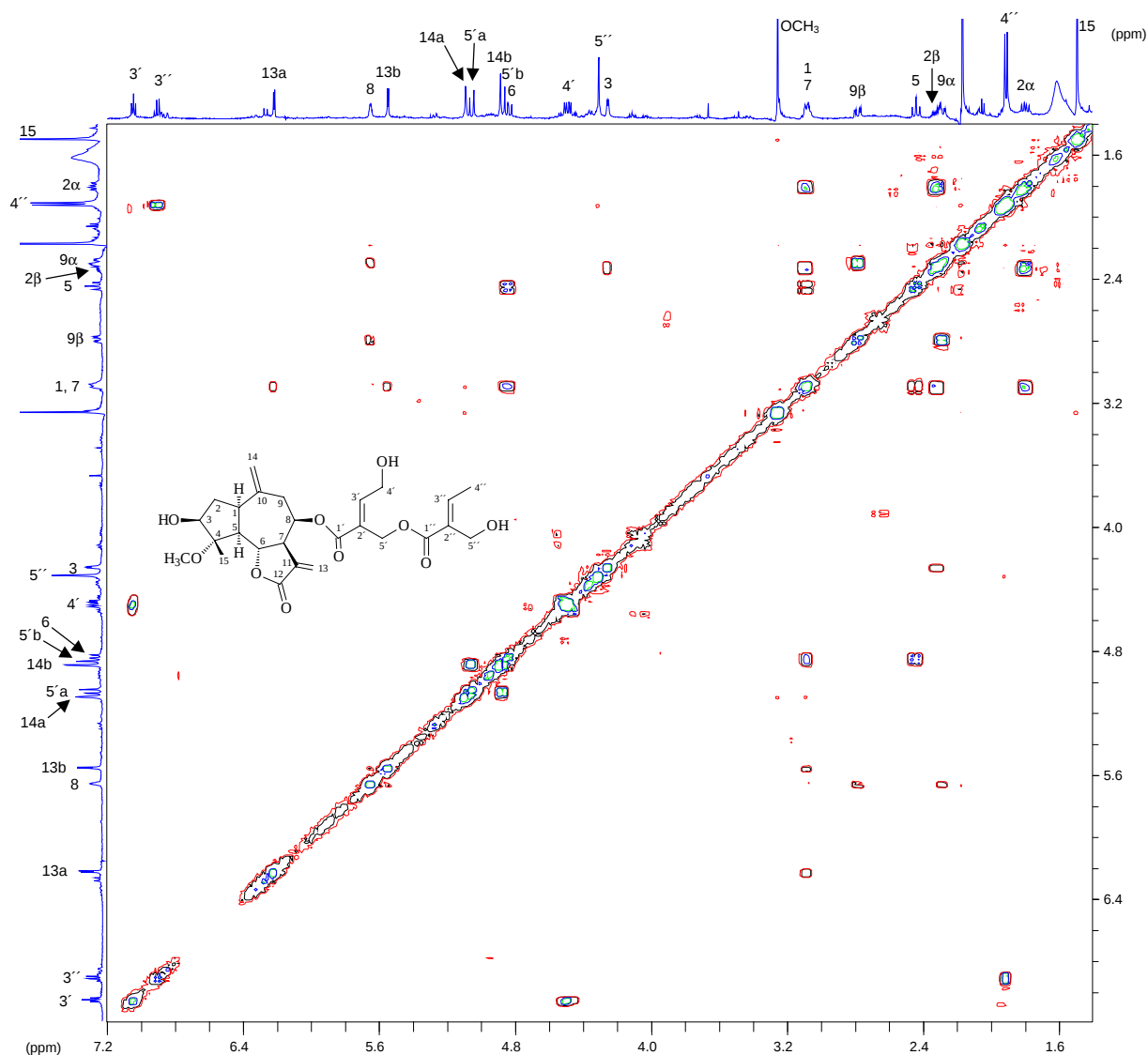


Bild 2.61: COSY-Spektrum von **SL11** (500 MHz, CDCl_3 , TMS)

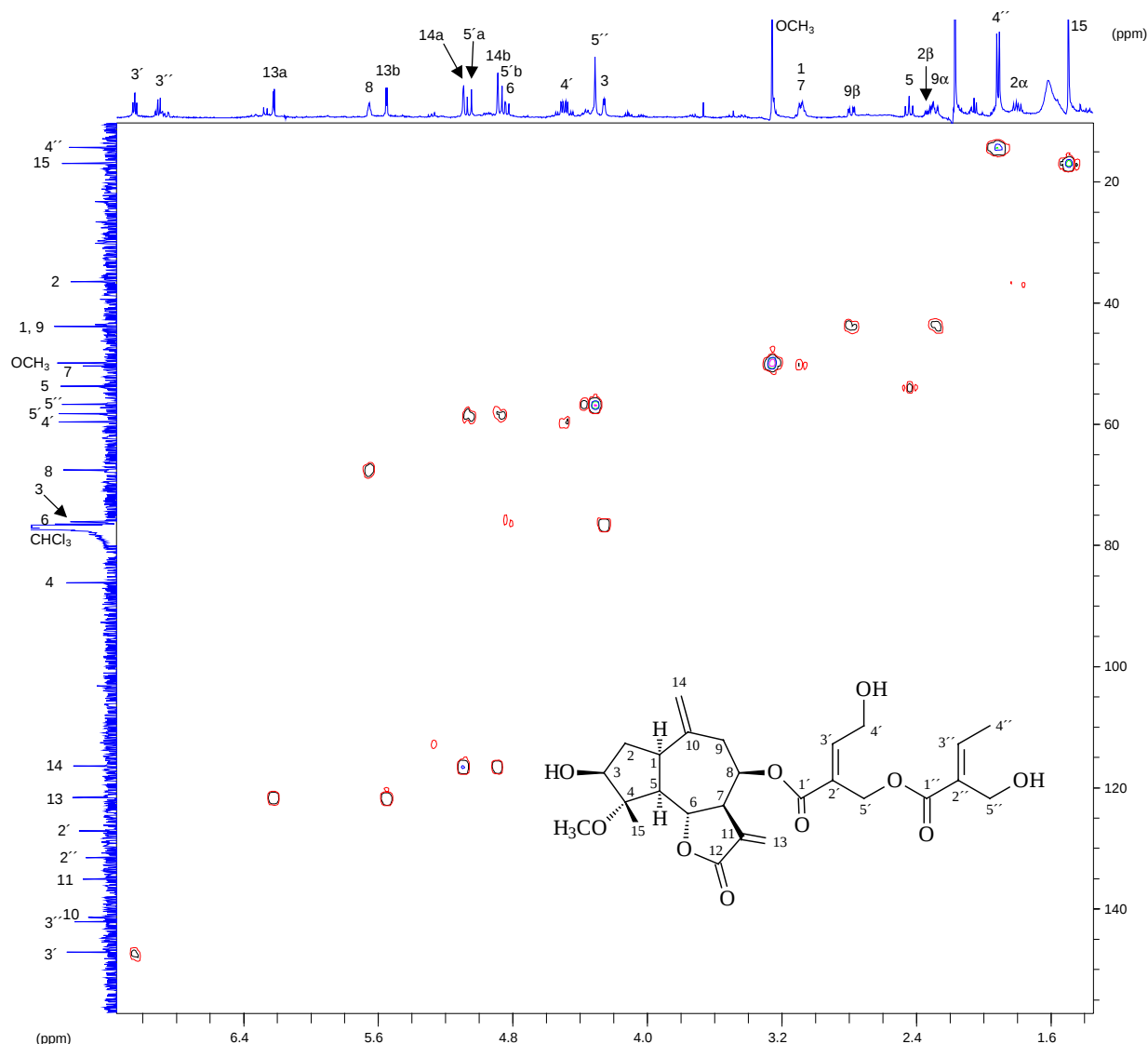


Bild 2.62: HMQC-Spektrum von Substanz **SL11** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Dass es sich bei **SL11** um ein Guaianolid und nicht um ein trizyklisches Eudesmanolid handeln muß, läßt sich schon aus der Aufspaltung des Signals für H-5 zum Triplett ableiten, zumal aus *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten neben Eudesmanoliden und Germacranoliden bislang keine trizyklischen SL anderer Grundstruktur isoliert worden sind [HASSON et al., 1995 und 1996]. Darüber hinaus passen die Shifts der Signale für H-1, H-5, C-1 und C-5 zu den in der Literatur angegebenen Daten für entsprechend aufgebaute Verbindungen [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995; ITO et al., 1982].

Bei allen bekannten 11(13)-Guaiadien-12,6-oliden ist das anguläre Proton an Position 5 α -ständig [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995; FISCHER et al., 1979; SEAMAN, 1982]. Dies trifft auch auf **SL11** zu. Was die relative Stereochemie an Position 1 betrifft, sind der Betrag der Kopplung mit H-5 (11.4 ppm) und der Shift von C-1 (43.84 ppm) starke Argumente für die Annahme einer α -Orientierung und damit für eine *cis*-Verknüpfung der beiden carbozyklischen Ringe des Guaian-Gerüsts [BOHLMANN et al., 1977b; BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995].

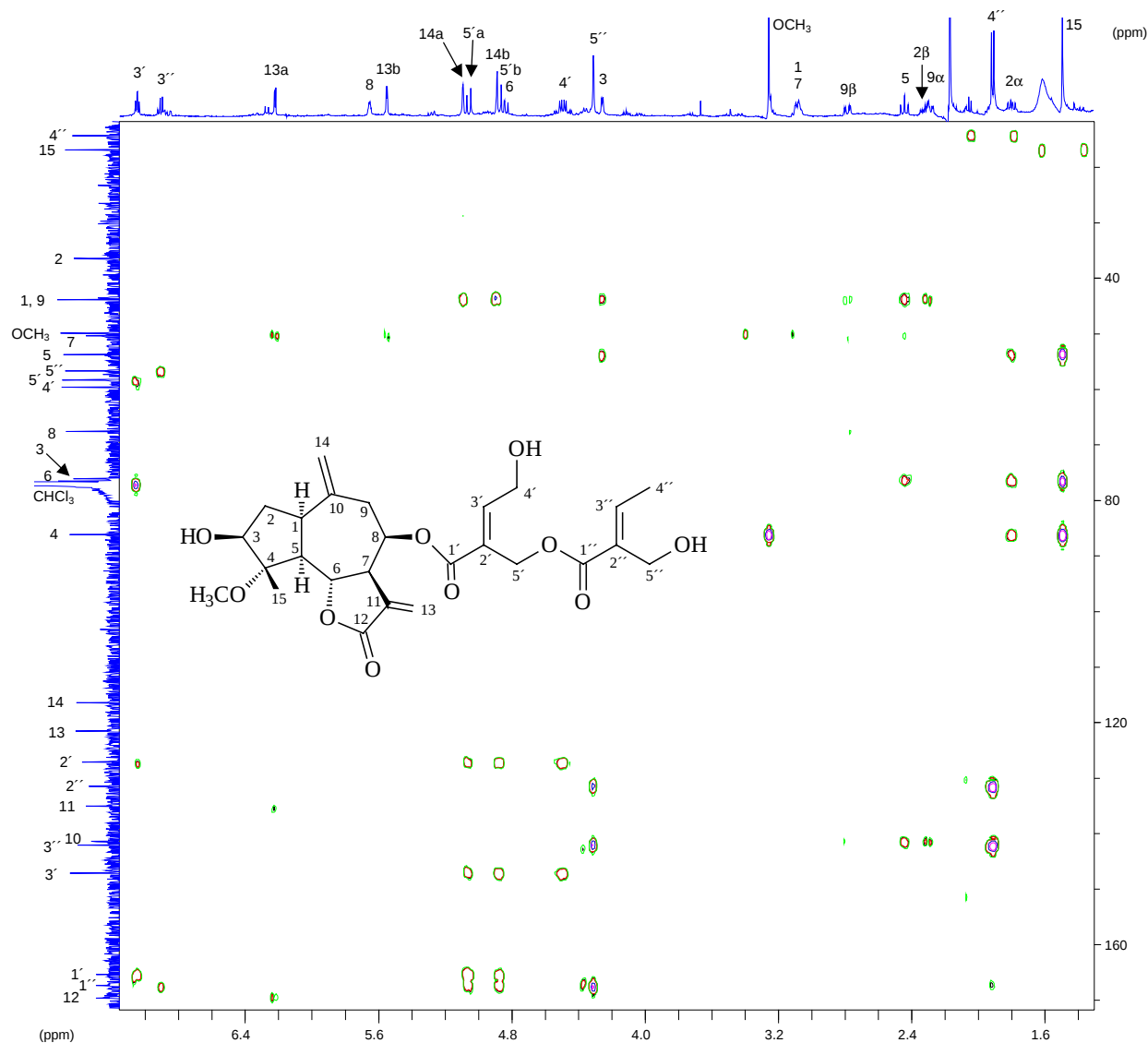


Bild 2.63: HMBC-Spektrum von Verbindung **SL11** (500 bzw. 125 MHz, CDCl_3 , TMS)

Bei *trans*-Guaianoliden dagegen beträgt die Kopplungskonstante der 1,5-Kopplung typischer Weise etwa 15 Hz [SKIBINSKI, 1990]. Der Betrag der Kopplung zwischen H-5 und H-6 (11.4 Hz) spricht für eine *trans*-diaxiale Kopplung. Die Orientierung von H-6 ist damit β . Die Kopplungskonstante für die Kopplung zwischen H-6 und H-7 beträgt 9.5 Hz. Damit koppeln diese beiden Atome ebenfalls *trans*-diaxial und H-7 ist α -ständig. Hieraus folgt, dass der 6,7-Lactonring ebenfalls die *trans*-Konfiguration besitzt. Die Kopplung von H-7 mit H-8 beläuft sich dagegen auf nur 5.7 Hz und liegt damit im Bereich der *cis*-Kopplungen. Hieraus ergibt sich, dass H-8 α - und der Acyloxy-Rest an C-8 β -ständig ist. Dies konnte durch den Bau eines Molekülmodells verifiziert werden. Ein weiteres Argument für die Annahme einer β -Acyloxy-Substitution von C-8 ist der Shift des korrespondierenden Signals im ^{13}C NMR-Spektrum (67.60 ppm). Würde sich an C-8 eine α -ständige freie oder veresterte OH-Gruppe befinden, wäre ein Shift größer als 70 ppm zu erwarten [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995]. Darüber hinaus läge in diesem Fall das Signal von H-8 im Bereich zwischen 5.00 und 5.20 ppm und nicht bei den beobachteten 5.65 ppm [FERNÁNDEZ et al., 1995; MERRILL und STEVENS, 1985].

Auf die Orientierung der Hydroxylgruppe an C-3 läßt sich durch den Shift des zugehörigen Signals (76.11 ppm) schließen. Nach dem Vergleich dieses Wertes mit entsprechenden Literaturangaben ist davon auszugehen, dass die Hydroxylgruppe β -orientiert ist. Bei einer α -Substitution wäre das Signal für C-3 im tieferem Feld zu suchen [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995].

Bei der Klärung der räumlichen Ausrichtung der Substituenten von C-4 gibt das NOESY-Spektrum wertvolle Hinweise. Ein Crosspeak zwischen dem Signal für die Methoxyprotonen bei 3.26 ppm und dem Signal des α -ständigen Protons an Position 5 bei 2.44 ppm dokumentiert einen NOE-Effekt zwischen diesen beiden Signalen. Der Bau eines Molekülmodells ergibt, dass eine solche Interaktion nur möglich ist, wenn die Methoxygruppe ebenfalls α -orientiert ist. Die Methylgruppe an C-4 nimmt damit die β -Position ein.

Faßt man alle Strukturinformationen zusammen, so muß es sich bei **SL11** um ein *cis*-Guaianolid mit der systematischen Bezeichnung 3 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxy-tigloyloxy)tigloyloxy]-4 α -methoxy-10(14),11(13)-guaiadien-12,6-olid handeln. In Anlehnung an das auf S. 29 beschriebene Verfahren konnte auch für **SL11** gezeigt werden, dass es sich bei dieser Substanz nicht um ein bei der Aufarbeitung mit Methanol entstandenes Artefakt handelt.

Von den 66 bislang aus *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten bekannten Guaianoliden sind einige strukturell mit **SL11** verwandt. Sie zeichnen sich ebenfalls durch eine 10(14)-Doppelbindung, die *cis*-Verknüpfung der Ringe und oft auch eine Esterseitenkette aus hydroxylierten ungesättigten C-5-Säuren aus. Beispiele sind etwa Funde in den Spezies *A. saltillensis* [FANG et al., 1988], *E. altissimum* [JAKUPOVIC et al., 1987], *E. brevipes* [GUERRERO et al., 1988], *E. chinense* [ITO et al., 1982] und *E. ligustrinum* [ROMO et al., 1968]. Im Gegensatz zu diesen Verbindungen zeichnet sich **SL11** durch die Dioxygenierung des Cyclopentan-Ringes an den Positionen 3 und 4 aus. Bei **SL11** handelt es sich um einen neuen Naturstoff.

2.2 Isolierung und Identifizierung von Flavonoid-Aglyka aus *Eupatorium semialatum*

Unter dem Begriff „Flavonoide“ faßt man eine große Gruppe von pflanzlichen Sekundärstoffen zusammen, bei deren Genese Metabolite aus zwei Biosynthesewegen vereinigt werden (siehe Bild 2.64, S. 83). Der B-Ring und die Kohlenstoffatome des C-Ringes leiten sich von der *para*-Cumarsäure aus dem Shikimat-Weg ab. Die Abstammung des A-Ringes von den Acetogeninen erkennt man an den *meta*-ständigen Sauerstoff-Funktionen. Man bezeichnet die Flavonoide wegen der unterschiedlichen biosynthetischen Herkunft ihrer Bausteine deshalb oft als „gemischte Polyketide“. Die im Verlauf der Biosynthese zunächst gebildeten Chalkone zyklisieren leicht zu Flavanonen. Von diesen einfachen Flavonoiden leiten sich die zahlreichen anderen Untergruppen ab, die sich von den Flavanonen durch den Oxidationsgrad an C-2, C-3 und C-4 unterscheiden. Innerhalb der Flavonoid-Untergruppen wird das Grundgerüst in mannigfacher Weise durch Hydroxylierung, Veretherung, Prenylierung und schließlich Glykosidierung sekundär verändert, so dass eine Vielzahl von Molekülvariationen realisiert wird [CAO et al., 1997; HÄNSEL et al., 1999].

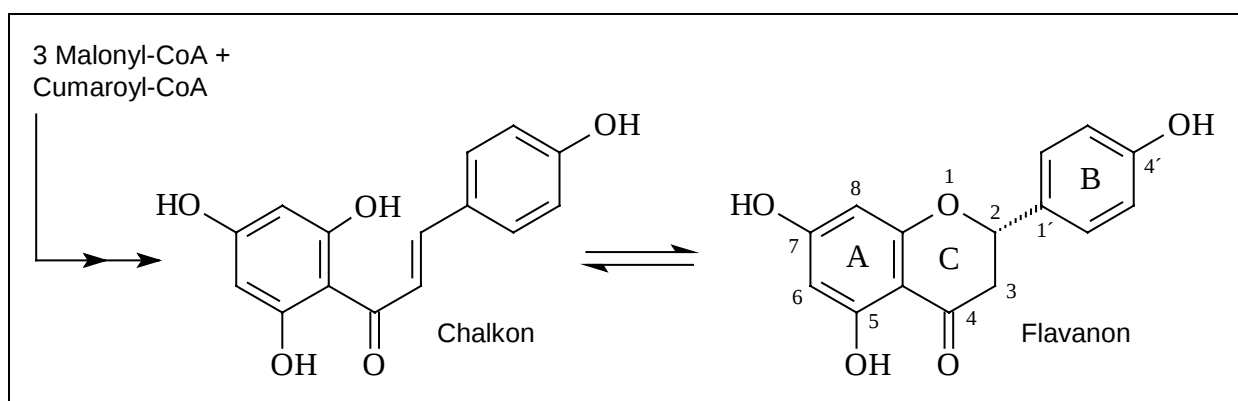


Bild 2.64: Biosynthese der Flavonoide

Zur Zeit sind mehr als 4000 verschiedene Flavonoide bekannt. Der Name der Verbindungen geht auf die Verwendung Flavonoid-reicher Pflanzen zum Gelbfärben von Wolle und Baumwolle zurück (das lateinische „flavus“ bedeutet „gelb“). Die gelbe Farbe zeichnet zwar nicht alle Flavonoide aus, ist jedoch für einen Großteil ihrer Vertreter typisch [CAO et al., 1997; HÄNSEL et al., 1999]. Den Pflanzen dienen die Flavonoide nicht nur als Pigmente, sondern auch als Botenstoffe, z.B. bei der Symbiose zwischen Fabaceae und Knöllchenbakterien [HUNGRIA und STACEY, 1997]. Die Flavonoide sind, sowohl was ihre Chemie als auch was ihre pharmakologischen Wirkungen angeht, sehr gut erforscht. In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Testsystemen konnten die unterschiedlichsten Effekte dokumentiert werden, bei denen die Flavonoide eine Fülle von Enzymen und physiologischen Prozessen beeinflussen. Als Beispiele seien exemplarisch die Enzyme ATPase, Lipoxygenase, Cyclooxygenase, Xanthinoxidase, Phospholipase A₂, Reverse Transkriptase, Protease, Proteinkinase C und DNA-Topoisomerase genannt [BERNARD et al. 1997; CAO et al., 1997; LACAILLE-DUBOIS und WAGNER, 1996; LINDAHL und TAGESSON, 1997; MIDDLETON, 1996]. Darüber hinaus sind Flavonoide in der Lage, mit bestimmten Rezeptoren wie z.B. dem Benzodiazepin-Rezeptor, zu interagieren [MEDINA et al., 1997]. Sie können antikanzerogen,

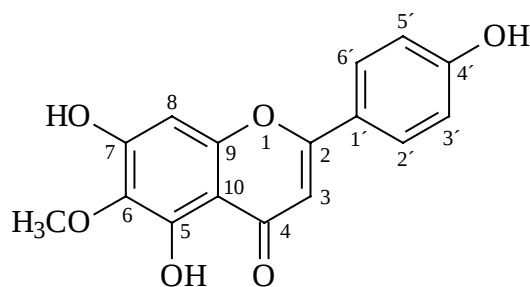
antilipoperoxidativ, antiischämisch, antiallergisch, antiviral, antiinflammatorisch und antikoagulativ wirken [CAO et al., 1997; LACAILLE-DUBOIS und WAGNER, 1996; MIDDLETON, 1996]. Seit einiger Zeit haben die positiven Wirkungen von antioxidativ wirksamen Flavonoiden, die in bestimmten pflanzlichen Nahrungsmitteln gehäuft vorkommen, vermehrte Aufmerksamkeit auf sich gezogen [METZ, 2000; YOKAZAWA et al., 1997]. Die antioxidative Potenz beruht auf der Chelatisierung von Metallionen, der Reduktion mutagener Oxidantien, dem Einfang reaktiver Sauerstoff-Spezies, dem Kettenabbruch radikalischer Reaktionen, der Funktion als Quencher bei der Bildung von Singulett-Sauerstoff und vor allem auf der Protektion von Ascorbinsäure [HALL und CUPPETT, 1997; KANDASWAMI und MIDDLETON, 1997]. In diesem Kontext wird diskutiert, dass diätären oder additiv verabreichten Flavonoiden bei der Prävention der koronaren Herzkrankheit, von Apoplexen oder Krebsleiden eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zukommt [CAO et al., 1997; DUTHIE et al., 1997]. Andere Autoren bringen den günstigen Einfluß auf das kardiovaskuläre System und die Blockade von Sexualhormon-abhängigen Proliferationsvorgängen mit der phytoöstrogenen Wirkung bestimmter Isoflavone und Lignane in Verbindung [BARTHA et al., 1997]. Den vielen förderlichen Eigenschaften stehen jedoch auch potentiell mutagene Effekte mancher Flavonoide gegenüber, obwohl Mutagenität bislang nur *in vitro* beobachtet werden konnte [CAO et al., 1997; DUTHIE et al., 1997; HOLLMAN und KATAN, 1997]. Ein früher eher vernachlässigtes Forschungsgebiet ist die Untersuchung der Resorption und Metabolisierung flavonoidischer Verbindungen im Säugetier-Organismus. Trotz intensiver Forschungen in den letzten Jahren sind noch viele Fragen offen. Der zentrale Streitpunkt ist nach wie vor, welche Metaboliten für die vielen verschiedenen Wirkungen der Flavonoide verantwortlich sind [HEILMANN und MERFORT, 1998a und 1998b].

2.2.1 Extraktion und Fraktionierung

Der überwiegende Teil der Flavonoid-Aglyka (**FA1** – **FA5** und **FA9**) konnte aus Fraktion D-IV des Dichlormethan-Extraktes isoliert bzw. nachgewiesen werden. Hierzu wurde diese Fraktion durch SC und präp. DC weiter aufgetrennt (siehe Kap. 6.5.3.2, S. 310). Die übrigen Flavonoid-Aglyka **FA6** – **FA8** wurden aus dem Methanol-Extrakt isoliert. Dazu wurden 40 g dieses Extraktes SC an Sephadex LH-20 aufgetrennt. Hierbei konnten die Fraktionen MI bis MXI gebildet werden, die neben den Verbindungen **FA6** – **FA8** hauptsächlich Flavonoid-Glykoside und Kaffeoyl-Chinasäuren enthielten. Die Flavonoid-Aglyka konnten nach SC, präp. DC und LPLC als Reinsubstanzen erhalten werden (siehe Kap. 6.5.5.6, S. 322 bis Kap. 6.5.5.8, S. 323).

Die R_f -Werte in verschiedenen DC-Fließmittelsystemen und das Detektionsverhalten der Flavonoid-Aglyka **FA1** bis **FA8** sind Tabelle 6.1 (S. 298) zu entnehmen.

2.2.2 Hispidulin = 4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavon (Verbindung FA1)



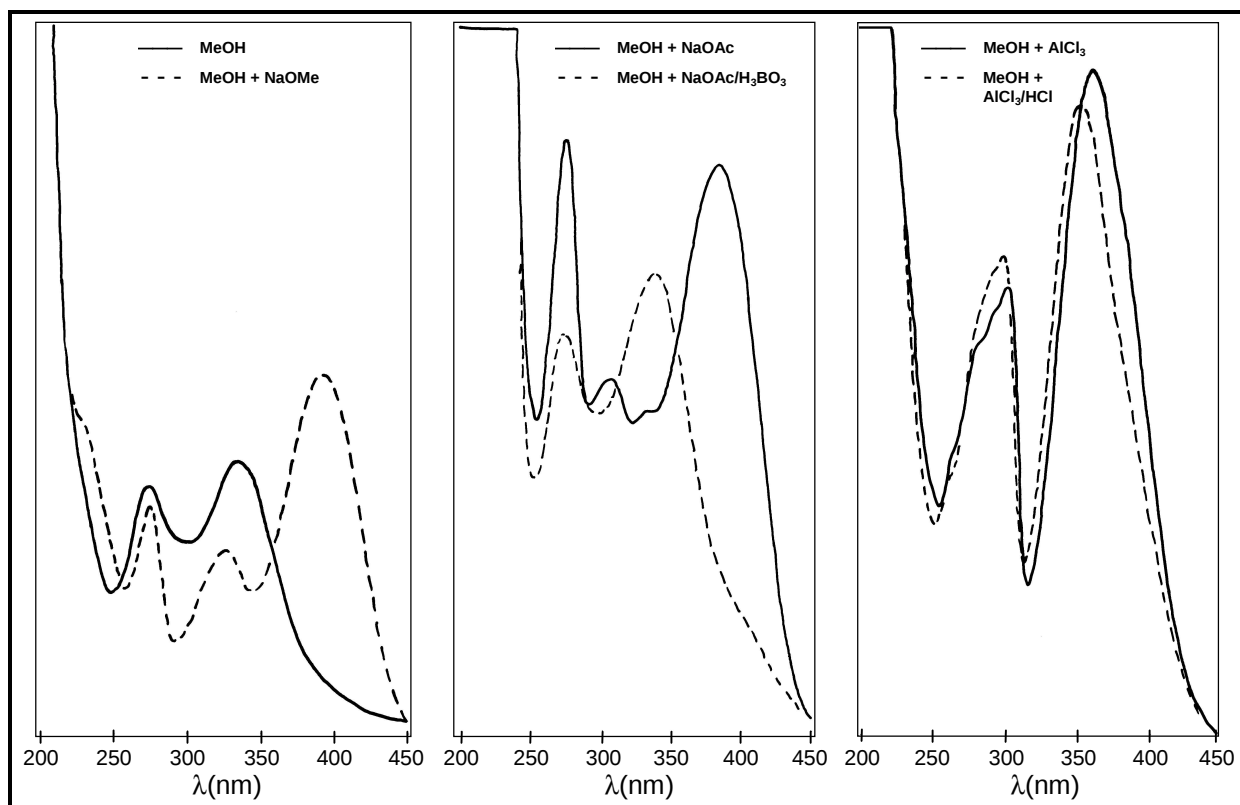
Verbindung **FA1** konnte in einer Ausbeute von 10 mg aus Fraktion D-IV DC-rein gewonnen werden (siehe Kap. 6.5.3.2, S. 310).

Flavonoide zeigen auf der DC bereits vor dem Besprühen im UV-Licht (365 nm) ein charakteristisches Fluoreszenzverhalten. So zeigen Flavonole vom Typ des Kämpferols bzw. Quercetins sowie deren an C-3', C-4' und/oder C-7 methylierten Derivate orangegelbe Fluoreszenz verschiedener Nuancen. Eine Methylierung oder der Wegfall der OH-Gruppe an C-5 bewirkt eine zitronengelbe Fluoreszenz. Ist die 3-OH-Gruppe methyliert oder nicht vorhanden (Flavone), so fehlt die Fluoreszenz und der Substanzfleck erscheint dunkel [WOLLENWEBER, 1982]. Weitere Strukturinformationen lassen sich aus dem Verhalten der Flavonoidzonen gegenüber dem „Naturstoffreagenz A“ gewinnen. So zeigen Flavonole nach dem Sprühen eine grünlichgelbe Fluoreszenz. Flavone und 3-Methoxyflavone werden gelb oder auch grünlich, 6- und 8-substituierte Flavonoide zeigen dunkle Farben [WOLLENWEBER, 1982].

Nach dem Auftragen der im Tageslicht hellgelben Substanz **FA1** auf eine DC-Folie mit Fluoreszenzindikator erschien sie unter UV-Licht von 365 nm lediglich als dunkler Fleck. Dieses Fluoreszenzverhalten deutete auf ein Flavon oder 3-Methoxyflavon hin. Nach dem Besprühen der DC mit Naturstoffreagenz A zeigte die Substanzbande nun bei derselben Wellenlänge eine dunkle Orangefärbung. Dies ist ein Indiz dafür, dass es sich bei **FA1** um ein Flavonoid mit C-6- und/oder C-8-Substitution handelt.

Die Analyse der UV-Spektren von Flavonoiden lässt bereits viele Rückschlüsse auf die Struktur zu. Eine Reihe von Autoren haben die aus den Spektraldaten ableitbaren Informationen publiziert [CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971; MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982; VOIRIN, 1983].

Die UV-Spektren von Flavonen und Flavonolen in Methanol zeigen zwei Hauptbanden im Bereich zwischen 240 und 400 nm. Die längerwellige Bande (300 bis 400 nm) wird dem Cinnamoyl-System des B-Ringes zugeschrieben und als Bande I bezeichnet. Die kürzerwellige Bande (240 bis 280 nm) wird Bande II genannt und durch den Benzoyl-Chromophor (A-Ring) verursacht. Darüber hinaus lassen sich durch den Einsatz von verschiedenen Shiftreagenzien (siehe 6.3.3, S. 303) Spektren erhalten, die sich vom Methanol-Spektrum in spezifischer Weise unterscheiden und damit wichtige Rückschlüsse auf Struktur und Substitutionsmuster des Flavonoids gestatten [MABRY et al., 1970].

Bild 2.65: UV-Spektren von Verbindung **FA1**Tabelle 2.12: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FA1** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
275	276	277	276	263 sh	263 sh
337	325	305 sh	337	285 sh	285 sh
	390	330 sh	400 sh	302	300
		386		359	352

Das UV-Spektrum von **FA1** in Methanol (siehe Bild 2.65, S. 86 und Tabelle 2.12, S. 86) zeigt die Bande I bei 337 nm im für Flavone oder Flavonole mit substituierter 3-OH-Gruppe erwarteten Bereich [MARKHAM, 1982]. Weil diese Bande nicht aufgespalten ist, kann das C-8 nicht substituiert sein [VOIRIN, 1983]. Das Aussehen der kürzerwelligen Bande II läßt Aussagen über das Substitutionsmuster des B-Ringes zu. Die Bande erscheint hier als symmetrischer Peak ohne Schultern oder Flexionen, woraus folgt, dass der B-Ring entweder mono- oder trisubstituiert ist. Bei Disubstitution wäre eine Störung der Symmetrie zu erwarten gewesen. Zur weiteren Eingrenzung ist die Lage des Maximums von Bande II hilfreich. Im Falle einer Trisubstitution müßte das Absorptionsmaximum unter 260 nm liegen. Im Spektrum von **FA1** befindet es sich jedoch bei 275 nm. Dieser Wert spricht eindeutig für eine Monosubstitution [CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971]. Die Lage der Bande I zeigt an, ob sich an Position 4' eine Hydroxy- oder eine Methoxygruppe befindet. Im ersten Fall liegt Bande I bei durchschnittlich 336 nm, im zweiten Fall jedoch bei 327 bis 329 nm

[VOIRIN, 1983]. Die Lage der Bande I im Spektrum von **FA1** (337 nm) ist ein Indiz dafür, dass **FA1** einen *para*-hydroxylierten B-Ring besitzt.

Durch den Zusatz von methanolischer Natriummethanolat-Lösung werden alle OH-Gruppen von Flavonen und Flavonolen deprotoniert. Dabei nimmt die Azidität der Hydroxylgruppen in der Reihenfolge 7-OH > 4'-OH > 3-OH > 5-OH merklich ab [MABRY et al., 1970]. In Folge der dadurch bedingten Erweiterung der Chromophore werden die Absorptionsbanden bathochrom verschoben. Dieser Shift liegt bei Flavonoiden mit einer 4'-OH-Gruppe zwischen 40 und 65 nm. Dabei nimmt die Peakintensität nicht ab. Fehlt dagegen die 4'-OH-Gruppe, tritt zwar ein ähnlich hoher Shift auf, die Peakintensität ist gegenüber dem Methanol-Spektrum jedoch deutlich geringer [MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982]. Das NaOMe-Spektrum von **FA1** zeigt einen bathochromen Shift der Bande I von 53 nm, wobei die Intensität der Bande im Vergleich mit dem Methanol-Spektrum höher ist. Dieser Befund sichert die schon an Hand des Methanol-Spektrums abgeleitete 4'-Mono-Hydroxylierung des B-Ringes ab. Weil das UV-Spektrum von **FA1** in der stark alkalischen Lösung auch nach fünf Minuten keine Degenerationserscheinungen zeigte, können Alkali-sensitive Substitutionsmuster (3,4'-Dihydroxy, *ortho*-Dihydroxy im A-Ring oder drei benachbarte OH-Gruppen im B-Ring) ausgeschlossen werden [MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982]. An Hand des Natriummethanolat-Spektrums läßt sich auch die Substitution an C-7 erschließen. Im Falle einer freien OH-Gruppe an diesem Atom erscheint im Spektrum eine dritte, manchmal nur schwache Absorptionsbande zwischen 305 und 350 nm, die als Bande III bezeichnet wird. Sie erscheint in allen 7-Hydroxyflavonen und -flavonolen mit einem 4'-monohydroxylierten B-Ring (Apigenin-Typ) als getrennter Peak, während sie bei Flavonoiden mit höher oxygeniertem B-Ring als Schulter im kurzwelligen Bereich von Bande I zu sehen ist. Im Gegensatz dazu erkennt man im Methanolat-Spektrum von Flavonen und Flavonolen, deren 7-OH-Gruppe verethert oder verestert ist, keine dritte Bande [BACON et al., 1976]. Das Spektrum von **FA1** spricht eindeutig für eine freie OH-Gruppe an C-7, da bei 325 nm eine deutlich differenzierte Bande zu erkennen ist.

Auch Natriumacetat-Lösung vermag phenolische OH-Gruppen zu deprotonieren. Infolge ihrer geringeren Basizität sind allerdings nur die stärker aziden OH-Gruppen davon betroffen (C-7-, C-4'- und C-3-OH). Die dadurch ausgelöste bathochrome Verschiebung von Bande I ist nicht mehr so groß wie bei der Verwendung von Natriummethanolat. Bande II wird in Natriumacetat nur durch Deprotonierung einer eventuell vorhandenen OH-Gruppe an C-7 beeinflusst. Die Spanne des Shifts beträgt bei einer solchen Substitution üblicher Weise 5 bis 20 nm. Liegt allerdings ein Flavon vor und sind an C-6 und/oder C-8 Sauerstoff-Substituenten, so ist der Shift nur gering oder nicht erkennbar. Die verschiedenen Autoren erklären dies mit einer Herabsetzung der Azidität der Hydroxylfunktion an C-7 durch positiv induktive und mesomere Effekte sowie durch eine sterische Hinderung des Basenangriffs [MABRY et al., 1970; HARBORNE und MABRY, 1982]. Die bathochrome Verschiebung von Bande II (2 nm) im Spektrum von **FA1** deutet auf die zuletzt beschriebene Konstellation im A-Ring hin. Da bereits aus dem Methanol-Spektrum geschlossen werden konnte, dass C-8 unsubstituiert ist, muß im Falle von **FA1** eine C-6-OR-Gruppe vorliegen. Bei dem Rest R kann es sich nicht um ein Wasserstoffatom handeln, da die beobachtete Stabilität des Methanolat-Spektrums eine *ortho*-Dihydroxygruppe im A-Ring von **FA1** ausschließt. Bande I ist gegenüber dem Methanol-Spektrum hypsochrom verschoben. Dies ist als zusätzliches

Indiz für eine freie OH-Gruppe an C-7 zu werten [BACON et al., 1976].

Sättigt man die Untersuchungs-Lösung zusätzlich zum Natriumacetat noch mit Borsäure, so kommt es bei vorhandenen *ortho*-Dihydroxygruppen im A- oder B-Ring zu einem bathochromen Shift von Bande I [MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982]. Da *ortho*-Dihydroxygruppen schon an Hand des Methanolat-Spektrums ausgeschlossen werden konnten, treten bei **FA1** keine Shifts mit Natriumacetat und Borsäure auf.

Der Chelatbildner Aluminiumchlorid bildet mit der 4-Oxo-Gruppe und den OH-Gruppen an C-3 und C-5 sowie mit *ortho*-Dihydroxygruppen fünf- (Flavonole) oder sechs-gliedrige (Flavone) Komplexe. Bande I und Bande II werden dadurch aufgespalten und bathochrom verschoben. Die mit den Hydroxylgruppen an C-3 oder C-5 und der 4-Oxo-Gruppe gebildeten Komplexe sind säurestabil, während die Chelate mit *ortho*-Dihydroxygruppen dagegen säurelabil sind. Die Zugabe von Salzsäure zur Untersuchungslösung führt in solchen Fällen zu einer hypsochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima gegenüber dem Aluminiumchlorid-Spektrum [MABRY et al., 1970]. Im Aluminiumchlorid-Spektrum von **FA1** erscheint im langwelligen Bereich des Spektrums Bande I als Einzelpeak, der gegenüber der Lage in Methanol um 22 nm bathochrom verschoben ist. Dies kann nach den Angaben in der Literatur als Indiz für eine freie OH-Gruppe an C-5 mit einer Hydroxyl- oder Methoxygruppe an C-6 gewertet werden [JURD, 1969; VOIRIN, 1983]. Der Betrag des Shifts spricht im Falle von **FA1** eher für eine 6-Methoxygruppe, da nach MARKHAM (1982) bei Vorliegen einer solchen Gruppierung mit einer bathochromen Verschiebung von 16 bis 23 nm zu rechnen ist. Demgegenüber würde eine freie OH-Gruppe an C-6 zu einem Shift von +25 bis +30 nm führen [HARBORNE und MABRY, 1982].

Nach Zugabe von Salzsäure zur AlCl_3 -haltigen Untersuchungslösung von **FA1** zeigt das Spektrum praktisch keine Veränderung. Diese Säurestabilität untermauert die schon vorher gefolgerte Abwesenheit von *ortho*-Dihydroxygruppen bei **FA1**. Durch das fast identische Aussehen beider Spektren kann auch die 4'-Hydroxy-6-Methoxy-Substitution von **FA1** erneut bestätigt werden, da in solchen Fällen nach VOIRIN (1983) identische Banden bei etwa 303 nm und Schultern oder Inflexionen bei 262 und 291 nm ein Merkmal von 6-Methoxyflavonen mit 4'-Substitution sind.

Faßt man die Ergebnisse aus den UV-spektroskopischen Untersuchungen an **FA1** zusammen, so kann man festhalten, dass es sich entweder um 4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavon oder um 4',5,7-Trihydroxy-3,6-dimethoxyflavon handeln muß.

Aus dem DCI-MS-Spektrum von **FA1**, in dem ein Pseudomolekülion bei m/z 301 auftritt, ergibt sich die molare Masse von **FA1** zu 300 g/mol.

Weitere wichtige Hinweise auf die Struktur von Flavonoid-Aglyka liefert die Massenspektroskopie. Bei der EI-MS ohne Derivatisierung wird die Probe mit einem Direkteinlaßsystem in die Ionenquelle eingebracht, da die Substanzen meist nur schwer verdampfbar sind bzw. zur Zersetzung neigen. In seltenen bisher beschriebenen Fällen war auch eine GC-MS-Analyse durchgeführt worden [SCHMIDT et al., 1993 und 1997], die aber in diesem Fall zu keinem Ergebnis führte. Durch die Elektronenstoß-Ionisation zerfallen Flavonoid-Aglyka nach zwei Hauptmechanismen (siehe Bild 2.66, S. 89). Weg 1 verläuft unter Genese der beiden Schlüsselbruchstücke A_1^{+*} und B_1^{+*} nach dem Mechanismus einer Retro-Diels-Alder-Reaktion. Bei Weg 2 entsteht neben Dehydrobenzol und einem Ketenradikal das Schlüsselbruchstück B_2^+ [HARBORNE et al., 1975].

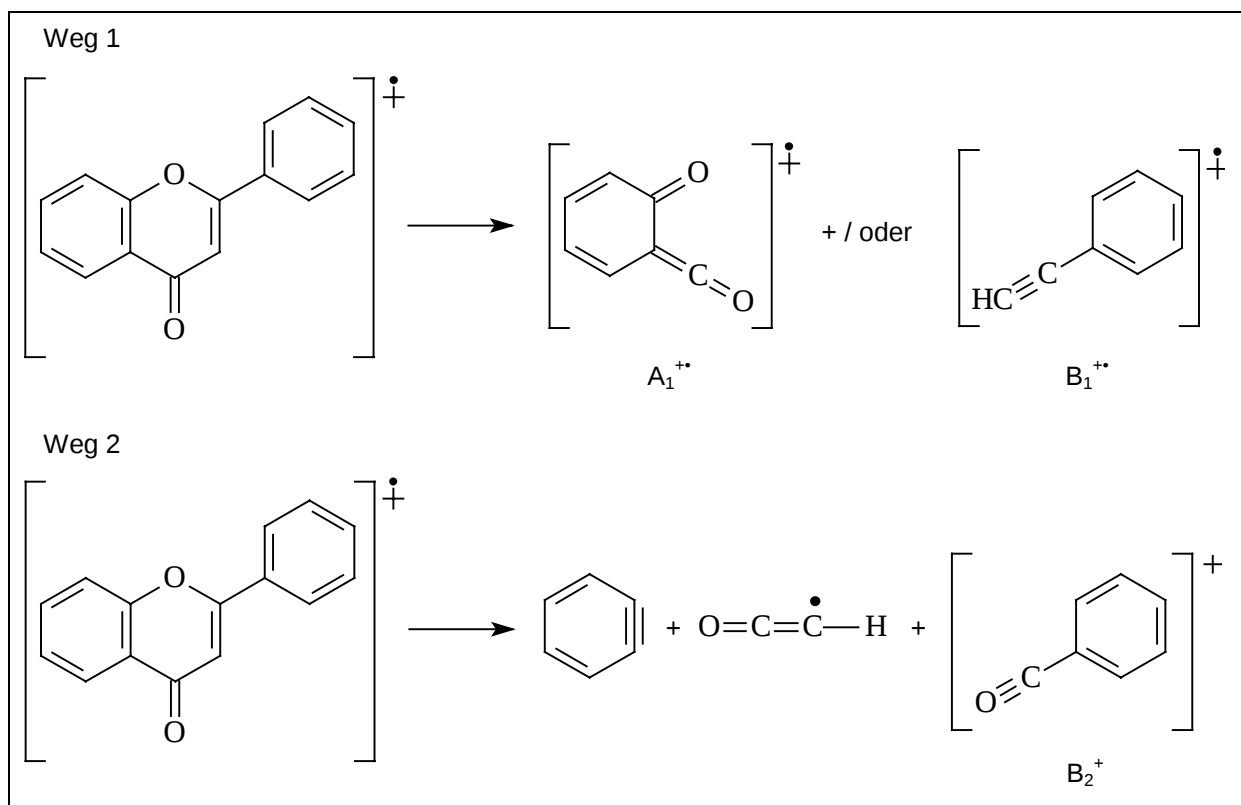
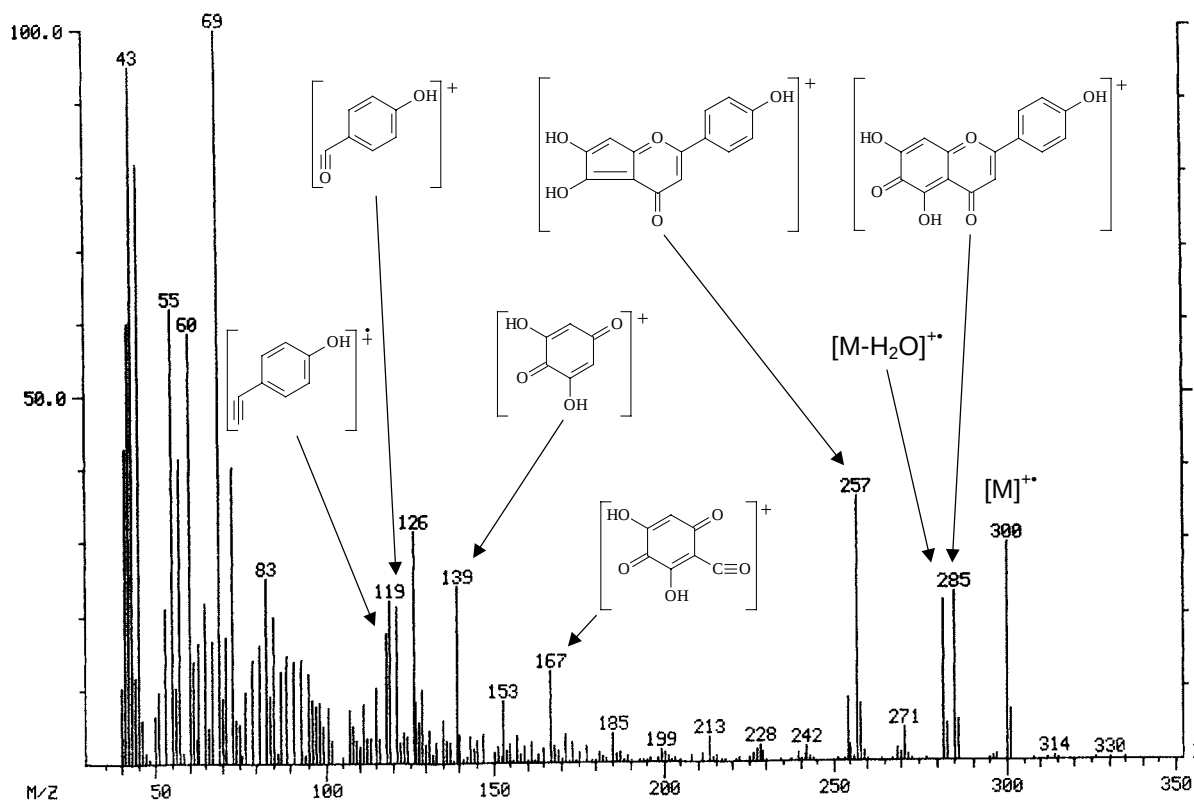


Bild 2.66: Haupt-Fragmentierungswege bei der Elektronenstoß-Ionisation von Flavonoiden

Bild 2.67: EI-MS-Spektrum von **FA1**

Im EI-MS-Spektrum von **FA1** (siehe Bild 2.67, S. 89) findet sich der Molpeak bei m/z 300, was mit dem bereits aus dem DCI-MS-Spektrum abgeleiteten Molekulargewicht von 300 g/mol in Einklang steht. Für 6-Methoxyflavonoide ist typisch, dass der $[M-CH_3]^+$ -Peak relativ intensiv ist und der sonst bei Flavonen beobachtete $[M-1]^+$ -Peak deutlich an Höhe einbüßt bzw. gar nicht mehr registriert wird [KINGSTON, 1971]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das $[M-CH_3]^+$ -Kation energetisch so stark begünstigt ist, da es ein vergleichsweise stabiles chinoides Kation bilden kann (siehe Bild 2.67, S. 89). Andere Autoren schließen durch das vollständige Fehlen des $[M-1]^+$ -Ions eine zusätzliche Methoxygruppe an C-3 aus [GOUDARD et al., 1978; HARBORNE und MABRY, 1982]. GOUDARD et al. (1978) folgern darüber hinaus aus einem Molpeak, der größer als der $[M-CH_3]^+$ -Peak ist, dass das entsprechende Molekül 5,7-Dihydroxy-6-methoxy-, 5-Hydroxy-6,7-dimethoxy- oder 5,7,8-Trimethoxy-Substitution besitzt. Macht der $[M-H_2O]^{++}$ -Peak mehr als 10% des Basispeaks aus, so muß es sich um die 5,7-Dihydroxy-6-methoxy-Substitution handeln.

Das Spektrum von **FA1** bestätigt durch die relativen Intensitäten der Peaks für die Ionen $[M]^{++}$, $[M-CH_3]^+$ und $[M-H_2O]^{++}$ die Zugehörigkeit zur letztgenannten Gruppe von Flavonoiden mit 5,7-Dihydroxy-6-methoxy-Substitution. Ein weiteres Kennzeichen von 6-Methoxy-Flavonoiden ist die geringe Intensität der unveränderten Retro-Diels-Alder-Bruchstücke und des B_2^+ -Ions. An die Stelle dieser Schlüsselionen treten Spezies, die durch Abspaltung von Methylradikalen und CO aus den Schlüsselionen hervorgehen [HARBORNE et al., 1975; KINGSTON, 1971]. Bei **FA1** sind das die Ionen mit den Massen 126, 139 und 167 amu. Die Tatsache, dass das Spektrum von **FA1** kein $[A_1+H]^+$ -Kation anzeigt, ist ein Hinweis darauf, dass die Verbindung ein Flavon und kein Flavonol ist [AUDIER, 1966].

Somit konnte das aus den UV-Spektren abgeleitete Substitutionsmuster des A-Ringes von **FA1** durch die Ergebnisse der MS-Untersuchungen verifiziert werden.

Das in Methanol- d_4 aufgenommene ^{13}C NMR-Spektrum von **FA1** zeigt vierzehn Signale, von denen zwei jeweils zwei Kohlenstoffen entsprechen. Es handelt sich dabei um die äquivalenten C-Atome des B-Ringes C-2' und C-6' (129.33 ppm) bzw. C-3' und C-5' (117.76 ppm). Flavone lassen sich an Hand des Shifts für C-3 eindeutig von Flavonol-Derivaten unterscheiden. Das Signal für C-3 liegt bei Flavonen zwischen 100 und 110 ppm, während es sich bei Flavonolen zwischen 130 – 140 ppm befindet [HARBORNE und MABRY, 1982]. Im Spektrum von **FA1** findet sich das Signal für C-3 in direkter Nachbarschaft zu dem für C-10 (102.54 ppm) bei 102.42 ppm. Dies bedeutet, dass es sich bei **FA1** um ein Flavon handelt. Darüber hinaus kommt die an Hand der UV-Spektren noch denkbare 3-Methoxygruppe nicht mehr in Frage, da das ^{13}C NMR-Spektrum von **FA1** nur ein Signal im Bereich der Methoxykohlenstoffe (um 60 ppm) zeigt. Dieses Signal bei 60.72 ppm korrespondiert mit dem C-Atom der 6-Methoxygruppe. Die verbleibenden neun Signale lassen sich zweifelsfrei an Hand der Vergleichsdaten von AGRAWAL (1989), DE VILLARRAGA und DE PÉREZ (1994) sowie HARBORNE und MABRY (1982) zuordnen (siehe Tabelle 2.13, S. 91).

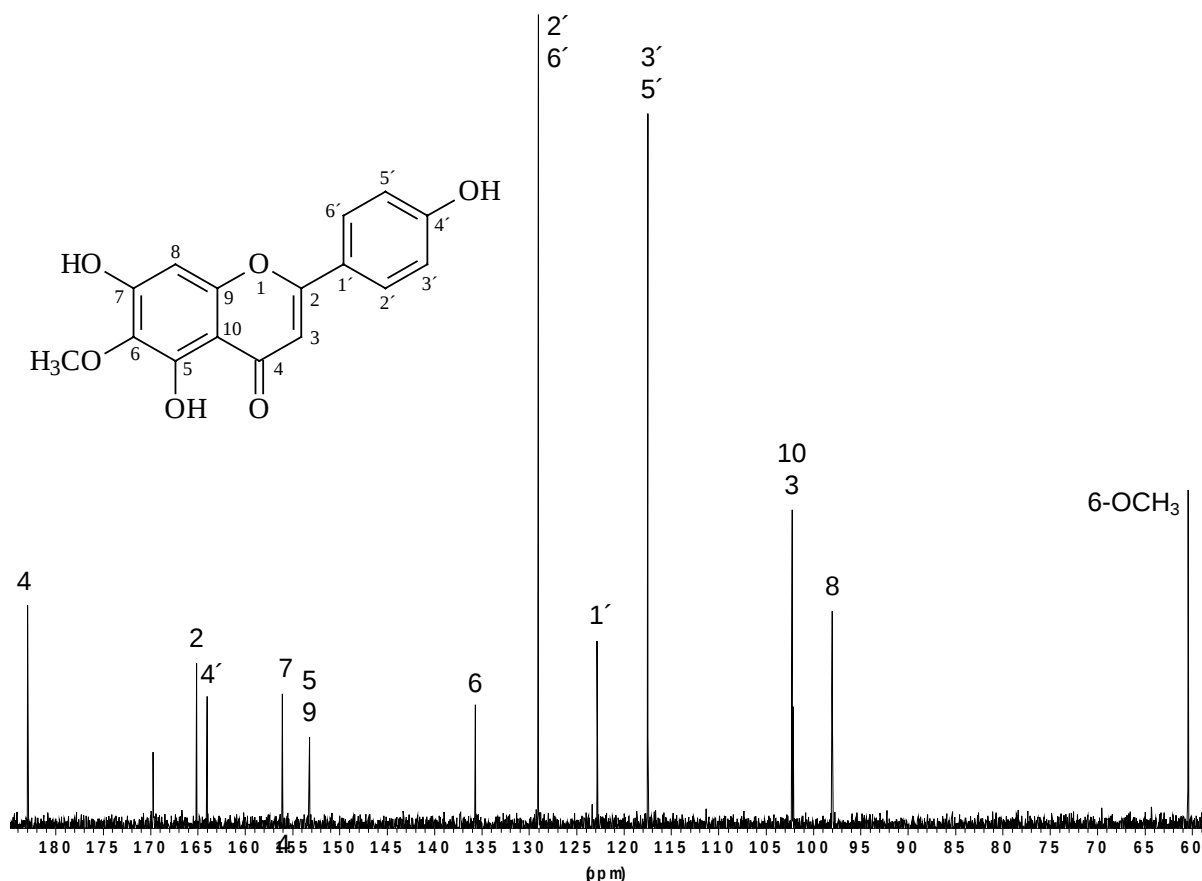


Bild 2.68: ^{13}C NMR-Spektrum von Verbindung **FA1** (125 MHz, CD_3OD , TMS)

Tabelle 2.13: NMR-Daten von Verbindung **FA1** (500 bzw. 125 MHz, CD_3OD , TMS) im Vergleich zu Angaben für Hispidulin: ¹EBERT, 1985 (360 MHz, CD_3OD , TMS); ²DE VILLARRAGA und DE PÉREZ, 1994 (22,40 MHz, $\text{DMSO}-d_6/\text{Aceton}-d_6$, TMS); * = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FA1	Hispidulin ¹	C	FA1	Hispidulin ²
3	6.45 s	6.563 s	2	165.43	163.7
8	6.33 s	6.598 s	3	102.42	102.3
2'	7.81 d (8.8)	7.846 d (9)	4	183.26	182.0
3'	6.91 d (8.8)	6.933 d (9)	5	153.50	152.7*
5'	6.91 d (8.8)	6.933 d (9)	6	136.01	131.4
6'	7.81 d (8.8)	7.846 d (9)	7	156.36	157.7
6-OCH ₃	3.86 s	3.888 s	8	98.30	94.3
			9	153.50	152.4*
			10	102.54	103.8
			1'	123.13	121.1
			2'	129.33	128.4
			3'	117.76	115.9
			4'	164.34	161.1
			5'	117.76	115.9
			6'	129.33	128.4
			6-OCH ₃	60.72	59.9

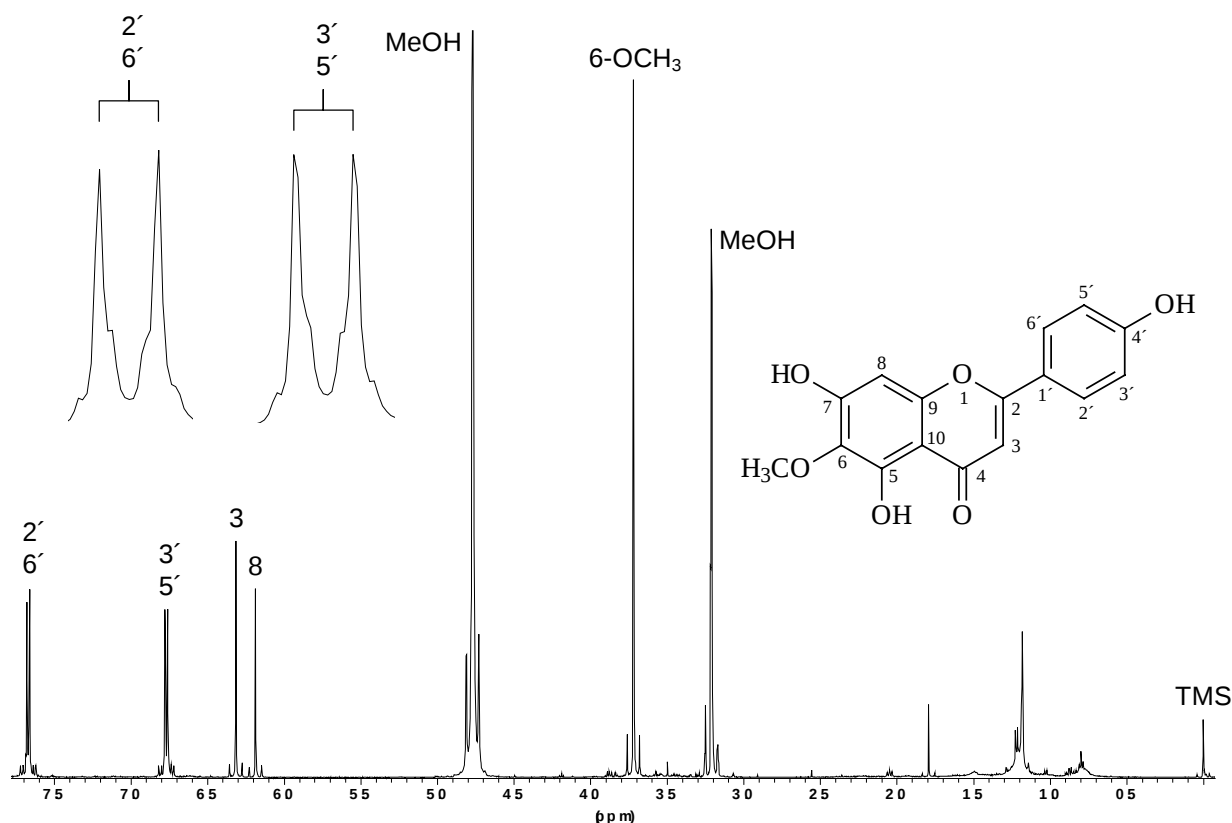


Bild 2.69: ^1H NMR-Spektrum von Verbindung **FA1** (500 MHz, CD_3OD , TMS)

Das ^1H NMR-Spektrum enthält fünf Signale für neun Protonen (siehe Bild 2.69, S. 92 und Tabelle 2.13, S. 91). Mit Hilfe des HMQC-Spektrums (siehe Bild 2.70, S. 93) lassen sie sich den korrespondierenden Kohlenstoffsignalen zuordnen. Die beiden zwei-Protonen Dubletts bei 6.91 und 7.81 ppm mit einer für *ortho* koppelnde aromatische Protonen typischen Kopplungskonstanten von etwa 9 Hz sind als AA'BB'-System interpretierbar [HESSE et al., 1995]. Sie sind den Protonen H-3' und H-5' sowie H-2' und H-6' des 4'-mono-substituierten B-Rings zuzuschreiben.

Das Singulett für drei Protonen bei 3.86 ppm korrespondiert mit den Protonen der Methoxygruppe an C-6, die beiden verbliebenen Singulets für jeweils ein Proton sind H-3 (6.45 ppm) und H-8 (6.33 ppm) zuzuordnen.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass es sich bei **FA1** nur um 4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavon bzw. Hispidulin handeln kann. Die eigenen Meßdaten stehen im Einklang mit den Angaben aus der Literatur [z.B. DE VILLARAGA und DE PÉREZ, 1994; EBERT, 1985; SKIBINSKI, 1990]. Die Benennung der Substanz als „Hispidulin“ geht auf HERZ und SUMI (1964) zurück, die das Flavon aus der Asteracee *Ambrosia hispidula* isoliert hatten. Offensichtlich war ihnen die ein Jahr vorher publizierte Arbeit von DOHERTY et al. (1963) nicht bekannt. Diese Arbeitsgruppe hatte den Naturstoff bereits aus *Digitalis lanata* isoliert. Hispidulin ist in den Genera *Ageratina* und *Eupatorium* weit verbreitet. Das Flavon konnte in folgenden Taxa gefunden werden: *A. angustifolia* [DE VILLARAGA und DE PÉREZ, 1994], *A. calophylla* [FANG et al., 1986], *A. glyptophlebia* [DE PÉREZ und DE PINILLA, 1990], *A. tomentella* [FANG und MABRY, 1986], *E. album*, *E. altissimum* [WOLLENWEBER et al., 1996], *E. cannabinum* [ELEMA et al., 1989; STEVENS et al., 1995], *E. cuneifolium* [KUPCHAN

et al., 1969b], *E. dubium*, *E. fistulosum*, *E. hyssopifolium*, *E. maculatum*, *E. purpureum*, *E. rotundifolium* [WOLLENWEBER et al., 1996], *E. semiserratum* [HERZ et al., 1981], *E. serotinum* [HERZ et al., 1979], *E. sessilifolium* [WOLLENWEBER et al., 1996], und *E. subhastatum* [FERRARO et al., 1987].

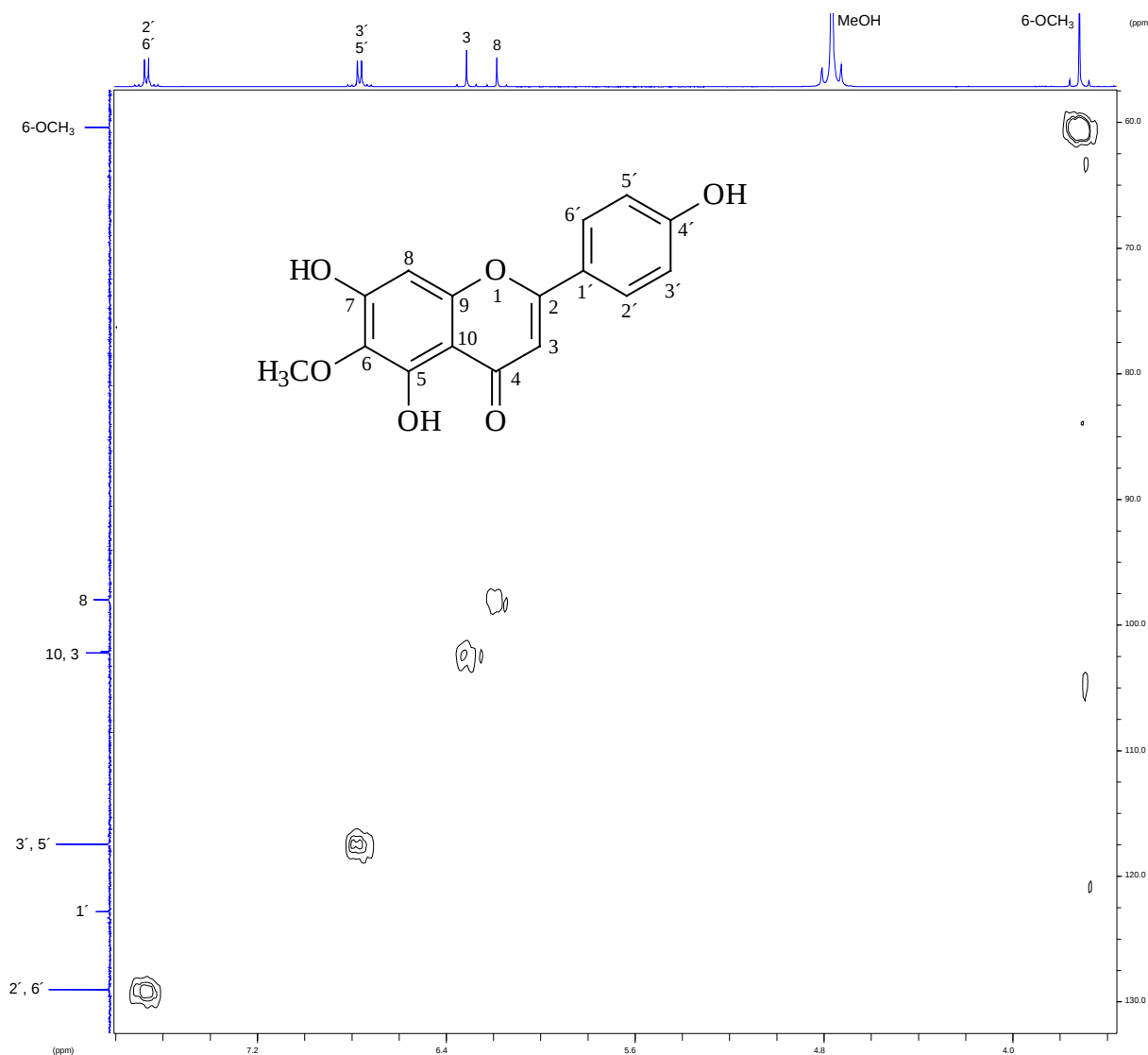
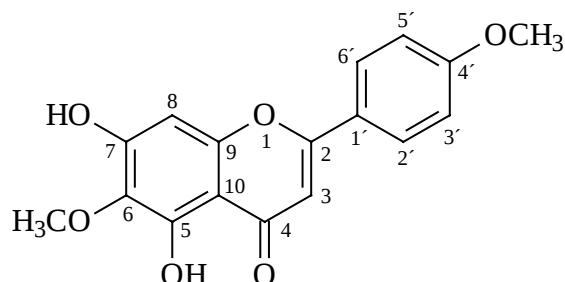


Bild 2.70: HMQC-Spektrum von Verbindung **FA1** (500 bzw. 125 MHz, CD₃OD, TMS)

2.2.3 Pectolinarigenin = 5,7-Dihydroxy-4',6-dimethoxyflavon (Verbindung FA2)



Eine weitere in Fraktion D-IV enthaltene Verbindung (**FA2**) wurde als Pectolinarigenin identifiziert (siehe Kap. 6.5.3.2, S. 310). Da die Substanz nur in Spuren vorkam, konnte sie nicht isoliert werden. Die Identifizierung gelang durch Vergleich mit einer authentischen Probe durch DC und LC-MS. In Bild 2.71, S. 94, sind das LC-Chromatogramm von Fraktion D-IV-1 und das APCI-MS-Spektrum von **FA2** dargestellt.

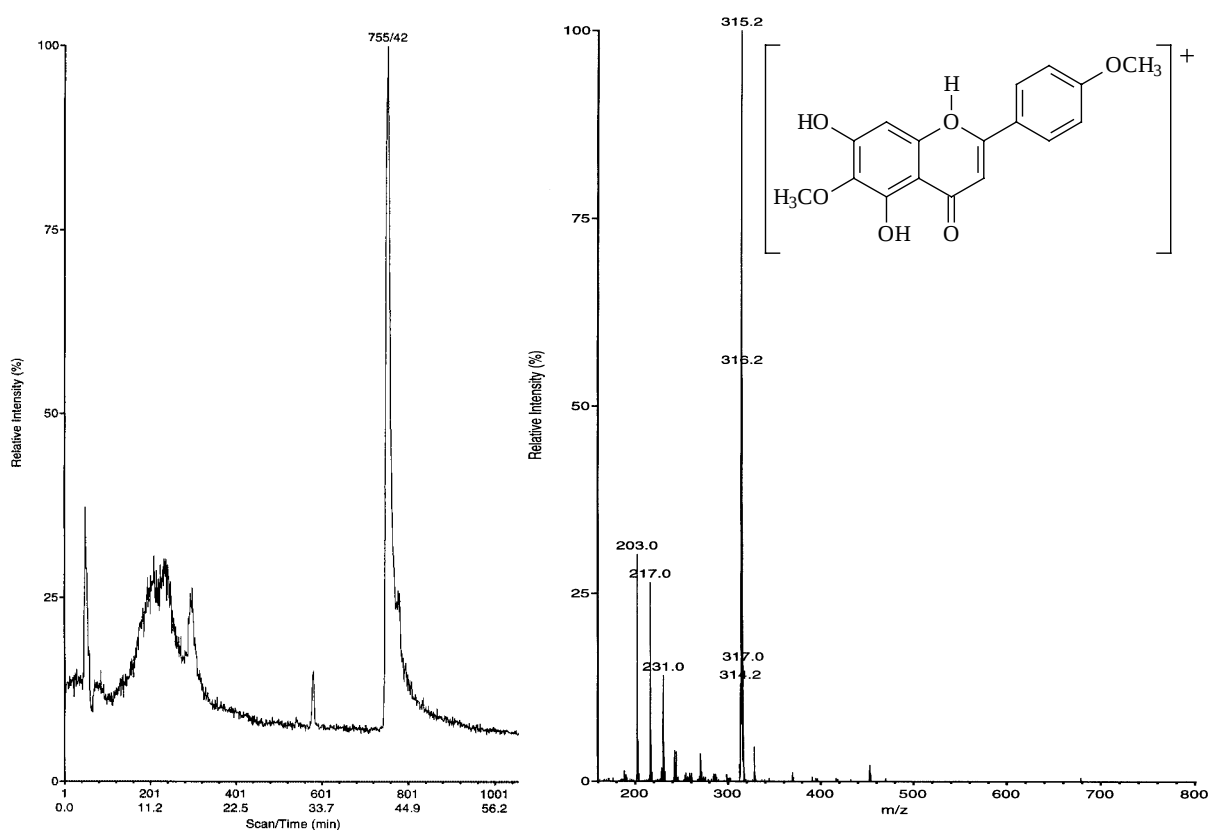
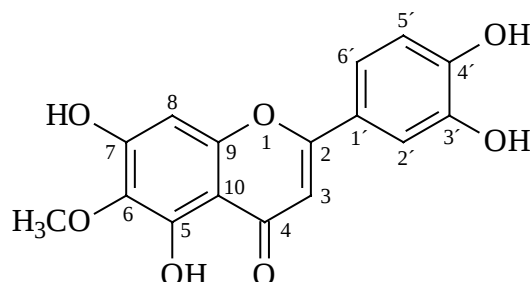


Bild 2.71: LC-Chromatogramm des LC-MS-Laufes von Fraktion D-IV-1 mit dem Peak für **FA2** bei 755 Scans (links) und das zugehörige APCI-MS-Spektrum (rechts); die Peaks der später eluierenden Verunreinigungen sind nicht dargestellt

Das Flavon Pectolinarigenin (**FA2**) ist bereits seit mehr als 70 Jahren bekannt. Im Jahre 1930 gelang ROBINSON und SCHWARZENBACH als ersten die Synthese der Verbindung. Einige Zeit darauf konnte das Flavonoid als Genin des Glykosids Pektolinarin zum ersten Mal aus einer Pflanze isoliert werden. Es handelte sich um die Scrophulariaceae *Linaria vulgaris* [MERZ und WU, 1936]. Wie Hispidulin (**FA1**) ist auch Pectolinarigenin (**FA2**) in den Genera

Ageratina und *Eupatorium* weit verbreitet. Es existieren Belege für die folgenden Arten: *A. angustifolia* [DE VILLARRAGA und DE PÉREZ, 1994], *A. calophylla* [FANG et al., 1986], *E. cannabinum* [STEVENS et al., 1995], *E. hyssopifolium* [WOLLENWEBER et al., 1996], *E. salvia* [GONZÁLEZ et al., 1990], *E. semiserratum* [HERZ et al., 1981; KUPCHAN et al., 1969] und *E. serotinum* [HERZ et al., 1979; WOLLENWEBER et al., 1996].

2.2.4 Eupafolin = 3',4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon (Verbindung FA3)



Von **FA3** konnten 7 mg isoliert werden. Die Substanz ist das einzige Flavonoid in dieser Arbeit, welches sowohl aus dem Dichlormethan- (Fraktion D-IV) als auch aus dem Methanol-Extrakt (Fraktion M-VIII) isoliert werden konnte (siehe Kap. 6.5.3.2, S. 310 und Kap. 6.5.6.5, S. 326).

Nach dem Besprühen der fertig entwickelten DC-Folie war **FA3** bei Tageslicht orange gefärbt. Unter UV-Licht der Wellenlänge 356 nm zeigte die Substanz eine hellorange Fluoreszenz. Ein solches Färbeverhalten zeigen Flavone mit *ortho*-Dihydroxygruppen im B-Ring und einer freien OH-Gruppe an C-7 [WOLLENWEBER, 1982].

Tabelle 2.14: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FA3** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
242 sh	265	268	263	274	261 sh
255 sh	275 sh	325 sh	374	305 sh	282
272	306 sh	394	421 sh	335 sh	295 sh
350	337 sh			424	368
	401				

Die von **FA3** aufgenommenen UV-Spektren liefern bis auf den monosubstituierten B-Ring alle bei **FA1** beschriebenen Strukturinformationen (vergl. Tabelle 2.12, S. 86 mit Tabelle 2.14, S. 96). Abweichend vom Methanol-Spektrum von **FA1** tritt im entsprechenden Spektrum von **FA3** die Bande I bei einer höheren Wellenlänge auf (350 nm gegenüber 337 nm). Ein weiterer Unterschied ist die bei **FA3** registrierte Aufspaltung der Bande II.. Beide Phänomene treten nur dann auf, wenn der B-Ring doppelt substituiert ist [CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971].

Das Natriummethanolat-Spektrum von **FA3** besitzt große Ähnlichkeit zu dem von **FA1**. Lediglich Bande III, die eine freie OH-Gruppe an C-7 anzeigt, ist bei **FA3** nur als Schulter bei 337 nm ausgebildet. Diese Schulterbildung ist dann zu beobachten, wenn das Flavonoid zusätzlich zur freien 7-OH-Gruppe zwei oder mehr Sauerstoff-Substituenten im B-Ring besitzt [BACON et al., 1976].

Das Natriumacetat-Spektrum von **FA3** liefert dieselben Informationen wie schon bei **FA1**. Ein deutlicher Unterschied zu **FA1** zeigt sich, wenn die Natriumacetat-haltige

Untersuchungslösung von **FA3** mit Borsäure gesättigt wird. Im Spektrum von **FA3** ist Bande I gegenüber dem Methanol-Spektrum um 24 nm bathochrom verschoben. Im VIS-Bereich findet sich eine Schulter bei 421 nm. Beide Beobachtungen sind starke Hinweise auf eine *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring [MABRY et al., 1970].

Dieses Strukturelement wird auch durch die Aufnahme von UV-Spektren nach dem Zusatz von Aluminiumchlorid bzw. Aluminiumchlorid/Salzsäure bewiesen. Nach dem Zutropfen der Säure zur Aluminiumchlorid-haltigen Untersuchungslösung von **FA3** kommt es zu einem hypsochromen Shift der Bande I von 56 nm. Dies ist auf die Säurelabilität der Komplexe zwischen *ortho*-Dihydroxygruppen und dem Chelatbildner zurückzuführen. Das chromophore System erleidet dadurch eine drastische Reduktion mit der Folge, dass das Absorptionsmaximum der mit dem B-Ring assoziierten Bande I in den kürzerwelligen Bereich verlagert wird [MABRY et al., 1970].

Das Massenspektrum von **FA3** (siehe Bild 2.72, S. 97) unterstützt die aus den UV-Spektren gezogenen Schlüsse, da der Molpeak bei m/z 316 ein genau um die Masse eines Sauerstoffatoms höheres Molekulargewicht von **FA3** gegenüber **FA1** anzeigt. Im oberen Massenbereich gleicht die Fragmentierung von **FA1** sehr stark der von **FA3**: Die nach Abspaltung eines Methylradikals und der Eliminierung von CO resultierenden Fragmente dominieren hinsichtlich ihrer Intensität. Im mittleren Massenbereich sind die Fragmentpeaks im Vergleich zu **FA1** meist klein, gut auszumachen sind jedoch die RDA-Fragmente $[A_1-CH_3]^+$ bei m/z 167 und B_1^{++} bei m/z 134.

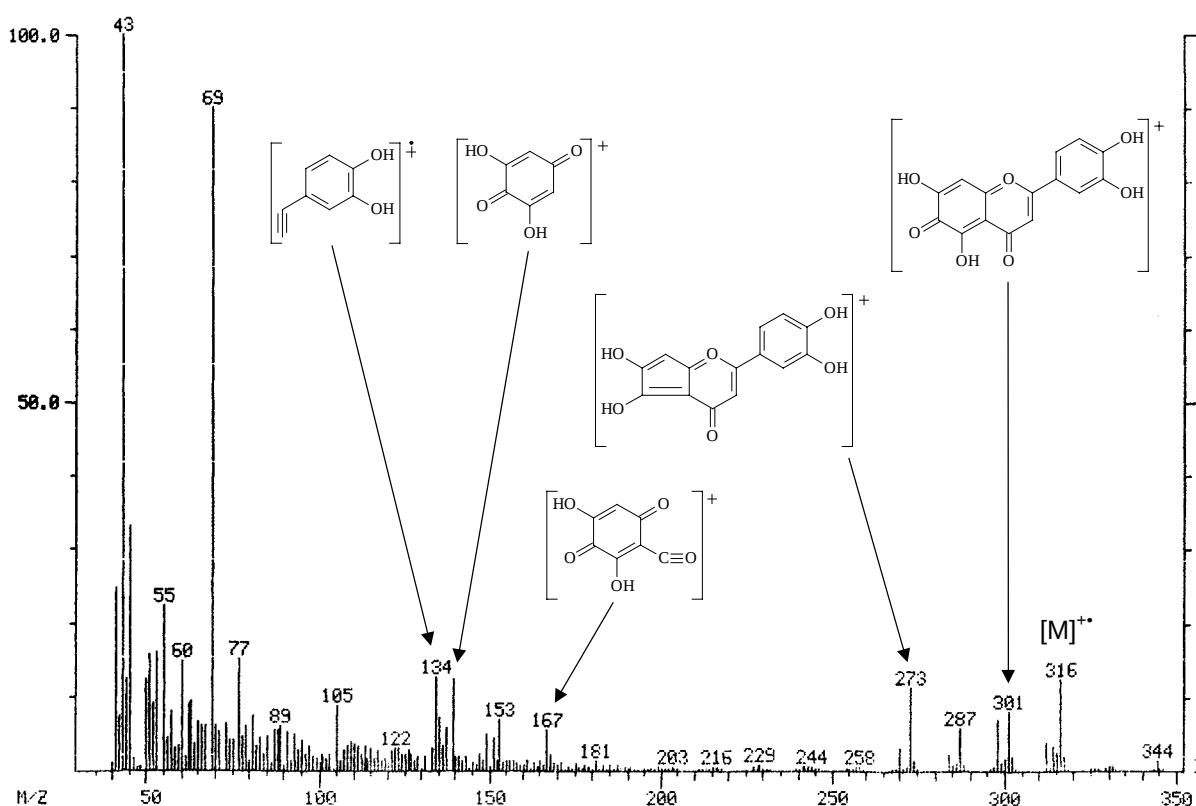


Bild 2.72: EI-MS-Spektrum von **FA3**

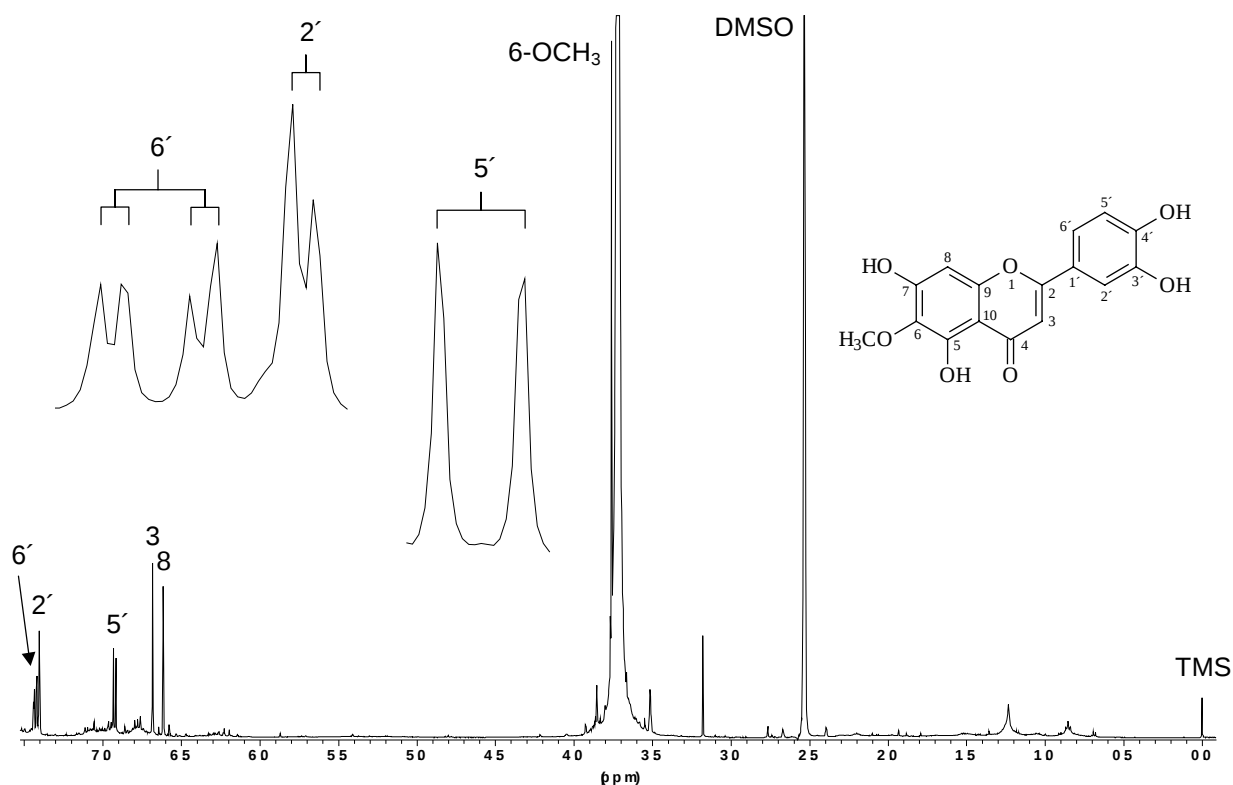


Bild 2.73: ^1H NMR-Spektrum von **FA3** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$, TMS)

Tabelle 2.15: NMR-Daten von Verbindung **FA3** (500 bzw. 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS) im Vergleich zu Angaben für Eupafolin: ¹DE PÉREZ und DE PINILLA, 1990 (60 MHz, $\text{DMSO-}d_6/\text{CDCl}_3$); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FA3	Eupafolin ¹	C	¹³ C-Shift
3	6.67 s	6.53 s	2	164.15
8	6.56 s	6.48 s	3	102.59
2'	7.40 d (2.2)	7.40 d (2)	4	182.23
5'	6.89 d (8.2)	6.92 d (9)	5	152.99
6'	7.42 dd (2.2, 8.2)	7.32 dd (2, 9)	6	131.54
6-OCH ₃	3.75 s	3.88 s	7	157.48
5-OH	13.09 s	13.07 m	8	94.32
			9	152.99
			10	104.25
			1'	121.72
			2'	113.54
			3'	145.94
			4'	149.90
			5'	116.22
			6'	119.17
			6-OCH ₃	60.14

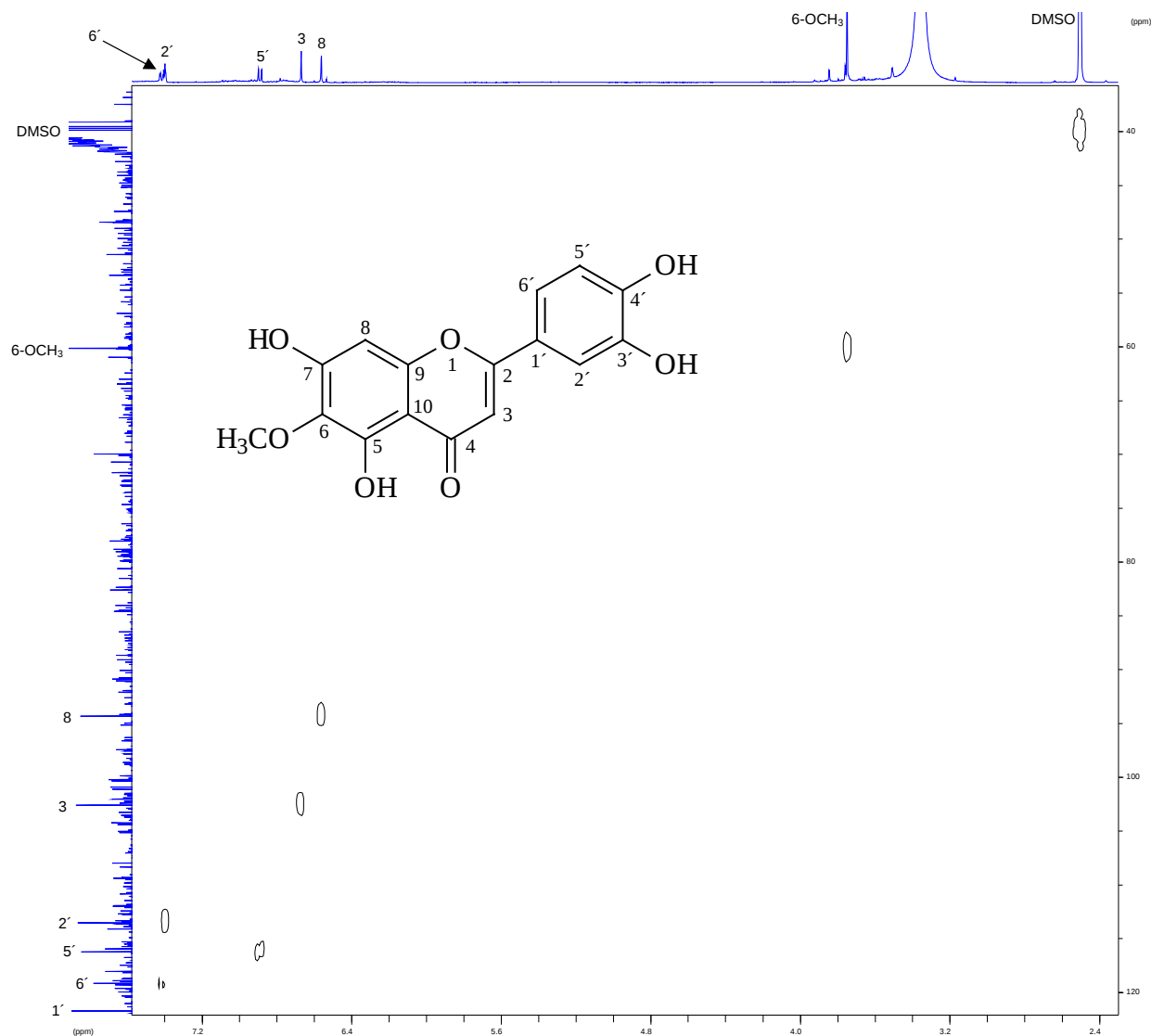


Bild 2.74: HMQC-Spektrum der Verbindung **FA3** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Das ^1H NMR.-Spektrum zeigt sieben Signale für neun Protonen (siehe Bild 2.73, S. 98). Neben dem Signal für das Proton der OH-Gruppe an C-5 (13.09 ppm) finden sich wie bei **FA1** zwei Singulets für je ein Proton bei 6.67 ppm (H-3) und 6.56 ppm (H-8). Das Singulett für drei Protonen bei 3.75 ppm korrespondiert mit der 6-Methoxygruppe. Daneben treten die Signale für drei aromatische Protonen des B-Ringes auf. Sie bilden ein typisches ABX-System, so dass der B-Ring 1,3,4-trisubstituiert sein muß. Unter Berücksichtigung der Informationen aus den UV-Spektren muß es sich daher bei **FA3** um eine Verbindung mit 3',4'-Dihydroxy-Substitution handeln. Das Dublett vom Dublett bei 7.42 ppm ist dem H-6' zuzuordnen, welches *ortho* mit H-5' ($J = 8.2$ Hz, $\delta = 6.89$ ppm) und *meta* mit H-2' ($J = 2.2$ Hz, $\delta = 7.40$ ppm) koppelt.

Im ^{13}C NMR-Spektrum erscheinen sechzehn Signale, die sich an Hand des zusätzlich aufgenommenen HMQC- (siehe Bild 2.74, S. 99) und HMBC-Spektrums (siehe Bild 2.75, S. 100) eindeutig zuordnen lassen. Hierdurch werden die Dihydroxy-Substitution des B-Ringes sowie die mit **FA1** übereinstimmende Konstitution der Ringe A und B bestätigt (siehe Tabelle 2.15, S. 99).

Bei **FA3** handelt es sich daher zweifelsfrei um 3',4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon. Die Verbindung ist auch unter den Trivial-Namen „Eupafolin“ und „Nepetin“ bekannt. Die Bezeichnung „Nepetin“ für **FA3** geht auf den Erstfund des Flavons in einem alkoholischen Extrakt der Lamiaceae *Nepeta hindostana* zurück [KRISHNASWAMY et al., 1968]. Wie **FA1** und **FA2** konnte auch **FA3** für mehrere *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten nachgewiesen werden: *A. glyptophlebia* [DE PÉREZ und DE PINILLA, 1990], *A. tomentella* [FANG und MABRY, 1986], *E. album*, *E. altissimum* [WOLLENWEBER et al., 1996], *E. cannabinum* [ELEMA et al., 1989; STEVENS et al., 1995], *E. cuneifolium* [KUPCHAN et al., 1969b], *E. dubium*, *E. fistulosum*, *E. hyssopifolium*, *E. maculatum*, *E. purpureum*, *E. rotundifolium*, *E. serotinum*, *E. sessilifolium* [WOLLENWEBER et al., 1996] und *E. subhastatum* [FERRARO und COUSSIO, 1973].

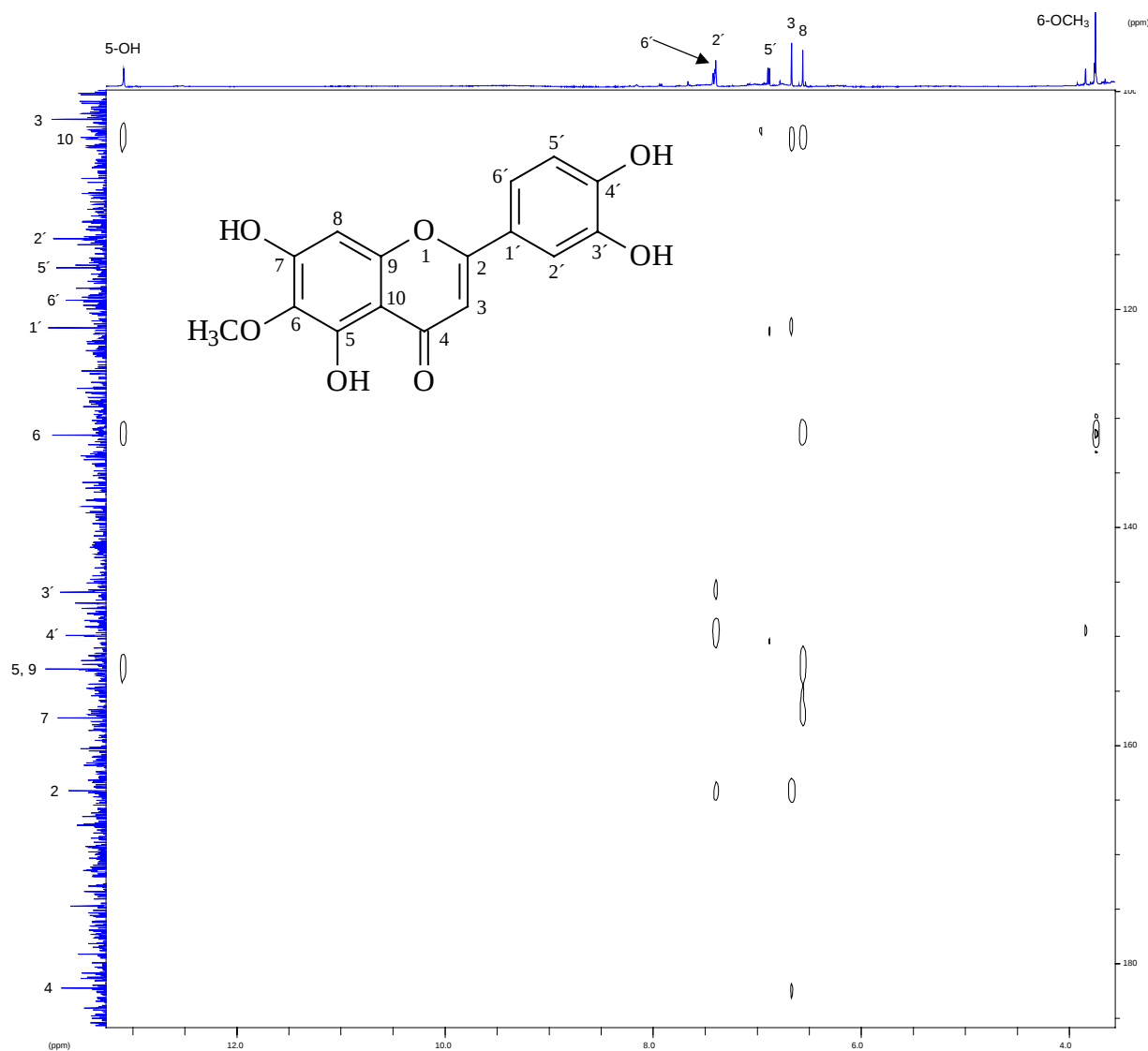
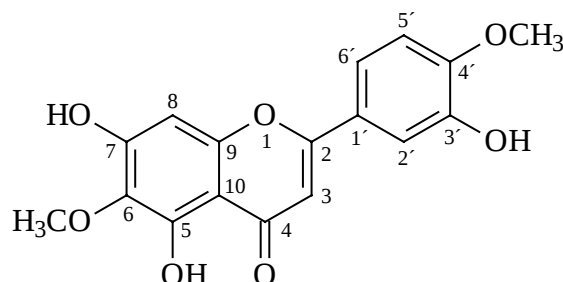


Bild 2.75: HMBC-Spektrum von Eupafolin (**FA3**) (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d₆, TMS)

2.2.5 Desmethoxycentaureidin = 3',5,7-Trihydroxy-4',6-dimethoxyflavon (Verbindung FA4)



Das hellgelb gefärbte Flavonoid **FA4** konnte in einer Ausbeute von 7 mg aus Fraktion D-IV isoliert werden (siehe Kap. 6.5.3.2, S. 310).

Im Färbeverhalten auf der DC-Folie stimmte **FA4** mit **FA1** überein (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Dies macht es wahrscheinlich, dass auch **FA4** eine Methoxygruppe an C-6 besitzt. Da **FA4** nach der Detektion mit Naturstoffreagenz A unter UV-Licht (365 nm) keine Fluoreszenz zeigt, kann eine *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring ausgeschlossen werden.

Tabelle 2.16: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FA4** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
240 sh	267	271	273	261	257
250 sh	300 sh	320 sh	343	281	284
273	379	372		296 sh	292 sh
342				370	360

Das UV-Spektrum in Methanol von **FA4** ist dem von **FA3** hinsichtlich der Shiftwerte und der Aufspaltung der Bande II sehr ähnlich (vergl. Tabelle 2.14, S. 96 und Tabelle 2.16, S. 101), wodurch eine Disubstitution des B-Ringes angezeigt wird. Bande I liegt bei **FA4** bei einer kleineren Wellenlänge als bei **FA3**, was für eine Einschränkung des chromophoren Systems im B-Ring, z.B. durch Veretherung einer oder beider OH-Gruppen, spricht.

Nach dem Zusatz von Natriummethanolat wird das Absorptionsmaximum von Bande I im stark alkalischen Milieu um 37 nm bathochrom verschoben. Ein solcher, weniger als 40 nm großer Shift, ist charakteristisch für Flavone mit substituierter OH-Gruppe an C-4'. Ein weiteres Indiz für eine solche Substitution ist die charakteristische Schulter auf dem langwelligen Ast von Bande II bei 300 nm [MERFORT, 1990]. Bei Flavonoiden mit 4'-monomethoxyliertem B-Ring liegt Bande I bei ca. 370 nm [SKIBINSKI, 1990], während sie bei **FA4** bei einer größeren Wellenlänge detektiert wird. Dieser Shift könnte durch eine zur 4-Methoxygruppe benachbarten freien OH-Gruppe hervorgerufen werden.

Die Natriumacetat-Spektren von **FA3** und **FA4** unterscheiden sich in der 30 nm bathochrom verschobenen Bande I bei Substanz **FA4**. Ein Shift in dieser Größenordnung ist immer dann zu erwarten, wenn an Position 4' eine Methoxygruppe gebunden ist [MERFORT, 1990].

Das Natriumacetat/Borsäure-Spektrum ist praktisch mit dem Methanol-Spektrum identisch. Dieses Verhalten tritt dann auf, wenn der A-Ring weder 6,7- noch 7,8-dihydroxyliert ist und der B-Ring keine *ortho*-Dihydroxygruppen besitzt [MARKHAM, 1982].

Durch Zusatz von Aluminiumchlorid-Lösung wird die Bande I um 28 nm bathochrom verschoben. Daraus läßt sich ableiten, dass das C-3 nicht hydroxyliert ist und eine freie OH-Gruppe an C-5 vorliegt [JURD, 1969; MABRY et al., 1970]. Das Auftreten nur einer Bande im langwelligen Bereich spricht für eine Sauerstoff-Substitution des C-6 [JURD, 1969]. Zusätzlich deutet ein Doppelpack bei 261 und 280 nm sowie die Schulter bei 296 nm auf das Vorliegen eines 6-Methoxy-Flavons mit 3',4'-Substitution hin, da ein 4'-monosubstituierter B-Ring bei gleicher Konstitution des A-Ringes nur einen Hauptpeak unterhalb von 300 nm liefern würde [VOIRIN, 1983].

Nach der Zugabe von Salzsäure zur AlCl_3 -Lösung beträgt der Shift von Bande I nur noch + 18 nm. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz für eine 5-Hydroxy- neben einer 6-Methoxygruppe [HARBORNE und MABRY, 1982; MEARS und MABRY, 1972; SAKAKIBARA und MABRY, 1977].

Bei **FA4** sollte es sich daher entweder um das 5,7-Dihydroxy-3',4',6-trimethoxyflavon oder um das 3',5,7-Trihydroxy-4',6-dimethoxyflavon handeln.

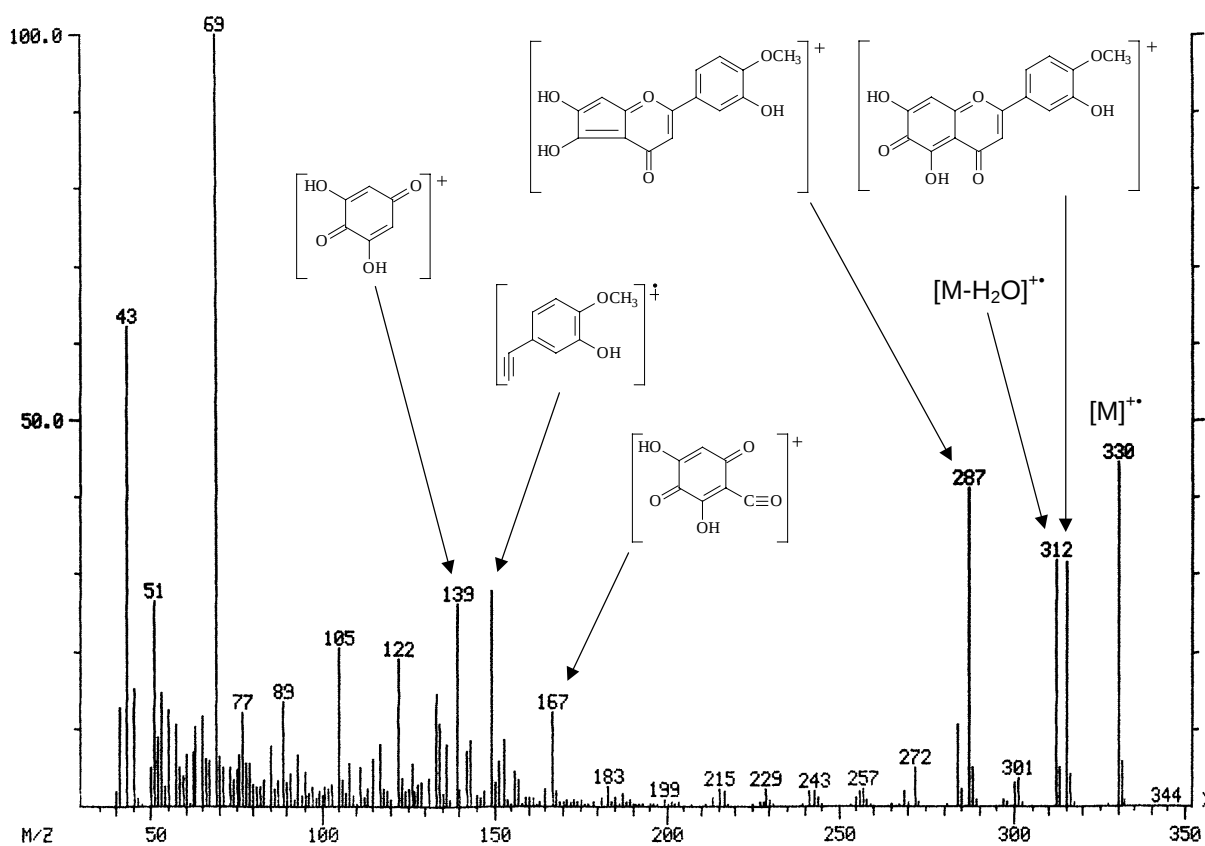


Bild 2.76: EI-MS-Spektrum von **FA4**

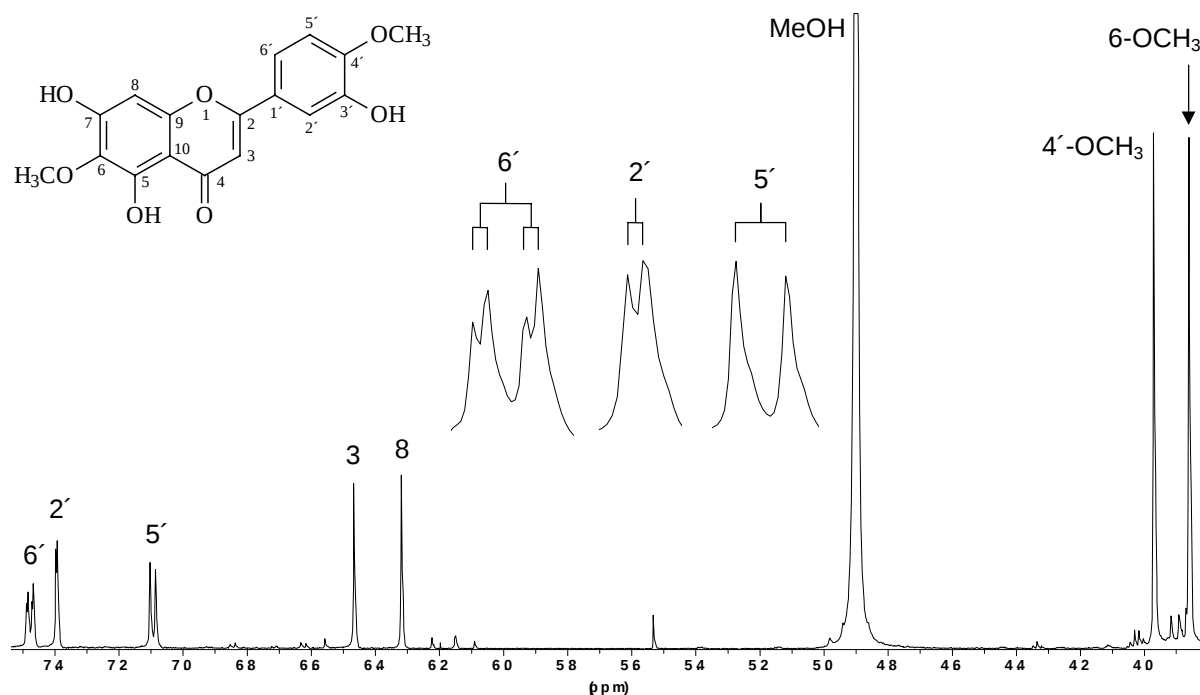
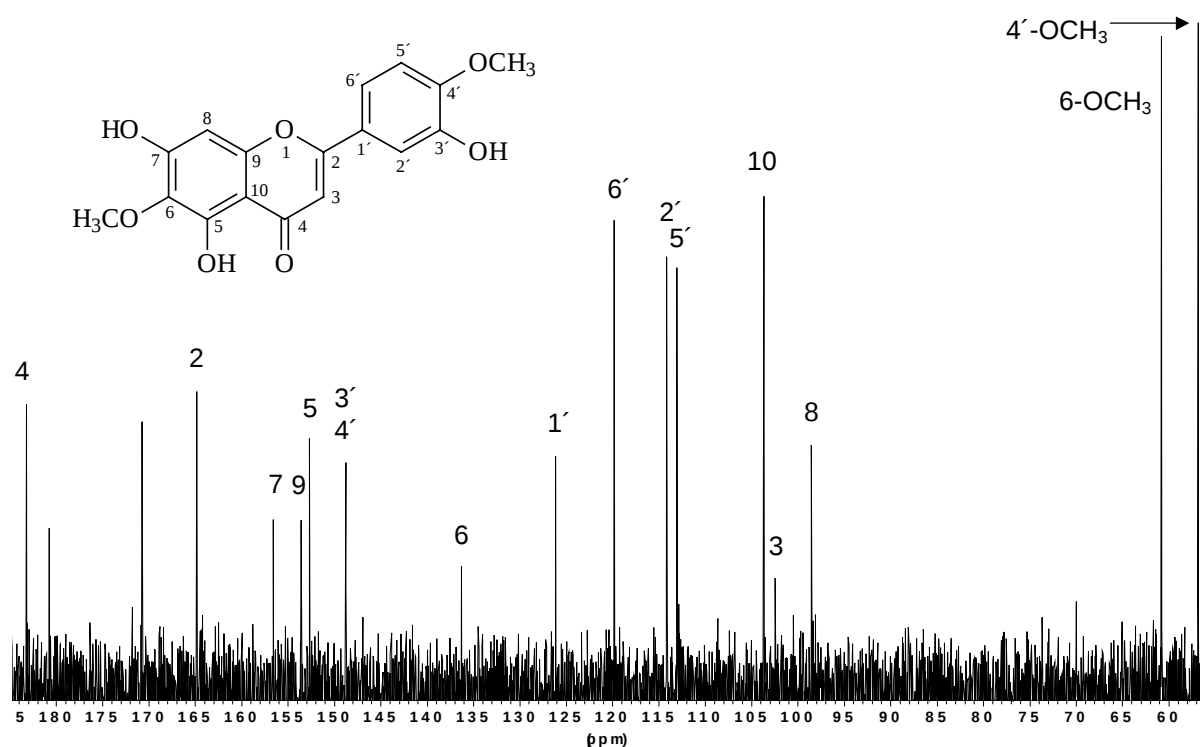
Das Molekulargewicht von **FA4** läßt sich sowohl aus dem EI- (m/z = 330, siehe Bild 2.76, S. 102), als auch aus dem ebenfalls aufgenommenen DCI-Massenspektrum (m/z = 331) entnehmen (330 g/mol). Von den nach der UV-Analyse als möglich diskutierten beiden Flavonoiden scheidet das erste (5,7-Dihydroxy-3',4',6-trimethoxyflavon) aus, da diese

Verbindung ein um vierzehn Massen-Einheiten schwereres Molekulargewicht besitzt. Dies spricht für die Annahme, dass es sich bei **FA4** um 3',5,7-Trihydroxy-4',6-dimethoxyflavon handelt. Ein weiteres Indiz für die 3'-Hydroxy-4'-methoxy-Substitution des B-Ringes liefert das B_1^{++} -Fragment bei m/z 151. Die RDA-Bruchstücke des A- und des C-Ringes bei m/z 167 und 139 belegen, dass der A-Ring von **FA4** die gleiche Konstitution besitzt wie schon bei **FA1** und **FA3**.

Das ^1H NMR-Spektrum von **FA4** zeigt sieben Signale für elf Protonen (siehe Bild 2.77, S. 104). Die drei Singulets für H-3 (6.46 ppm), H-8 (7.32 ppm) und die Protonen der Methoxygruppe an C-6 (3.86 ppm) finden sich bei gleichen chemischen Verschiebungen wie schon bei **FA1**, woraus folgt, dass die beiden Moleküle im Hinblick auf die Substitution des A- und des C-Ringes übereinstimmen. Die übrigen aromatischen Protonen (H-2', H-5' und H-6') bilden wie bei **FA3** ein ABX-System. Hieraus kann die 3',4'-Disubstitution des B-Ringes abgeleitet werden. Das zusätzliche 3-Protonen-Singulett bei 3.97 ppm für eine weitere Methoxygruppe beweist, dass C-3' oder C-4' einen solchen Substituenten tragen muß. Die Position dieser Methoxygruppe wird eindeutig durch den Vergleich der Signallagen der B-Ring-Protonen von Desmethoxycentaureidin (3'-OH, 4'-OCH₃) und Jaceosidin (4'-OH, 3'-OCH₃) bestimmbar [SKIBINSKI, 1990]. Hierbei zeigt sich, dass die Meßdaten von **FA4** sehr gut mit den Referenzdaten für Desmethoxycentaureidin übereinstimmen (siehe Tabelle 2.17, S. 103).

Tabelle 2.17: NMR-Daten von Verbindung **FA4** (500 bzw. 125 MHz, CD₃OD, TMS) im Vergleich zu Angaben für Desmethoxycentaureidin: ¹SKIBINSKI, 1990 (360 MHz, CD₃OD, TMS); * = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FA4	Desmethoxycentaureidin ¹	C	FA4
3	6.46 s	6.537 s	2	164.74
8	7.32 s	6.589 s	3	102.36
2'	7.39 d (1.9)	7.388 d (2.0)	4	183.13
5'	7.09 d (8.2)	7.074 d (8.2)	5	152.55*
6'	7.47 dd (1.9, 8.2)	7.504 d (2.0, 8.2)	6	136.21
4'-OCH ₃	3.97 s	3.934 s	7	156.49
6-OCH ₃	3.86 s	3.867 s	8	98.43
			9	153.48*
			10	103.55
			1'	126.04
			2'	114.05
			3'	148.67
			4'	148.67
			5'	112.94
			6'	119.72
			4'-OCH ₃	56.73
			6-OCH ₃	60.69

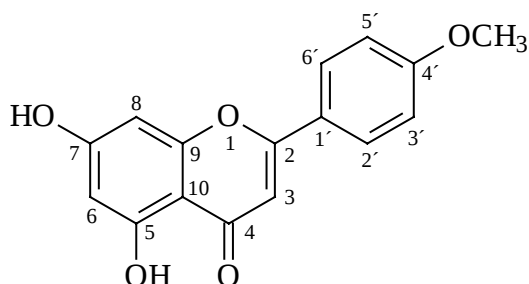
Bild 2.77: ^1H NMR-Spektrum von Verbindung **FA4** (500 MHz, CD_3OD , TMS)Bild 2.78: ^{13}C NMR-Spektrum von Verbindung **FA4** (125 MHz, CD_3OD , TMS)

Das ebenfalls aufgenommene ^{13}C NMR-Spektrum zeigt erwartungsgemäß siebzehn Signale (siehe Bild 2.78, S. 104). In Analogie zu **FA1** und **FA3** lassen sich die Signale für die Kohlenstoffe des A- (C-5 bis C-10) und des C-Ringes (C-2 bis C-4) zuordnen. Die in der Literatur verfügbaren Daten für Flavonoide mit einer 3'-Hydroxy-4'-methoxy-Substitution des B-Ringes [AGRAWAL, 1989; HARBORNE und MABRY, 1982] ermöglichen die Zuordnung

der Signale für C-1' bis C-6' von **FA4**. Es verbleibt das Singulett für drei Protonen bei 56.73 ppm. Dieses Signal korrespondiert mit den Protonen der C-4'-Methoxygruppe.

Es handelt sich somit bei **FA4** zweifelsohne um 3',5,7-Trihydroxy-4',6-dimethoxyflavon bzw. Desmethoxycentaureidin. Die Substanz wurde zuerst aus *Centaurea*-Arten isoliert [BOHLMANN und ZDERO, 1967]. Für die Gattung *Eupatorium* lag bisher noch kein Beleg in der Literatur vor.

2.2.6 Acacetin = 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon (Verbindung FA5)



In Fraktion D-IV-3 konnte das nur in Spuren vorkommende Flavon **FA5** durch direkten Vergleich mit authentischer Substanz mittels DC und LC-MS (siehe Bild 2.79, S. 107) nachgewiesen werden (siehe Kap. 6.5.3.2, S. 310).

Acacetin (**FA5**) ist das einzige im Rahmen dieser Arbeit im Drogenmaterial von *E. semialatum* nachgewiesene Flavonoid ohne 6-Methoxygruppe. Die chemische Synthese von Acacetin gelang bereits im Jahre 1926 [ROBINSON und VENKATARAMAN, 1926]. In den Taxa *Ageratina* und *Eupatorium* scheint die Verbindung ähnlich verbreitet zu sein wie etwa die Flavone **FA1** bis **FA3**. Für folgende Arten existieren Nachweise in der Literatur: *A. stevioides* [MORALES MÉNDEZ und ROSQUETTE, 1988], *E. buniifolium* [CAULA et al., 1991], *E. glabratum* [GUERRERO et al., 1978], *E. hookerianum* [FERRARO et al., 1983], *E. odoratum* [BOSE et al., 1974], *E. subhastatum* [FERRARO et al., 1987] und *E. tinifolium* [MORENO et al., 1980].

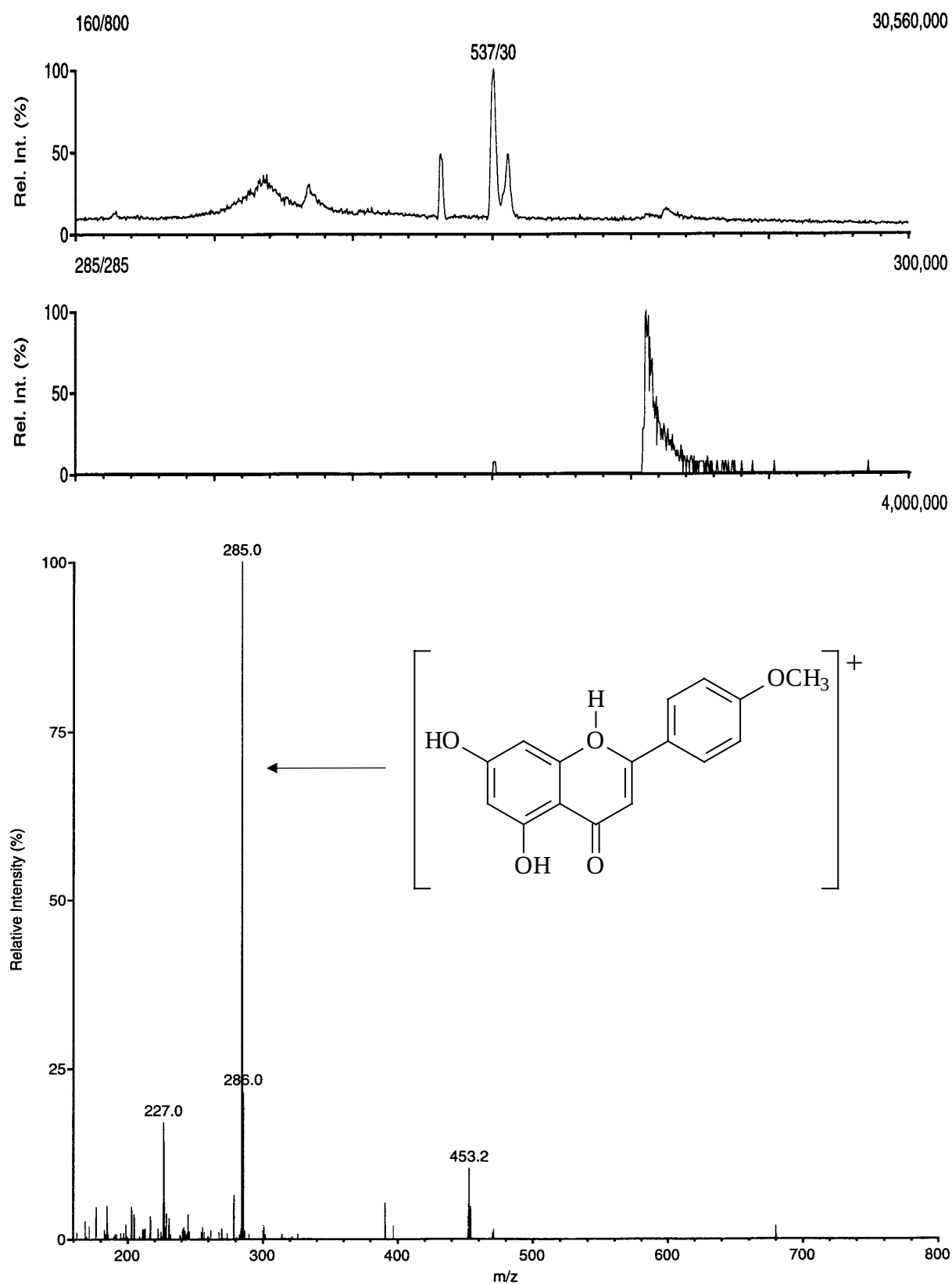
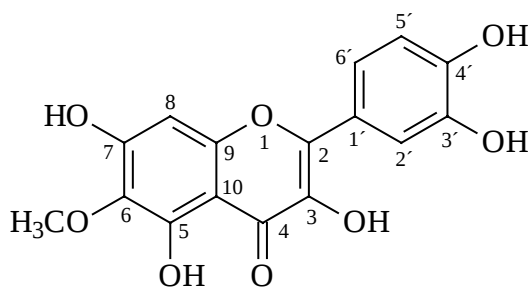


Bild 2.79: LC-Chromatogramm des LC-MS-Laufes von Fraktion D-IV-3 (oben) mit Massen-Fragmentogramm der Masse des Pseudomoleküls von **FA5** (285 amu, darunter) und APCI-MS-Spektrum des LC-Eluats im Maximum dieses Ions (unten)

2.2.7 Patuletin = 3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon (Verbindung FA6)



FA6 konnte ausschließlich im Methanol-Extrakt nachgewiesen werden. Die Auftrennung der Fraktion M-V lieferte 8 mg DC-reines **FA6** (siehe Kap. 6.5.6.3, S. 325).

Der R_f -Wert und das Detektionsverhalten von **FA6** ähneln denen von **FA3** (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Die hellorange leuchtende Färbung (UV 365 nm), die sich nach Detektion mit Naturstoffreagenz A ergab, spricht wie bei **FA3** für eine *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring.

Tabelle 2.18: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FA6** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien; die Shifts unter Natriummethanolat-Einfluß waren instabil

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
255	295 sh	261	261	272	266
271 sh	332	275 sh	291 sh	301 sh	301 sh
293 sh	415 sh	337	385	325 sh	325 sh
346 sh		385		444	372 sh
365					425

Im UV-Spektrum von **FA6** liegt das Maximum der Bande I über 360 nm (siehe Tabelle 2.18, S. 108). Das deutet darauf hin, dass es sich bei **FA6** um ein Flavonol mit freier OH-Gruppe an C-3 handeln muß [MARKHAM, 1982]. Aus der Aufspaltung der Bande II in zwei Teilbanden folgt, dass der B-Ring disubstituiert ist [CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971].

Da das Natriummethanolat-Spektrum instabil ist (Degeneration nach 5 Minuten) muß **FA6** mindestens eine Alkali-sensitive Gruppierung besitzen. In Verbindung mit der vom Methanol-Spektrum angezeigten freien OH-Gruppe an C-3 ist das Vorliegen einer 3,4'-Di- oder 3,3',4'-Trihydroxy-Gruppierung wahrscheinlich. Diese Vermutung wird durch die bathochrome Verschiebung von Bande I (51 nm), die bei Flavonolen mit freier OH-Gruppe an C-4' beobachtet wird, zusätzlich bekräftigt [MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982]. Eine eindeutige Entscheidung zwischen den beiden genannten Substitutionsmustern des B-Ringes kann an Hand der Lage und Intensität der Bande III (332 nm) gefällt werden. Da diese als Schulter auf dem kurzwelligen Ast von Bande I auftritt, muß 3',4'-Disubstitution des B-Ringes vorliegen [MERFORD, 1990].

Die Existenz der freien OH-Gruppe an C-7 kann auch durch den Shift der Bande II (+ 6 nm) im Natriumacetat-Spektrum abgeleitet werden. Wie bei den anderen bisher diskutierten Flavonoiden deutet der Betrag des Shifts auf eine Methoxygruppe an C-6 hin.

Nach Zugabe von Borsäure zur Natriumacetat-haltigen Untersuchungslösung wird Bande I um 20 nm bathochrom relativ zur Lage im Methanol-Spektrum verschoben. Dies ist typisch für Flavonoide mit einer *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring [MABRY et al., 1970].

Die *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring lässt sich auch aus den AlCl_3 -Spektren ableiten. Nach Zugabe von Säure reduziert sich der bathochrome Shift von Bande I von 79 auf 60 nm gegenüber der Lage in reinem Methanol. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der mit der komplexierten *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring korrespondierende Chromophor nach Säurezusatz zusammenbricht, während die auch im sauren Milieu chelatisierbaren OH-Gruppen an C-3 und C-5 sowie die 4-Oxo-Gruppe einen stabilen Shift bewirken [MABRY et al., 1970].

Die aus dem EI-MS-Spektrum ableitbare molare Masse beträgt 332 g/mol (siehe Bild 2.80, S. 109). Dieser Wert steht im Einklang mit den Strukturinformationen aus den UV-Spektren, nach denen **FA6** ein 6-methoxyliertes Flavonol mit einer *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring sein sollte. Für die 6-Methoxylierung spricht das intensive $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$ -Fragment. Bei Flavonolen allgemein spielen von den bekannten Schlüsselbruchstücken die Fragmente $[\text{A}_1+\text{H}]^+$ und $[\text{B}_2]^+$ die größte Rolle [HARBORNE et al., 1975]. Im Spektrum von **FA6** ist das $[\text{A}_1+\text{H}]^+$ -Ion zwar nicht auszumachen, dafür erscheint das $[\text{B}_2]^+$ -Fragment jedoch als intensiver Peak, wodurch der dihydroxylierte B-Ring bestätigt wird. Das $[\text{B}_2]^+$ -Ion spaltet zusätzlich CO ab, woraus das Fragment bei m/z 109 resultiert.

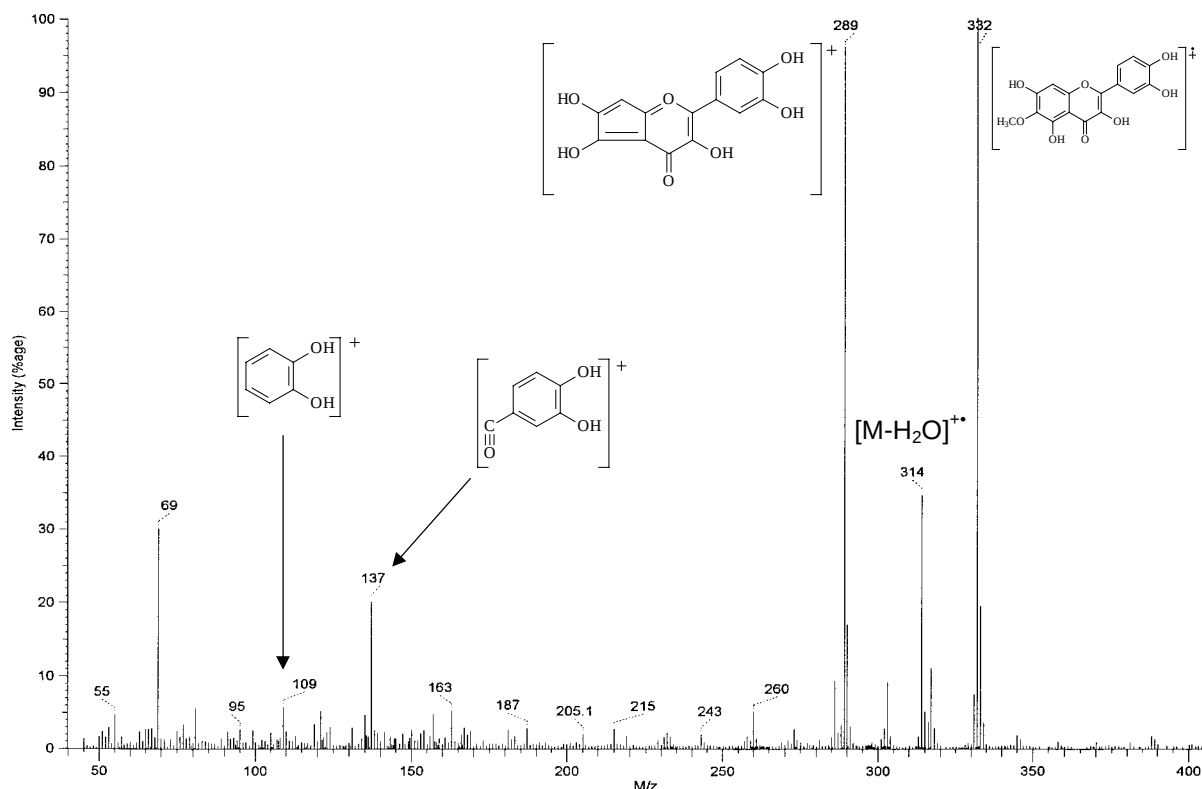
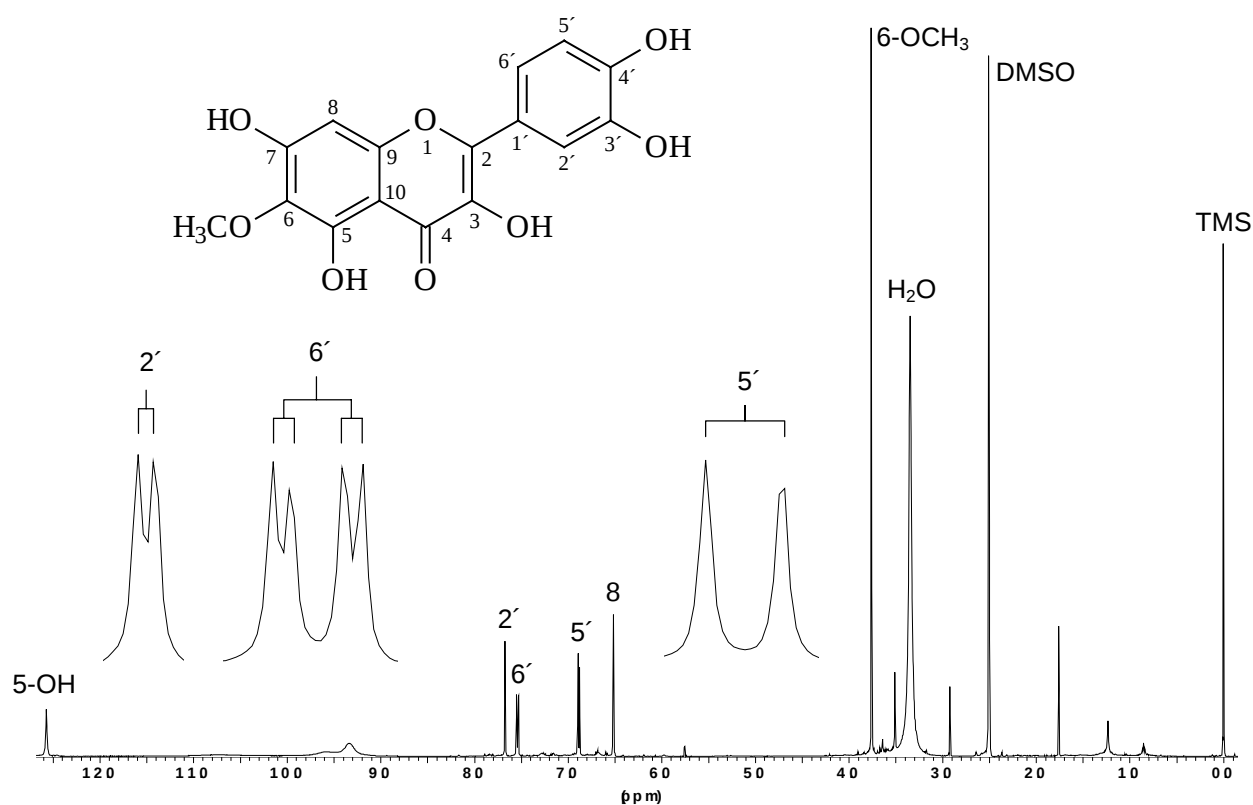
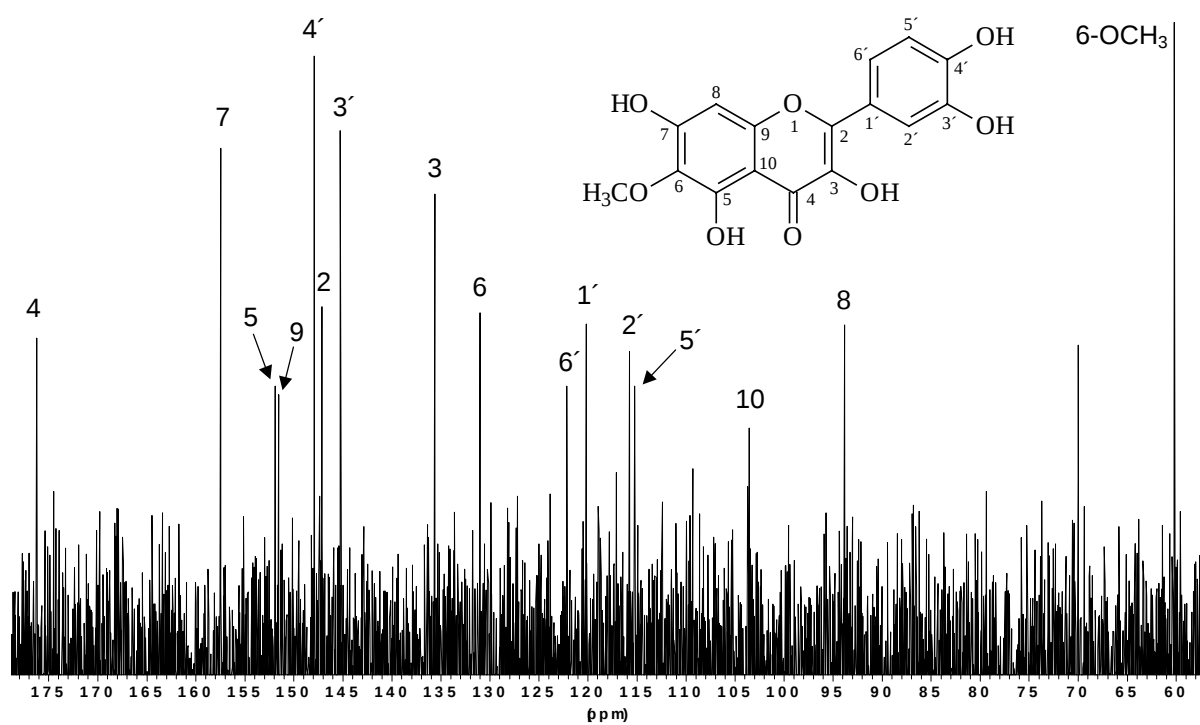


Bild 2.80: EI-MS-Spektrum von Verbindung **FA6**

Bild 2.81: ^1H NMR-Spektrum von **FA6** (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS)Bild 2.82: ^{13}C NMR-Spektrum von **FA6** (125 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

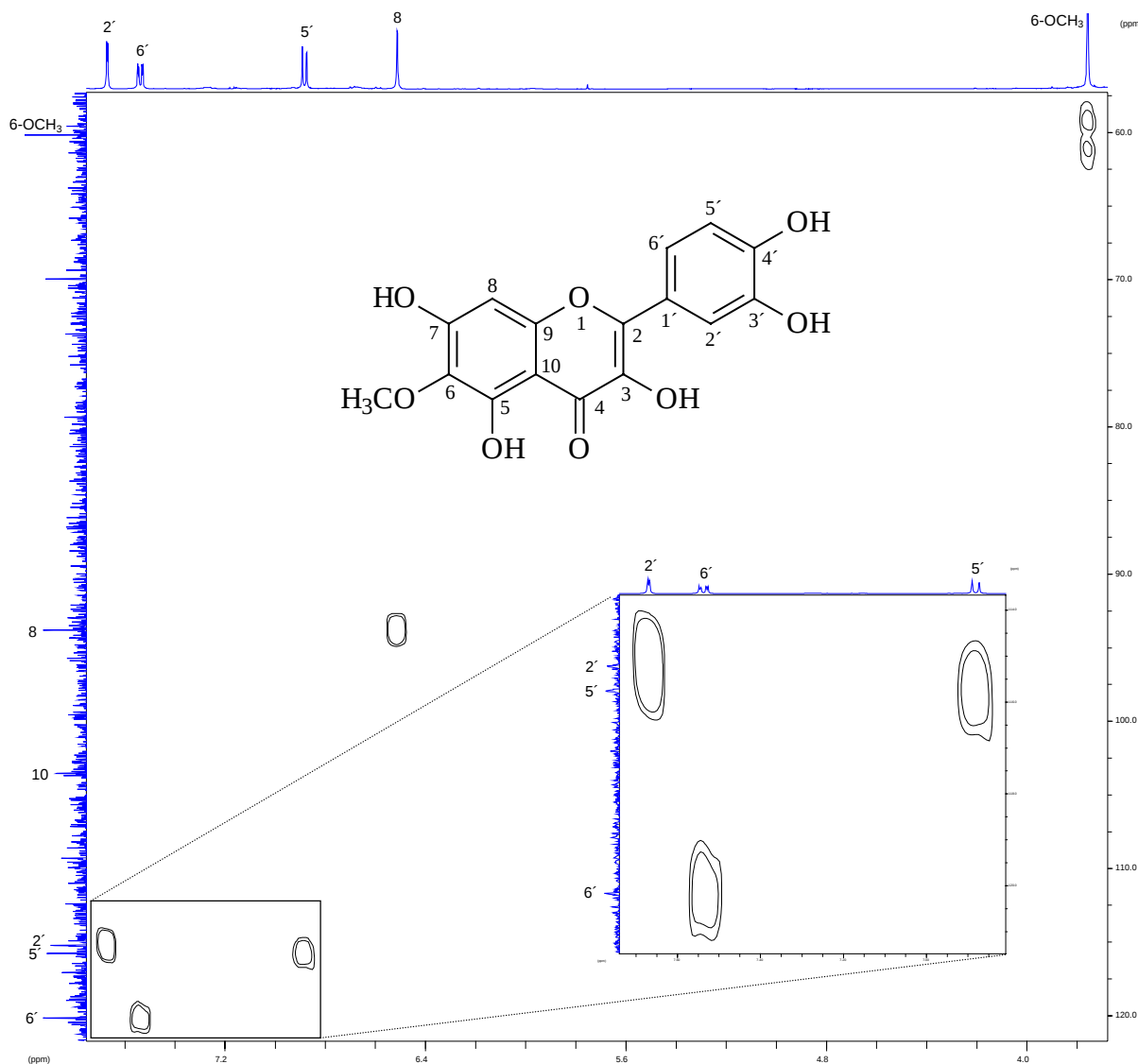


Bild 2.83: HMQC-Spektrum der Verbindung **FA6** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

Das ^1H NMR-Spektrum bestätigt durch das Fehlen des Singulets für das Proton an C-3, dass es sich bei **FA6** um ein Flavonol handelt (siehe Bild 2.81, S. 110). Die übrigen Protonensignale gleichen denen von Verbindung **FA3**, dem zu **FA6** analogen Flavon (vergl. Bild 2.73, S. 98 mit Bild 2.81, S. 110). Leichte Abweichungen existieren lediglich bei den Signallagen für die Protonen H- $2'$ und H- $6'$ des ABX-Systems des B-Ringes. Sie ergeben sich aus der nur bei **FA6** möglichen Wechselwirkung mit der OH-Gruppe an C-3.

Beim Vergleich der ^{13}C NMR-Spektren von **FA6** und **FA3** trifft man auf eine weitgehende Übereinstimmung (siehe Tabelle 2.15, S. 98 und Bild 2.82, S. 110), deutliche Abweichungen finden sich lediglich für die Kohlenstoffe des C-Ringes (vergl. Tabelle 2.15, S. 99 mit Tabelle 2.19, S. 112). So ist bei **FA6** das Signal für C-3 auf Grund der Hydroxylierung gegenüber **FA3** zu tiefem Feld verschoben. Diese Abschirmung betrifft bei **FA6** in geringerem Maße auch die beiden benachbarten Atome C-2 und C-3. Die Zuordnung der ^{13}C NMR-Shifts wird durch zusätzlich aufgenommene HMQC- und HMBC-Spektren weiter abgesichert (siehe Bild 2.83, S. 111 und Bild 2.84, S. 113).

Es handelt sich demnach bei **FA6** um das Flavonol Patuletin (3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon). Für die Substanz wurden neben zwei Synthesen [BHARDWAY et al., 1978 und NIELSEN et al., 1970] auch etliche Funde aus *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten beschrieben. Es handelt sich um die Spezies *A. calophylla* [FANG et al., 1986], *A. havanensis* [YU et al., 1987], *A. saltillensis* [YU et al., 1986a], *E. areolare* var. *leiocarpum* [YU et al., 1986b] und *E. gracile* [TORRENEGRA et al., 1984].

Tabelle 2.19: NMR-Daten von Verbindung **FA6** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d₆, TMS) im Vergleich zu Angaben für Patuletin: ¹PAßREITER, 1990 (80 MHz, CD₃OD, TMS); ²ARITOMI et al., 1986 (68 MHz, DMSO-d₆, TMS); *, #, § = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FA6	Patuletin ¹	C	FA6	Patuletin ²
8	6.51 s	6.46 s	2	147.11	146.9
2'	7.67 d (1.9)	7.70 d (2.1)	3	135.59	135.4
5'	6.88 d (8.8)	6.87 d (8.4)	4	176.21	175.9
6'	7.54 dd (1.9, 8.8)	7.57 dd (2.1, 8.5)	5	151.90*	151.7 [#]
6-OCH ₃	3.76 s	3.87 s	6	131.01	130.7
5-OH	12.57 s	-	7	157.41	151.3 [#]
			8	93.82	93.6
			9	151.53*	151.7 [#]
			10	103.54	103.3
			1'	122.15	121.9 [§]
			2'	115.23	115.5*
			3'	145.23	145.0
			4'	147.89	147.6
			5'	115.77	115.0*
			6'	120.17	120.0 [§]
			6-OCH ₃	60.17	59.9

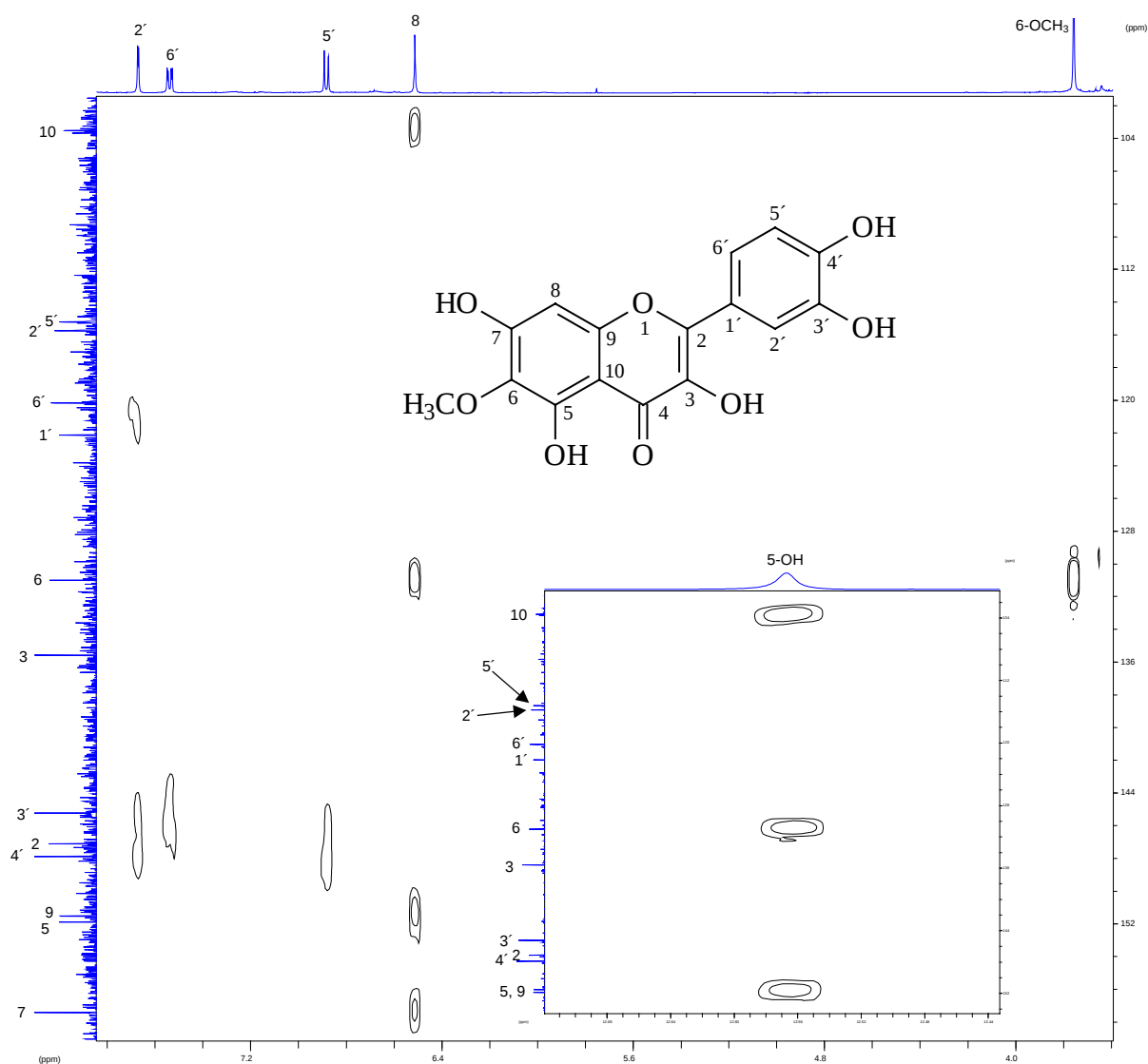
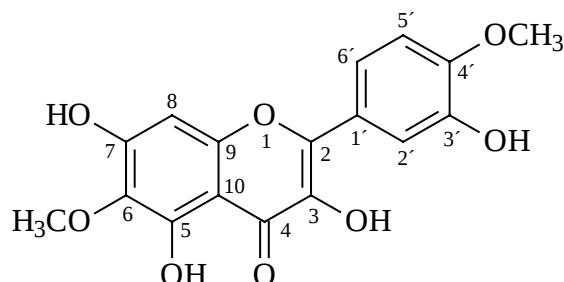


Bild 2.84: HMBC-Spektrum der Substanz **FA6**, die Einblendung zeigt die longrange-Kopplungen des Protons der 5-OH-Gruppe (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

2.2.8 Laciniatin = 3,3',5,7-Tetrahydroxy-4',6-dimethoxyflavon (Verbindung FA7)



Wie **FA6** wurde auch **FA7** ausschließlich im Methanol-Extrakt gefunden. Bei der Aufarbeitung der Fraktion M-XI fielen 4 mg der Substanz DC-rein an (siehe Kap. 6.5.5.7, S. 323).

Die R_f -Werte von **FA6** und **FA7** sind sich sehr ähnlich (siehe Tabelle 6.1, S. 298), **FA7** zeigt jedoch ein anderes Färbeverhalten nach der Detektion. An der gelbgrünen Fluoreszenz nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A erkennt man für gewöhnlich im B-Ring methylierte Quercetin-Derivate [WOLLENWEBER, 1982].

Tabelle 2.20: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FA7** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

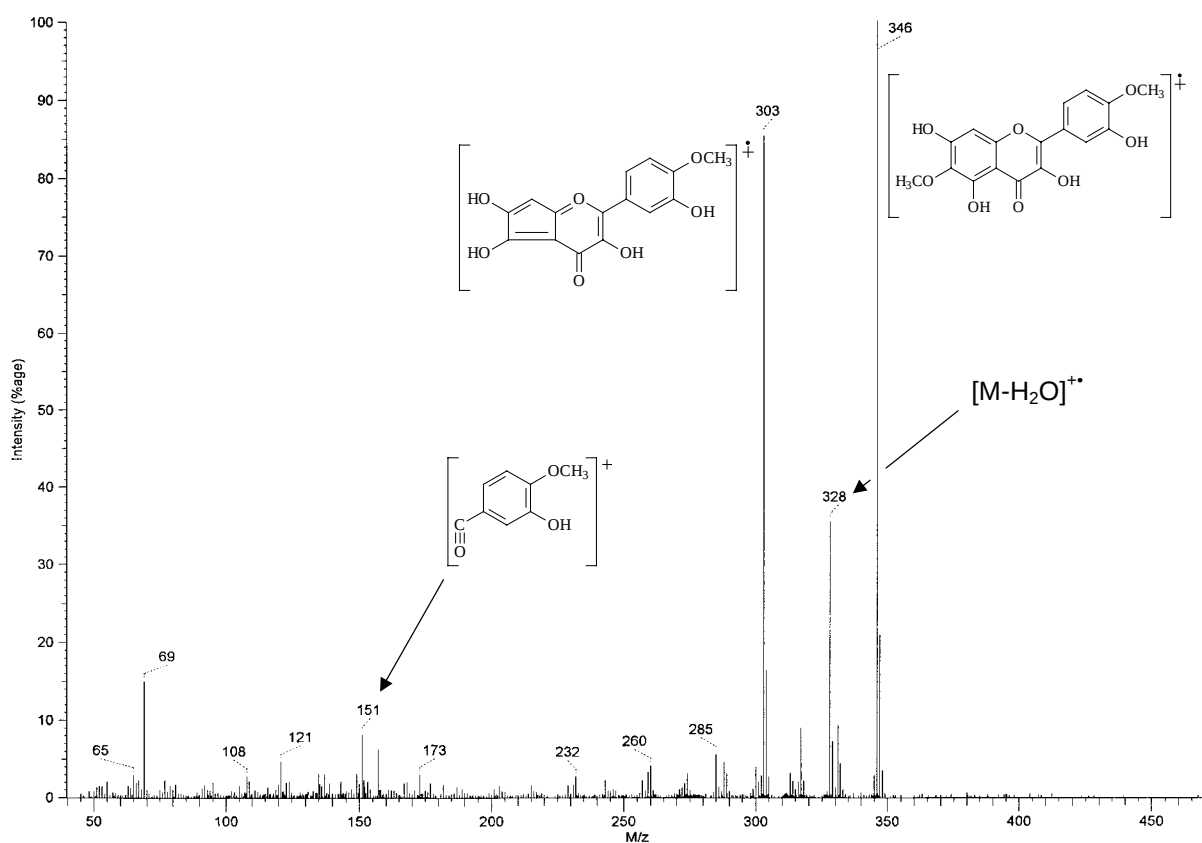
MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
257	269 sh	264	255	266	262
273 sh	328 sh	273 sh	270 sh	300 sh	300 sh
293 sh	400	298 sh	370	370 sh	370 sh
366		318 sh		430	425 sh
		384			

Die UV-Daten in Methanol von **FA7** stimmen annähernd mit denen von **FA6** überein (vergl. Tabelle 2.18, S. 108 mit Tabelle 2.20, S. 114), woraus folgt, dass auch **FA7** ein Flavonol mit doppelt substituierten B-Ring sein muß.

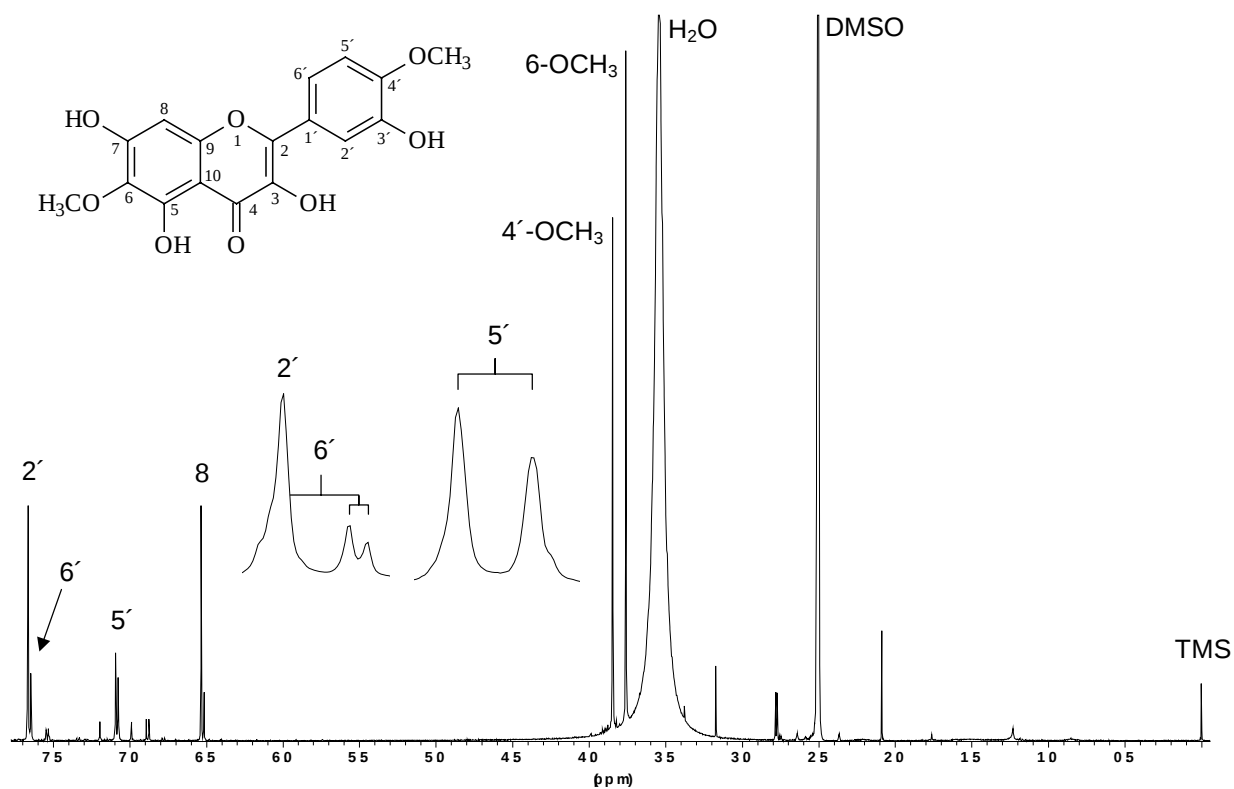
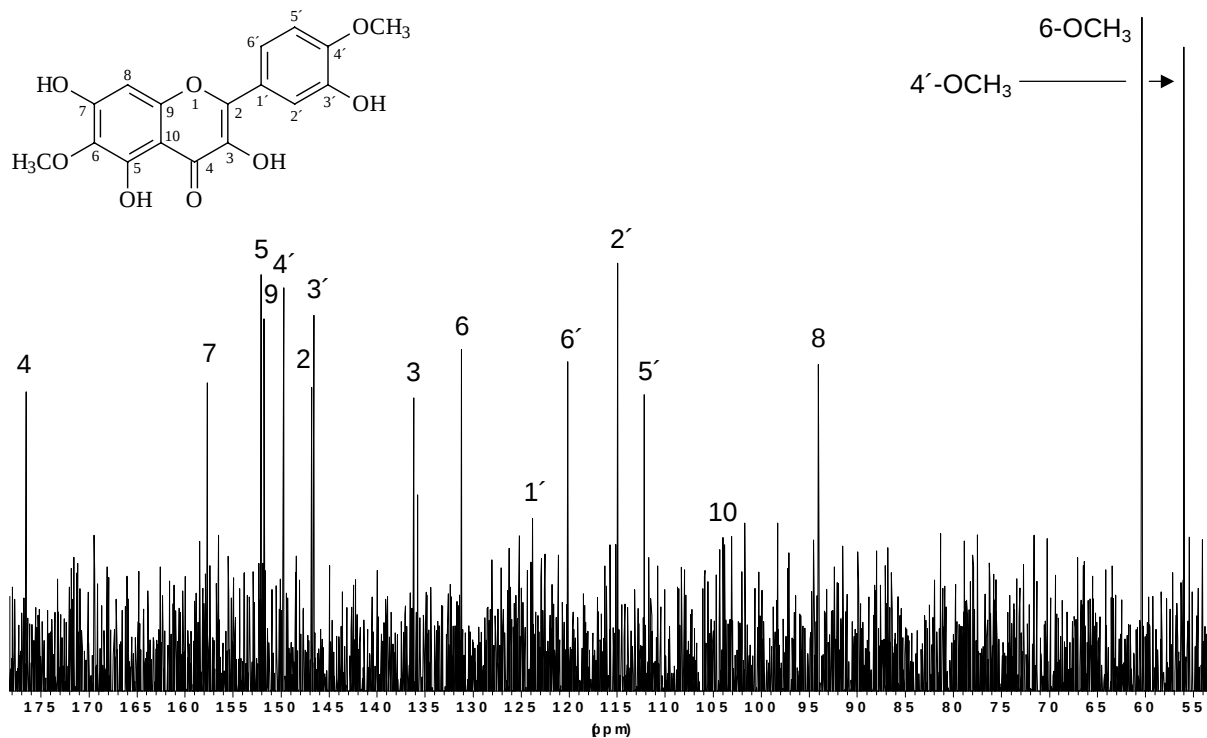
Im Natriummethanolat-Spektrum wird durch die ebenfalls auftretende Schulter am kurzwelligen Ast von Bande I eine freie 7-OH-Gruppe angezeigt [BACON et al., 1976]. Die Bande I wird im Falle von **FA7** um 34 nm unter Abnahme der Intensität bathochrom verschoben. Ein soches Phänomen wird bei 7-Hydroxy-Flavonoiden mit einer substituierten 4'-OH-Gruppe beobachtet [MERFORT, 1990].

Die Interpretation des Natriumacetat-Spektrum liefert die schon bei **FA6** beschriebenen Hinweise.

Nach der Zugabe von Borsäure zur Natriumacetat-haltigen Untersuchungslösung beträgt der bathochrome Shift von Bande I gegenüber der Lage des Absorptionsmaximums in Methanol nur noch 4 nm. Aufgrund dieses geringen Betrages kommen *ortho*-Dihydroxygruppen im Molekül nicht in Betracht [MABRY et al., 1970].

Bild 2.85: EI-MS-Spektrum von **FA7**Tabelle 2.21: NMR-Daten von Verbindung **FA7** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-*d*₆, TMS) im Vergleich zu Angaben für Laciniatin: ¹TIMMERMANN et al., 1979 (CCl₄, TMS); * = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], *J* [Hz] (in Klammern)

H	FA7	Laciniatin ¹	C	FA7
8	6.53 s	6.54 s	2	145.65*
2'	7.66 brs	7.60 d (2.5)	3	136.02
5'	7.08 d (8.2)	6.84 d (9.0)	4	176.37
6'	7.65 dd (2.2, 8.2)	7.70 dd (2.5, 9.0)	5	151.93
4'-OCH ₃	3.85 s	3.87 s	6	131.05
6-OCH ₃	3.76 s	3.72 s	7	157.50
			8	93.90
			9	151.62
			10	103.81
			1'	123.63
			2'	114.78
			3'	146.39*
			4'	149.56
			5'	112.02
			6'	119.98
			4'-OCH ₃	55.82
			6-OCH ₃	60.21

Bild 2.86: ^1H NMR-Spektrum von FA7 (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)Bild 2.87: ^{13}C NMR-Spektrum von FA7 (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)

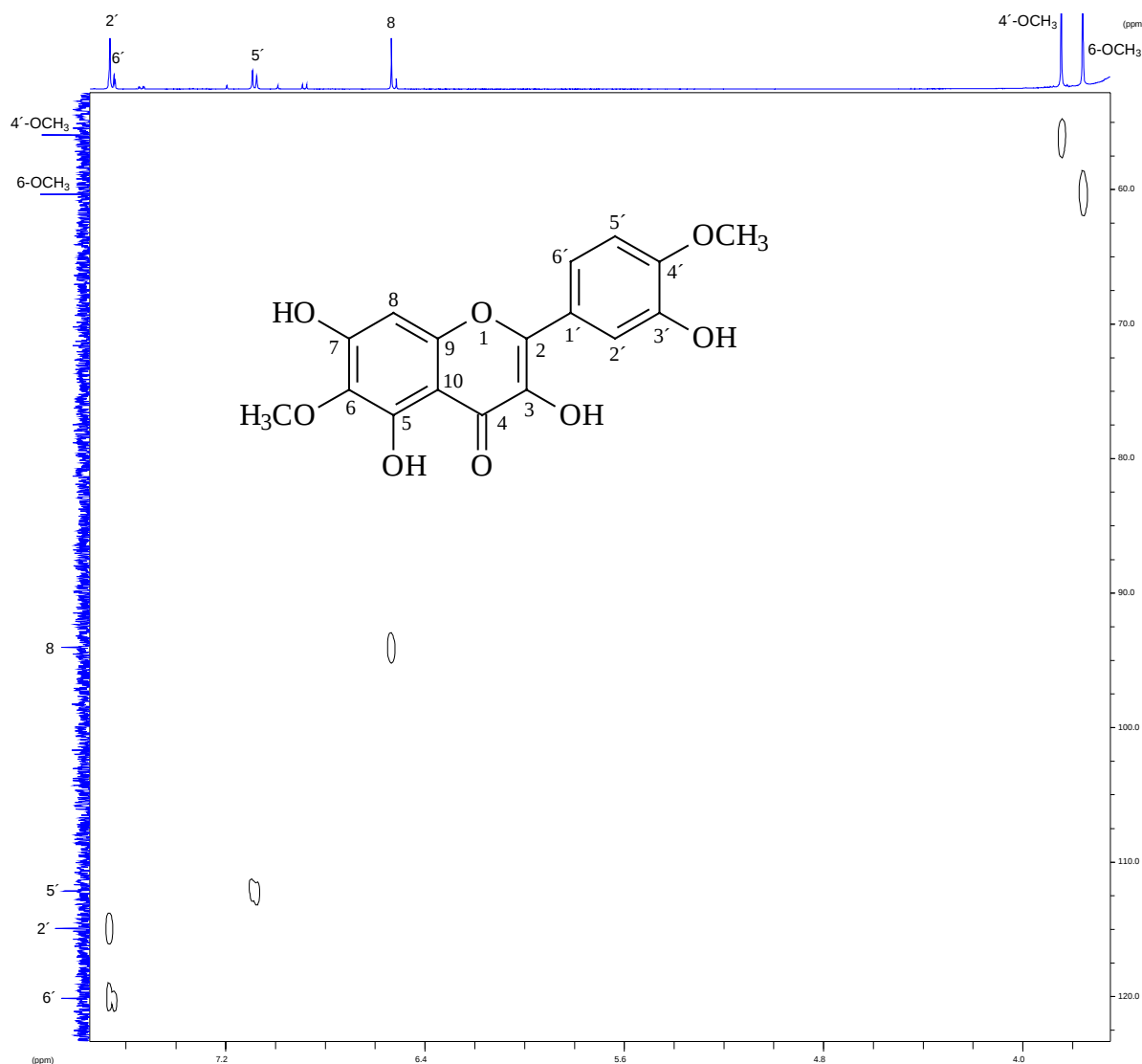


Bild 2.88: HMQC-Spektrum der Verbindung **FA7** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Eine *ortho*-Dihydroxygruppe im B-Ring kann auch dadurch ausgeschlossen werden, dass das AlCl_3 - und das AlCl_3/HCl -Spektrum fast deckungsgleich sind [MARKHAM, 1982].

Das EI-MS-Spektrum von **FA7** (siehe Bild 2.85, S. 115) zeigt dieselben Fragmentierungsschritte wie bei **FA6**. Das $[\text{B}_2]^+$ -Fragment von **FA7** tritt jedoch bei m/z 151 auf und steht damit im Einklang mit einem 3-Hydroxy-4'-methoxy-substituierten B-Ring.

Das ^1H NMR-Spektrum von **FA7** enthält im Vergleich zu **FA6** ein weiteres 3-Protonen-Singulett bei 3.85 ppm (vergleiche Bild 2.81, S. 110 und Bild 2.86, S. 116), welches zu einer zusätzlichen Methoxygruppe gehört. Ein weiterer Unterschied zum Spektrum von **FA6** besteht in den Shiftwerten der Signale für die Protonen des ABX-Systems. Alle weiteren Signale zeigen, dass die Substitution des A- und des B-Ringes mit **FA6** übereinstimmt (vergl. Tabelle 2.19, S. 112 mit Tabelle 2.21, S. 115). Dieser Befund steht auch im Einklang mit den ^{13}C NMR-Daten (siehe Bild 2.87, S. 116 und Bild 2.88, S. 117). Die zusätzliche Methoxygruppe muß demnach dem B-Ring angehören. Zur Klärung der exakten Position des Substituenten wurde ein HMBC-Spektrum aufgenommen (siehe Bild 2.84, S. 113). Hier besteht eine Kopplung zwischen dem angesprochenen Signal für die Methoxyprotonen bei

3.85 ppm und dem Signal für einen quartären Kohlenstoff bei 149.56 ppm (C-4'). Ein Vergleich mit den Angaben aus der Literatur [HARBORNE et al., 1982] zeigt, dass ein solcher Shift nur mit der 3'-Hydroxy-4'-methoxy-Substitution vereinbar ist.

Somit handelt es sich bei **FA7** um 3,3',5,7-Tetrahydroxy-4',6-dimethoxyflavon, eine Substanz, die auch unter dem Trivial-Namen Laciniatin bekannt ist. Die Verbindung erhielt ihren Namen auf Grund der Tatsache, dass die Substanz zum ersten Mal aus der Asteraceae *Brickellia laciniata* isoliert werden konnte [TIMMERMAN et al., 1979]. Daneben existieren noch mehrere Nachweise für verschiedene *Arnica*-Arten [EBERT et al., 1988; MERFORT et al., 1986]. Für die Gattung *Eupatorium* ist dies der erste Beleg.

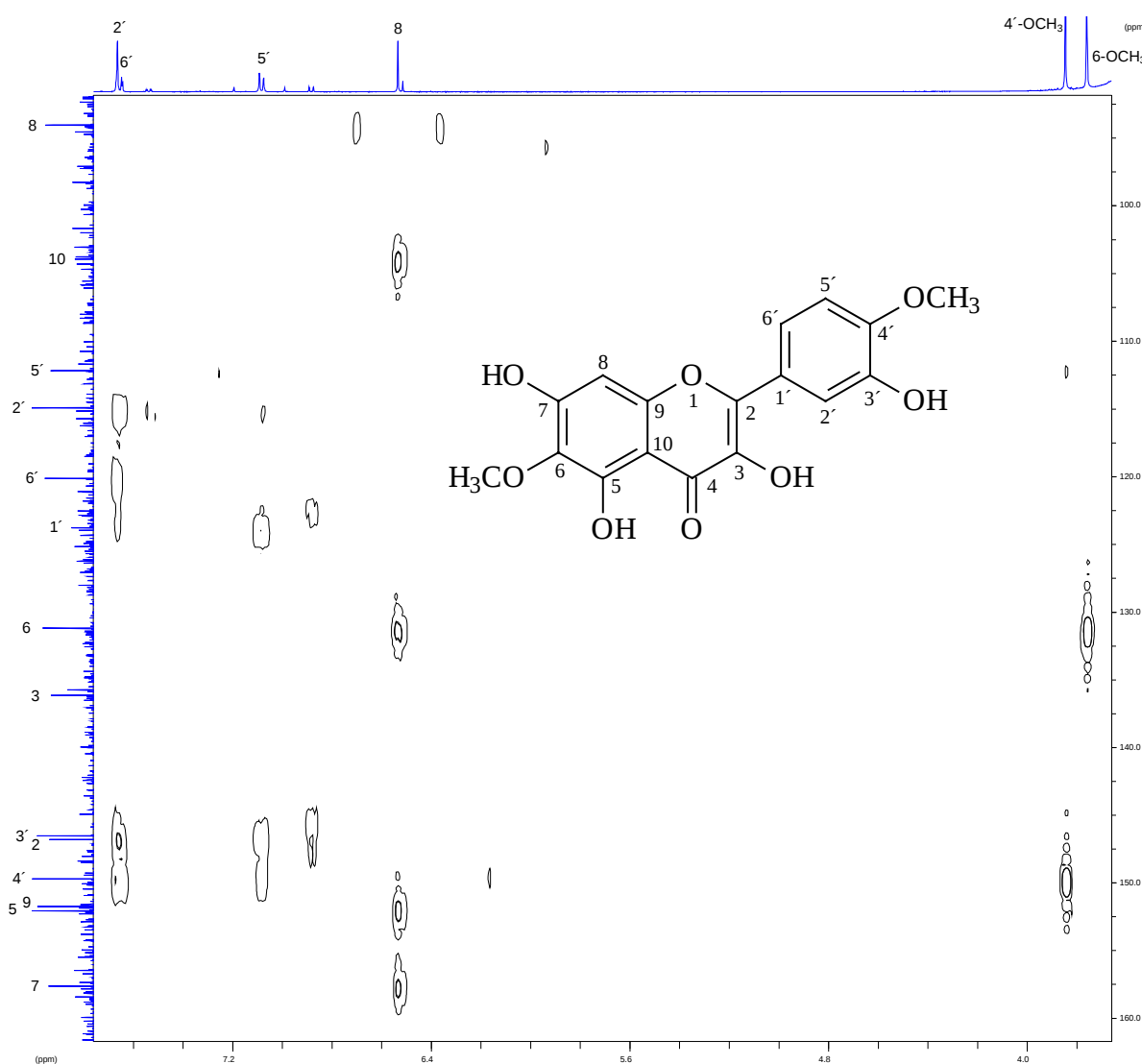
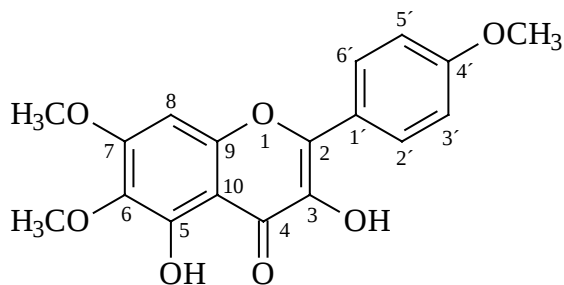


Bild 2.89: HMBC-Spektrum der Substanz **FA7** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

2.2.9 Mikanin = 3,5-Dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavon (Verbindung FA8)



Verbindung **FA8** wurde in einer Ausbeute von 3 mg aus Fraktion M-IX isoliert. Auch dieses Flavonoid wurde nur im Methanol-Extrakt gefunden (siehe Kap. 6.5.5.8, S. 323).

Wie bei **FA7** deutet die gelbgrüne Fluoreszenz nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A auf ein im B-Ring methyliertes Quercetin-Derivat hin [WOLLENWEBER, 1982].

Im UV-Spektrum (Methanol) von **FA8** (siehe Tabelle 2.22, S. 119) liegt die Bande I bei 360 nm und damit im Bereich der Flavonole mit freier 3-OH-Gruppe [MABRY et al., 1970]. Wird die Untersuchungslösung zusätzlich mit Natriummethanolat versetzt, so wird das Absorptionsmaximum von Bande I um 46 nm bathochrom verschoben. Da gleichzeitig die Intensität der Absorptionsbande abnimmt und die Substanz von der starken Base nicht zersetzt wird, könnte es sich um ein Flavonol mit substituierter oder fehlender 4'-OH-Gruppe handeln [MABRY et al. 1970].

Nach der Zugabe von Natriumacetat unterliegt Bande II keinem Shift. Damit muß die 7-OH-Gruppe substituiert sein [MARKHAM, 1982]. Ein zusätzlicher Hinweis darauf ist die Lage der Bande I, die hier bei einer längeren Wellenlänge auftritt als im Methanolat-Spektrum. Dieses Verhalten tritt häufig bei Flavonen und Flavonolen mit substituierter 7-OH-Gruppe auf [BACON et al., 1976].

Tabelle 2.22: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FA8** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
256 sh	261	255	255	270	267
270	280 sh	270 sh	270 sh	300 sh	300 sh
337 sh	333 sh	347	347	369 sh	363 sh
360	406	415 sh		415	415

Die Abwesenheit von *ortho*-Dihydroxygruppen läßt sich daraus folgern, dass sich weder das Natriumacetat- noch das Aluminiumchlorid-Spektrum nach Zugabe von Borsäure bzw. Salzsäure nennenswert verändert [MABRY et al., 1970]. Im Aluminiumchlorid-Spektrum beweist der bathochrome Shift von Bande I gegenüber dem Methanol-Spektrum (55 nm), verbunden mit der Existenz der Schulter bei 363 nm, dass **FA8** zu den Flavonolen mit 5-OH-Gruppe zu zählen ist [JURD, 1969].

Das EI-MS-Spektrum zeigt, dass **FA8** ähnlich fragmentiert wie die anderen bereits diskutierten Flavonole **FA6** und **FA7** (siehe Bild 2.90, S. 120). Das $[B_2]^+$ -Fragment bei m/z 135 im Spektrum von **FA8** deutet im Gegensatz zu den beiden genannten Flavonolen auf einen monomethoxylierten B-Ring hin.



Bild 2.90: EI-MS-Spektrum von **FA8**

Das ^1H NMR-Spektrum zeigt sechs Signale für vierzehn Protonen (siehe Bild 2.91, S. 121). Die Monosubstitution des B-Ringes an C-4' wird durch zwei typische Dubletts für ein aromatisches AA'BB'-System im tiefen Feld bestätigt. Im Bereich zwischen 3.5 und 4.0 ppm finden sich drei 3-Protonen-Singulets für je eine Methoxygruppe. Daneben tritt nur noch ein Signal bei 6.92 ppm auf, das dem H-8 zuzuordnen ist. Dieses Proton koppelt im HMBC-Spektrum (siehe Bild 2.94, S. 123) mit fünf Nachbar-Kohlenstoffen (C-6 bis C-10). Das C-6 zeigt eine zweite Kopplung mit dem Methoxy-Signal bei 3.74 ppm. Somit besitzt auch **FA8** eine 6-Methoxygruppe. Das C-7 muß ebenfalls Methoxy-substituiert sein. Dies wird durch die ^3J -Kopplung zwischen dem Signal für C-7 (158.83 ppm) und dem Methoxy-Signal bei 3.93 ppm bewiesen. Das Dublett für die Protonen H-2' und H-6' bei 8.19 ppm zeigt longrange-Kopplungen mit den Signalen für C-2 (146.98 ppm), C-2'/C-6' (129.40 und 129.60 ppm) und C-4' (160.82 ppm). Das Signal für C-4' koppelt mit dem Signal für die dritte Methoxygruppe bei 3.85 ppm, so dass der B-Ring 4'-mono-methoxyliert sein muß.

Tabelle 2.23: NMR-Daten von Verbindung **FA8** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben für Mikanin: ¹TIMMERMANN et al., 1979 (CCl₄, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FA8	Mikanin ¹	C	FA8
8	6.92 s	6.8 s	2	146.98
2'	8.19 d (8.8)	8.2 d (8)	3	136.36
3'	7.13 d (8.8)	7.1 d (8)	4	176.47
5'	7.13 d (8.8)	7.1 d (8)	5	151.85
6'	8.19 d (8.8)	8.2 d (8)	6	131.49
4'-OCH ₃	3.85 s	-	7	158.83
6-OCH ₃	3.74 s	-	8	91.49
7-OCH ₃	3.93 s	-	9	151.23
5-OH	-	12.4 s	10	104.60
			1'	123.40
			2'	129.40
			3'	114.27
			4'	160.82
			5'	114.27
			6'	129.60
			4'-OCH ₃	55.61
			6-OCH ₃	60.29
			7-OCH ₃	56.66

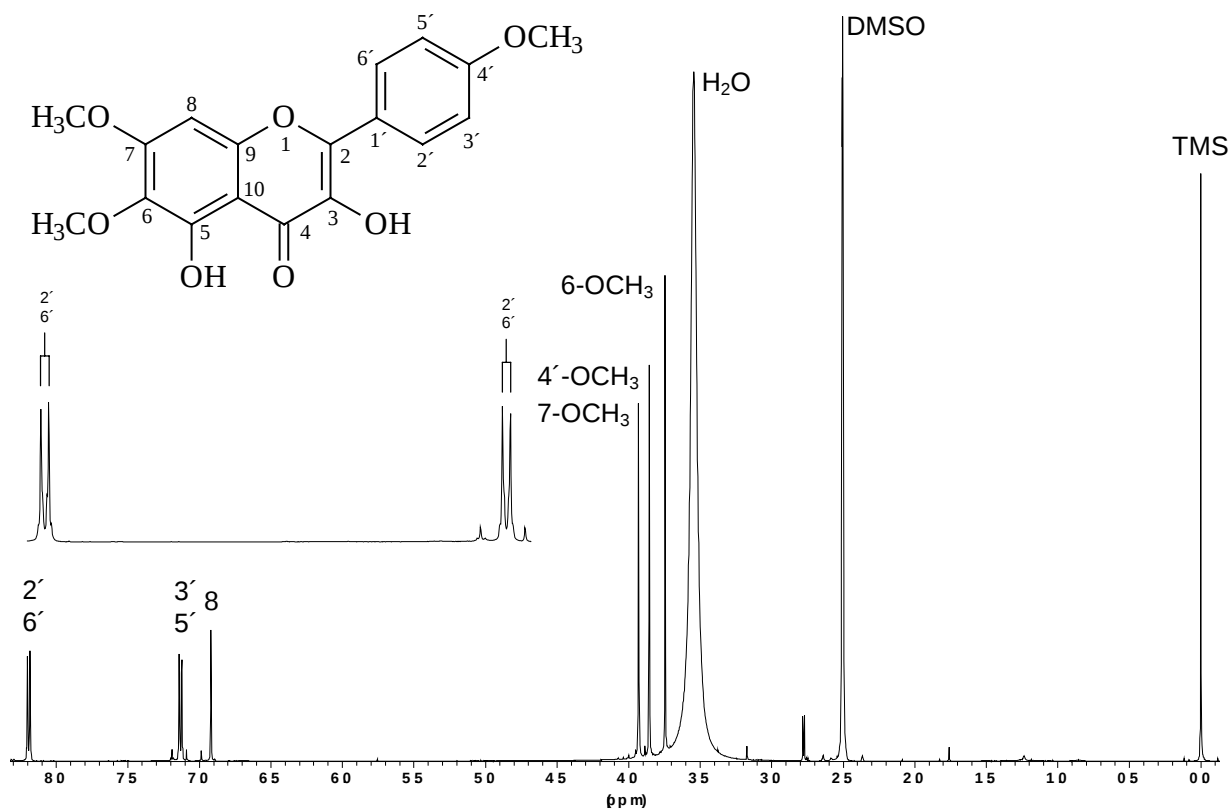
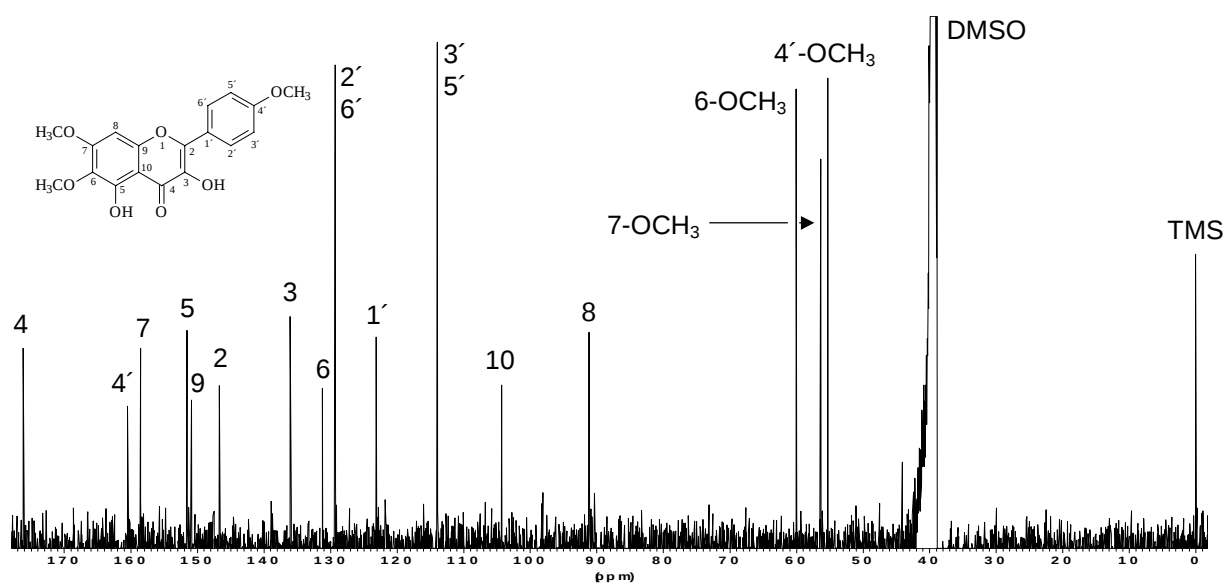
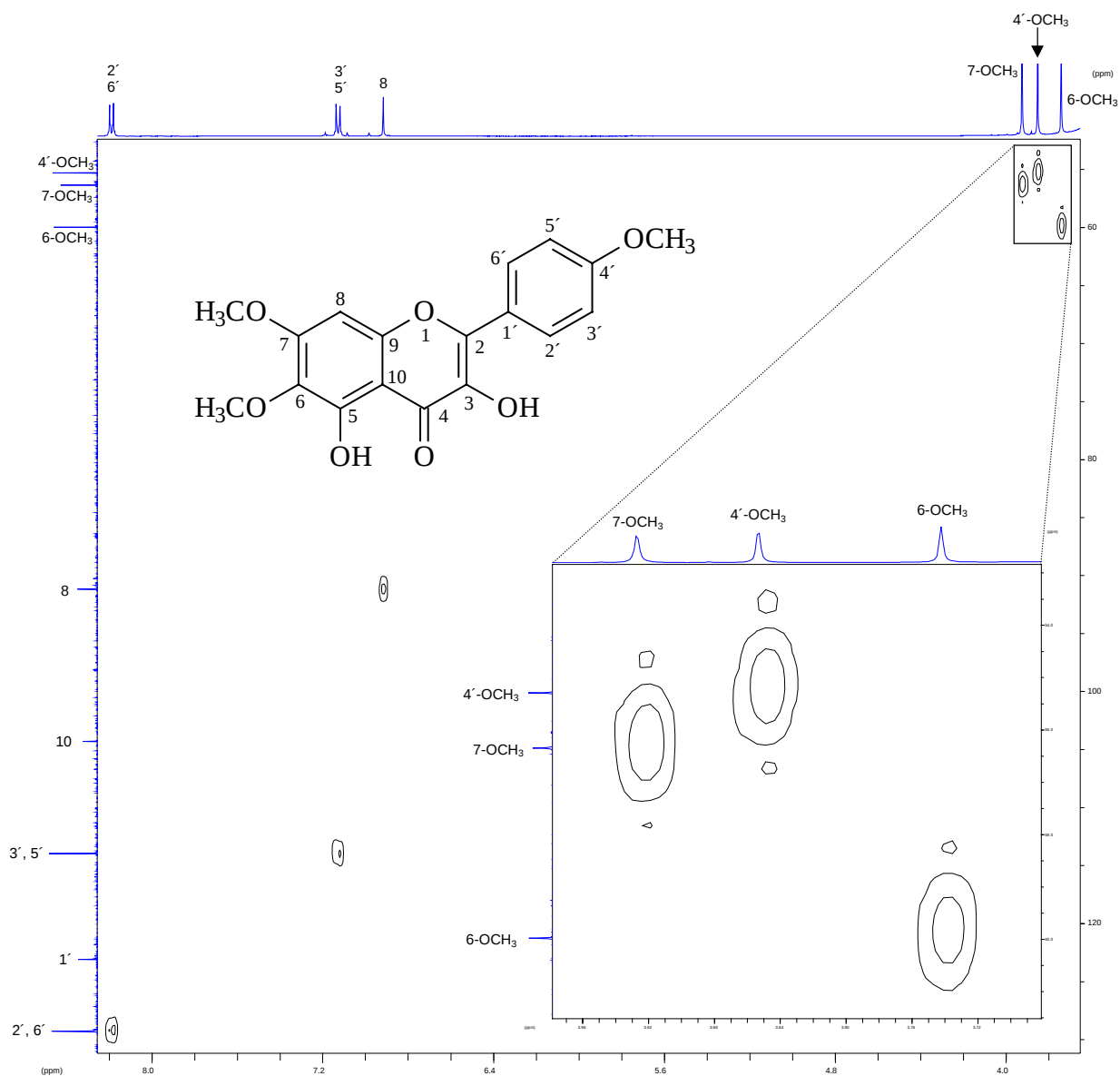


Bild 2.91: ¹H NMR-Spektrum von **FA8** (500 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Bild 2.92: ¹³C NMR-Spektrum von **FA8** (125 MHz, DMSO-d₆, TMS)Bild 2.93: HMQC-Spektrum der Verbindung **FA8** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d₆, TMS)

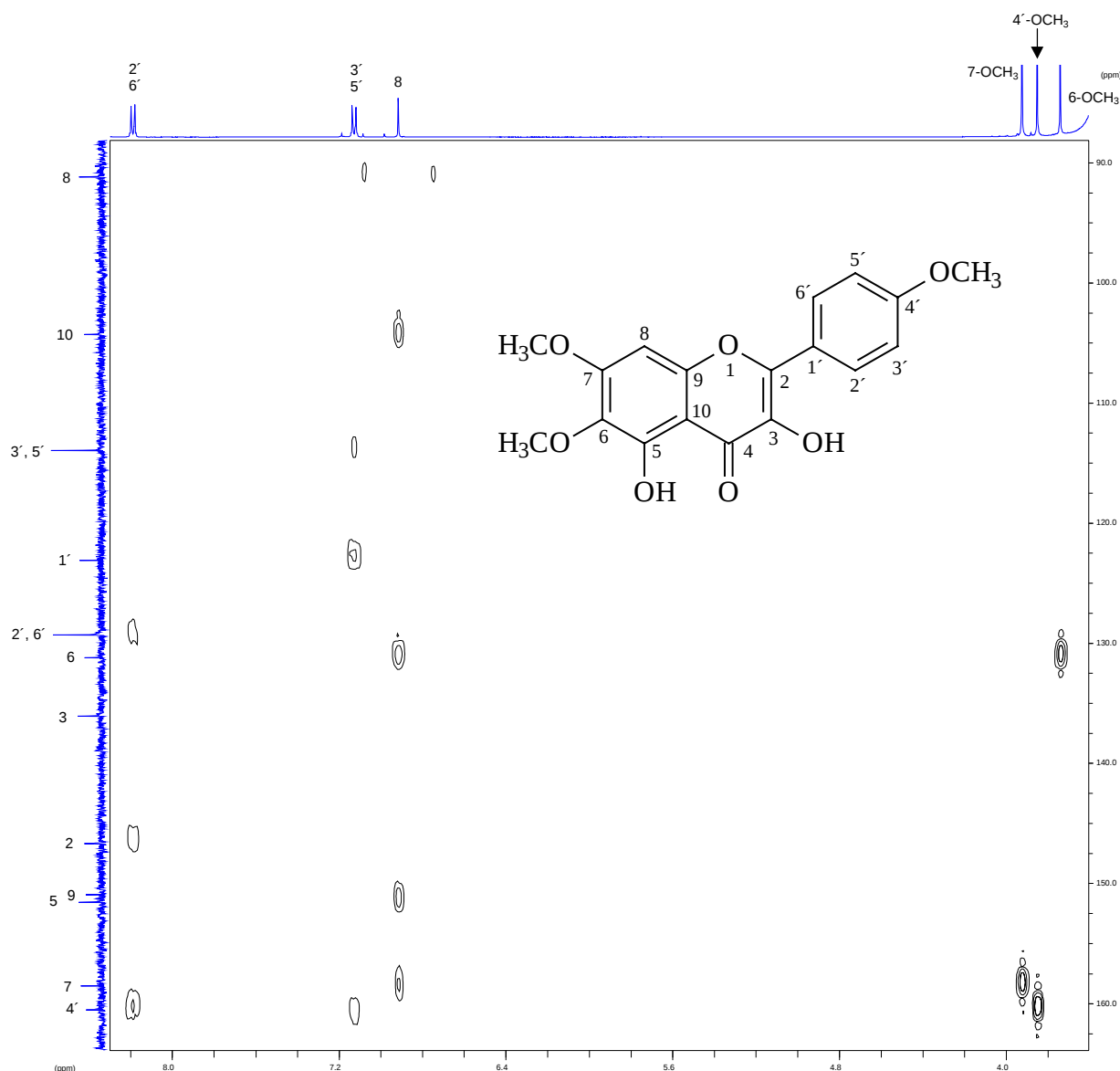
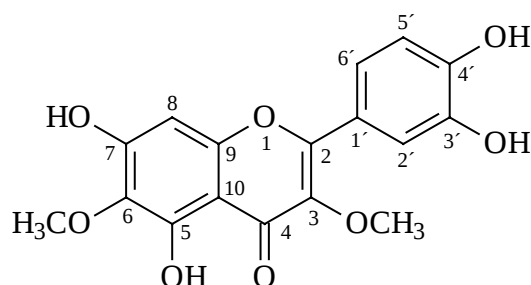


Bild 2.94: HMBC-Spektrum der Substanz **FA8** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so kann es sich bei **FA8** nur um Mikanin (3,5-Dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavon) handeln. Der Erstfund der Verbindung datiert auf das Jahr 1965. KIANG et al. isolierten das Flavonol aus der Eupatorieae *Mikania cordata* und nannten es „Mikanin“. Kurze Zeit später wurden zwei Synthesen publiziert [SIM, 1967; WAGNER et al., 1967]. Für die Gattung *Eupatorium* wird die Verbindung hiermit zum ersten Mal beschrieben.

2.2.10 Axillarin = 3',4',5,7-Tetrahydroxy-3,6-dimethoxyflavon (Verbindung FA9)



Das einzige 3-Methoxy-Flavon, das im Extrakt von *E. semialatum* gefunden werden konnte, war Axillarin (**FA9**). Es kam in Fraktion D-IV-2 nur in Spuren vor und konnte nicht isoliert werden (siehe Kap. 6.5.3.2, S. 310). Die Identifizierung gelang durch direkten Vergleich mit authentischer Substanz mittels DC und LC-MS (siehe Bild 2.95, S. 124).

Die Erstbeschreibung von **FA9** beanspruchen zwei Arbeitskreise für sich [HERZ et al., 1966; TAYLOR und WONG, 1965]. Die Bezeichnung „Axillarin“ wurde in der Arbeit von 1966 eingeführt, da die Verbindung aus der nordamerikanischen Pflanze *Iva axillaris* isoliert worden war. Den tatsächlichen Erstfund aus *Xanthium pensylvanicum* belegt jedoch die Arbeit von 1965. Für die Gattung *Ageratina* existiert bisher lediglich ein Beleg für *A. saltillensis* [YU et al., 1986a]. Für das Genus *Eupatorium* ist die Verbindung neu.

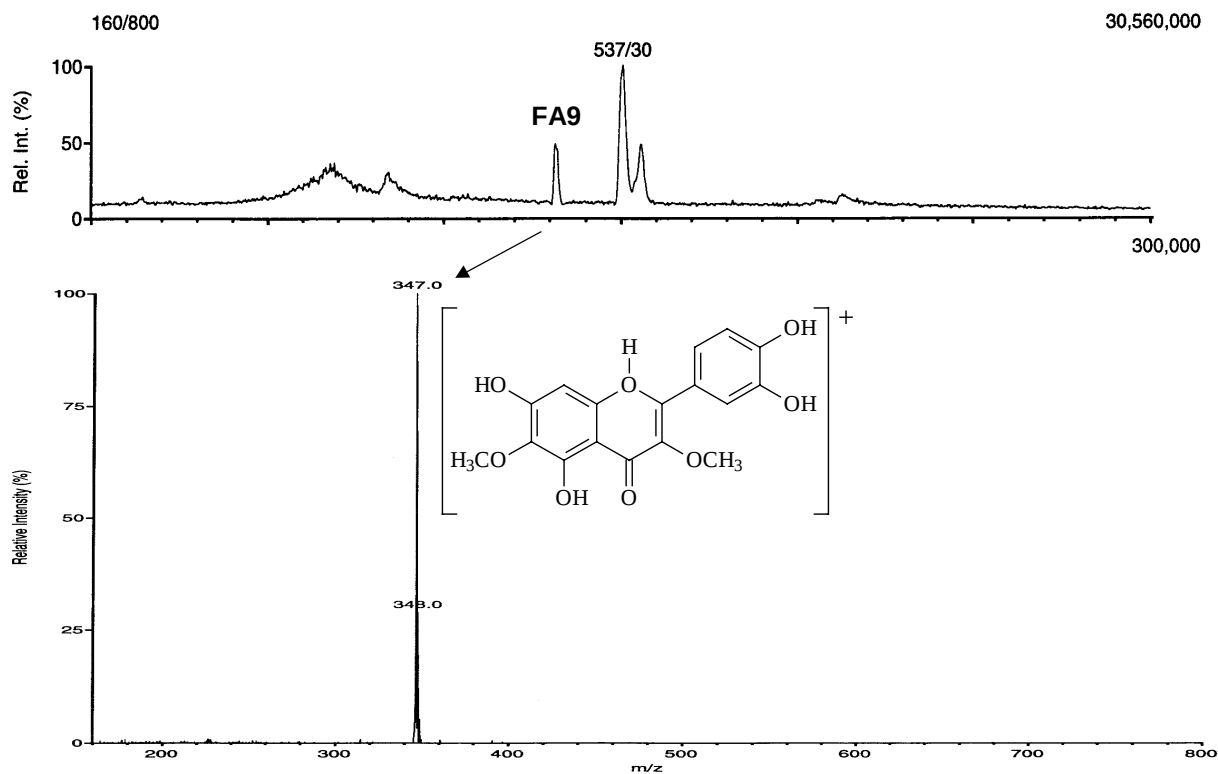


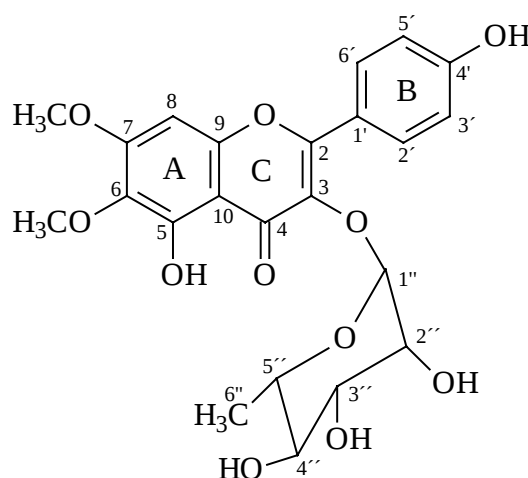
Bild 2.95: LC-Chromatogramm des LC-MS-Laufes von Fraktion D-IV-2 mit **FA9** als erstem Flavonoidpeak (oben) und APCI-MS-Spektrum der mit diesem Peak bei 471 Scans eluierten Substanz (darunter); die Peaks der später eluierenden Verunreinigungen sind nicht dargestellt

2.3 Isolierung und Identifizierung von Flavonoid-Glykosiden aus *Eupatorium semialatum*

2.3.1 Extraktion und Fraktionierung

Sämtliche isolierten und identifizierten Flavonoid-Glykoside entstammen dem Methanol-Extrakt (siehe Kap. 6.5.6, S. 324).

2.3.2 Eupalin = 3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid (Verbindung FG1)



Die Verbindung **FG1** konnte in einer Ausbeute von 5 mg aus Fraktion M-II des Methanol-Extraktes DC-rein gewonnen werden (siehe Kap. 6.5.6.1, S. 324).

Die Analyse des im LC-MS detektierten Peaks von **FG1** (24.24 min) zeigte im APCI-Modus ein Molekülion bei m/z 477 $[M+H]^+$ (siehe Bild 2.96, S. 126). Nach Untersuchungen von STEVENS et al. (1995) werden Flavonoide unter diesen Reaktionsbedingungen am O-1 protoniert. Anschließend werden bei Glykosiden lediglich die Zucker abgespalten, für eine weitere Fragmentierung der Aglyka reicht die Kollisionsenergie der beschleunigten Pseudomolekülionen nicht aus (vgl. Kap. 6.4.2, S. 306). Im Falle von **FG1** spaltet das Pseudomolekülion ein Fragment der Masse 146 ab. Der Verlust dieses Bruchstückes deutet darauf hin, dass es sich bei dem Zucker mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Desoxyhexose Rhamnose handelt, da andere Desoxyhexosen bei den bisher bekannten Flavonoid-Glykosiden nur äußerst selten gefunden worden sind [HARBORNE et al., 1975].

Das Tochterionen-Spektrum zeigt die Fragmentierung des protonierten Aglykons (m/z 331) unter pseudo-MS/MS/MS-Bedingungen (siehe Bild 2.96, S. 126). Hierbei reicht die zugeführte kinetische Energie nicht aus, die üblichen Zerfallswege anzustoßen (siehe Bild 2.66, S. 89). Retro-Diels-Alder-Fragmente und B_2^+ -Ionen werden aus diesem Grund meist nicht beobachtet, vielmehr dominiert die Abspaltung von leichten Radikalen und kleinen Neutralteilchen aus dem protonierten Aglykon. Bei **FG1** entsteht aus dem protonierten Aglykon durch Abspaltung eines Methylradikals das Radikalkation mit einer

Masse von 316 amu. Die Wahrscheinlichkeit ist sehr hoch, dass dieses Radikal aus dem Verlust einer 6-Methoxygruppe hervorgeht, da sich in diesem Falle ein stabiles chinoides Radikalkation bilden kann [BOWIE und CAMERON, 1966]. Dieses Teilchen eliminiert daraufhin ein Wassermolekül. An dessen Bildung könnte neben der 6-Methoxy- auch eine 7-Methoxygruppe beteiligt sein. Durch diese Wasserabspaltung würde ein gespannter Oxetring entstehen, der durch Anellierung mit dem Flavonoidkern ein trizyklisches System bildet [STEVENS, 2000]. Das aus dieser Reaktion hervorgegangene, durch die hohe Spannung des Oxetringes sehr kurzlebige Teilchen mit m/z 298 spaltet unter Bildung des stabilen Ions mit der Masse 270 amu (Basispeak) Kohlenmonoxid ab. Hierbei wird der viergliedrige Ring wieder zerstört. Anschließend kommt es durch Elimination der Carbonylgruppe des C-Ringes zu einer Ringverengung. Die beschriebenen Decarboxylierungen werden bei Flavonoiden häufig beobachtet [MARKHAM, 1982].

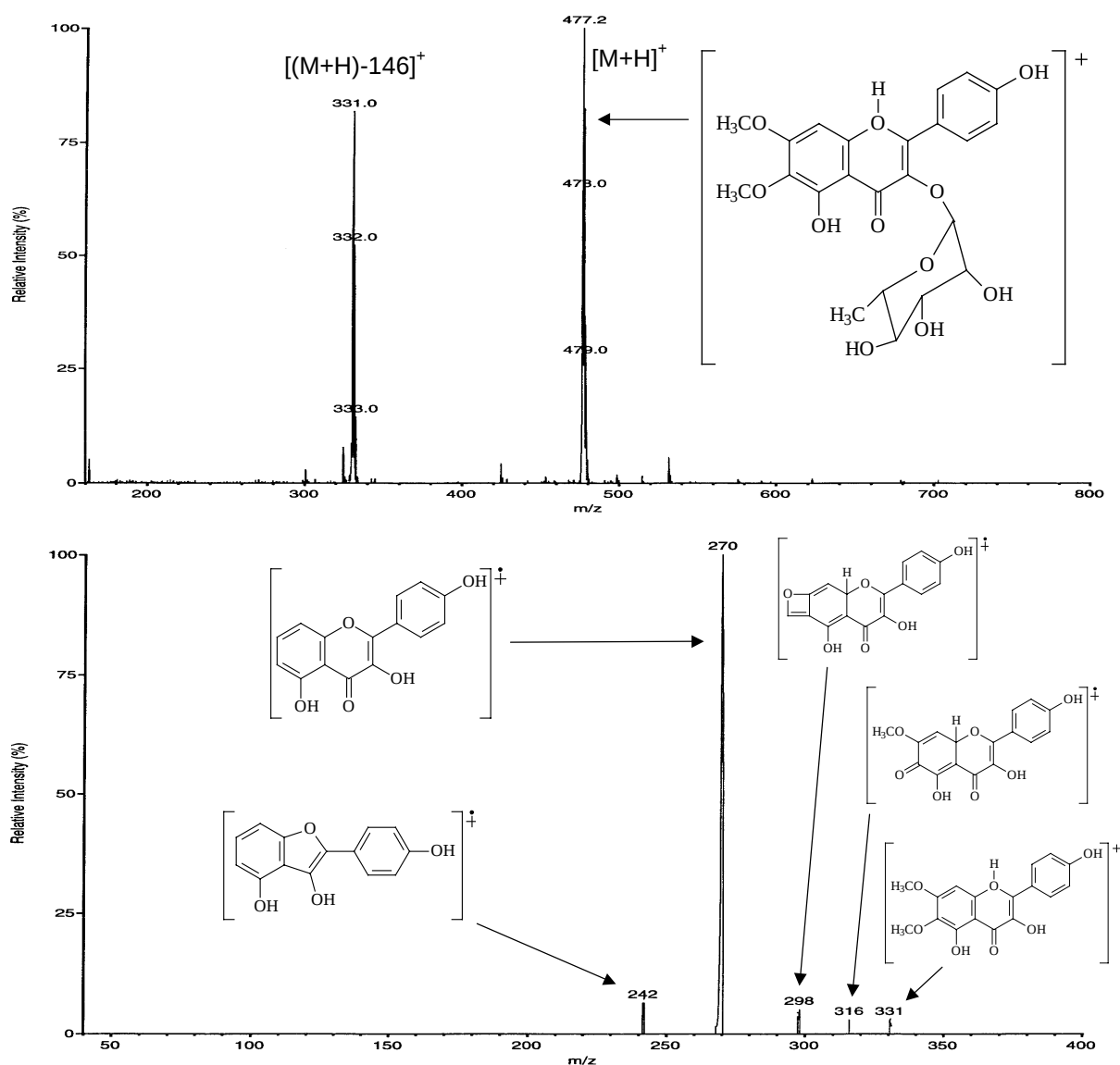


Bild 2.96: APCI-CID-MS-Spektrum von **FG1** (oben), darunter pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des protonierten Aglykons

Tabelle 2.24: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG1** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
267	254 sh	268	268	277	279
328	266	345	333	300 sh	300 sh
	295 sh	385 sh		354	354
	382			400 sh	400 sh

Das UV-Spektrum in Methanol von **FG1** (siehe Tabelle 2.24, S. 127) zeigt die Bande I bei 328 nm im für Flavonole mit einer substituierten OH-Gruppe an C-3 erwarteten Bereich (320 – 360 nm) [CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971]. Da das Maximum am kurzwelligen Ende dieses Bereiches auftritt, muß der B-Ring entweder gering substituiert oder die C-3-OH-Gruppe glykosidiert sein, da bei 5-Hydroxy-Flavonolen eine Glykosidierung an dieser Position die Bande I um 12 bis 17 nm hypsochrom verschiebt [MABRY et al., 1970]. Eine Aufspaltung der Bande I ist nicht zu beobachten, wodurch eine Sauerstoff-Substitution an C-8 ausgeschlossen werden kann [HARBORNE et al., 1982; VOIRIN, 1983]. Auch die Bande II (267 nm) zeigt keine Aufspaltung. Daraus folgt, dass der B-Ring entweder einen oder drei Substituenten besitzt. Da bei di- und trisubstituierten B-Ringen Bande II unter 260 nm erscheint, muß bei **FG1** Monosubstitution vorliegen [CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971]. Bei diesem Substituenten muß es sich um eine freie OH-Gruppe handeln, da eine Methoxygruppe das Absorptionsmaximum hypsochrom auf 260 bis 265 nm verschieben würde [MABRY et al., 1970].

Nach Zusatz von Natriummethanolat-Lösung wird das Absorptionsmaximum von Bande I unter Zunahme der Peakintensität um 54 nm zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Dies ist ein eindeutiges Indiz für eine freie Hydroxylgruppe an C-4' und untermauert die aus dem Methanol-Spektrum abgeleiteten Ergebnisse [MABRY et al., 1970]. Aufgrund der Stabilität des Methanolat-Spektrums können Alkali-sensitive Gruppen (3,4'-Dihydroxy, Trihydroxy im B-Ring oder *ortho*-Dihydroxy im A-Ring) ausgeschlossen werden [MABRY et al., 1970]. Da auf dem kurzwelligen Ast von Bande I bei 295 nm eine Schulter auftritt, muß **FG1** eine substituierte OH-Gruppe an C-7 besitzen [BACON et al., 1976]. Vor dem Hintergrund des bereits diskutierten Massenspektrums sollte es sich bei diesem Substituenten um eine Methoxygruppe handeln.

Die Lage der Bande II wird durch den Zusatz von Natriumacetat nicht beeinflusst. Auch daraus folgt, dass die OH-Gruppe an C-7 substituiert ist. Dafür spricht auch die bei 385 nm auftretende Schulter von Bande I, die nur bei Flavonolen mit einer freien OH-Gruppe an C-4' und einer fehlenden oder substituierten OH-Gruppe an C-7 in Erscheinung tritt [MABRY et al., 1970].

Nach Zugabe von Borsäure zur Natriumacetat-haltigen Lösung beobachtet man nur geringe Verschiebungen der Absorptionsbanden. Dies bestätigt die Abwesenheit von *ortho*-Dihydroxygruppen [MABRY et al., 1970].

Dasselbe folgt auch aus dem fast identischen Aussehen des Aluminiumchlorid- und des Aluminiumchlorid/Salzsäure-Spektrums [HARBORNE et al., 1982]. Die Schulter von Bande I bei 400 nm ist ein weiterer Hinweis auf die bereits aus dem Massenspektrum abgeleitete 6-Methoxygruppe [JURD, 1969; MEARS und MABRY, 1972; SAKAKIBARA und MABRY, 1977].

Nach Auswertung der UV-Daten sollte es sich daher bei Verbindung **FG1** um ein Flavonoid mit freien Hydroxylgruppen an C-4' und C-5, Methoxygruppen an C-6 und C-7 sowie einem Sauerstoff-Substituenten an C-3 handeln.

Tabelle 2.25: NMR-Daten von Verbindung **FG1** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben für Eupalin: ¹QUIJANO et al., 1970 (60 MHz, CDCl₃, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG1	Eupalin ¹	C	FG1
8	6.87 s	6.74 s	2	157.76
2'	7.79 d (8.8)	7.81 d (9)	3	134.37
3'	6.92 d (8.8)	6.94 d (9)	4	178.23
5'	6.92 d (8.8)	6.94 d (9)	5	151.90
6'	7.79 d (8.8)	7.81 d (9)	6	131.90
1''	5.34 d (1.9)	5.34	7	158.92
2''	3.98 dd (1.9, 3.2)	-	8	91.59
3''	3.47 dd (3.2, 8.9)	-	9	152.08
4''	3.13 t (8.9)	-	10	105.68
5''	3.09 m (6.3, 8.9)	-	1'	120.61
6''	0.78 d (6.3)	0.84	2'	130.82
6-OCH ₃	3.72 s	3.72 s	3'	115.58
7-OCH ₃	3.89 s	3.90 s	4'	160.28
5-OH	12.57 s	-	5'	115.58
4'-OH	10.24 s	-	6'	130.82
andere OH	4.98 d (4.4)	3.90 – 5.34	1''	101.94
	4.74 d (4.4)		2''	70.24
	4.64 d (5.7)		3''	70.84
			4''	71.28
			5''	70.50
			6''	17.65
			6-OCH ₃	60.27
			7-OCH ₃	56.72

Zur endgültigen Aufklärung der Struktur wurden verschiedene NMR-Experimente durchgeführt. Um im Protonenspektrum die Signale der Hydroxylprotonen von den übrigen Signalen unterscheiden zu können, wurden der Probe nach der Messung in DMSO- d_6 2 – 3 Tropfen D₂O zugesetzt. Im anschließend aufgenommenen ¹H NMR-Spektrum hatten alle OH-Gruppen ihr Proton gegen Deuterium ausgetauscht und wurden folglich nicht mehr detektiert [HARBORNE, 1994]. Bei dieser Technik verschiebt sich gleichzeitig das DMSO-Signal, sodass eventuell darunter liegende Signale erkennbar werden. Darüber hinaus sind die Multipletts der Zuckerprotonen in DMSO- d_6 /D₂O besser separiert und klarer aufgespalten.

Das ¹H NMR-Spektrum von **FG1** zeigt sechzehn Signale für vierundzwanzig Protonen (siehe Tabelle 2.25, S. 128). Fünf dieser Signale gehören zu austauschbaren Hydroxylprotonen (δ = 12.57, 10.24, 4.98, 4.74 und 4.64 ppm). Das Signal bei 12.57 ppm ist besonders charakteristisch und stammt von der OH-Gruppe an C-5. Im anschließend aufgenommenen DMSO- d_6 /D₂O-Spektrum tauchen die Signale der Hydroxylprotonen nicht mehr auf, es verbleiben elf Signale für neunzehn Protonen (siehe Bild 2.97, S. 129). Die Dubletts bei 7.79 und 6.92 ppm (H-2'/H-6' und H-3'/H-5') gehören zu den vier aromatischen Protonen

eines AA'BB'-Systems im B-Ring. Das Singulett bei 6.87 ppm ist dem Proton an C-8 zuzuordnen. Im Bereich zwischen 3.5 und 4.0 ppm finden sich zwei Signale für die beiden Methoxygruppen des A-Ringes (3.72 und 3.89 ppm). Die verbliebenen sechs Signale werden durch die Protonen der Zuckerkomponente von **FG1** verursacht. Besonders charakteristisch sind das Dublett für ein Proton im Bereich der anomeren Protonen zwischen 5 und 6 ppm (5.34 ppm, H-1'') sowie das Dublett für drei Methylprotonen bei 0.78 ppm (H-6''). Vergleicht man neben den Shifts und Kopplungskonstanten dieser beiden Signale zusätzlich die Daten der restlichen Zuckersignale (zwischen 3 und 4 ppm) mit den Angaben aus der Literatur, so bestätigt sich die an Hand des APCI-MS-Spektrums aufgestellte Vermutung, dass es sich bei der Zuckerkomponente von **FG1** um Rhamnose handelt. Die Kopplungskonstante des anomeren Protons von 1,9 Hz beweist das Vorliegen einer α -Rhamnose, da beim β -Anomer die Kopplungskonstante nur etwa 1 Hz beträgt [HARBORNE, 1994].

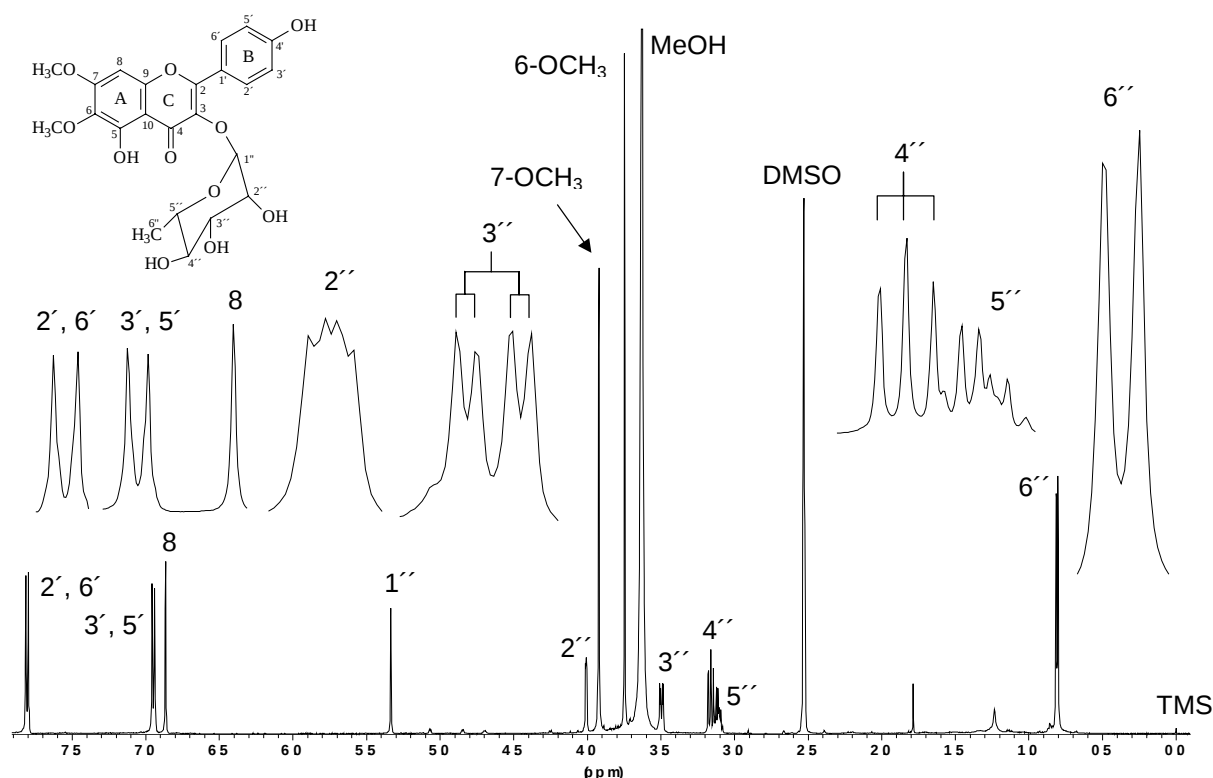


Bild 2.97: ^1H NMR-Spektrum **FG1** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$)

Das ^{13}C NMR-Spektrum zeigt einundzwanzig Signale für dreiundzwanzig Kohlenstoffatome (siehe Bild 2.98, S. 130). Mit Hilfe des ergänzend aufgenommenen HMQC-Spektrums (siehe Bild 2.98, S. 130) konnten die Signale für H-8, für die Protonen des AA'BB'-Systems und für die Protonen der Rhamnose eindeutig den korrespondierenden Signalen im ^{13}C NMR-Spektrum zugeordnet werden (siehe Tabelle 2.25, S. 128). Hierbei zeigt sich, dass auch die Kohlenstoffshifts der Rhamnose mit den Literaturangaben übereinstimmen [HARBORNE und MABRY, 1982]. Die Signale für C-2' und C-6' (130.82 ppm) sowie C-3' und C-5' (115.58 ppm) fallen zusammen. Das zusätzlich aufgezeichnete HMBC-Spektrum (siehe Bild 2.99, S. 131) erlaubt die Zuordnung der Signale für die quartären Kohlenstoffe und die beiden Methoxygruppen sowie die Identifizierung der Hydroxylgruppe des Aglykons, an

welche die Rhamnose gebunden ist. An Hand der zwischen H-8 und dem Proton der 5-OH-Gruppe mit den Kohlenstoffen des A-Ringes bestehenden 2J - und 3J -Kopplungen ist es möglich, die Atome C-5 bis C-10 eindeutig ihren korrespondierenden Signalen zuzuordnen. Für die Atome C-2, C-1' und C-4' gelingt dies durch die mit den Protonen des AA'BB'-Systems bestehenden longerange-Kopplungen. Ein Crosspeak für eine 3J -Kopplung zwischen dem Signal für das C-3 und dem Signal des anomeren Protons zeigt, dass die Rhamnose mit der Hydroxylgruppe an C-3 verknüpft ist. Weitere 3J -Kopplungen bestehen zwischen dem Singulett für drei Methoxyprotonen bei 3.72 ppm (6-OCH₃) und dem Signal bei 131.90 ppm (C-6) sowie dem Singulett der zweiten Methoxygruppe bei 3.89 ppm (7-OCH₃) und dem Signal bei 158.92 ppm (C-7). Hierdurch wird die aus dem Massenspektrum abgeleitete 6,7-Dimethoxylierung bewiesen.

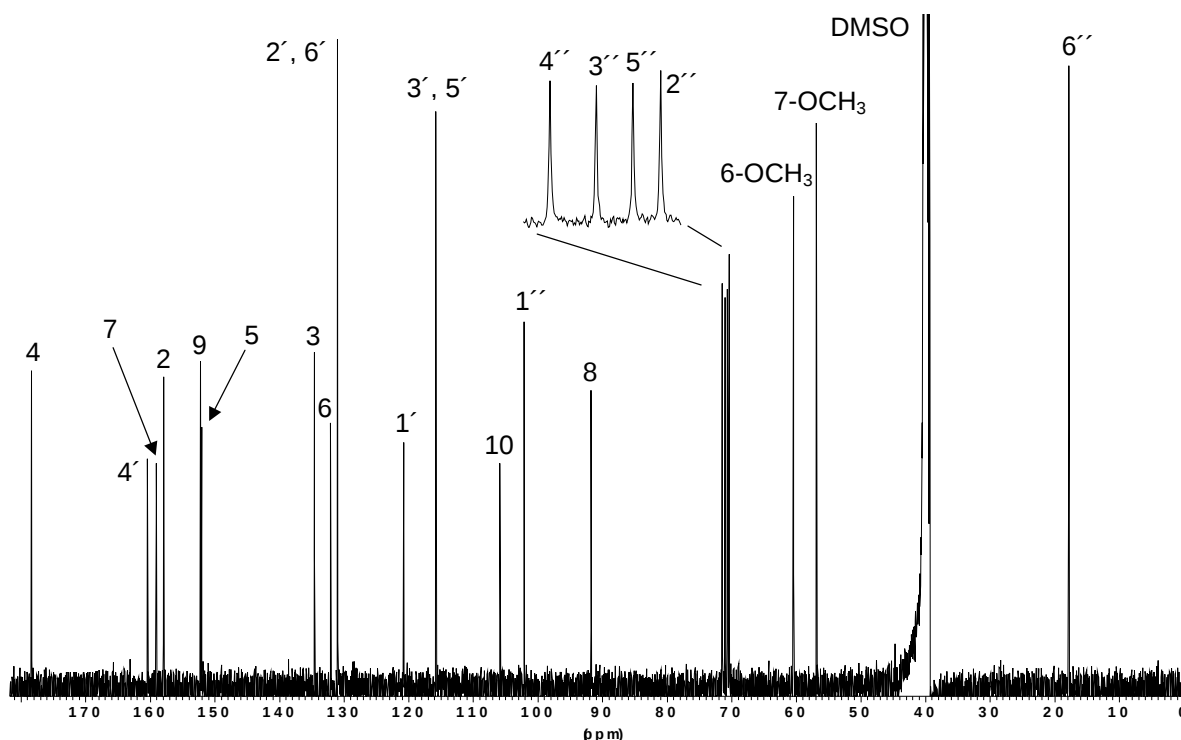


Bild 2.98: ^{13}C NMR-Spektrum von **FG1** (125 MHz, DMSO- d_6)

Es handelt sich daher bei Substanz **FG1** um das 3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid, welches in der Literatur auch als Eupalin oder Eupalitin 3-rhamnosid bezeichnet wird. Die erste Isolierung von **FG1** gelang aus einem ethanolischen Extrakt von *Ageratina ligustrina* [QUIJANO et al., 1970]. Weitere Belege für das Genus *Ageratina* existieren für die Arten *A. calophylla* [FANG et al., 1986] und *A. saltillensis* [YU et al., 1986a]. Darüber hinaus konnte Eupalin aus zwei weiteren Asteraceae, nämlich *Brickellia vernicosa* [AHMED et al., 1986] und *Rudbeckia bicolor* [HORIE et al., 1988], isoliert werden. ^{13}C NMR-Daten sowie Strukturhinweise aus zweidimensionalen NMR-Experimenten und MS/MS-Untersuchungen wurden in keinem der Artikel publiziert.

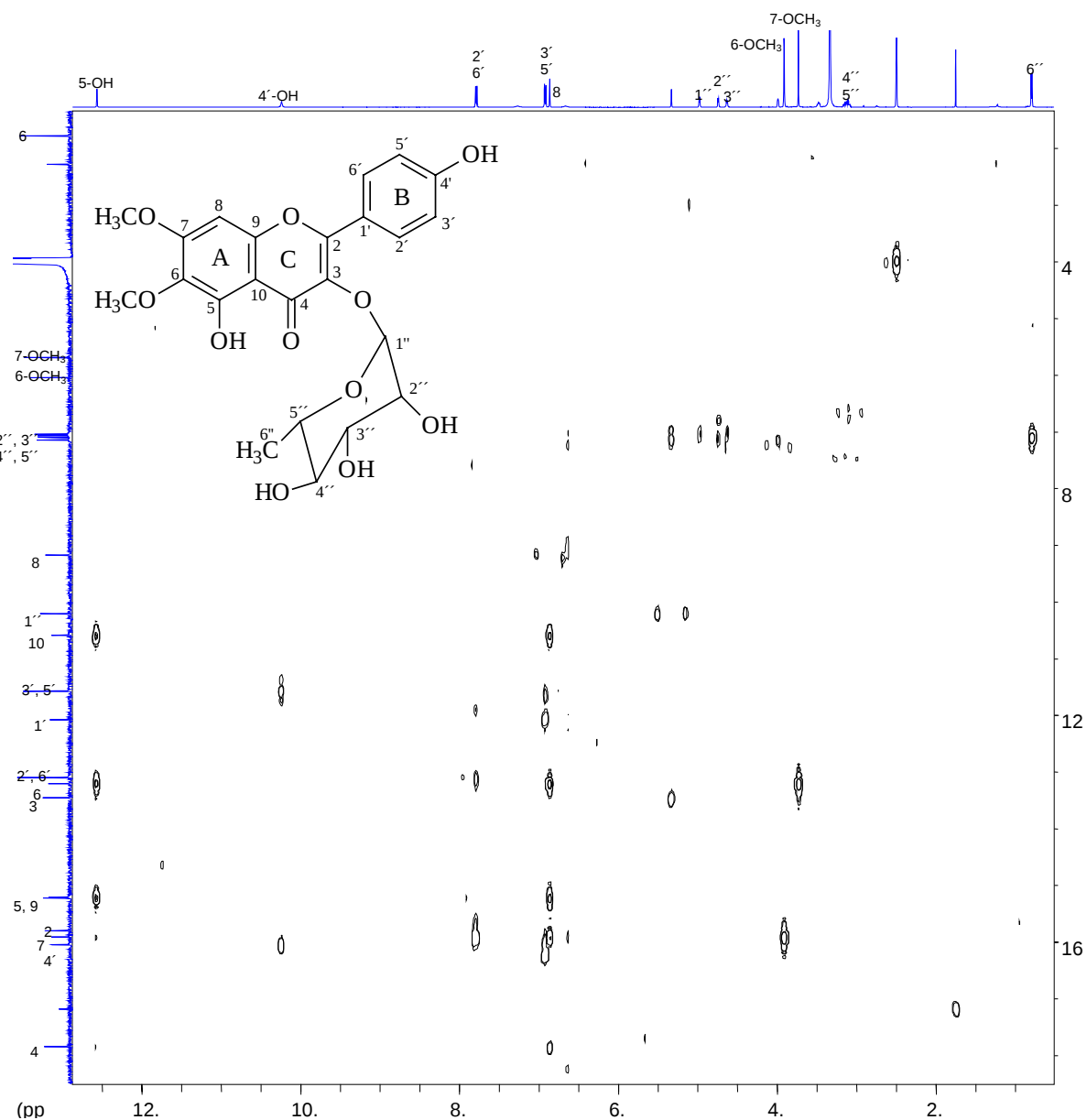
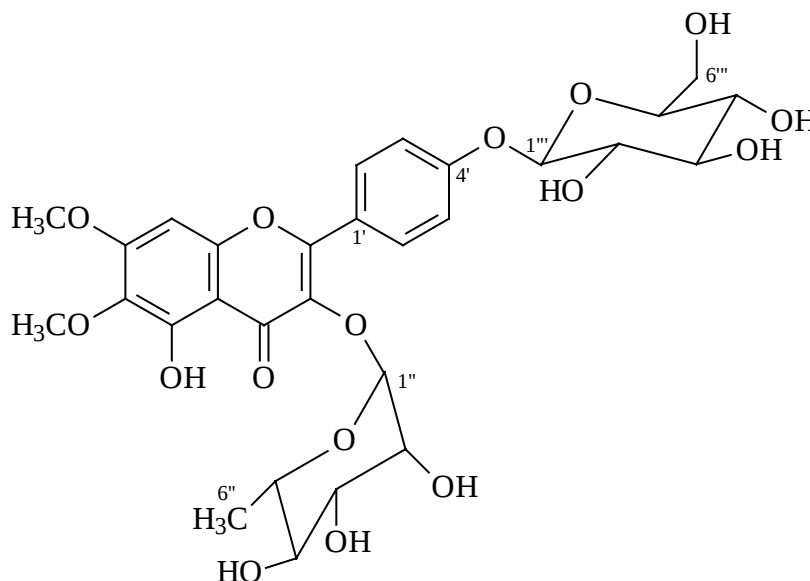


Bild 2.99: HMBC-Spektrum von **FG1** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-*d*₆, TMS)

2.3.3 Eupalitin 3-rhamnosid-4'-glucosid =
3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid-4'-O- β -glucopyranosid (Verbindung FG2)



Die Verbindung **FG2** konnte neben **FG1** aus Fraktion M-II des Methanol-Extraktes gewonnen werden. Die Ausbeute betrug 7 mg (siehe Kap. 6.5.6.1, S. 324).

Bei der Dünnschicht-Chromatographie zeigt **FG2** – abgesehen von den R_f -Werten – identisches Detektionsverhalten wie **FG1** (siehe Tabelle 6.1, S. 298).

Im APCI-CID-Spektrum von **FG2** findet sich das $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 639 (siehe Bild 2.100, S. 133 oben). Die Folgefragmente finden sich bei m/z 493 ($[M+H-146]^+$), m/z 477 ($[M+H-162]^+$) und m/z 331 ($[M+H-162-146]^+$). Der Verlust eines Teilchens mit der Masse 146 amu wurde schon bei **FG1** detektiert und deutet auf die Abspaltung von Rhamnose hin. Das zweite abgespaltene Neutralteilchen mit einer Masse von 162 amu ist typisch für Hexosen wie Glucose oder Galactose, die häufig als Zuckerkomponente von Flavonoid-Glykosiden gefunden werden konnten. Somit sollte **FG2** zwei verschiedene Zucker gebunden haben. Die Tatsache, dass das Pseudomolekülion sowohl ein 162 amu- als auch ein 146 amu-Fragment abspalten kann, deutet darauf hin, dass die beiden postulierten Zucker nicht miteinander verbunden, sondern mit zwei verschiedenen Hydroxylgruppen des Aglykons verknüpft sind.

Das pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des protonierten Aglykons liefert qualitativ dasselbe Bild wie bei der bereits diskutierten Substanz **FG1** (vergl. Bild 2.96, S. 126 mit Bild 2.100, S. 133). Es existieren lediglich Abweichungen in den relativen Verhältnissen der Peakhöhen zueinander. Dies bedeutet, dass die Aglyka von **FG1** und **FG2** sehr eng miteinander verwandt oder sogar identisch sind.

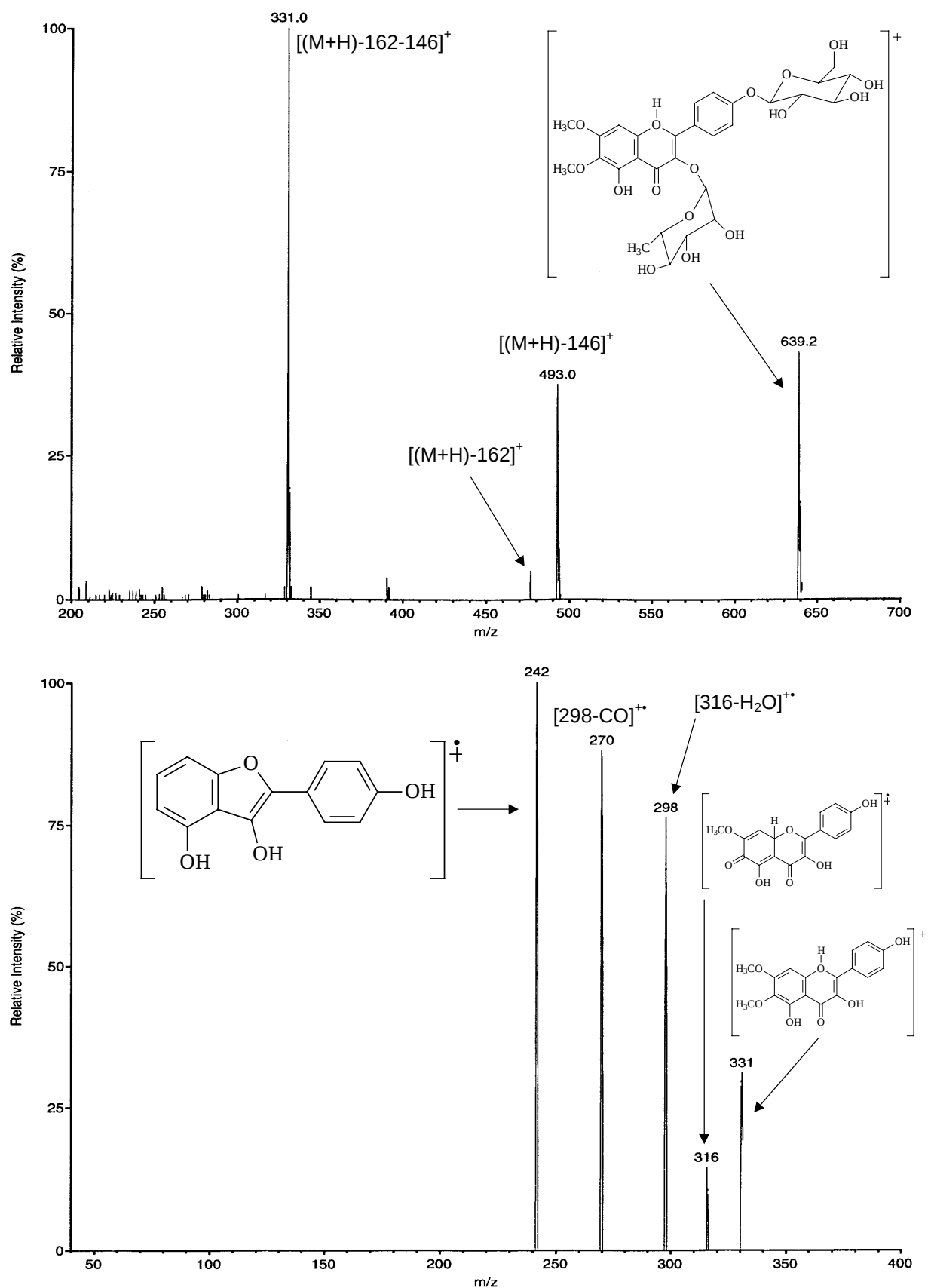
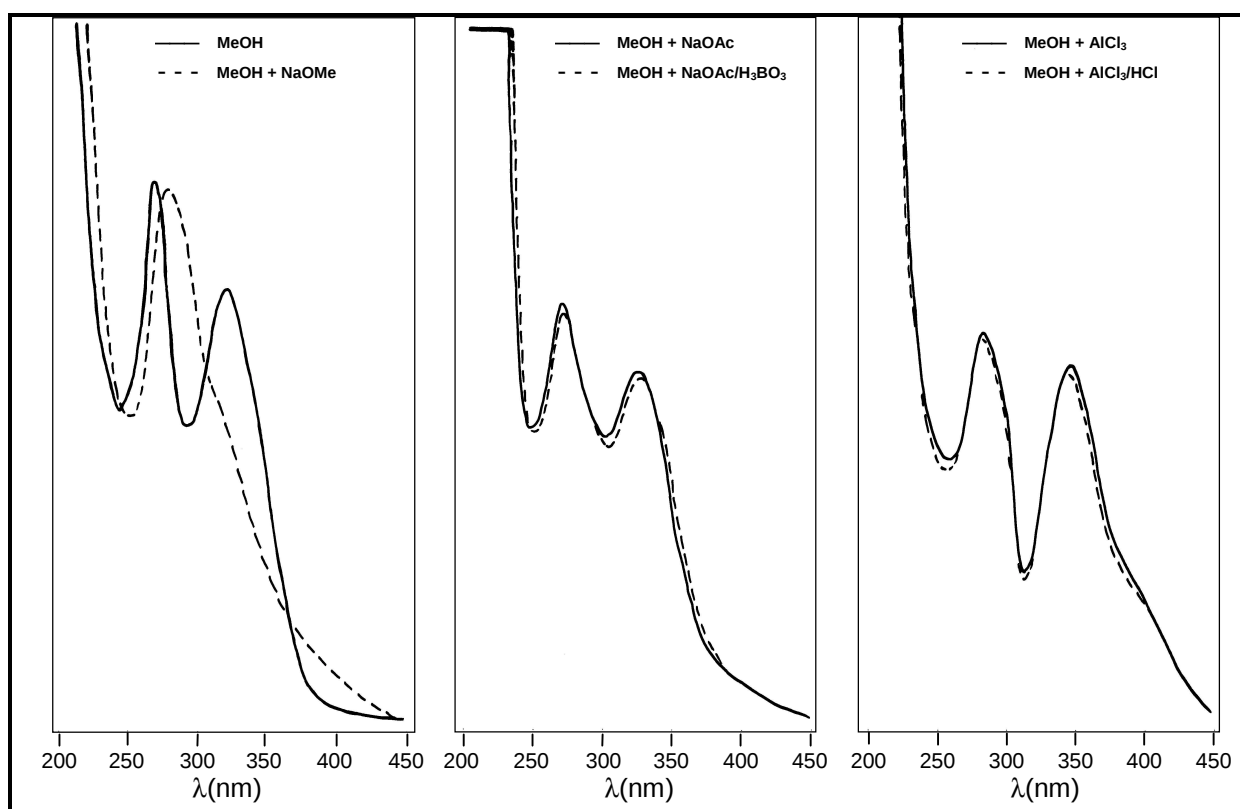


Bild 2.100: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG2**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 331 amu (unten)

Tabelle 2.26: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG2** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
269	270	270	272	282	282
320	320 sh	325	327	300 sh	300 sh
				346	346
				400 sh	400 sh

Bild 2.101: UV-Spektren von Verbindung **FG2**

Der Vergleich der UV-Daten von **FG2** und **FG1** läßt nur deutliche Unterschiede an der längerwelligen Bande I erkennen (vergl. Tabelle 2.24, S. 127 mit Tabelle 2.26, S. 134). Dies spricht dafür, dass sich **FG2** von **FG1** nur im Substitutionsmuster des B-Ringes unterscheidet. Im Methanol-Spektrum von **FG2** (siehe Bild 2.101, S. 134) liegt Bande I bei 320 nm und damit auf der unteren Grenze des Wellenlängenintervalls, in dem die Bande I von 3-substituierten Flavonolen gewöhnlich zu finden ist [CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971]. Da die MS-Spektren eine 3-Methoxygruppe ausschließen, muß einer der beiden im APCI-CID-Spektrum detektierten Zucker mit der OH-Gruppe an C-3 verknüpft sein.

Das Natriummethanolat-Spektrum von **FG2** unterscheidet sich von der Lage der Peaks und Schultern praktisch nicht vom Methanol-Spektrum, allerdings erscheint Bande I nur noch als Schulter im langwelligen Bereich von Bande II. Im Falle einer freien Hydroxylgruppe an Position 4' wäre ein deutlicher bathochromer Shift einer klar differenzierten Bande I zu erwarten. Da nach Auswertung des pseudo-MS/MS/MS-Spektrums davon auszugehen ist,

dass **FG2** ebenso wie **FG1** Eupalitin als Aglykon besitzt, muß die 4'-Hydroxy-Gruppe durch einen Substituenten vor der Deprotonierung durch die Methanolatanionen geschützt sein. Hierfür kommt nach den Massenspektren nur einer der beiden Zucker in Betracht.

Die von **FG2** nach Zusatz von Natriumacetat/Borsäure, Aluminiumchlorid und Aluminiumchlorid/Salzsäure aufgenommenen UV-Spektren ähneln ebenfalls denen von **FG1**. Man beobachtet jedoch auch hier, dass bei **FG2** Bande I bei kleineren Wellenlängen liegt als bei **FG1**. Dies ist ein weiteres Indiz für die Glykosidierung der 4'-OH-Gruppe.

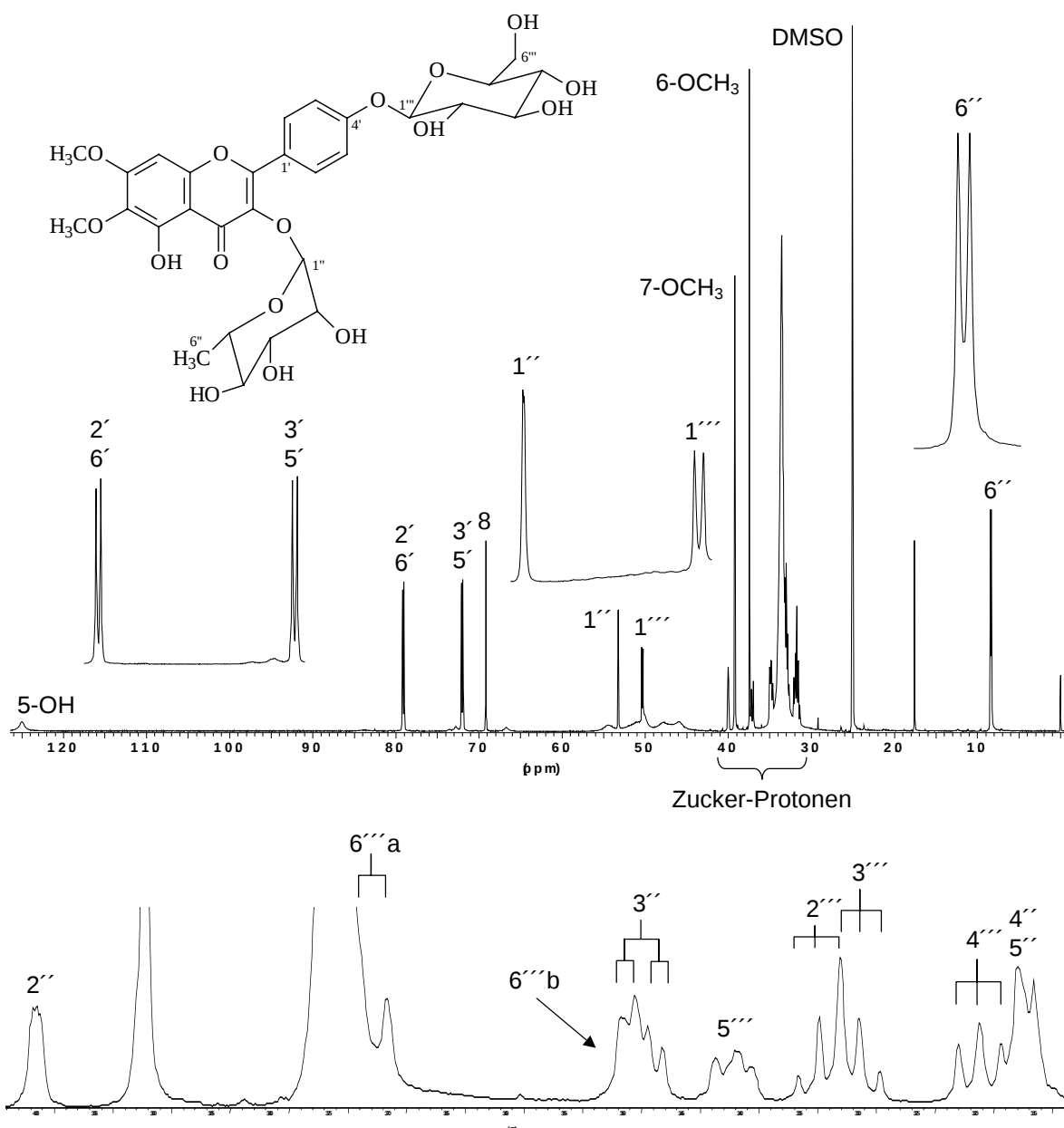


Bild 2.102: ^1H NMR-Spektrum von **FG2** in DMSO-d_6 (oben), darunter ein Ausschnitt des Spektrums nach Zugabe von D_2O zur detaillierten Darstellung der Signale der Zuckerprotonen (500 MHz, DMSO-d_6 bzw. $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$, TMS)

Tabelle 2.27: NMR-Daten von Verbindung **FG2** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG2	C	^{13}C -Shift
8	6.91 s	2	156.99
2'	7.90 d (8.8)	3	134.98
3'	7.20 d (8.8)	4	178.40
5'	7.20 d (8.8)	5	151.89
6'	7.90 d (8.8)	6	131.95
1''	5.32 d (1.3)	7	159.03
2''	4.00 brs	8	91.71
3''	3.48 dd	9	152.17
4''	3.18 m	10	105.78
5''	3.18 m	1'	123.43
6''	0.84 d (5.7)	2'	130.55
1'''	5.03 d (7.6)	3'	116.37
2'''	3.35 t (8.8)	4'	159.49
3'''	3.31 t (8.8)	5'	116.37
4'''	3.21 t (8.8)	6'	130.55
5'''	3.41 m	1''	102.25
6'''	3.71 d (10.7)	2''	70.22
	3.48 d (10.7)	3''	70.89
6-OCH ₃	3.74 s	4''	71.34
7-OCH ₃	3.92 s	5''	70.49
5-OH	12.50 s	6''	17.70
		1'''	100.01
		2'''	73.37
		3'''	76.78
		4'''	69.86
		5'''	77.33
		6'''	60.82
		6-OCH ₃	60.30
		7-OCH ₃	56.75

Das ^1H NMR-Spektrum von **FG2** zeigt achtzehn Signale für siebenundzwanzig Protonen (siehe Bild 2.102, S. 135). Die zum A-Ring gehörigen Signale sind mit denen von **FG1** identisch (vergl. Tabelle 2.25, S. 128 mit Tabelle 2.27, S. 136). Es handelt sich um die Singuletts für das Proton der 5-OH-Gruppe (12.50 ppm), für die 6- und die 7-Methoxygruppe (3.72 und 3.92 ppm) sowie für H-8 (6.91 ppm). Die Dubletts für je zwei Protonen bei 7.90 (H-2'/H-6') und 7.20 ppm (H-3'/H-5') sind dem AA'BB'-System des B-Ringes zuzuordnen. Durch die Glykosidierung der 4'-OH-Gruppe sind diese Signale im Vergleich zu **FG1** zu tieferem Feld verschoben. Von den verbliebenen dreizehn Signalen lassen sich sechs durch Vergleich mit **FG1** der Rhamnose zuordnen. Die restlichen sieben Signale gehören damit zu der aus dem APCI-CID-Spektrum abgeleiteten Hexose. Das Signal des anomeren Protons erscheint als Dublett bei 5.03 ppm ($J = 7.6$ Hz). Die übrigen Signale liegen in einem engen Bereich zwischen 3.2 und 3.8 ppm. Der Vergleich der Shifts und Kopplungskonstanten mit Angaben aus der Literatur zeigt, dass es sich bei der Hexose um die β -Glucose handeln muß [HARBORNE, 1994].

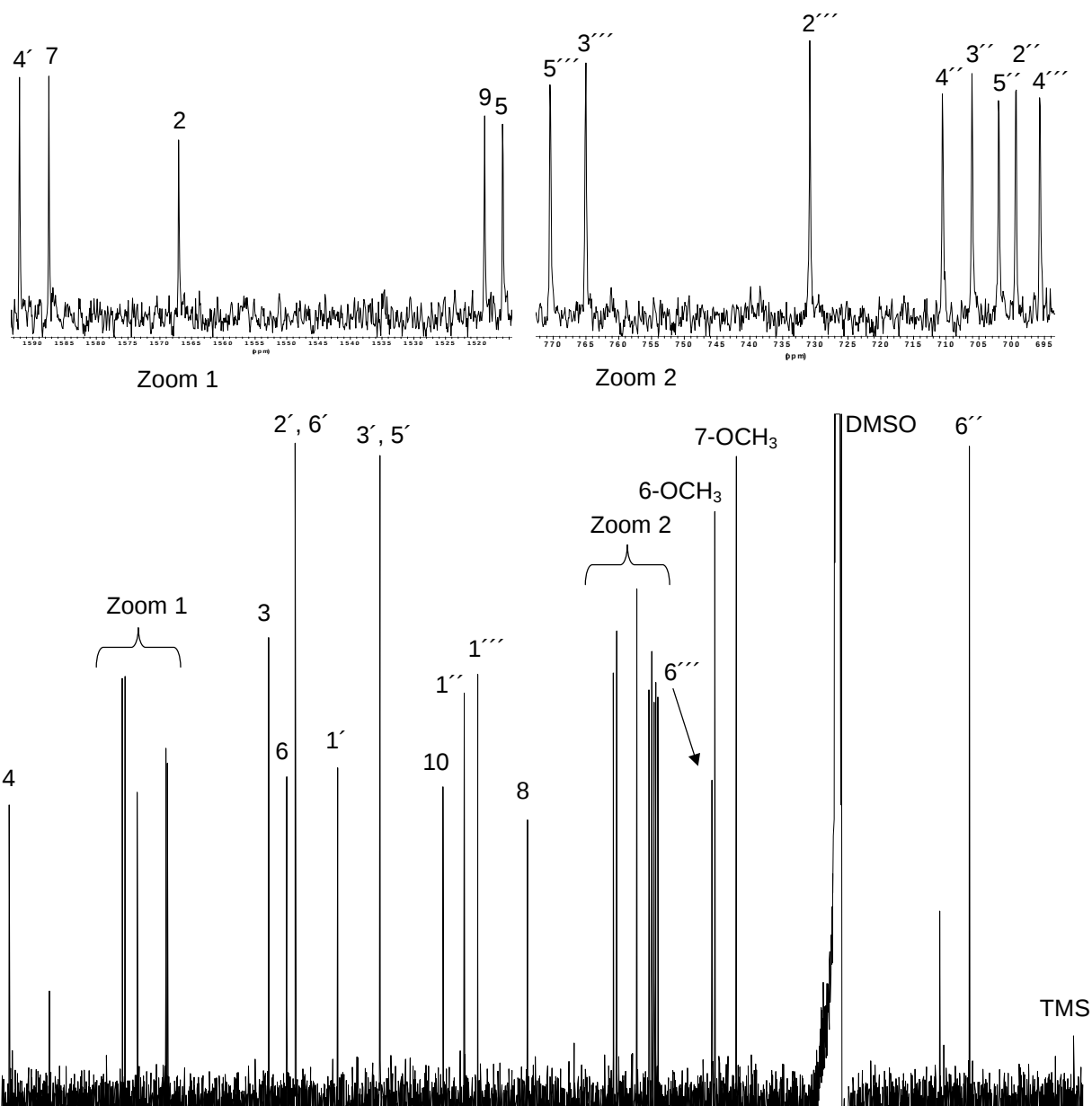


Bild 2.103: ^{13}C NMR-Spektrum von Verbindung **FG2**, darüber in Vergrößerung die Bereiche zwischen 69 und 78 sowie 151 und 160 ppm (125 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

Im ^{13}C NMR-Spektrum von **FG2** finden sich siebenundzwanzig Signale für neunundzwanzig Kohlenstoffe. In Analogie zu **FG1** lassen sich einundzwanzig dieser Signale den Kohlenstoffatomen des Aglykons und der Rhamnose zuordnen (siehe Tabelle 2.27, S. 136). Mit Hilfe des HMQC-Spektrums (siehe Bild 2.104, S. 138) können die mit den Protonen der Glucose korrespondierenden Kohlenstoffsignale identifiziert werden. Auch die ^{13}C NMR-Shifts passen sehr gut zu den für β -Glucose publizierten Daten. Aus dem Shift von C-1''' (100.01 ppm) lässt sich ableiten, dass die β -Glucose in der Pyranose-Form vorliegen muß, da im Falle einer Glucofuranose das Signal für C-1''' im tieferen Feld auftreten würde [HARBORNE und MABRY, 1982]. Im HMBC-Spektrum erkennt man eine Korrelation zwischen dem anomeren Proton der Rhamnose und dem C-3 (siehe Bild 2.105, S. 139). Hieraus folgt, dass die OH-Gruppe an C-3 mit α -Rhamnose und die Hydroxylgruppe an C-4' mit β -Glucose verknüpft ist.

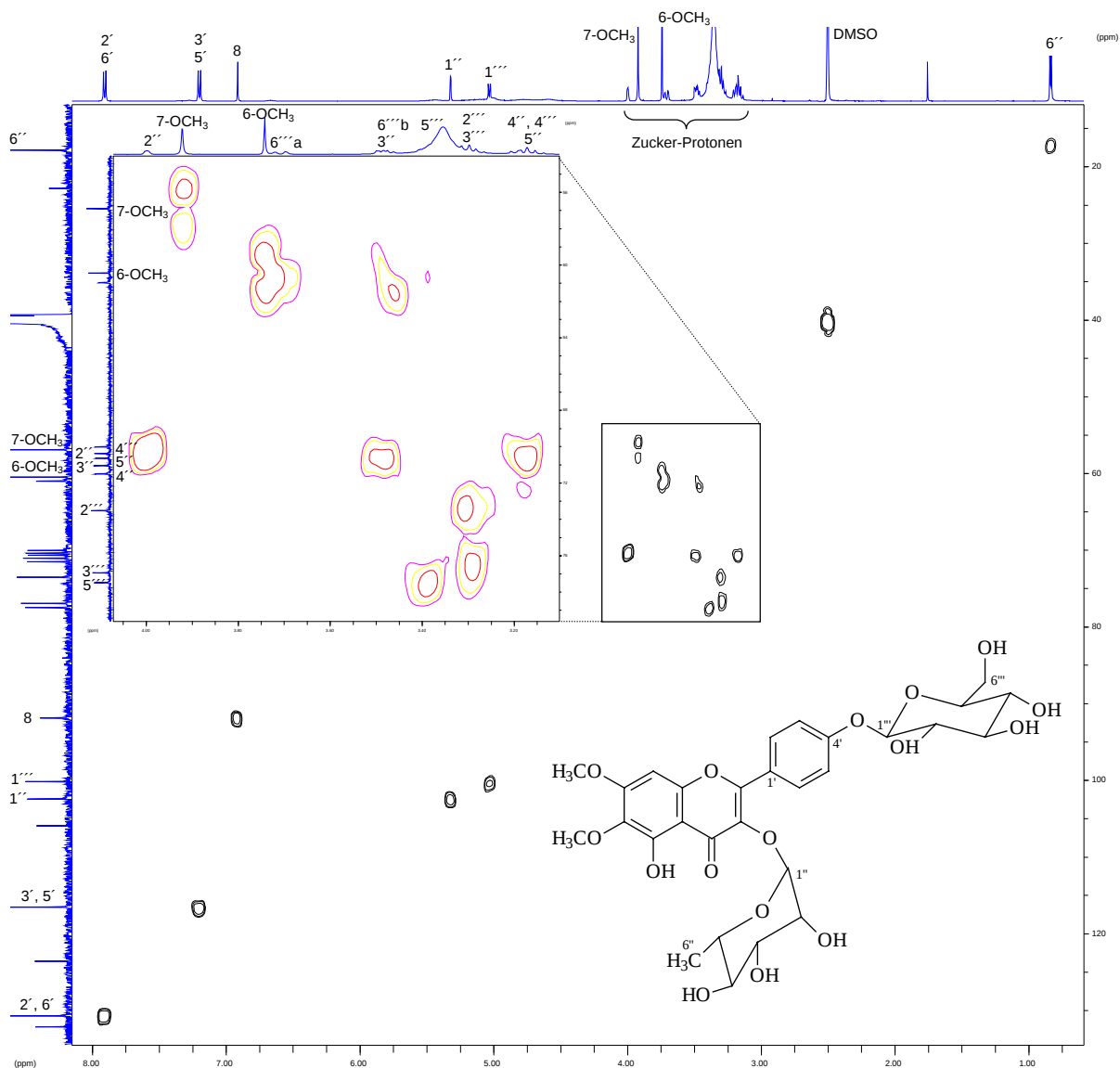


Bild 2.104: HMQC-Spektrum von Verbindung **FG2** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Es handelt sich demnach bei Substanz **FG2** um 3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid-4'-O- β -glucopyranosid. Bei der Verbindung handelt es sich um einen neuen Naturstoff. Von dem **FG2** zu Grunde liegenden Aglykon Eupalitin sind weder 4'-Glykoside noch Di-Monosaccharide, sondern lediglich Mono- und Disaccharide bekannt.

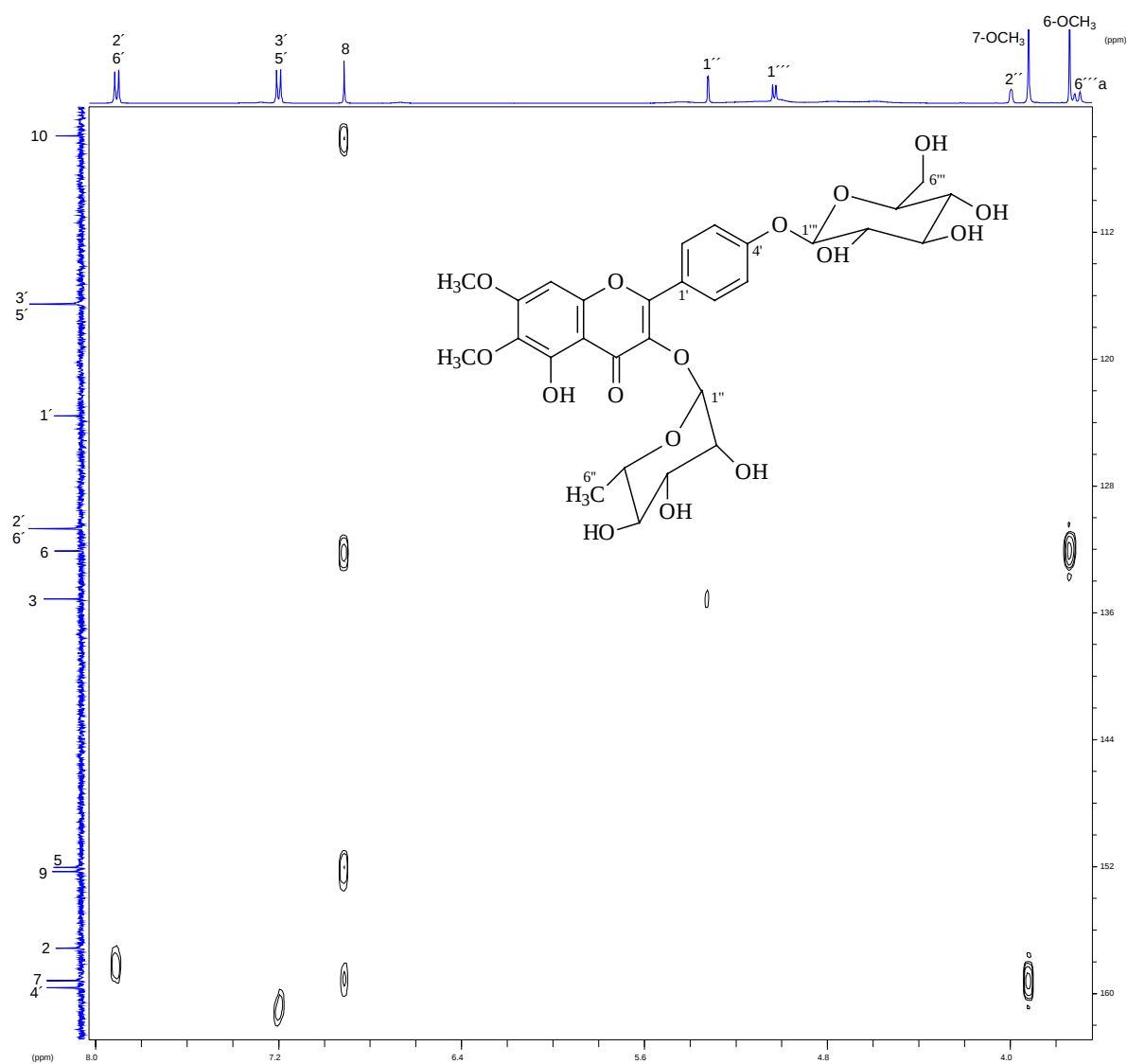
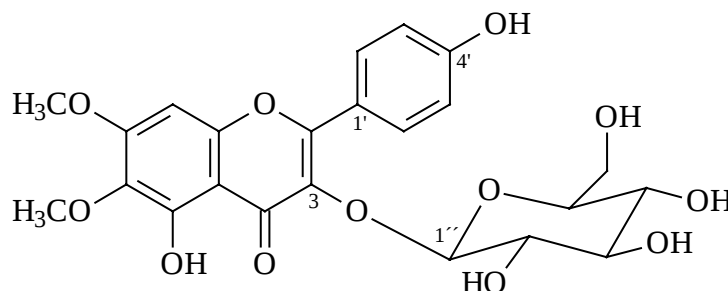


Bild 2.105: HMBC-Spektrum von Verbindung **FG2** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

2.3.4 Eupalitin 3-glucosid =
3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- β -glucopyranosid
(Verbindung FG3)



Ein weiteres aus Fraktion M-II des Methanol-Auszuges isoliertes Flavonol-Glykosid ist **FG3**. Es konnte in einer Ausbeute von 5 mg DC-rein isoliert werden (siehe Kap. 6.5.6.1, S. 324).

Die Laufhöhen bei der DC von **FG3** in den verschiedenen eingesetzten Fließmitteln unterscheiden sich sowohl von denen von **FG1** als auch von denen von **FG2**, hinsichtlich des Detektionsverhaltens sind sich die drei Substanzen jedoch sehr ähnlich (siehe Tabelle 6.1, S. 298).

Im APCI-CID-Spektrum (siehe Bild 2.106, S. 141) erscheint der Pseudomolpeak für das $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 493. Das Molekulargewicht von **FG3** beträgt demnach 492 g/mol. Unter Abspaltung eines Fragmentes der Masse 162 amu entsteht das Kation des protonierten Aglykons bei m/z 331. Wie bei **FG2** deutet die Massendifferenz von 162 auf die Abspaltung einer Hexose hin. Das pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des protonierten Aglykons zeigt dieselbe Fragmentierung wie bei **FG1** und **FG2** (vergl. etwa Bild 2.100, S. 133 mit Bild 2.106, S. 141). Hierdurch erscheint es sehr wahrscheinlich, dass auch **FG3** Eupalitin als Aglykon besitzt.

Vergleicht man die UV-Spektren von **FG1** und **FG3**, so fällt das hohe Maß an Übereinstimmung auf (vergl. Tabelle 2.24, S. 127 mit Tabelle 2.28, S. 140). Bei **FG3** ist lediglich die Bande I leicht gegenüber **FG1** bathochrom verschoben. Dasselbe gilt zwar auch für Bande II, die Unterschiede sind jedoch minimal. Es ist daher anzunehmen, dass zwischen **FG1** und **FG3** eine große strukturelle Verwandtschaft besteht. Die starke Verschiebung des Maximums der Bande I unter dem Einfluß von Natriummethanolat zeigt, dass bei **FG3** die 4'-OH-Gruppe im Gegensatz zu **FG2** frei sein muß.

Tabelle 2.28: UV-spektroskopische Meßdaten [λ_{max} (nm)] von Verbindung **FG3** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
270	257 sh	269	269	263 sh	263 sh
340	270	298 sh	342	278	278
	302 sh	352		302 sh	302 sh
	394	400 sh		358	358
				402 sh	402 sh

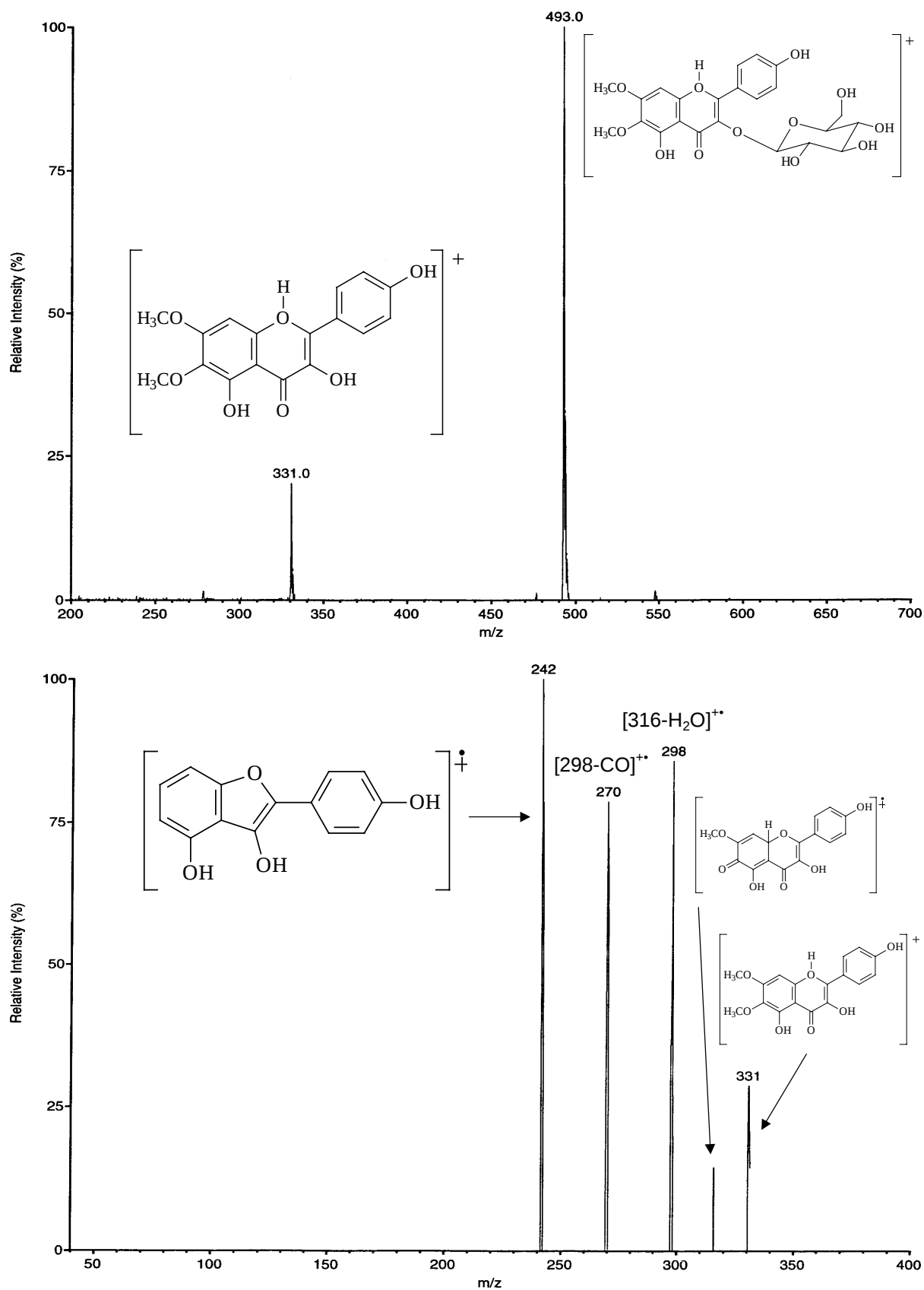


Bild 2.106: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG3**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 331 amu (unten)

Tabelle 2.29: NMR-Daten von Verbindung **FG3** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben für Eupalitin 3-glucosid: ¹Li et al., 1997 (400 bzw. 100 MHz, DMSO- d_6 , TMS); * = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG3	Eupalitin 3-glucosid ¹	C	FG3	Eupalitin 3-glucosid ¹
8	6.90 s	6.87 s	2	156.80	156.8
2'	8.08 d (8.8)	8.10 d (8.8)	3	133.37	133.3
3'	6.89 d (8.8)	6.86 d (7.2)	4	177.93	177.8
5'	6.89 d (8.8)	6.86 d (7.2)	5	151.86*	151.7
6'	8.08 d (8.8)	8.10 d (8.8)	6	131.88	131.8
1''	5.48 d (7.6)	5.41 d (7.2)	7	158.85	158.7
2''	3.19 t (7.6)	-	8	91.53	91.3
3''	3.21 t (8.8)	-	9	151.95*	151.6
4''	3.08 m	-	10	105.56	105.3
5''	3.08 m	-	1'	121.03	120.8
6''	3.56 dd (5.7, 11.4)		2'	131.12	131.0
	3.32 dd (5.0, 11.4)		3'	115.29	115.1
6-OCH ₃	3.74 s	3.89 s	4'	160.25	151.6
7-OCH ₃	3.92 s	3.71 s	5'	115.29	115.1
5-OH	12.57 brs	12.56 s	6'	131.12	131.0
4'-OH	10.20 brs	-	1''	100.92	101.7
andere OH	5.35 d (5.0)	-	2''	74.40	71.3
	5.06 d (4.4)	-	3''	76.59	73.2
	4.95 d (4.4)	-	4''	70.09	67.9
	4.26 t (5.0)	-	5''	77.71	75.8
			6''	61.02	60.2
			6-OCH ₃	60.26	60.0
			7-OCH ₃	56.72	56.5

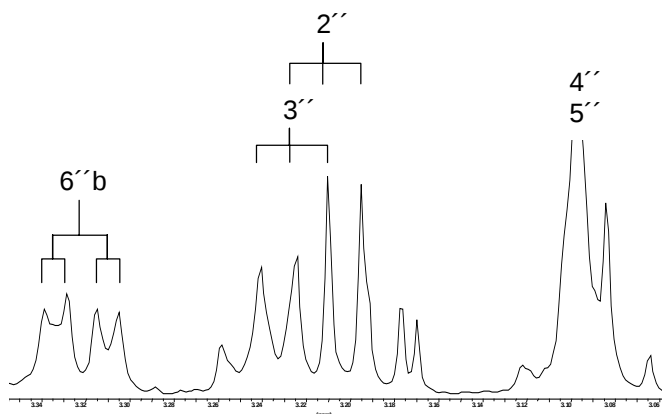
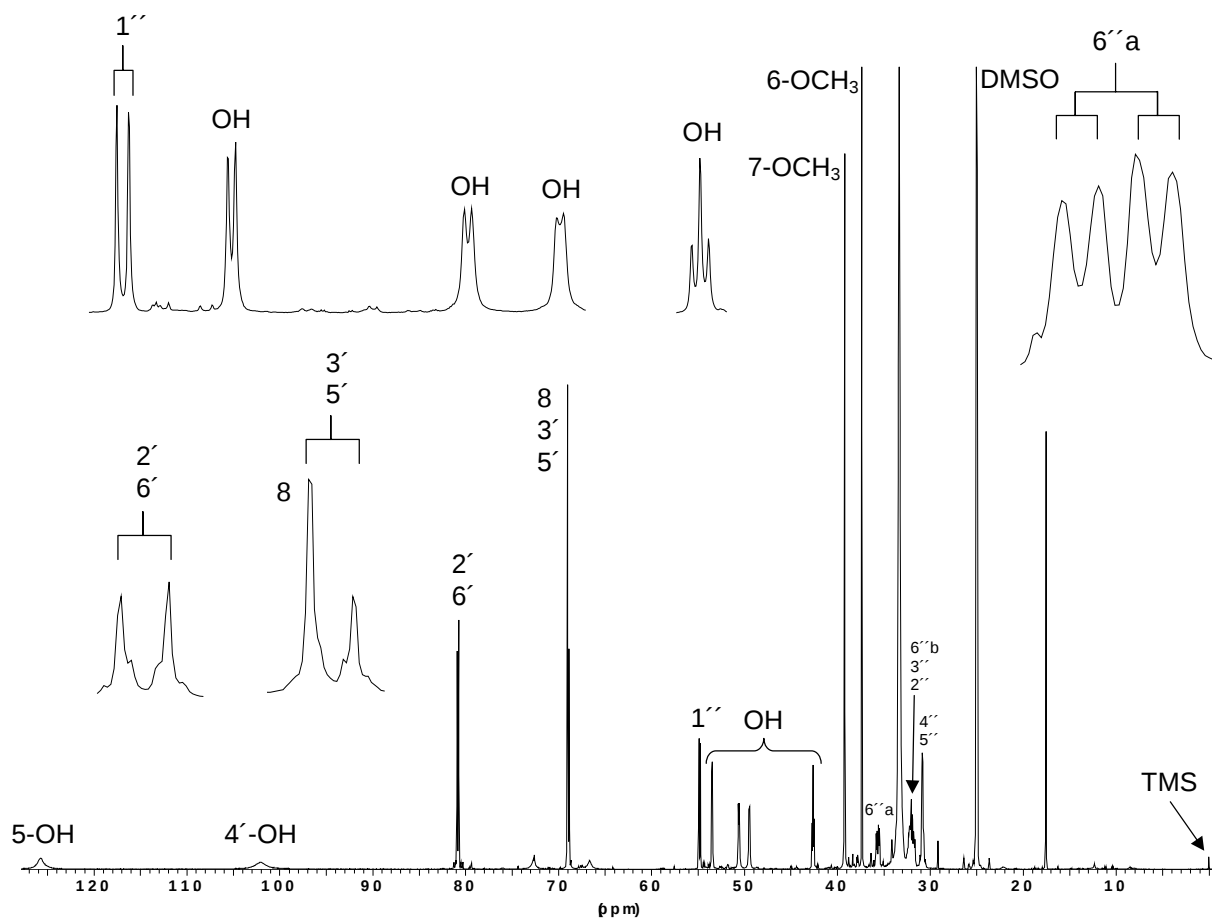
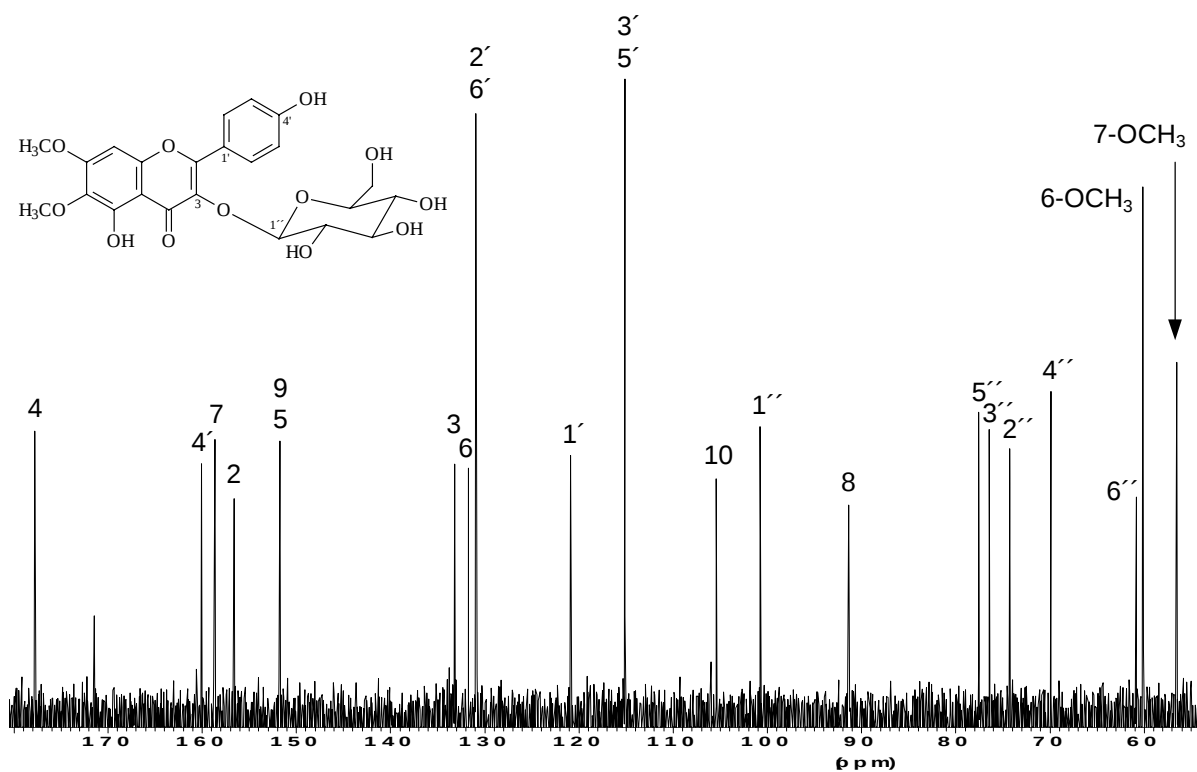


Bild 2.107: Auch bei **FG3** verbessert sich die Aufspaltung der Signale der Zuckerprotonen beträchtlich nach Zutropfen von D₂O zur Probe (500 MHz, DMSO- d_6 /D₂O, TMS)

Bild 2.108: ^1H NMR-Spektrum von **FG3** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)Bild 2.109: ^{13}C NMR-Spektrum von Substanz **FG3** (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)

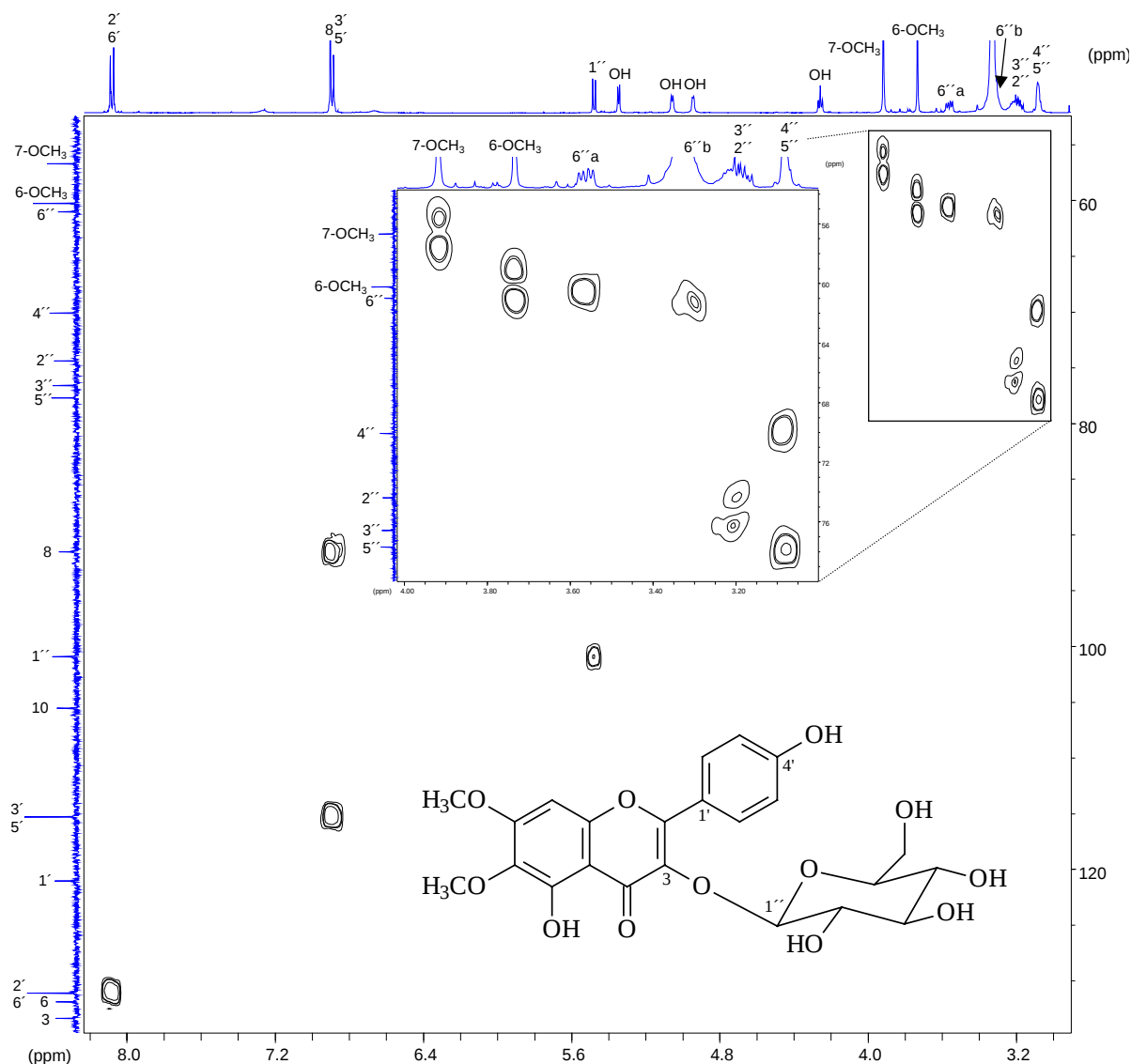


Bild 2.110: HMQC-Spektrum von **FG3** mit Vergrößerung der Kopplungen der Glucose-Signale (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Das ^1H NMR-Spektrum von **FG3** (siehe Bild 2.107, S. 142 und Bild 2.108, S. 143) zeigt siebzehn Signale für vierundzwanzig Protonen. Es besteht damit große Ähnlichkeit zum Protonenspektrum von **FG1** (siehe Bild 2.97, S. 129). So finden sich auch bei **FG3** die Signale für H-8 (6.90 ppm), für die Protonen des AA'BB'-Systems des B-Ringes (H-2'/H-6', 8.08 ppm und H-3'/H-5', 6.89 ppm), für die beiden Methoxygruppen an C-6 und C-7 (3.74 bzw. 3.92 ppm) sowie für mehrere Hydroxylprotonen, u.a. die Protonen der OH-Gruppen an C-5 (12.57 ppm) und C-4' (10.20 ppm). Aus der Existenz der beiden letztgenannten Signale läßt sich folgern, dass die aus dem APCI-CID-Spektrum abgeleitete Hexose mit der OH-Gruppe an C-3 verbunden sein muß. Im Unterschied zu **FG1** wird bei **FG3** das Dublett für H-2'/H-6' bei einem größeren δ -Wert detektiert (8.08 ppm gegenüber 7.79 ppm). Dies könnte auf unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Protonen und den bei **FG1** und **FG3** verschiedenen Zuckern an C-3 beruhen. Es verbleiben sechs Signale für die Protonen der Hexose. Vergleicht man deren Shiftwerte und Kopplungskonstanten mit entsprechenden Literaturangaben, so findet sich eine gute Übereinstimmung mit den Daten für β -Glucose [HARBORNE, 1994].

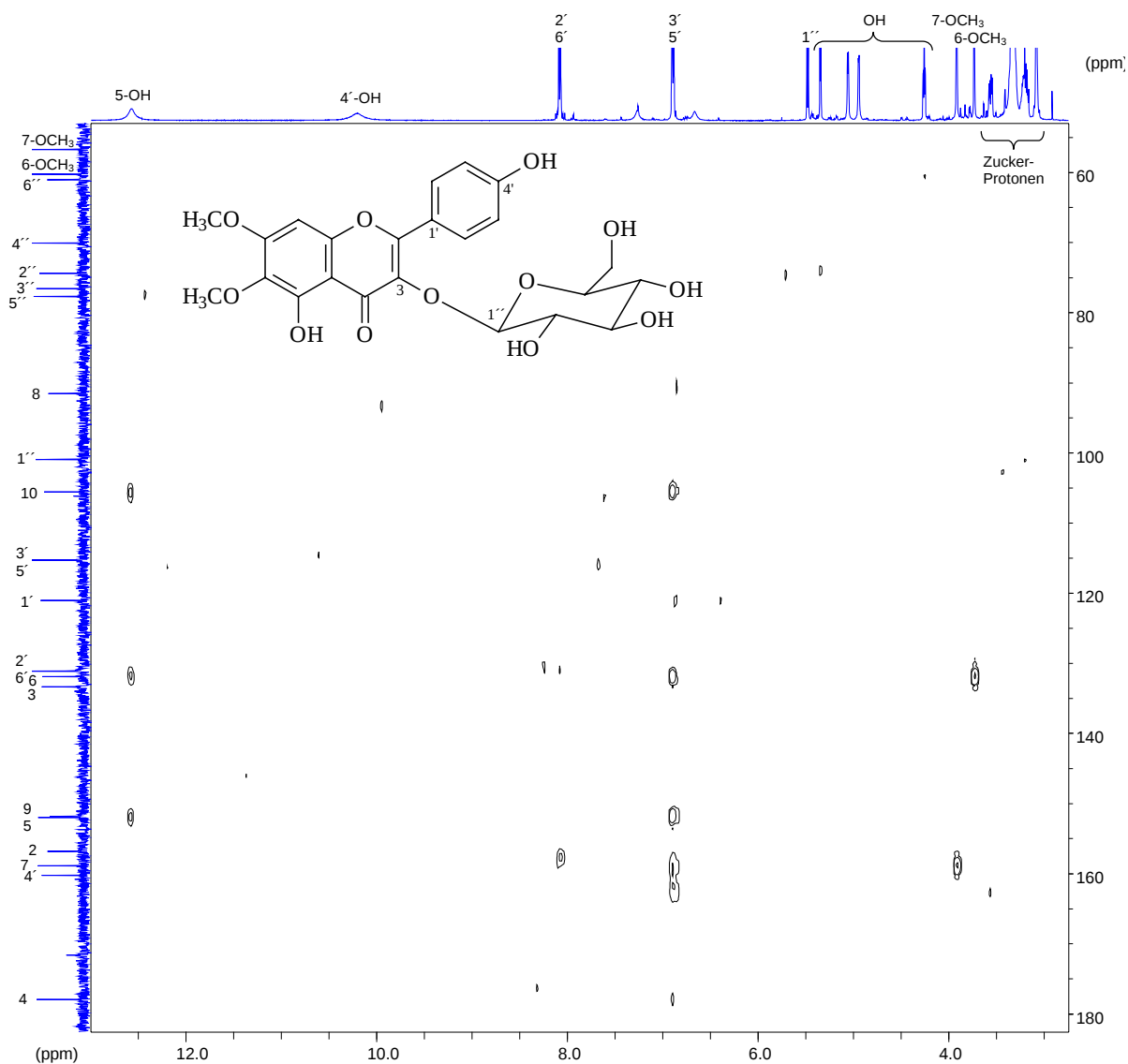
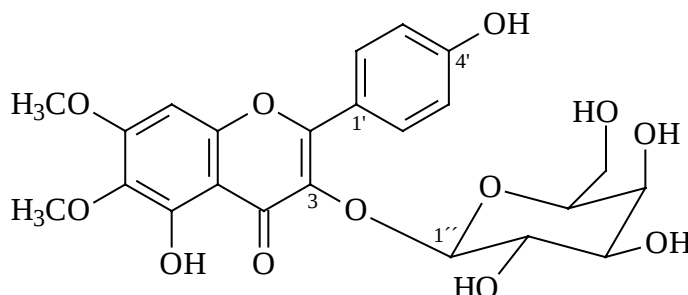


Bild 2.111: HMBC-Spektrum von **FG3** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Das ^{13}C NMR-Spektrum von **FG3** (siehe Bild 2.109, S. 143) liefert einundzwanzig Signale, die sich mit Hilfe des HMQC- (siehe Bild 2.110, S. 144) und des HMBC-Spektrums (siehe Bild 2.111, S. 145) eindeutig dem Aglykon Eupalitin sowie der 3-O- β -Glucose zuordnen lassen. Auch die ^{13}C NMR-Shifts für die Zuckerkohlenstoffe sprechen eindeutig für β -Glucose [HARBORNE und MABRY, 1982].

Bei Verbindung **FG3** muß es sich demnach um 3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- β -glucopyranosid bzw. Eupalitin 3-glucosid handeln. Was die beiden Genera *Ageratina* und *Eupatorium* angeht, konnte Verbindung **FG3** aus *A. glyptophlebia* [HIGUERA und DE PÉREZ, 1989] und *E. adenophorum* [DING et al., 1999; LI et al., 1997] isoliert werden, wobei aber lediglich in der Arbeit von LI et al. NMR-Daten publiziert wurden. Die dort veröffentlichten Angaben sind jedoch insofern fehlerhaft, als die Zuordnung der beiden Methoxygruppen vertauscht und der Zucker falsch zugeordnet wurde. Ein Vergleich der ^{13}C NMR-Daten von LI et al. mit denen von AGRAWAL (1989) sowie HARBORNE und MABRY (1982) zeigt, dass es sich bei dem als Glucose identifizierten Zucker eigentlich um Galactose handelt.

2.3.5 Eupalitin 3-galactosid =
3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- β -galactopyranosid
(Verbindung FG4)



Verbindung **FG4** konnte in einer Ausbeute von 3 mg aus Fraktion M-III des Methanol-Extraktes DC-rein gewonnen werden (siehe Kap. 6.5.7.4, S. 328).

Bereits bei der Dünnschicht-Chromatographie wird die große strukturelle Verwandtschaft von **FG4** mit **FG3** deutlich. Beide Substanzen zeigen nicht nur ein identisches Detektionsverhalten, auch ihre R_f -Werte sind sehr ähnlich (siehe Tabelle 6.1, S. 298).

Die Ergebnisse der UV-Messungen sprechen ebenfalls für diese Ähnlichkeit, da die Meßwerte für beide Substanzen sehr nahe beieinander liegen (vergl. Tabelle 2.28, S. 140 mit Tabelle 2.30, S. 146).

Tabelle 2.30: UV-spektroskopische Meßdaten [λ_{max} (nm)] von Verbindung **FG4** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
268	270	267	267	250 sh	250 sh
338	305 sh	296 sh	338	279	279
	392	347		304 sh	304 sh
		400 sh		358	358
				400 sh	400 sh

Dasselbe gilt für die Massenspektren beider Verbindungen (vergl. Bild 2.106, S. 141 mit Bild 2.112, S. 147). Da sich die Massen der Pseudomolekülonen nicht unterscheiden, muß bei **FG4** das Aglykon mit einer zur Glucose isomeren Hexose verbunden sein.

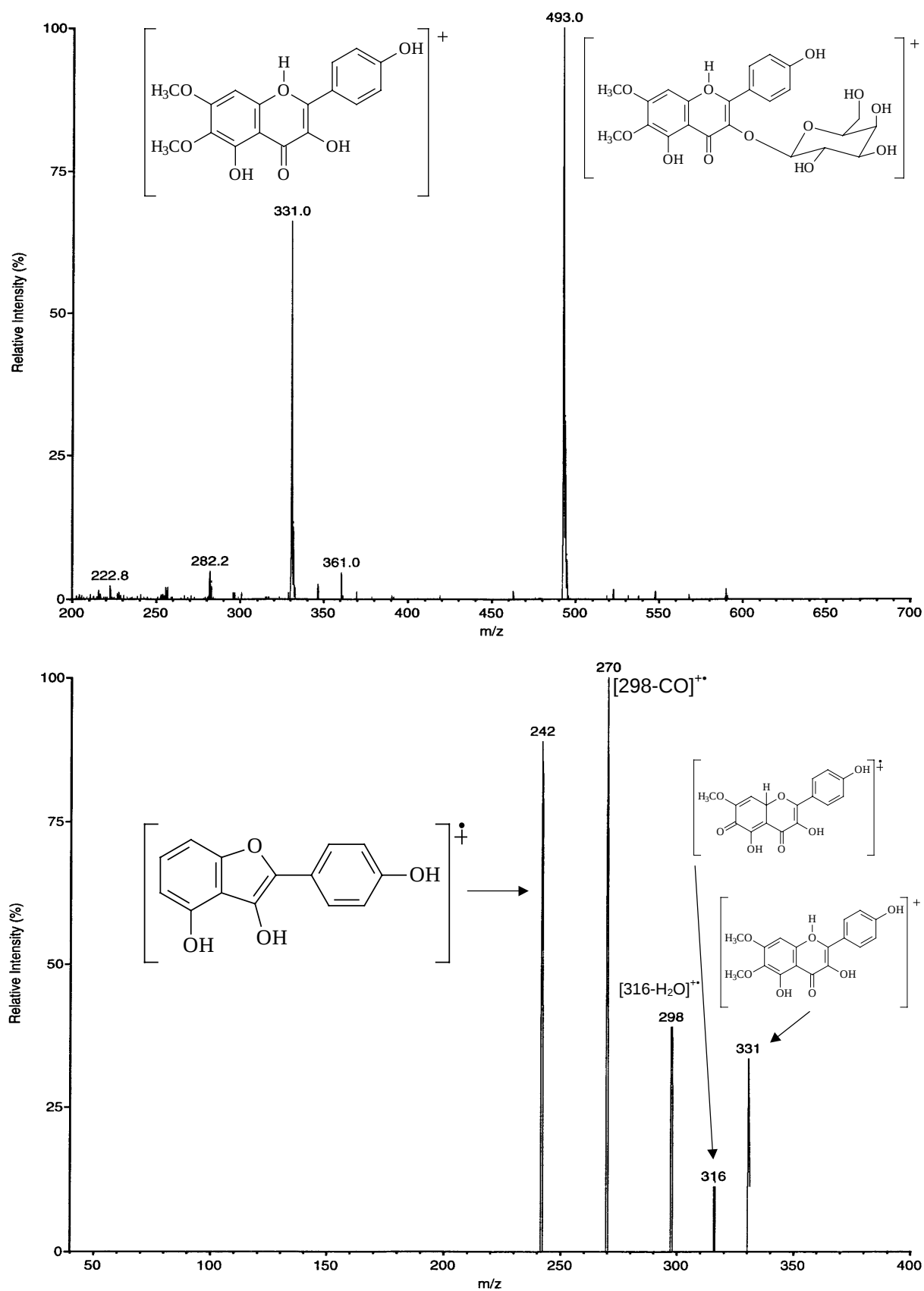


Bild 2.112: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG4**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 331 amu (unten)

Tabelle 2.31: NMR-Daten von Verbindung **FG4** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d₆, TMS); * = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG4	C	FG4
8	6.90 s	2	156.16*
2'	8.11 d (8.8)	3	134.38
3'	6.87 d (8.8)	4	177.35
5'	6.87 d (8.8)	5	151.84
6'	8.11 d (8.8)	6	131.88
1''	5.43 d (7.6)	7	157.09*
2''	3.56 dd (7.6, 9.5)	8	91.55
3''	3.39 dd (3.2, 9.5)	9	151.84
4''	3.66 t (3.2)	10	105.50
5''	3.36 t (5.7)	1'	120.99
6''	3.45 dd (5.7, 10.7)	2'	131.21
	3.30 dd (5.7, 10.7)	3'	115.25
6-OCH ₃	3.74 s	4'	160.25
7-OCH ₃	3.92 s	5'	115.25
5-OH	12.58 s	6'	131.21
4'-OH	10.21 brs	1''	102.76
andere OH	5.18 d (5.0)	2''	71.38
	4.86 d (5.7)	3''	73.26
	4.50 d (3.8)	4''	68.06
	4.44 t (5.7)	5''	75.98
		6''	60.37
		6-OCH ₃	60.26
		7-OCH ₃	56.71

Die ¹H NMR-Daten von **FG3** und **FG4** unterscheiden sich nur im Hinblick auf die Zuckerprotonen. Diese Beobachtung trifft weitgehend auch auf die ¹³C-Shifts zu (siehe Tabelle 2.29, S. 142 und Tabelle 2.31, S. 148). Ein Vergleich der Zuckersignale mit Daten aus der Literatur [HARBORNE, 1994; HARBORNE und MABRY, 1982] erbrachte das Resultat, dass es sich bei dem Zucker des Flavonoid-Glykosids **FG4** um β -Galactose in der Pyranoseform handeln muß.

Es handelt sich demnach bei Verbindung **FG4** um 3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- β -galactopyranosid (= Eupalitin 3-galactosid). Die Substanz wurde zuerst in der Polemoniaceae *Ipomopsis aggregata* gefunden [SMITH et al., 1971]. Weitere Belege betreffen *Anvillea garcini* [ULUBELEN et al., 1979] sowie die Eupatorieae *Brickellia monocephala* [NORRIS und MABRY, 1985], *Brickellia dentata* [ULUBELEN et al., 1980] und *Eupatorium areolare* var. *leiocarpum* [YU et al., 1986b]. NMR-Daten für **FG4** wurden bislang noch nicht publiziert.

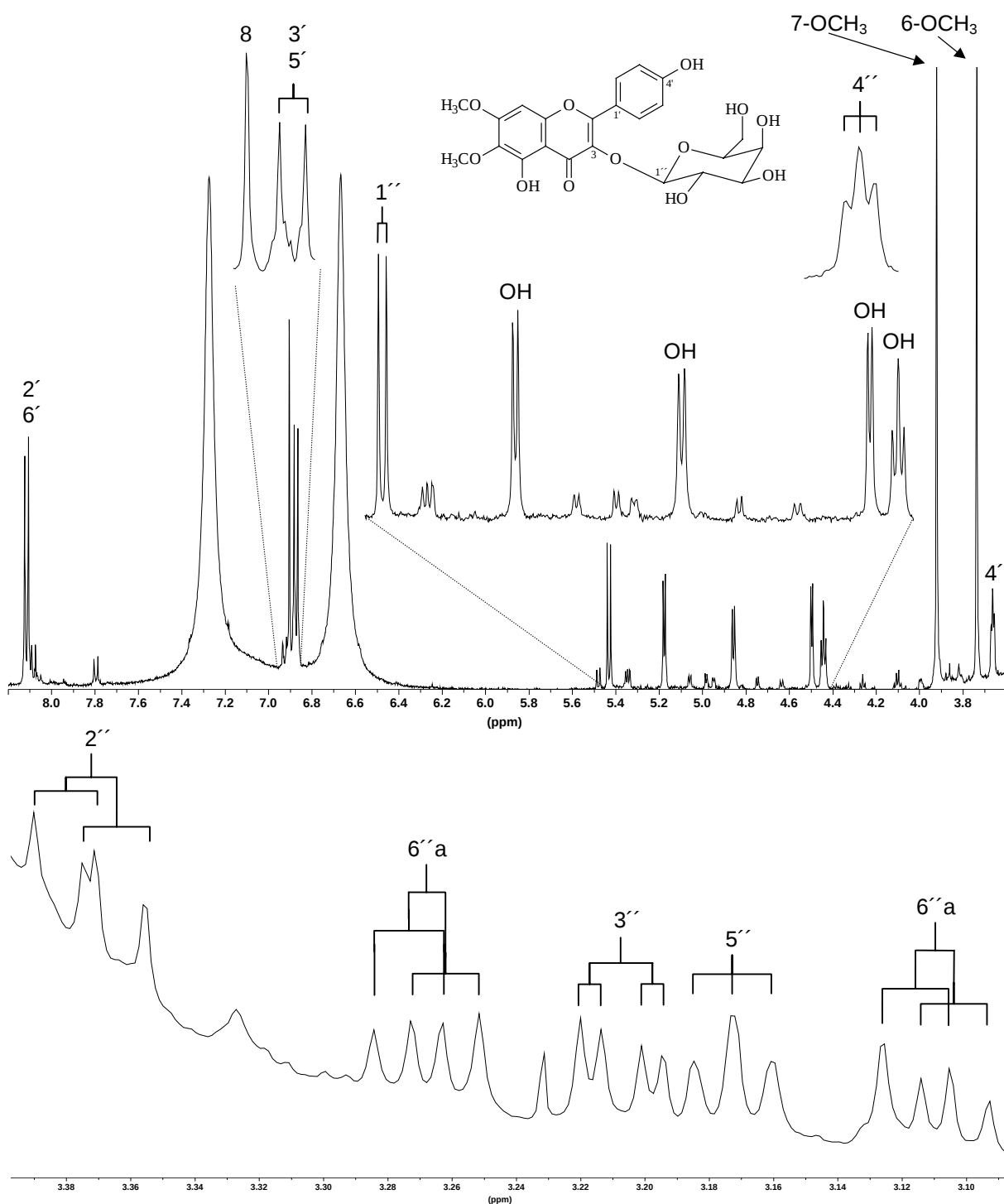
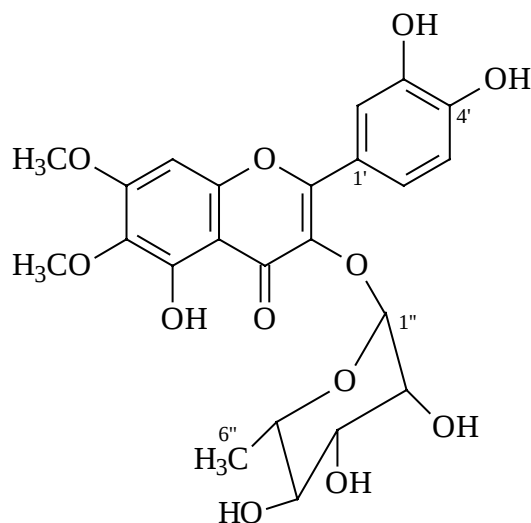


Bild 2.113: Sich ergänzende Ausschnitte aus den Protonenspektren von **FG4**: Der obere Teil ist dem in $\text{DMSO}-d_6$ aufgenommenen Spektrum entnommen, der untere Teil mit den Resonanzen der Galactose gehört zu dem nach D_2O -Zugabe erhaltenen Spektrum (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ bzw. $\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$, TMS)

2.3.6 Eupatolin =
3,3',4',5-Tetrahydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid
(Verbindung FG5)



FG5 wurde ebenfalls aus Fraktion M-IV des Methanol-Extraktes isoliert. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 38 mg (siehe Kap. 6.5.6.2, S. 325).

Nach Detektion mit Naturstoffreagenz A sind die Reaktionsprodukte von **FG5** auf der DC-Folie bei Tageslicht orange gefärbt (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Im UV-Licht (365 nm) fluoresziert die Verbindung hellorange, was ein Merkmal von Flavonolen mit einer 3', 4'-Dihydroxygruppe im B-Ring ist [WOLLENWEBER, 1982].

Verbindung **FG5** ist massengleich mit **FG3** und **FG4**, da auch hier im APCI-MS-Spektrum ein Molekülion bei m/z 493 auftritt (siehe Bild 2.112, S. 147). Das $[M+H]^+$ -Ion spaltet ein Fragment der Masse 146 ab, woraus folgt, dass Rhamnose als Zucker vorliegt. Das bei dieser Reaktion gebildete Kation mit einer Masse von 347 amu entspricht dem protonierten Aglykon. Damit ist das Aglykon von **FG5** um 16 amu schwerer als das von **FG3** bzw. **FG4**. Das protonierte Aglykon fragmentiert unter pseudo-MS/MS/MS-Bedingungen allerdings in gleicher Weise wie die eben genannten Verbindungen, da es nacheinander ein Methylradikal, Wasser und zweimal Kohlenmonoxid abspaltet. Dies deutet darauf hin, dass **FG5** hinsichtlich der Konstitution der Ringe A und C mit **FG3** und **FG4** übereinstimmt (vergl. Kap. 2.3.2, S. 125 f.).

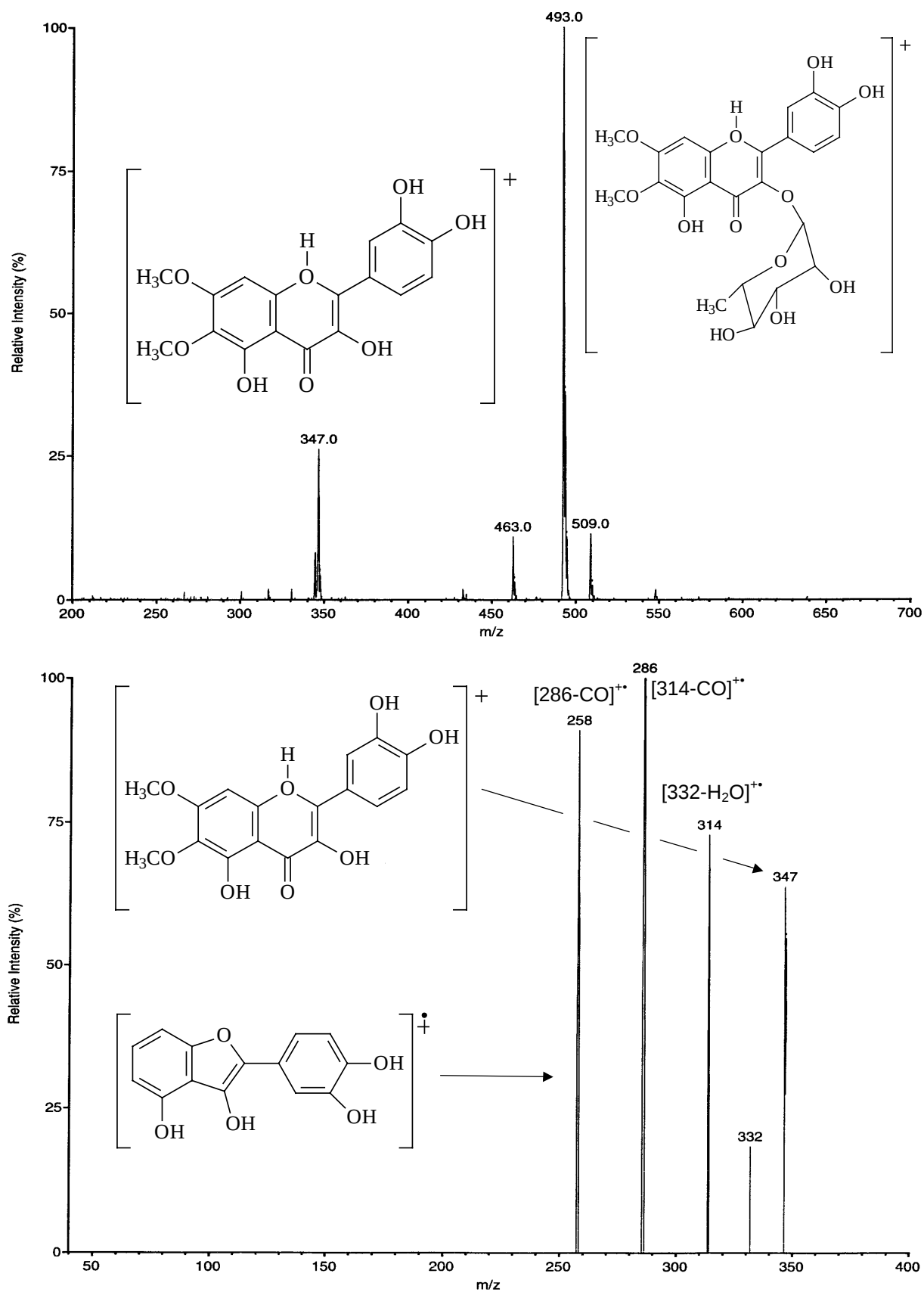


Bild 2.114: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG5**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 347 amu (unten)

Tabelle 2.32: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG5** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
257	265	264	264	277	270
270 sh	290 sh	365	365	337 sh	300 sh
343	392	400 sh		427	374
					405 sh

Die Position der Bande II im UV-Spektrum (MeOH) bei 257 nm (siehe Tabelle 2.32, S. 152) spricht in Verbindung mit der Schulter bei 270 nm für eine Disubstitution des B-Ringes [CHIRIKDJIAN und BLEIER, 1971; MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982].

Nach Zusatz von Natriummethanolat wird Bande I bei fast gleicher Intensität um 49 nm zu längeren Wellenlängen verschoben, wodurch eine freie OH-Gruppe an C-4' angezeigt wird. Die OH-Gruppe an C-3 muß substituiert vorliegen, da die Bande I sonst eine starke Intensitätsabnahme erleiden würde [HARBORNE et al., 1982]. Auch etliche Minuten nach Reagenzzugabe war keine Intensitätsabnahme von Bande I zu beobachten, wodurch die Existenz Alkali-labiler Gruppen im Molekül auszuschließen ist [MABRY et al., 1970]. Die Schulter bei 290 nm im langwelligen Bereich von Bande II macht es bei gleichzeitiger Abwesenheit einer Schulter bei 330 nm wahrscheinlich, dass das Molekül über eine substituierte 7-OH-Gruppe verfügt [BACON et al., 1976, MERFORT, 1990].

Die nach dem Zusatz von Natriumacetat im langwelligen Bereich der Bande I auftretende Schulter (400 nm) spricht für substituierte Hydroxylgruppen an den Positionen 3 und 7 [MABRY et al., 1970].

Auf Zusatz von Borsäure findet sich die Bande I bei 365 nm. Die bathochrome Verschiebung von 22 nm gegenüber dem Spektrum in reinem Methanol ist typisch für Flavonoide mit einer *ortho*-Dihydroxygruppierung im B-Ring [MARKHAM, 1982].

Dasselbe Ergebnis liefert das Aluminiumchlorid- bzw. das Aluminiumchlorid/Salzsäure-Spektrum, da nach HCl-Zusatz der säurelabile Chromophorkomplex zerstört und die in Methanol/Aluminiumchlorid bei 427 nm liegende Bande I dadurch um 53 nm hypsochrom verschoben wird [MABRY et al., 1970]. Da nach dem Säurezusatz die Bande I immer noch 31 nm bathochrom gegenüber ihrer Lage im Methanol-Spektrum verschoben ist, muß an C-5 eine freie OH-Gruppe und an C-6 eine Methoxygruppe vorliegen. Dies wird durch die Schulter bei 405 nm zusätzlich bekräftigt [HARBORNE und MABRY, 1982; JURD, 1969; SAKAKIBARA und MABRY, 1977].

Nach den MS- und UV-Untersuchungen sollte es sich bei **FG5** um ein Flavonol-Rhamnosid handeln, welches mit **FG1** – **FG4** den A-Ring gemeinsam hat und im B-Ring eine 3',4'-Dihydroxygruppe besitzt.

Tabelle 2.33: NMR-Daten von Verbindung **FG5** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben für Eupatolin: ¹QUIJANO et al., 1970 (60 MHz, CDCl₃, TMS); * = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG5	Eupatolin ¹	C	FG5
8	6.85 s	6.82 s	2	157.91
2'	7.37 s	7.43 d (2)	3	134.40
5'	6.90 d (8.2)	6.91 d (8)	4	178.29
6'	7.31 d (8.2)	7.35 dd (2; 8)	5	151.95*
1''	5.32 s	7.36 s	6	131.91
2''	4.01 s	5.34	7	158.93
3''	3.54 dd (3.2, 8.8)	} 3.90 – 4.92	8	91.52
4''	3.17 t (9.5)		9	152.07*
5''	3.24 dd (5.7, 9.5)		10	105.66
6''	0.84 d (5.7)		1'	120.87
6-OCH ₃	3.75 s	3.76 s	2'	116.01
7-OCH ₃	3.93 s	3.92 s	3'	145.48
5-OH	12.62 s	12.6 s	4'	148.81
			5'	115.68
			6'	121.35
			1''	102.44
			2''	70.26
			3''	70.84
			4''	71.40
			5''	70.56
			6''	17.72
			6-OCH ₃	60.30
			7-OCH ₃	56.73

Im Protonenspektrum finden sich dreizehn Signale für neunzehn Protonen (siehe Bild 2.115, S. 154). Die Signale für das Proton der 5-OH-Gruppe (12.62 ppm), für H-8 (6.85 ppm) sowie für die 6- (3.75 ppm) und die 7-Methoxygruppe (3.93 ppm) sind von den Flavonol-Glykosiden **FG1** bis **FG4** bekannt und bestätigen, dass **FG5** im Hinblick auf den A-Ring mit diesen Substanzen übereinstimmt. Die Signale bei 7.37 ppm (H-2'), 6.90 ppm (H-5') und 7.31 ppm (H-6') gehören zu einem ABX-System im B-Ring. Die Shifts und Kopplungskonstanten bestätigen die 3',4'-Dihydroxylierung des B-Ringes [HARBORNE, 1994]. Die restlichen sechs Signale für acht Protonen sind der bereits aus dem APCI-MS-Spektrum abgeleiteten Rhamnose zuzuordnen (siehe Tabelle 2.33, S. 153).

Dem ¹³C NMR-Spektrum lassen sich dreiundzwanzig Signale für ebenso viele Kohlenstoffatome entnehmen (siehe Bild 2.116, S. 155). In Analogie zu den Substanzen **FG1** – **FG4** lassen sich die zehn Signale für die Kohlenstoffe des A-Ringes zuordnen. Die Korrelationssignale im HMQC- (siehe Bild 2.117, S. 155) und HMBC-Spektrum (siehe Bild 2.118, S. 156 und Bild 2.119, S. 156) erlauben die eindeutige Zuordnung der Signale des 3',4'-dihydroxylierten B-Ringes. Die restlichen sechs Signale lassen sich durch den Vergleich mit den Zuckersignalen von **FG1** zweifelsfrei der α -Rhamnose zuschreiben (vergl. Tabelle 2.25, S. 128 mit Tabelle 2.33, S. 153). Ein Crosspeak zwischen dem Signal für C-3 (134.40 ppm) und dem Signal des anomeren Protons der Rhamnose (5.32 ppm) beweist, dass der Zucker mit der 3-Hydroxy-Gruppe des Aglykons verbunden ist (siehe Bild 2.119, S. 156).

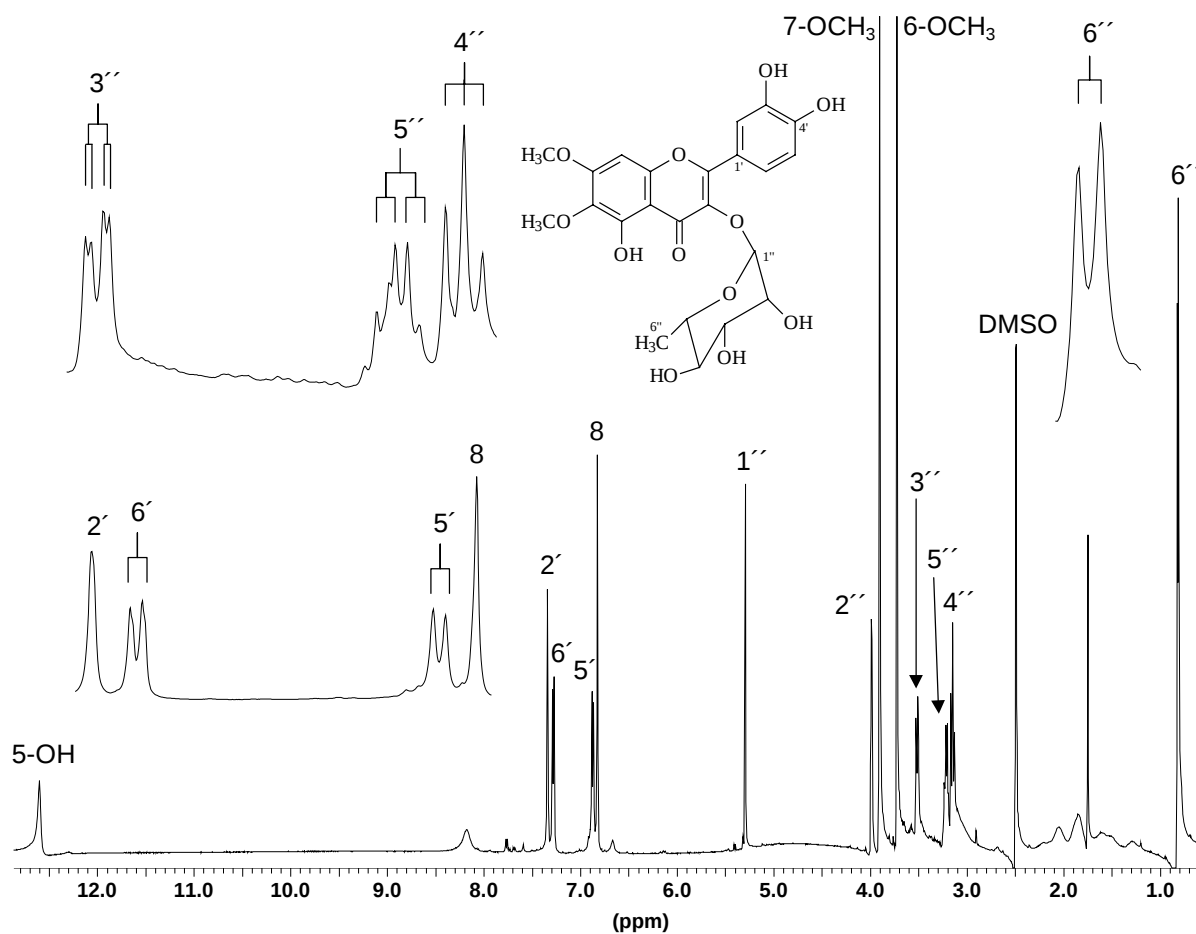


Bild 2.115: ^1H NMR-Spektrum von Verbindung **FG5** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)

Es handelt sich demnach bei Verbindung **FG5** um Eupatolin bzw. 3,3',4',5-Tetrahydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid. Die Benennung von **FG5** geht auf QUIJANO et al. (1970) zurück. Die Mexikaner isolierten die Verbindung aus *E. ligustrinum*. Sie konnte danach noch aus vier weiteren Vertretern der Eupatorieae dargestellt werden, nämlich aus *A. calophylla*, *A. saltillensis*, *Brickellia vernicosa* und *E. areolare* var. *leiocarpum* [AHMED et al., 1986; FANG et al., 1986; YU et al., 1986a und 1986b]. In diesen Publikationen wurden noch keine ^{13}C NMR-Daten veröffentlicht, Untersuchungen mittels zweidimensionaler NMR lagen ebenfalls nicht vor.

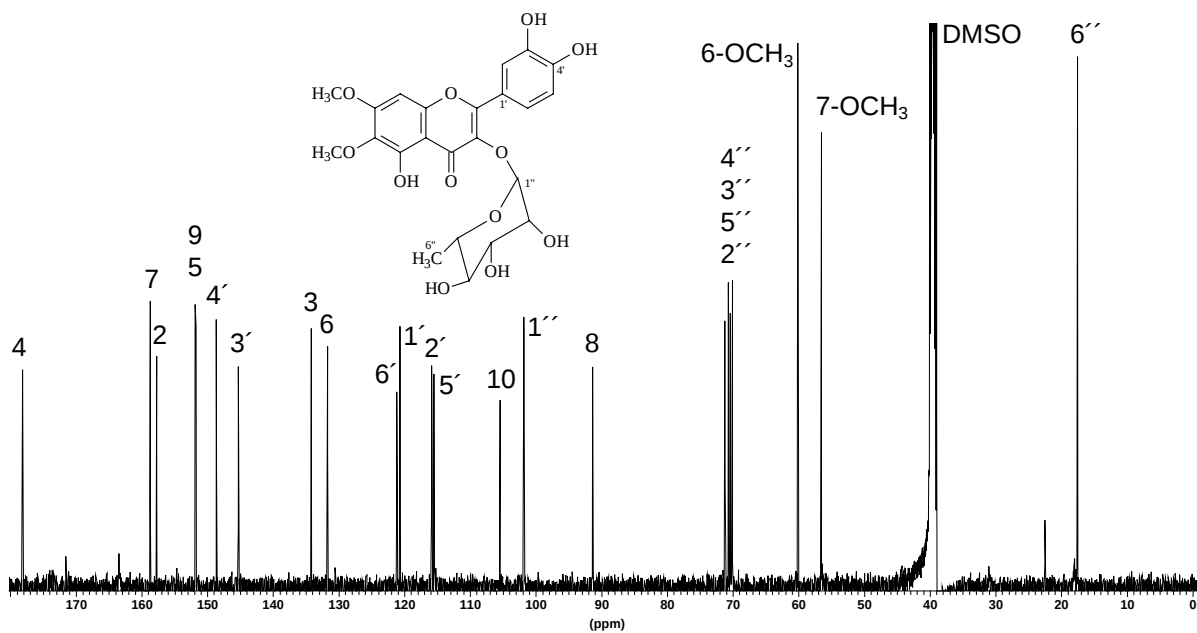
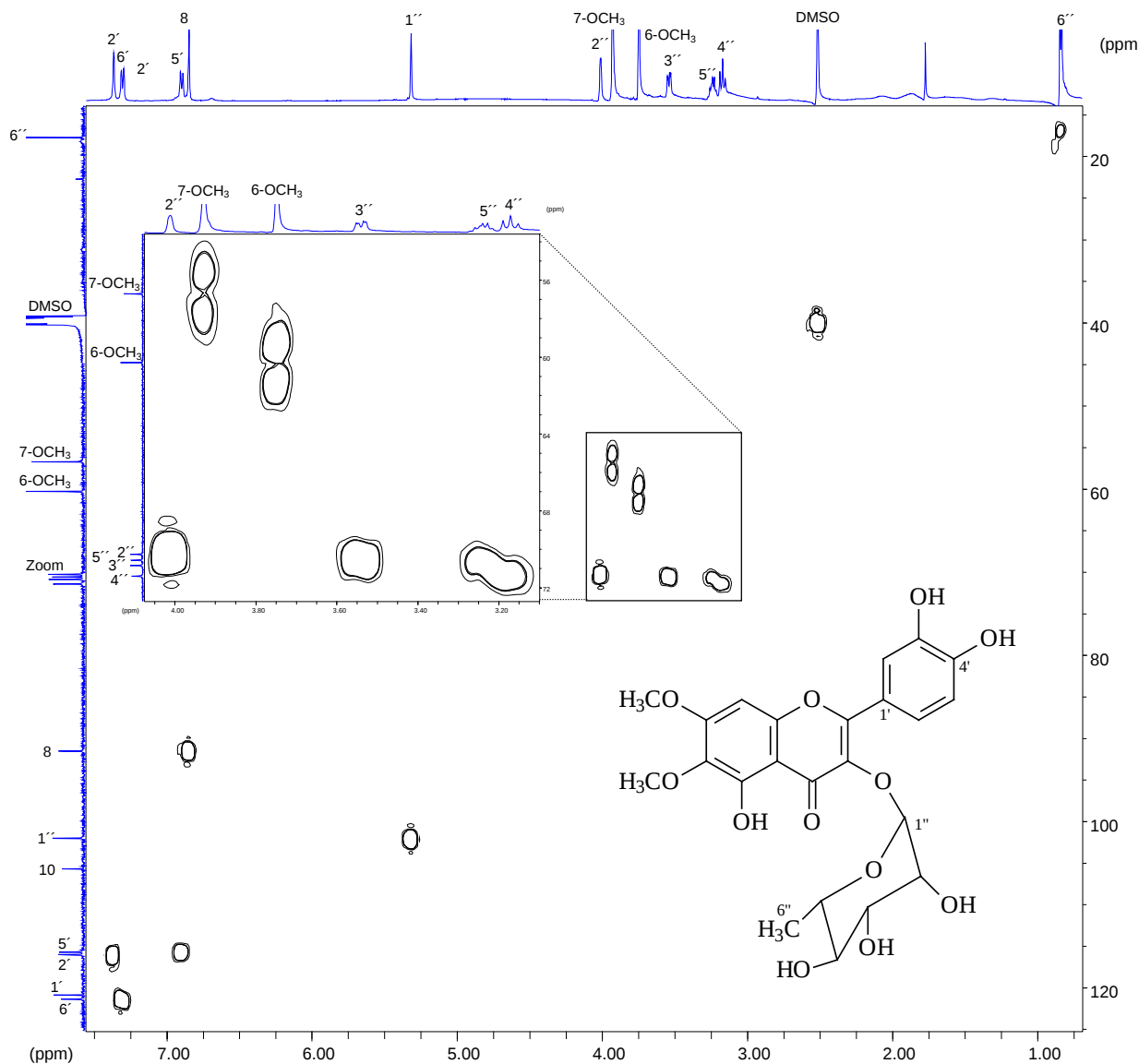


Bild 2.116: ^{13}C NMR-Spektrum von Substanz **FG5** (125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)



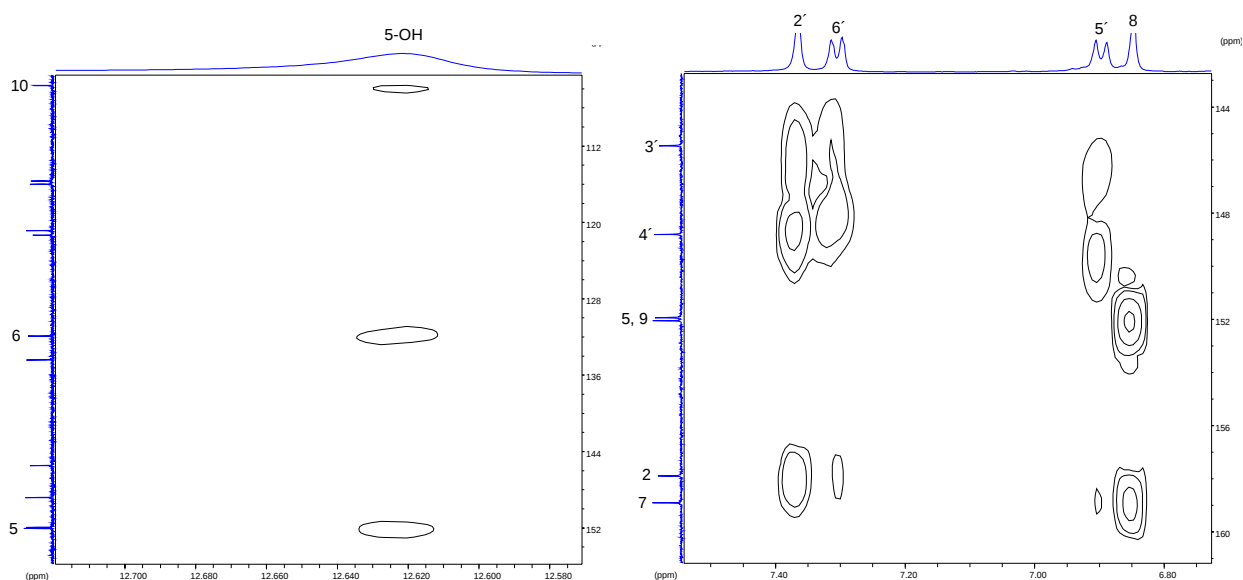


Bild 2.118: Details aus dem HMBC-Spektrum von Verbindung **FG5** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

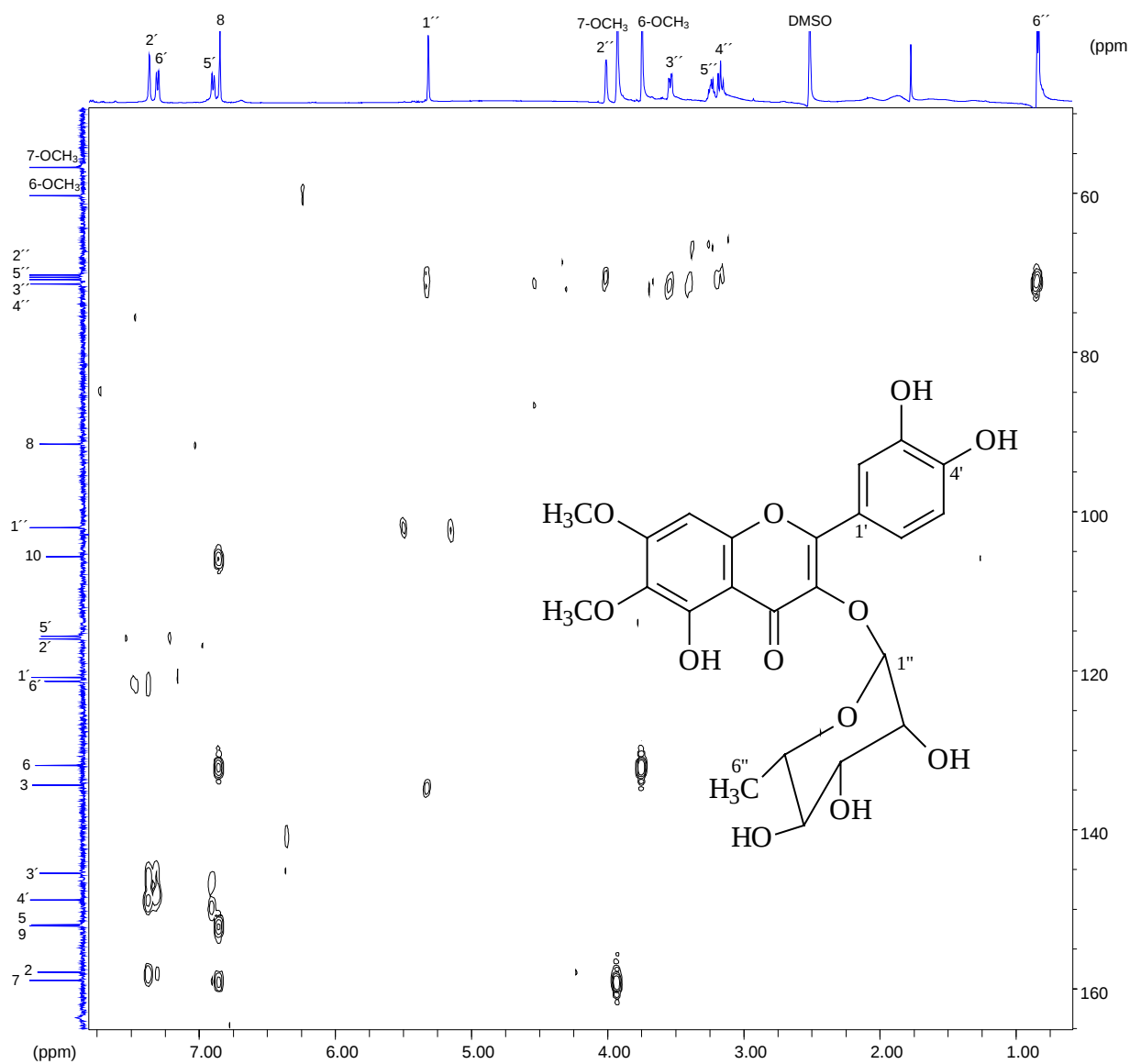
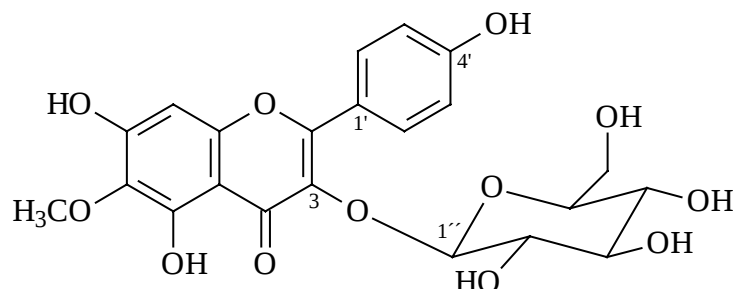


Bild 2.119: HMBC-Spektrum von Verbindung **FG5** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

**2.3.7 6-Methoxykaempferol 3-glucosid =
3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- β -glucopyranosid
(Verbindung FG6)**



Die Verbindung fiel bei der Aufarbeitung der Fraktion M-IV des Methanol-Extraktes in einer Ausbeute von 4 mg DC-rein an (siehe Kap. 6.5.6.2, S. 325).

Bei Betrachtung der DC-Eigenschaften fällt die große Ähnlichkeit zu Verbindung **FG3** auf (siehe Tabelle 6.1, S. 298), da beide Substanzen in drei verschiedenen Fließmitteln jeweils fast gleiche R_f -Werte zeigen. Die Färbung nach dem Besprühen sowie die Fluoreszenz im UV (365 nm) von **FG6** gleicht der von **FG1**, **FG3** und **FG4**, was auf das Vorhandensein eines 4'-monohydroxylierten B-Ringes hinweist. Es könnte sich daher bei **FG6** um ein Flavonol-3-Glucosid mit *para*-hydroxyliertem B-Ring handeln.

Im APCI-MS-Spektrum von **FG6** findet sich das Pseudomolekülion bei m/z 479. Von diesem Ion wird ein Neutralteilchen der Masse 162 amu unter Bildung des protonierten Aglykons (m/z 317) abgespalten. Dies deutet auf den Verlust einer Hexose wie Glucose oder Galactose hin. Das pseudo-MS/MS/MS-Spektrum zeigt die Fragmentierung des protonierten Aglykons. Es finden sich Folgefragmente bei m/z 302 und m/z 274. Diese Teilchen entstehen durch die Elimination eines Methylradikals sowie die nachfolgende Abspaltung von Kohlenmonoxid. Die Tatsache, dass kein H_2O und nur ein Molekül CO abspalten wird, spricht dafür, dass **FG6** im Gegensatz zu **FG1** bis **FG5** keine 7-Methoxygruppe besitzt, da eine sich an die Methylabspaltung anschließende Elimination von Wasser nur dann beobachtet wird, wenn sich bei Vorliegen einer 7-Methoxygruppe ein mit dem A-Ring annellierter Oxetring bilden kann (vergl. Bild 2.96, S. 126 mit Bild 2.120, S. 158) [STEVENS, 2000].

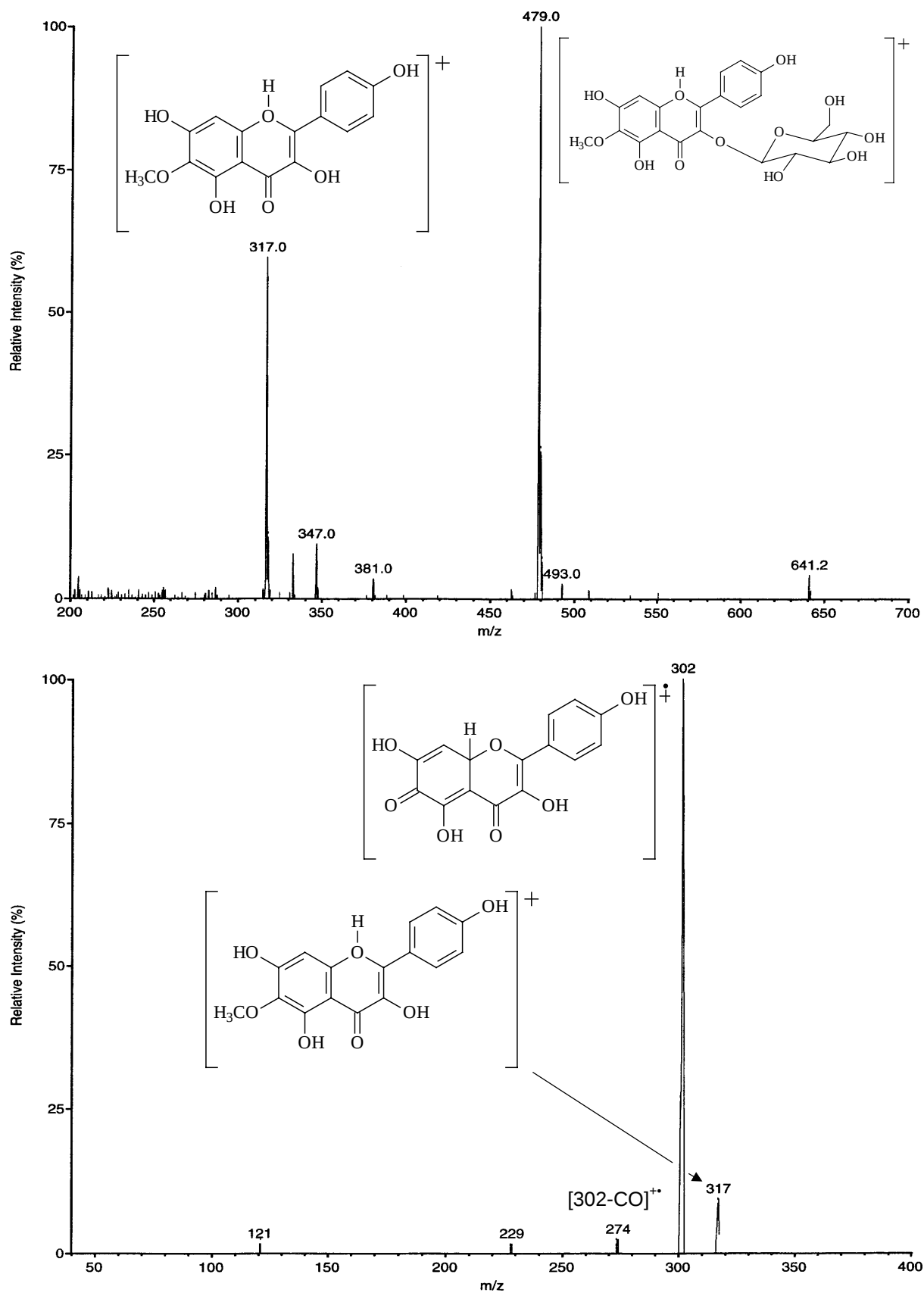


Bild 2.120: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG6**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 317 amu (unten)

Tabelle 2.34: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG6** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
268	273	271	268	276	276
294 sh	328 sh	298 sh	348	305 sh	305 sh
344	402	376		360	356
				400 sh	400 sh

Die UV-Spektren von **FG6** zeigen, dass sich das Aglykon dieser Verbindung von den Aglyka der Substanzen **FG1** bis **FG4** nur hinsichtlich der nicht vorhandenen Methylierung der OH-Gruppe an C-7 unterscheidet. Die freie 7-OH-Gruppe wird durch die im Methanolat-Spektrum am kurzwelligen Schenkel von Bande I bei 328 nm auftretende Schulter bewiesen [BACON et al., 1976], alle übrigen UV-Daten sprechen für die von **FG1** bis **FG4** bekannten und dort diskutierten Strukturmerkmale (Glykosidierung an C-3, freie OH-Gruppe an C-5, Methoxygruppe an C-6 und 4'-monohydroxylierter B-Ring).

Tabelle 2.35: NMR-Daten von Verbindung **FG6** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d₆, TMS) im Vergleich zu 6-Methoxykaempferol 3-glucosid: ¹MERFORT und WENDISCH., 1987 (200 bzw. 90,52 MHz, CD₃OD, TMS); *, #, § = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG6	6-Methoxy- kaempferol 3-glucosid ¹	C	FG6	6-Methoxy- kaempferol 3-glucosid ¹
8	6.54 s	6.480 s	2	156.49	158.751 [#]
2'	8.03 d (8.8)	8.041 d (9)	3	133.01	135.315
3'	6.88 d (8.8)	6.874 d (9)	4	177.60	179.753
5'	6.88 d (8.8)	6.874 d (9)	5	151.17*	153.802 [§]
6'	8.03 d (8.8)	8.041 d (9)	6	131.43	132.762
1''	5.46 d (7.6)	5.256 m (7.6)	7	157.60	159.372 [#]
2''	3.18 t (7.6)	3.292 – 3.460 m	8	94.10	95.132
3''	3.24 t (8.2)	3.292 – 3.460 m	9	152.29*	153.538 [§]
4''	3.10 d (7.6)	3.167 – 3.278 m	10	104.54	106.248
5''	3.10 d (7.6)	3.292 – 3.460 m	1'	121.12	122.867
6''	3.56 dd (5.0, 12.0)	3.698 dd (2.1, 11.9)	2'	131.06	132.312
	3.33 dd (5.0, 12.0)	3.526 dd (5.2, 11.9)	3'	115.26	116.126
6-OCH ₃	3.75 s	3.866 s	4'	160.11	161.555
OH	5.34 d (4.4)		5'	115.26	116.126
	5.05 d (4.4)		6'	131.06	132.312
	4.94 d (3.2)		1''	100.99	104.535
	4.25 t (5.7)		2''	74.39	75.792
			3''	76.58	78.300*
			4''	70.08	71.491
			5''	77.67	78.108*
			6''	61.03	62.813
			6-OCH ₃	60.16	61.025

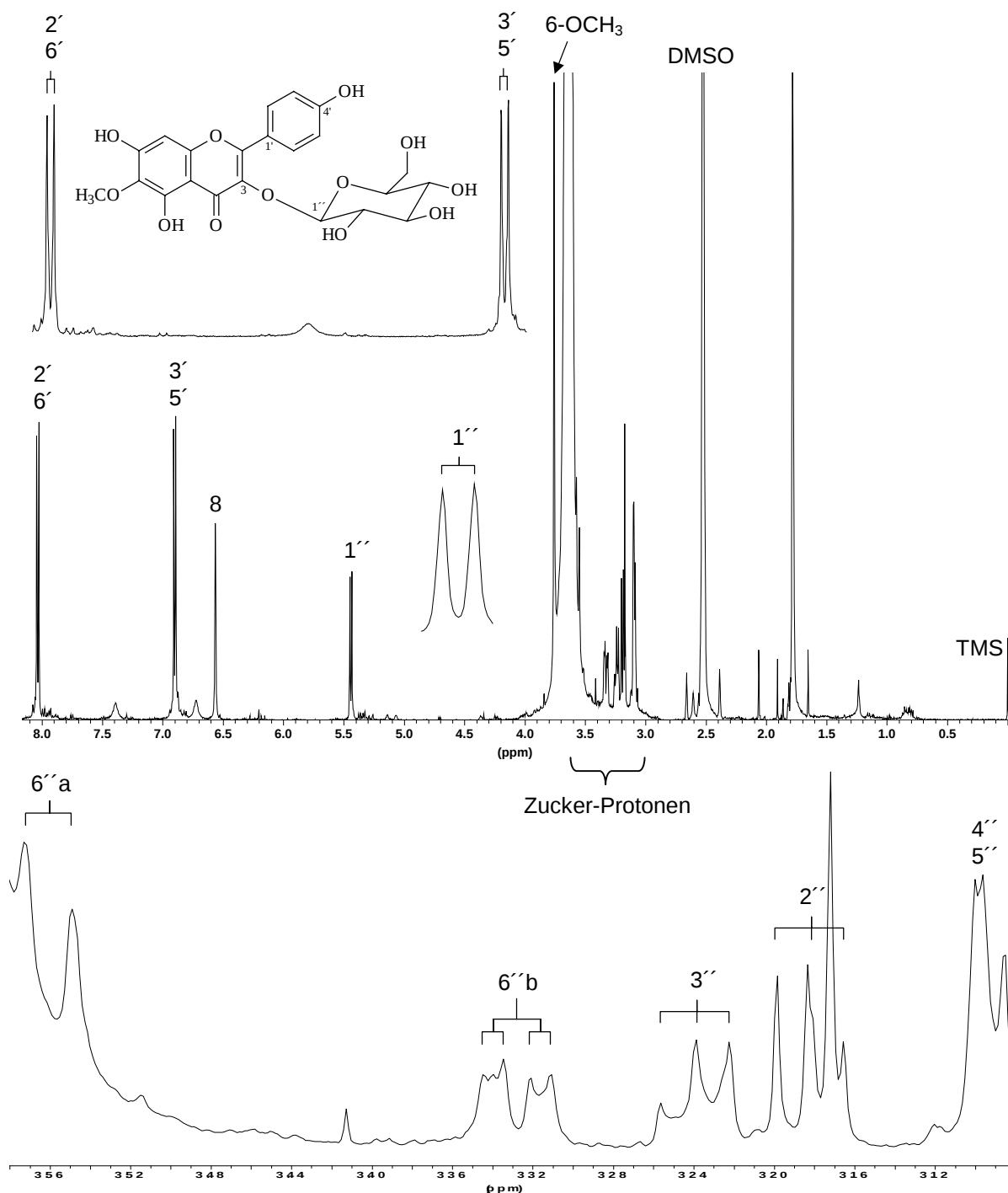


Bild 2.121: Protonenspektrum von **FG6** in DMSO- d_6 /D $_2$ O: Der untere Teil zeigt den Ausschnitt mit den Resonanzen einiger Glucoseprotonen (500 MHz, DMSO- d_6 /D $_2$ O, TMS)

Das ^1H NMR-Spektrum von **FG6** zeigt vierzehn Signale für neunzehn Protonen (siehe Bild 2.121, S. 160). Wie nach den Informationen aus den MS- und UV-Spektren erwartet, finden sich darunter die Signale für H-8 (6.54 ppm), für H-2'/H-6' und H-3'/H-5' (8.03 bzw. 6.88 ppm) und für die drei äquivalenten Protonen der 6-Methoxygruppe (3.75 ppm). Das Signal für H-8 ist damit gegenüber den Verbindungen **FG1** – **FG5** um mehr als 0.3 ppm hypsochrom verschoben. Dieser Tieffeldshift beweist in Verbindung mit dem Fehlen des Signals für die 7-Methoxygruppe, dass sich an C-7 eine freie OH-Gruppe befindet. Die

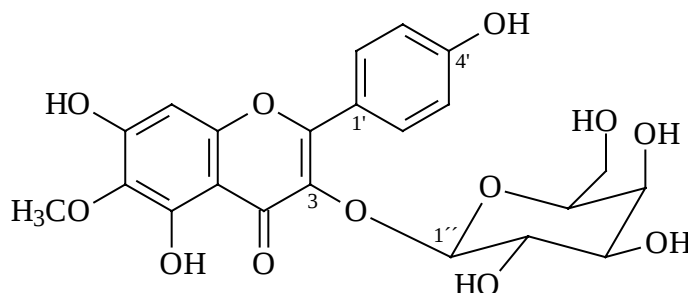
restlichen zehn Signale verteilen sich auf die Zuckerkomponente (sechs Signale) sowie auf mehrere Hydroxylprotonen (siehe Tabelle 2.35, S. 159). Der Vergleich der Shifts der Zuckersignale von **FG6** mit den Shifts der entsprechenden Signale von **FG3** zeigt, dass es sich auch bei **FG6** um ein β -Glucosid handelt (vergl., S. 142 mit Tabelle 2.35, S. 159).

Im ^{13}C NMR-Spektrum finden sich zwanzig Signale für zweiundzwanzig Kohlenstoffe (siehe Tabelle 2.35, S. 159), die sich in Analogie zu **FG3** dem Aglykon und der Glucose zuordnen lassen. Der strukturelle Unterschied zwischen **FG6** und **FG3** – eine freie Hydroxyl- statt einer Methoxygruppe an C-7 – lässt sich auch an den Shifts für C-7 und C-8 ablesen, da bei **FG6** das Signal für C-7 im Vergleich mit **FG3** um 1.25 ppm hochfeldverschoben ist, während das Signal für C-8 um 2.57 ppm ins tiefere Feld verlagert erscheint. Darüber hinaus fehlt wie im Protonenspektrum das Signal für die 7-Methoxygruppe. Die Shifts für die Zuckersignale bestätigen die β -Glucose, während die Lage des Signals für C-3 (133.01 ppm) die C-3-Glucosidierung beweist (vergl. Tabelle 2.29, S. 142 mit Tabelle 2.35, S. 159).

Es handelt sich bei Verbindung **FG6** daher um 3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- β -glucopyranosid (= 6-Methoxykaempferol 3-glucosid).

Die Erstbeschreibung von **FG6** geht auf die Arbeitsgruppe um T. J. Mabry aus Austin/Texas zurück [AL-KHUBAIZI et al., 1978]. Die Wissenschaftler isolierten das Flavonol-Glykosid aus der Asteraceae *Flaveria brownii*. Darüber hinaus wurde die Verbindung noch aus der Rutaceae *Haplophyllum tuberculatum* [KHALID und WATERMAN, 1981], den Eupatorieae *A. calophylla* [FANG et al., 1986], *A. saltillensis* [YU et al., 1986a], *E. areolare* var. *leiocarpum* [YU et al., 1986b] und *A. havanensis* [YU et al., 1987] sowie aus den Arnica-Arten *Arnica montana*, *A. chamissonis* subsp. *foliosa* var. *incana* [MERFORT und WENDISCH, 1987] und *A. sachalinensis* [PABREITER, 1990] gewonnen.

2.3.8 6-Methoxykaempferol 3-galactosid =
3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- β -galactopyranosid
(Verbindung FG7)



Verbindung **FG7** fiel bei der Aufarbeitung der Fraktion M-IV in einer Ausbeute von 4 mg DC-rein an (siehe Kap. 6.5.6.2, S. 325).

Auch **FG7** verhält sich in der DC-Analyse bezüglich des Lauf- und Detektionsverhaltens ähnlich wie **FG3**, **FG4** und **FG6** (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Insgesamt deutet dies darauf hin, dass der B-Ring eine OH-Gruppe an Position 4' trägt und ein Glykosid vorliegt.

Die LC-MS-Spektren von **FG7** zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den entsprechenden Spektren von **FG6** (vergl. Bild 2.120, S. 158 mit Bild 2.122, S. 163). Das pseudo-MS/MS/MS-Spektrum, das bei einer Kollisionsenergie von 11 V aufgenommen wurde, dokumentiert, dass unter diesen Bedingungen praktisch noch keine Fragmentierung erfolgt. Diese setzt erst bei einer Kollisionsenergie von 30 V ein, liefert dann aber zu 100% das chinoide Radikalkation mit einer Masse von 317 amu.

Tabelle 2.36: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG7** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
268	273	274	269	275	276
337	328 sh	305 sh	297 sh	305 sh	305 sh
	397	378	346	365	356
				405 sh	400 sh

Die Unterschiede in den UV-Daten von **FG6** und **FG7** sind so gering, dass keine für die Strukturaufklärung relevanten qualitativen Unterschiede daraus abgeleitet werden können (vergl. Tabelle 2.34, S. 159 mit Tabelle 2.36, S. 162). Dies impliziert, dass sich die beiden Glykoside nur hinsichtlich des gebundenen Zuckers voneinander unterscheiden können.

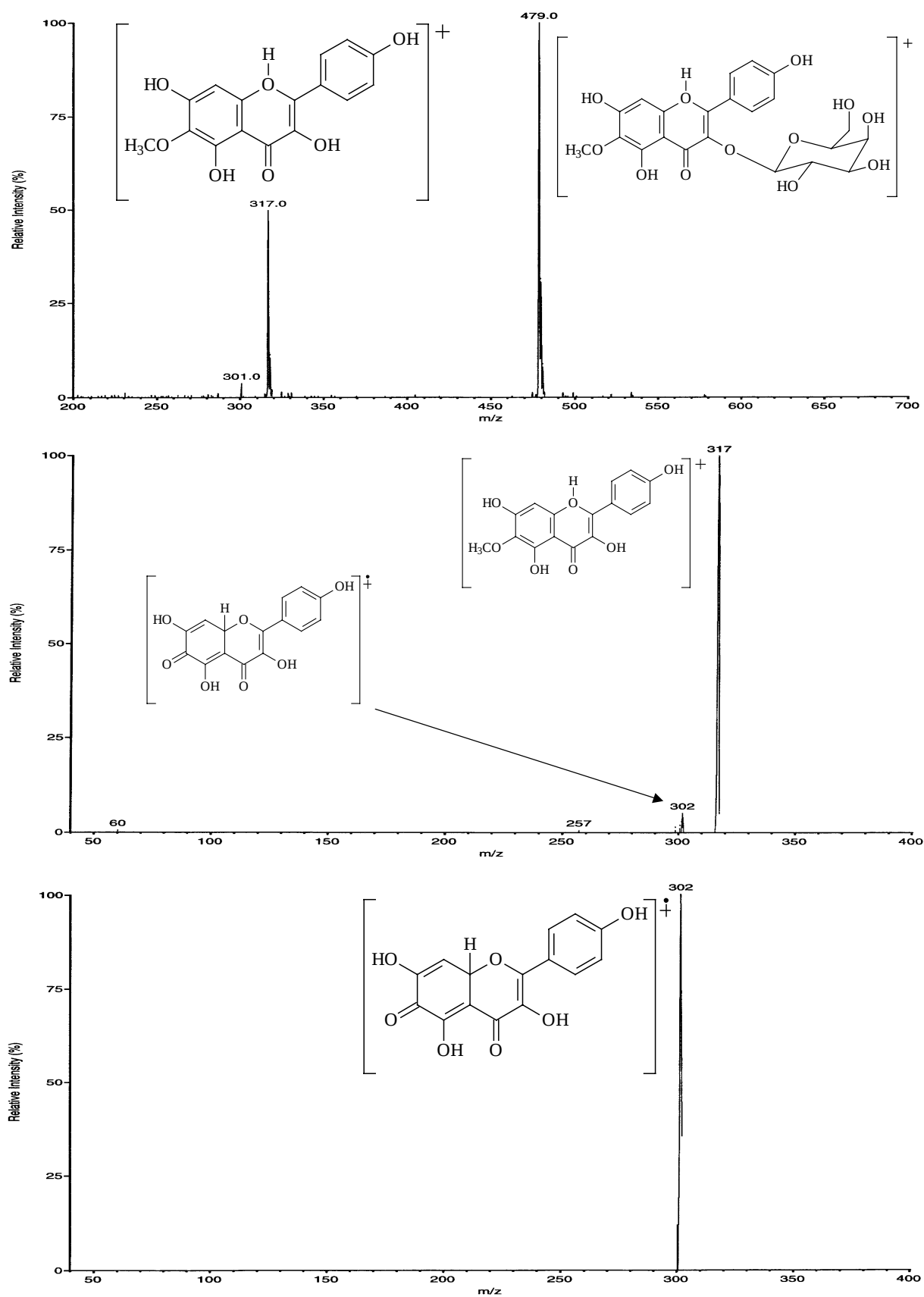


Bild 2.122: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG7**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektren des Fragmentes mit 317 amu (Mitte: Kollisionsenergie: 11 V; unten: Kollisionsenergie: 30 V)

Tabelle 2.37: NMR-Daten von Verbindung **FG7** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS); *, #, § = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG7	C	FG7
8	6.53 s	2	156.55
2'	8.06 d (8.8)	3	133.04
3'	6.86 d (8.8)	4	177.87
5'	6.86 d (8.8)	5	151.79*
6'	8.06 d (8.8)	6	131.50
1''	5.40 d (7.6)	7	160.09#
2''	3.55 dd (7.6, 9.5)	8	94.14
3''	3.39 dd (3.2, 9.5)	9	152.49*
4''	3.66 brs	10	104.35
5''	3.36 t (5.7)	1'	121.10
6''	3.46 dd (5.7, 10.7)	2'	131.14
	3.30 dd (5.7, 10.7)	3'	115.23
6-OCH ₃	3.75 s	4'	160.12#
5-OH	12.69 brs	5'	115.23
4'-OH	10.17 brs	6'	131.14
andere OH	5.18 s	1''	101.83
	4.85 s	2''	71.37
	4.49 s	3''	73.27
	4.44 s	4''	68.05
		5''	75.95
		6''	60.37§
		6-OCH ₃	60.12§

Das ^1H NMR-Spektrum von **FG7** (siehe Bild 2.123, S. 165) zeigt, dass der Flavonoid-Grundkörper dieser Substanz mit dem von **FG6** identisch ist (vergl. Tabelle 2.35, S. 159 mit Tabelle 2.37, S. 164). Unterschiede zwischen **FG7** und **FG6** treten nur im Bereich der Zuckerprotonen auf. Ein Vergleich der Signale von **FG4** und **FG7** sowie der Vergleich mit Literaturdaten verschiedener Flavonoid-Glykoside [HARBORNE, 1994] zeigt, dass es sich bei dem Zucker um β -Galactose handelt. Dies wird durch entsprechende Signale im ^{13}C NMR- und im HMQC-Spektrum bestätigt (siehe Bild 2.124, S. 166 und Bild 2.125, S. 166).

Bei **FG7** handelt es sich demnach um 3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- β -galactopyranosid (= 6-Methoxykaempferol 3-galactosid).

Die Substanz **FG7** wurde zum ersten Mal im Jahre 1979 beschrieben. Sie konnte aus einem Extrakt der im Iran heimischen Asteraceae *Anvillea garcini* isoliert werden [ULUBELEN et al., 1979]. Ein weiterer Fund ist für *E. areolare* var. *leiocarpum* belegt [YU et al., 1986b]. In der ersten Arbeit wurden zwar UV-Daten publiziert, NMR-Daten sind jedoch bis heute noch nicht veröffentlicht worden.

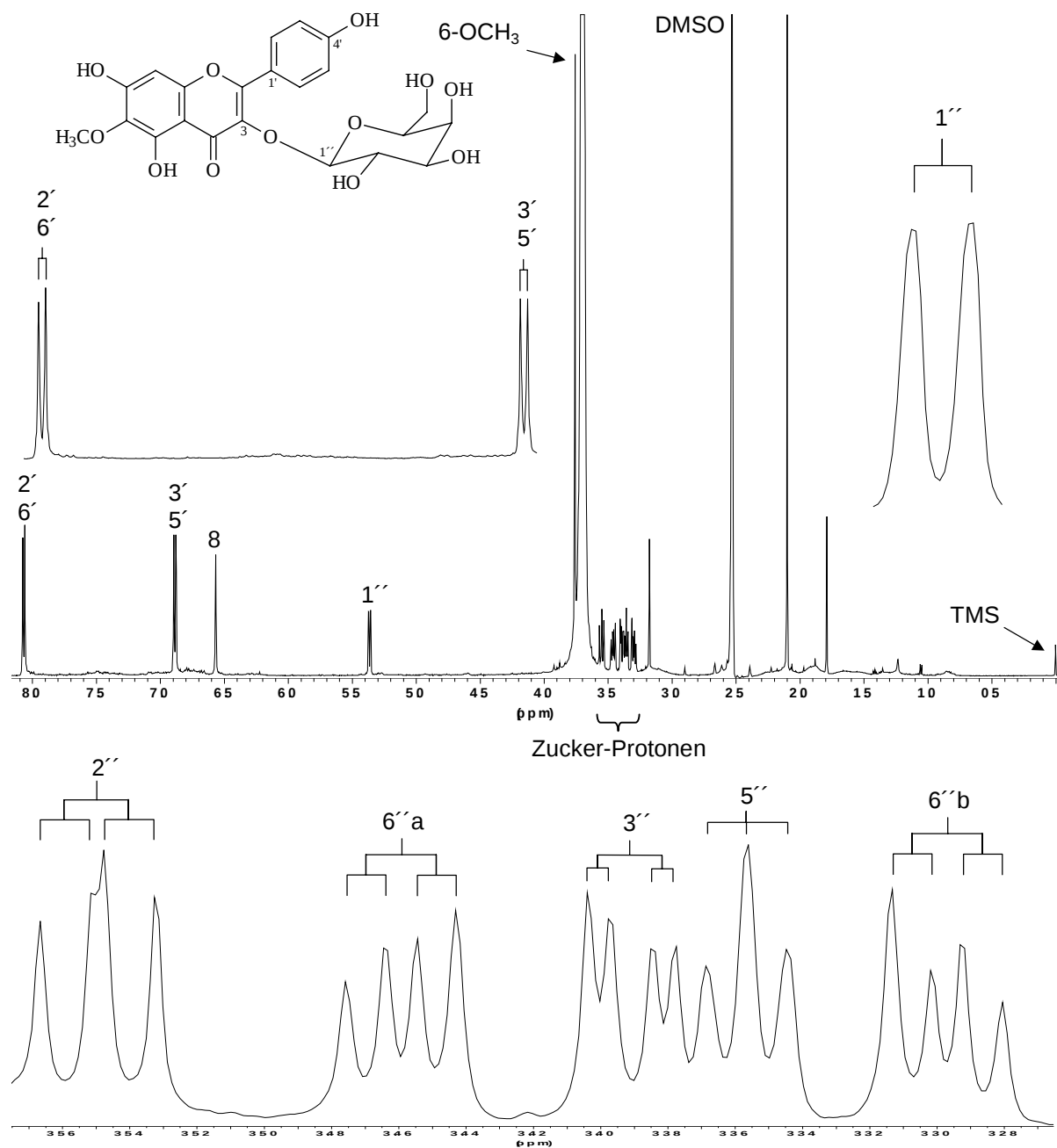
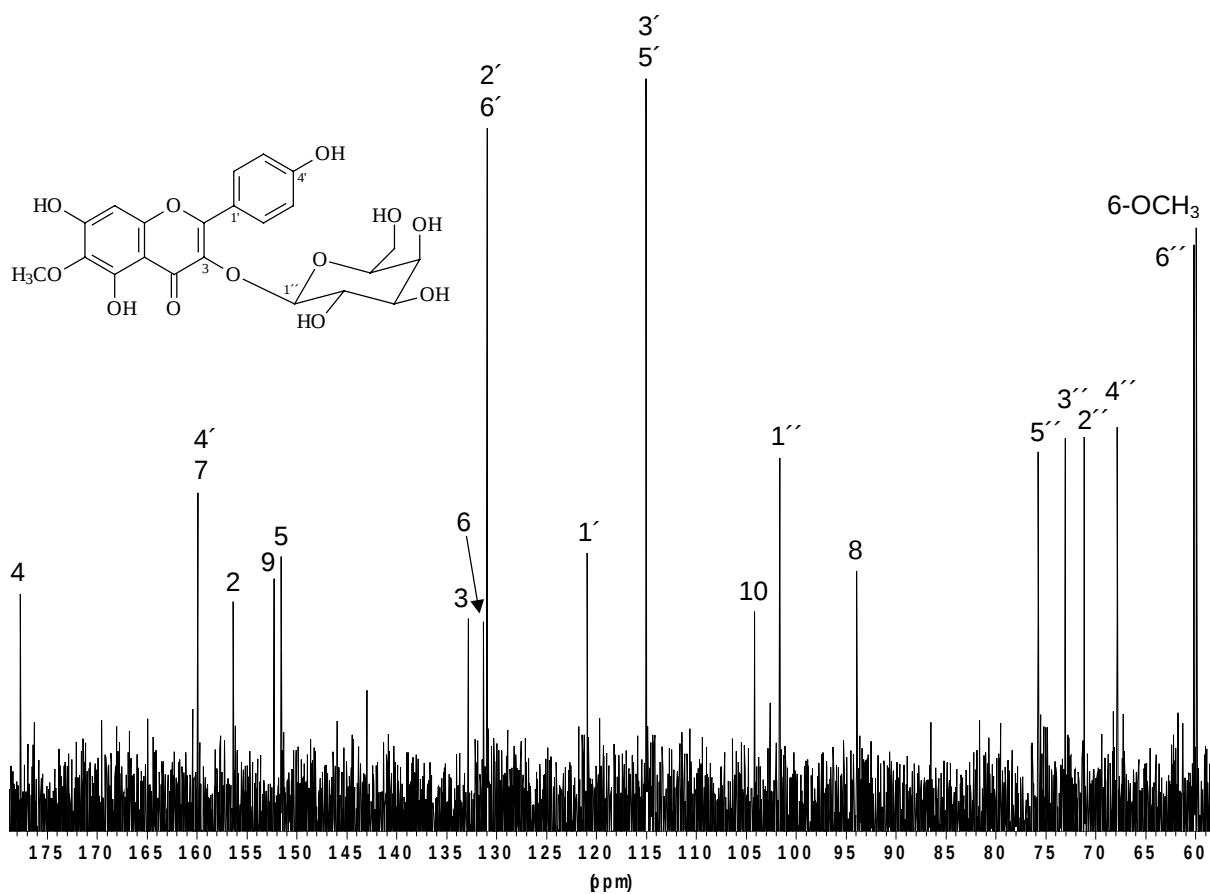
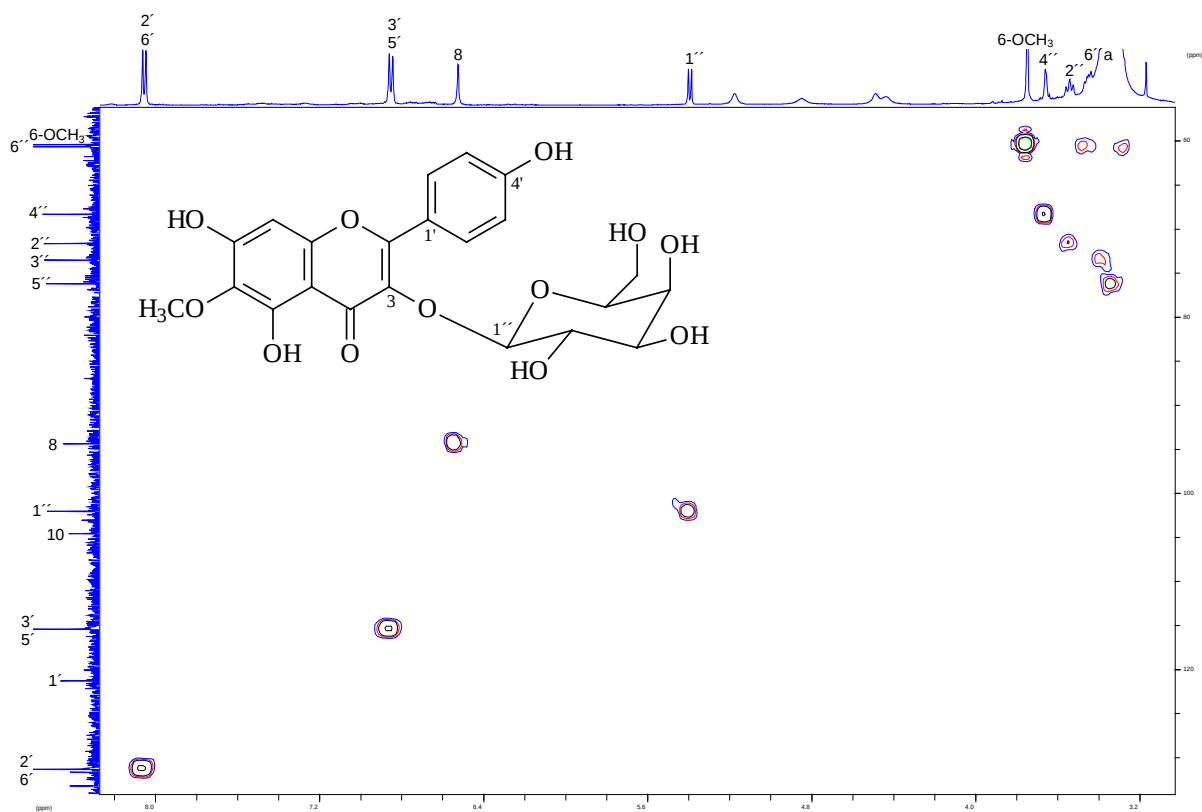
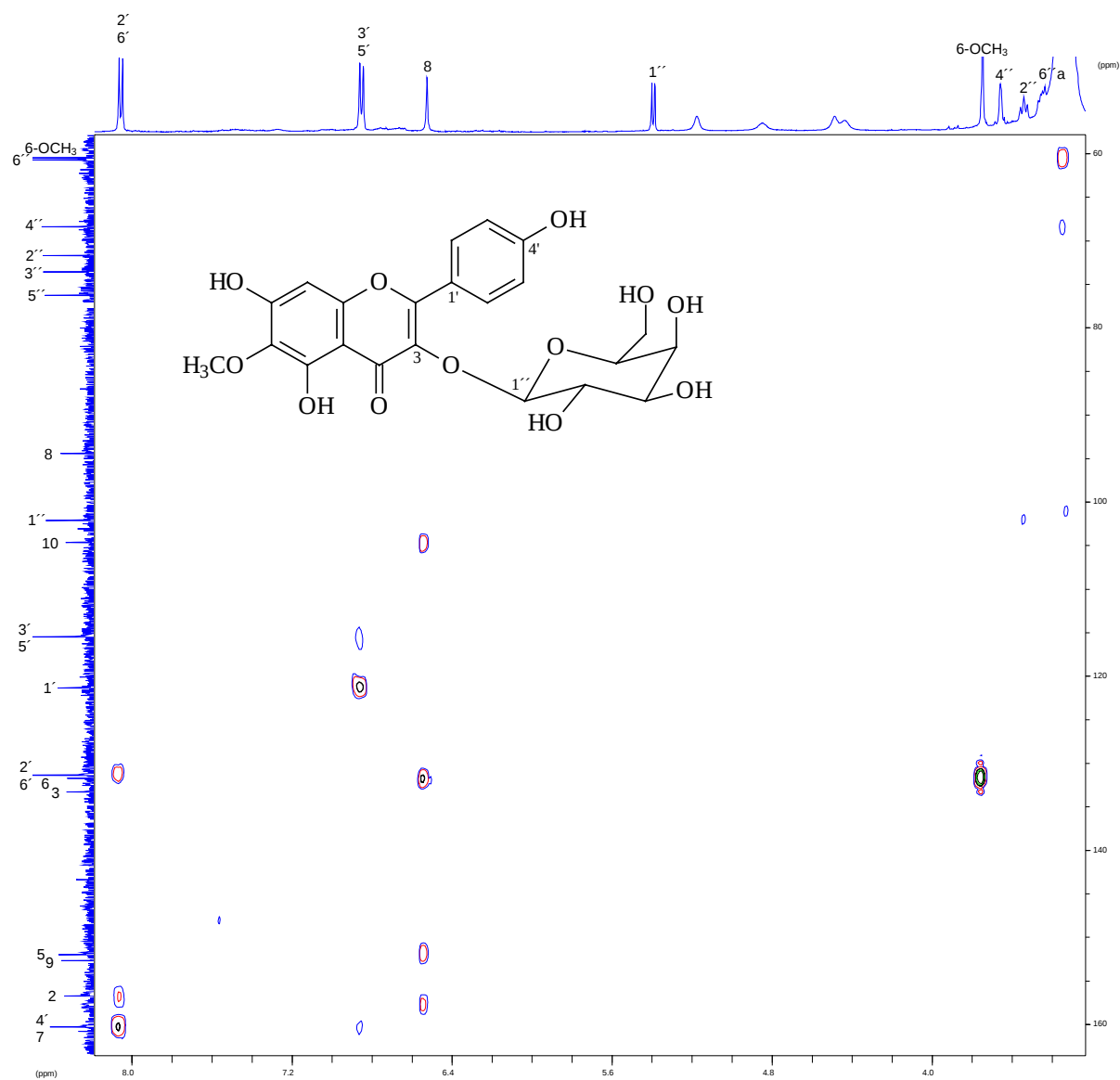
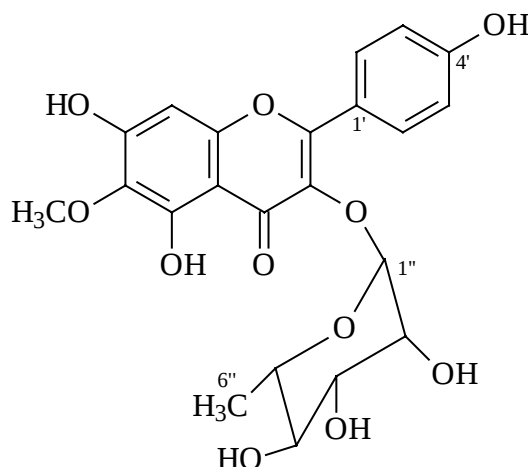


Bild 2.123: Protonenspektrum von **FG7** in DMSO-*d*₆/D₂O: Der untere Teil zeigt den Ausschnitt mit den Signalen einiger Galactose-Protonen (500 MHz, DMSO-*d*₆/D₂O, TMS)

Bild 2.124: ^{13}C NMR-Spektrum von Substanz **FG7** (125 MHz, DMSO-d_6 , TMS)Bild 2.125: HMQC-Spektrum von **FG7** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

Bild 2.126: HMBC-Spektrum von **FG7** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

**2.3.9 6-Methoxykaempferol 3-rhamnosid =
3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-*O*- α -rhamnopyranosid
(Verbindung FG8)**



Diese Substanz wurde aus Fraktion M-V des Methanol-Extraktes isoliert. Die Ausbeute betrug 1 mg an reinem Flavonoid (siehe Kap. 6.5.6.3, S. 325).

Bei der DC stimmt **FG8** hinsichtlich des Detektionsverhaltens mit **FG6** und **FG7** überein (siehe Tabelle 6.1, S. 298).

Das Pseudomolekülion im APCI-MS-Spektrum von **FG8** ist 16 amu leichter als die entsprechenden Kationen von **FG6** und **FG7**. Nach Abspaltung eines Neutralteilchens (146 amu) findet sich in Analogie zu **FG6** und **FG7** das Ion des protonierten Aglykons bei m/z 317. Dieses Ion fragmentiert unter pseudo-MS/MS/MS-Bedingungen in der von **FG6** und **FG7** bekannten Weise. Daraus folgt, dass **FG8** dasselbe Aglykon wie die beiden genannten Substanzen besitzt, im Gegensatz zu diesen Verbindungen jedoch ein Rhamnosid darstellt.

Tabelle 2.38: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG8** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
266	271	270	267	275	275
329	324 sh	296 sh	337	300 sh	300 sh
	387	366		351	347
				400 sh	400 sh

Die UV-Spektren von **FG8** stimmen qualitativ näherungsweise mit den Spektren von **FG6** und **FG7** überein (vergl. Tabelle 2.22, S. 119 mit Tabelle 2.18, S. 108 und Tabelle 2.20, S. 114). Der Unterschied besteht in den gegenüber **FG6** und **FG7** bei etwas kleineren Wellenlängen auftretenden Absorptionsbanden. Somit bestätigen die UV-Daten die aus den Massenspektren abgeleiteten Schlüsse.

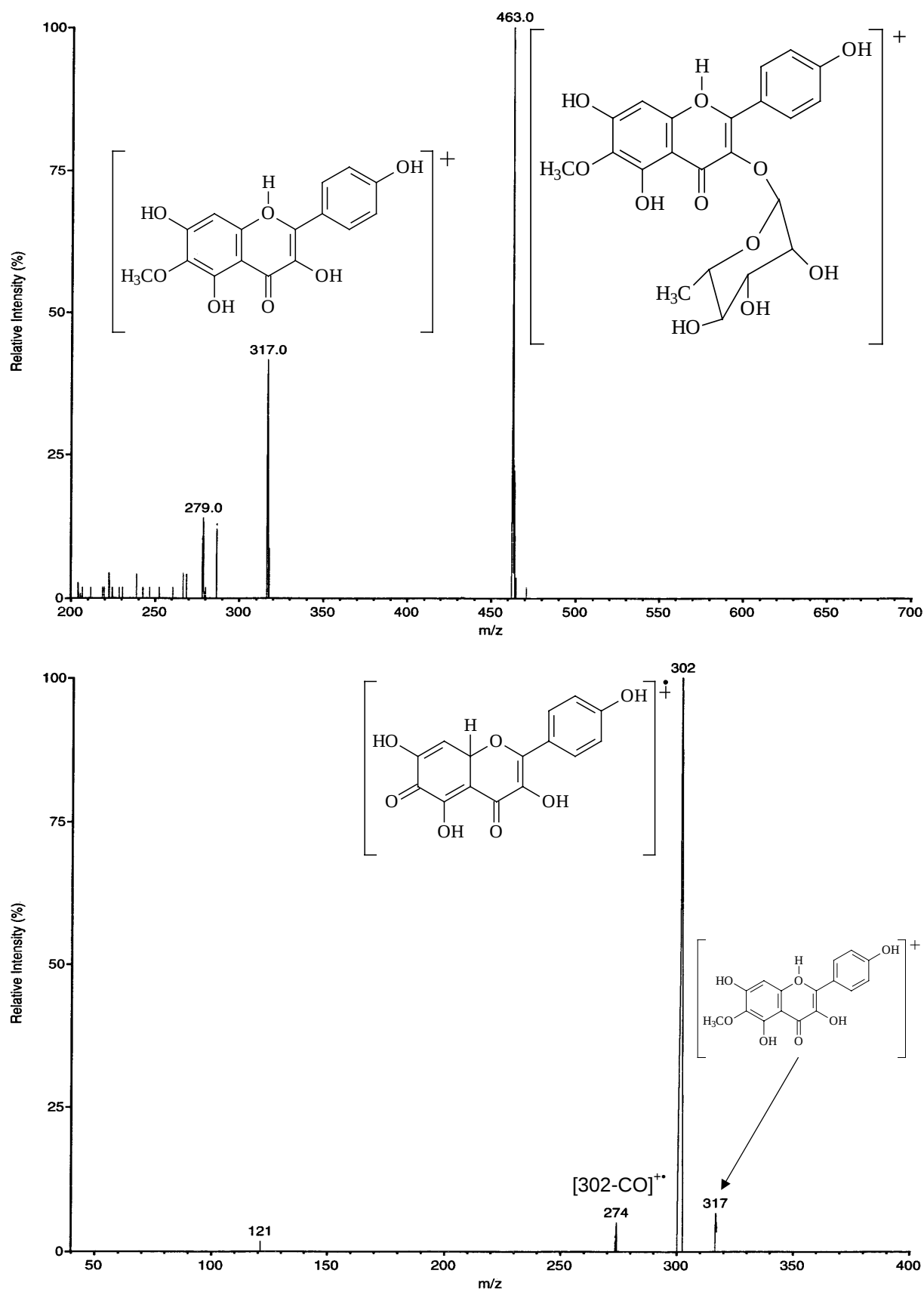


Bild 2.127: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG8**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 317 amu (unten)

Tabelle 2.39: NMR-Daten von Verbindung **FG8** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben für 6-Methoxykaempferol 3-rhamnosid: ¹AHMED et al., 1986 (Messung als Tetramethylsilylether, keine Angaben zur Meßfrequenz, CD₃OD); *, # = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG8	6-Methoxy- kaempferol 3-rhamnosid ¹	C	FG8
8	6.41 s	6.5 s	2	157.49
2'	7.73 d (8.8)	7.2 d (9)	3	133.59
3'	6.90 d (8.8)	6.9 d (9)	4	178.63
5'	6.90 d (8.8)	6.9 d (9)	5	152.00*
6'	7.73 d (8.8)	7.2 d (9)	6	131.58
1''	5.30 d (1.3)	5.2 d (2)	7	158.65 [#]
2''	3.98 s	} 3.3 – 4.2	8	94.83
3''	3.46 dd (3.2, 8.8)		9	152.67*
4''	3.14 t (8.8)		10	103.99
5''	3.08 dd (5.7, 8.8)	-	1'	120.57
6''	0.78 d (5.7)	0.82	2'	130.40
6-OCH ₃	3.73 s	3.7 s	3'	115.24
5-OH	12.67 s	-	4'	158.96 [#]
			5'	115.24
			6'	130.40
			1''	101.61
			2''	70.20
			3''	71.00
			4''	71.30
			5''	70.51
			6''	17.35
			6-OCH ₃	59.70

Das ¹H NMR-Spektrum von **FG8** zeigt elf Signale (siehe Bild 2.128, S. 171 und Bild 2.129, S. 171), wovon fünf durch direkten Vergleich mit **FG6** und **FG7** eindeutig dem Aglykon 6-Methoxykaempferol zugeordnet werden können (verg. Tabelle 2.39, S. 170 mit Tabelle 2.35, S. 159 und Tabelle 2.37, S. 164). Die Shifts und Kopplungskonstanten der verbliebenen sechs Signale bestätigen, dass es sich bei dem Zucker um α -Rhamnose handelt (verg. Tabelle 2.39, S. 170 mit Tabelle 2.25, S. 128). Durch den Einfluß der Rhamnose sind die Signale für H-8 (6.41 ppm) und für H-2'/H-6' (7.73 ppm) im Gegensatz zum entsprechenden Glucosid (**FG6**) bzw. Galactosid (**FG7**) um etwa 0.12 bzw. 0.3 ppm Hochfeld-verschoben.

Das ¹³C NMR-Spektrum bestätigt in Kombination mit dem zusätzlich aufgenommenen HMQC-Spektrum die an Hand der Protonenshifts vorgenommene Zuordnung (siehe Tabelle 2.39, S. 170). Der Shift des Signals für C-3 (133.59 ppm) beweist, dass die α -Rhamnose mit der 3-Hydroxy-Gruppe verknüpft ist.

Damit ist **FG8** als 6-Methoxykaempferol 3-rhamnosid bzw. 3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid eindeutig identifiziert.

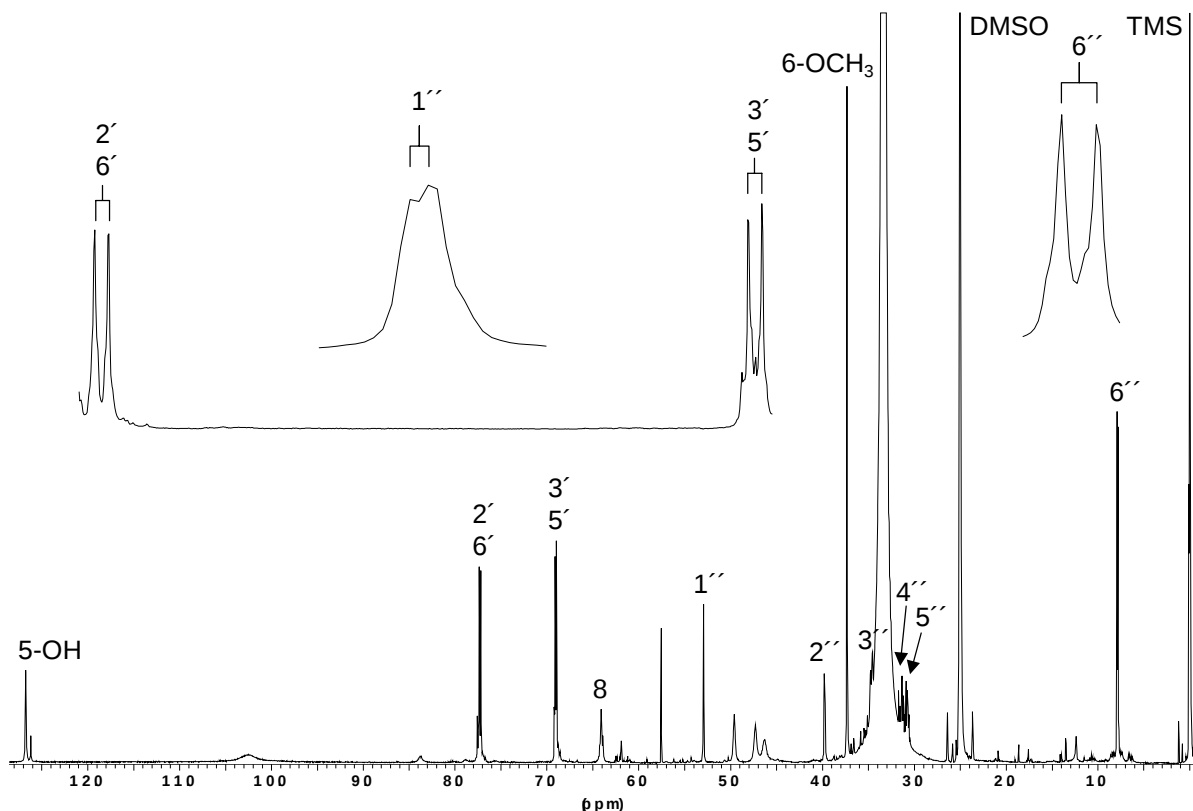


Bild 2.128: ^1H NMR-Spektrum von Verbindung **FG8** (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

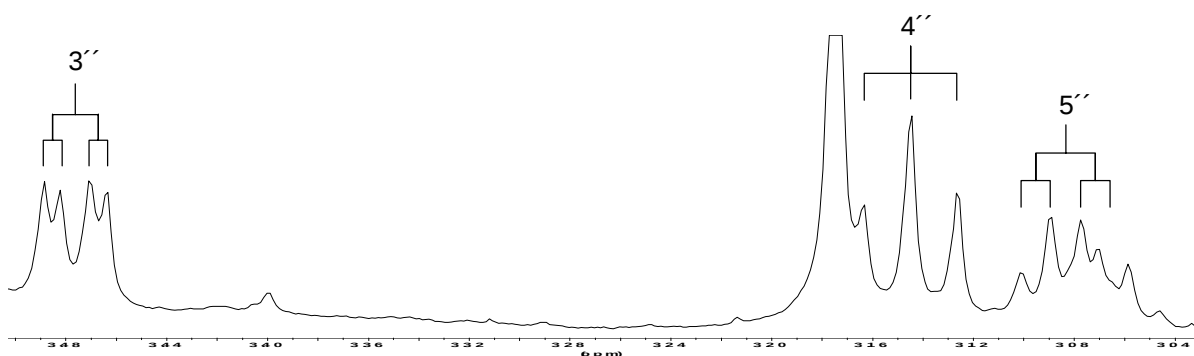
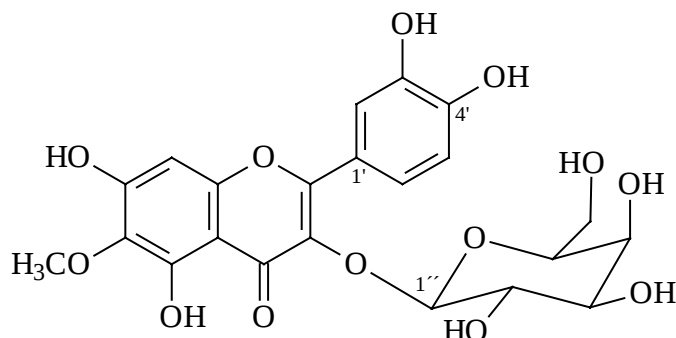


Bild 2.129: Ausschnitt aus dem Protonenspektrum von **FG8** in $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$, TMS)

Die Erstcharakterisierung von **FG8** geht auf den Arbeitskreis um T. J. Mabry aus Austin/Texas zurück [AHMED et al., 1986]. Das aufgearbeitete Drogenmaterial stammte von der mexikanischen Eupatorieae *Brickellia vernicosa*. Fast zeitlich wird die Substanz als Inhaltsstoff von *E. areolare* var. *leiocarpum* angegeben [YU et al., 1986b]. Die publizierten ^1H NMR-Daten sind lückenhaft, Ergebnisse aus ^{13}C NMR-Messungen lagen bislang noch nicht vor.

**2.3.10 Patuletin 3-galactosid =
3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon-3-O-galactopyranosid
(Verbindung FG9)**



Die Verbindung **FG9** fiel bei der Aufarbeitung von Fraktion M-V in einer Ausbeute von 14 mg DC-rein an (siehe Kap. 6.5.6.3, S. 325).

Die Laufhöhen in den DC-Systemen DC-1, DC-2 und DC-4 zeigen, dass **FG9** ähnlich wie **FG4** und **FG7** aufgebaut sein sollte (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Die Färbung nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A glich der von **FG5**, welches durch seine intensive Orangefärbung (UV 365 nm) auffiel. Es ist demnach wahrscheinlich, dass **FG9** wie **FG5** eine 3',4'-Dihydroxygruppe im B-Ring besitzt.

Im APCI-MS-Spektrum findet sich das Pseudomolekülion von **FG9** bei m/z 495 (siehe Bild 2.130, S. 173). Unter Abspaltung eines Neutralteilchens der Masse 162 amu entsteht das protonierte Aglykon, welches bei m/z 333 detektiert wird. Die Masse des abgespaltenen Teilchens deutet auf eine Hexose hin. Unter pseudo-MS/MS/MS-Bedingungen verliert das protonierte Aglykon ein Methylradikal. Der Fragmentierungsprozeß bleibt auf der Stufe des dabei gebildeten Radikalkations mit der Masse 318 amu stehen.

Die Lage der Bande II (257 nm) im Methanol-UV-Spektrum bestätigt in Verbindung mit der Schulter bei 270 nm die an Hand des Färbeverhaltens bei der DC postulierte 3',4'-Dihydroxygruppe (siehe Tabelle 2.40, S. 174) [MARKHAM, 1982].

Nach dem Zusatz von Natriummethanolat ergibt sich qualitativ das gleiche Bild wie bei Substanz **FG6**. Die Lage von Bande I bei 407 nm signalisiert eine freie OH-Gruppe an C-4', die Schulter bei 336 nm zeigt an, dass die OH-Gruppe an Position 7 unsubstituiert vorliegt.

Das NaOAc-Spektrum bestätigt wie schon bei den Verbindungen **FG6** bis **FG8** durch die bathochrome Verschiebung der Bande II um 16 nm gegenüber dem Spektrum in Methanol den Befund einer freien OH-Gruppe an C-7.

Das NaOAc/H₃BO₃-Spektrum zeigt durch die Verschiebung der Bande I um + 22 nm erneut die *ortho*-Dihydroxylierung des B-Ringes an.

Hierfür spricht auch die Lage von Bande I bei 439 nm im Aluminiumchlorid-Spektrum sowie die hypsochrome Verschiebung dieser Bande um 64 nm nach dem Zusatz von Salzsäure.

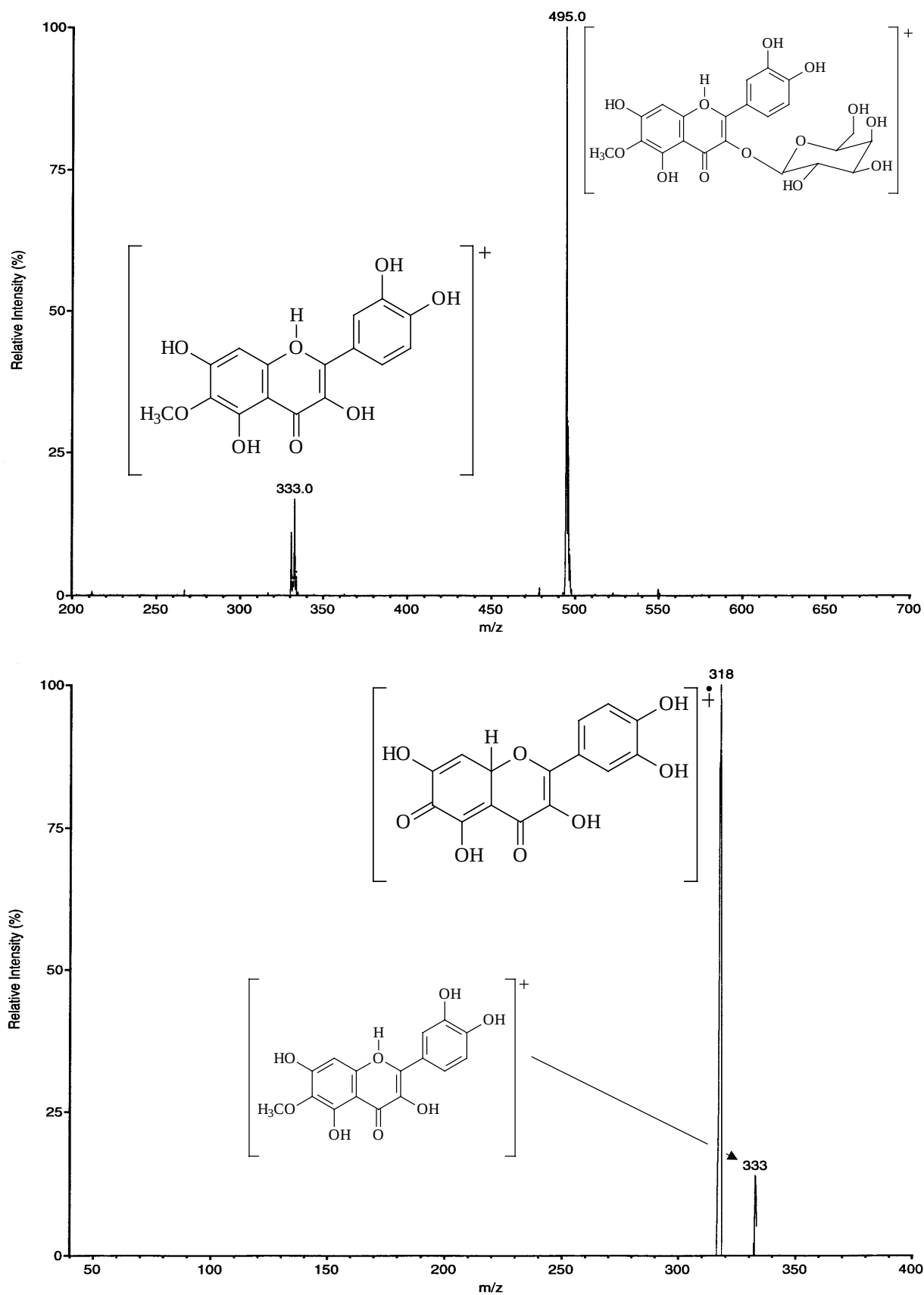


Bild 2.130: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG9**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 317 amu (unten)

Tabelle 2.40: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG9** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
257	270	273	263	276	266
270 sh	336 sh	325 sh	377	305 sh	300 sh
355	407	385		340 sh	375
				439	400 sh

Tabelle 2.41: NMR-Daten von Verbindung **FG9** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d₆, TMS) im Vergleich zu Angaben für Patuletin 3-galactosid: ¹DE PÉREZ und MOLINA, 1995 (300 bzw. 75,42 MHz, DMSO-d₆/CDCl₃, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG9	Patuletin 3-galactosid ¹	C	FG9	Patuletin 3-galactosid ¹
8	6.52 s	6.51 s	2	156.53	157.3
2'	7.53 d (1.9)	7.94 d (2.2)	3	133.34	133.7
5'	6.82 d (8.8)	6.91 d (8.8)	4	177.91	177.5
6'	7.67 dd (1.9, 8.8)	7.50 dd (2.2, 8.8)	5	152.58	151.5
1''	5.39 d (7.6)	4.97 d (8.6)	6	131.47	130.8
2''	3.58 t (8.8)	3.82 m	7	157.77	156.8
3''	3.38 dd (3.2, 9.5)	} 3.45 – 3.87 m	8	93.99	93.5
4''	3.66 d (3.2)		9	151.72	151.7
5''	3.34 t (5.7)	3.45 m	10	104.45	104.2
6''	3.46 dd (5.7, 10.1)	} 3.61 m	1'	121.35	120.7
	3.30 dd (5.7, 10.1)		2'	116.13	114.5
6-OCH ₃	3.76 s	3.89 s	3'	145.05	143.5
5-OH	12.72 s	12.39 s	4'	148.69	147.7
andere OH	-	5.30 s	5'	115.40	116.5
			6'	122.23	120.9
			1''	101.98	104.7
			2''	71.41	71.1
			3''	73.39	73.2
			4''	68.14	67.9
			5''	76.05	74.8
			6''	60.36	60.6
			6-OCH ₃	60.19	59.7

Das ¹H NMR-Spektrum von **FG9** zeigt dreizehn Signale für fünfzehn Protonen. Hierunter finden sich die von den bereits diskutierten Flavonoid-Glykosiden bekannten Signale für H-8 (6.52 ppm), für die 6-Methoxygruppe (3.76 ppm) und für das Proton der 5-Hydroxylgruppe (12.72 ppm). Drei weitere Signale (H-2', 7.53 ppm; H-5', 6.82 ppm und H-6', 7.67 ppm) gehören zu einem aromatischen ABX-System. Sie bestätigen damit die an Hand der UV-Spektren abgeleitete 3',4'-Dihydroxygruppe im B-Ring. Die restlichen sieben Signale sind dem Zucker zuzuordnen. Die Shifts und Kopplungskonstanten dieser Signale sprechen nach direktem Vergleich mit den entsprechenden Daten der Verbindungen **FG4** und **FG7** dafür, dass es sich um β -Galactose handelt.

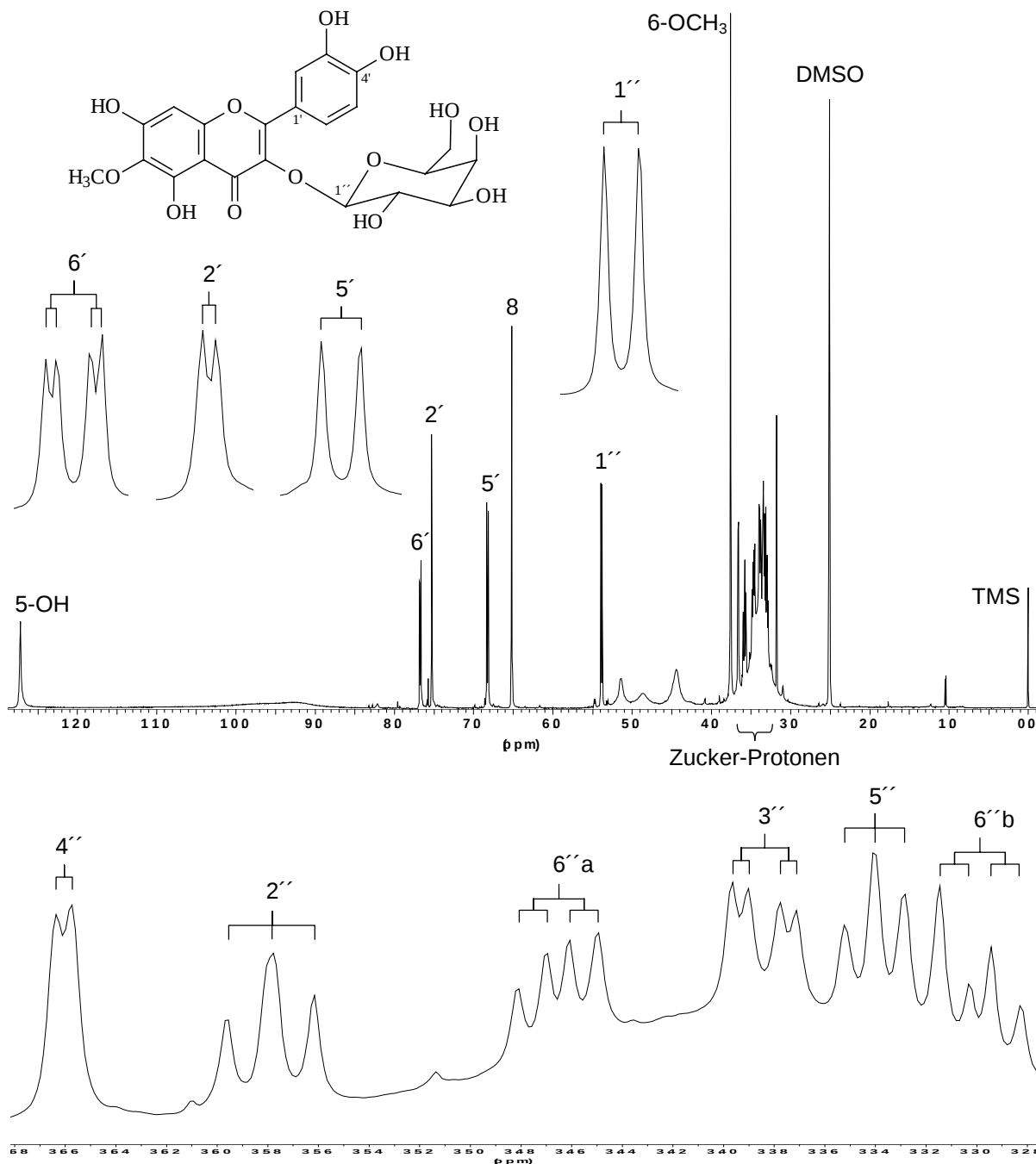
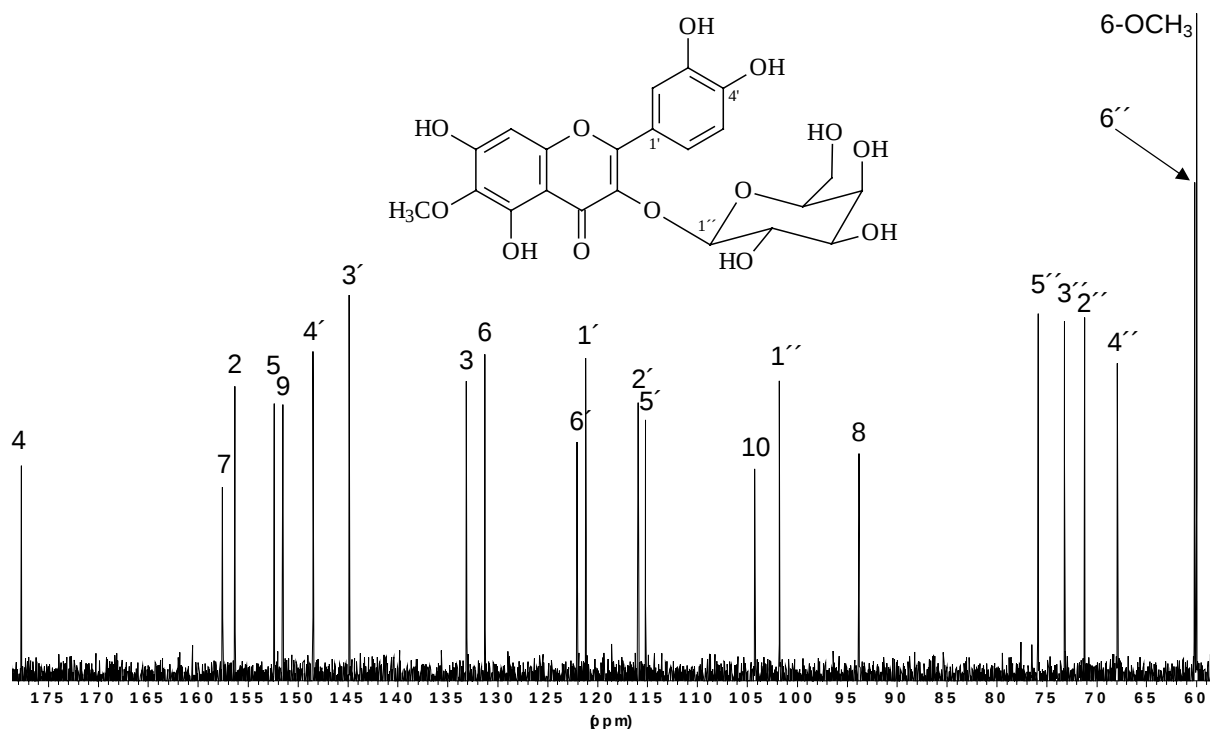
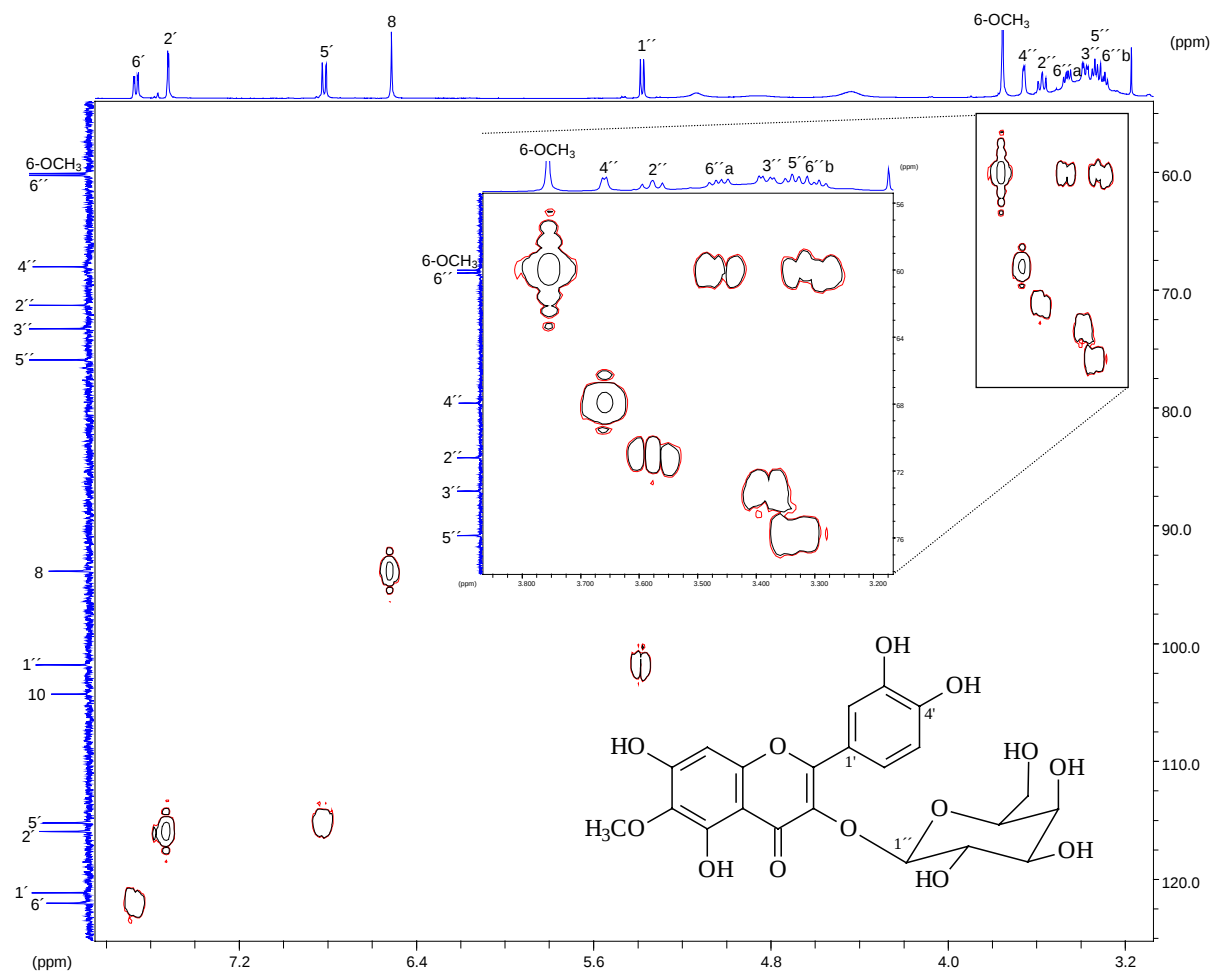
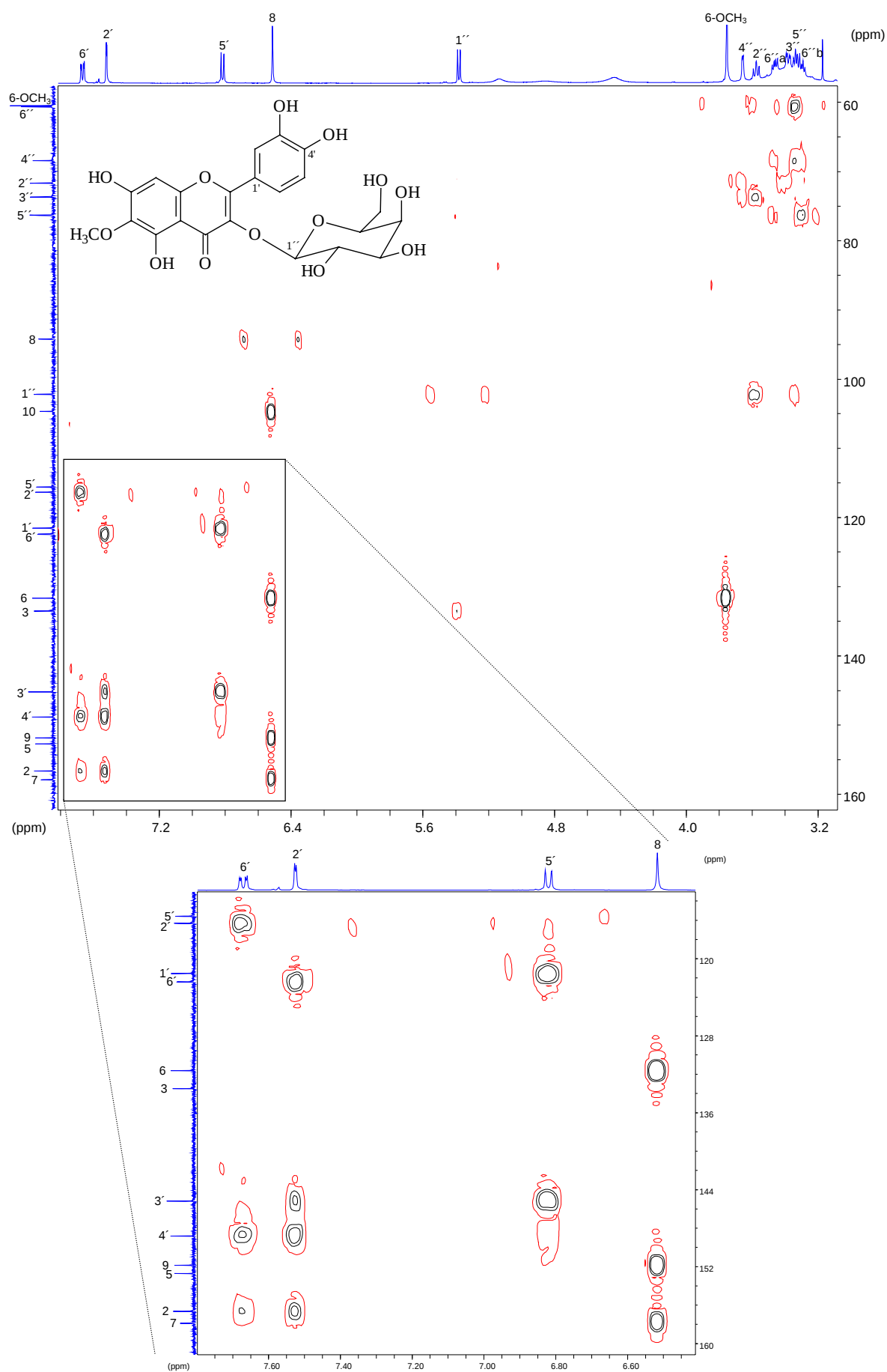


Bild 2.131: Protonenspektrum von **FG9** in DMSO- d_6 : Der untere Teil zeigt den Ausschnitt mit den Resonanzen einiger Galactoseprotonen (500 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

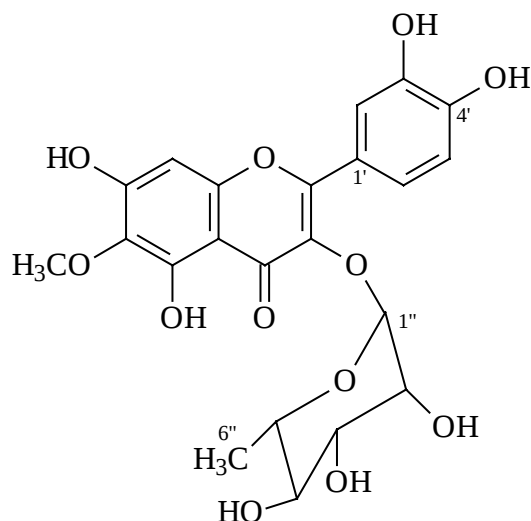
Das ^{13}C NMR-Spektrum liefert zweiundzwanzig Signale (siehe Bild 2.132, S. 176), die sich mit Hilfe des ebenfalls aufgenommenen HMQC- (siehe Bild 2.133, S. 176) und HMBC-Spektrums (siehe Bild 2.134, S. 177) eindeutig zuordnen lassen und die an Hand des Protonenspektrums gewonnenen Strukturinformationen bestätigen. Der Crosspeak für eine ^3J -Kopplung zwischen dem Signal für H-1'' (5.39 ppm) und dem Signal für C-3 (133.34 ppm) beweist, dass die Galactose mit der Hydroxylgruppe an Position 3 des Aglykons verbunden ist.

Bild 2.132: ¹³C NMR-Spektrum der Verbindung **FG9** (125 MHz, DMSO-d₆, TMS)Bild 2.133: HMQC-Spektrum von **FG9** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d₆, TMS)

Bild 2.134: HMBC-Spektrum von **FG9** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Bei Verbindung **FG9** handelt es sich daher um 3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- β -galactopyranosid (= Patuletin 3-galactosid). Sie ist schon seit dem Jahre 1971 bekannt und hinreichend analytisch charakterisiert. Sie wurde zuerst aus der kalifornischen Polemoniaceae *Ipomopsis aggregata* isoliert [SMITH et al., 1971]. Es folgten Funde aus den Eupatorieae *Brickellia californica* [MUES et al., 1979], *Brickellia arguta* [ROSLER et al., 1984], *E. areolare* var. *leiocarpum* [YU et al., 1986b] und *Ageratina arbutifolia* [DE PÉREZ und MOLINA, 1995] sowie aus der Polemoniaceae *Ipomopsis polycladon* [KIREDJIAN und SMITH, 1985].

2.3.11 Patuletin 3-rhamnosid =
3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid
(Verbindung FG10)



Ein weiteres Flavonoid-Glykosid aus der Fraktion M-V des Methanol-Extraktes ist **FG10**. Am Ende der Reinigung resultierten 7 mg der Reinsubstanz (siehe Kap. 6.5.6.3, S. 325).

Das dünnschichtchromatographische Lauf- und Färbeverhalten von **FG10** ist mit dem von **FG9** identisch (siehe Tabelle 6.1, S. 298).

Unterschiede zu **FG9** werden bei der Betrachtung des APCI-MS-Spektrums deutlich (siehe Bild 2.135, S. 180). Das Pseudomolekülion von **FG10** ist 16 amu leichter als das analoge Ion von **FG9**. Aus dem Folgefragment bei m/z 333 läßt sich folgern, dass das abgespaltene Zuckerfragment eine Masse von 146 amu besitzt, was auf eine Rhamnose hindeutet. Da sich die pseudo-MS/MS/MS-Spektren der Aglyka von **FG9** und **FG10** nicht nennenswert unterscheiden, sollte **FG10** dasselbe Aglykon besitzen wie **FG9**.

Tabelle 2.42: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG10** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
257	270	269	262	277	270
266 sh	330 sh	313 sh	366	305 sh	278 sh
345	395	373		337 sh	305 sh
				426	362
					405 sh

Bei der Analyse der UV-Spektren findet man keinen qualitativen Unterschied zu den Daten von **FG9** (vergl. Tabelle 2.40, S. 174 mit Tabelle 2.42, S. 179). Daraus läßt sich folgern, dass **FG10** und **FG9** dasselbe Aglykon besitzen.

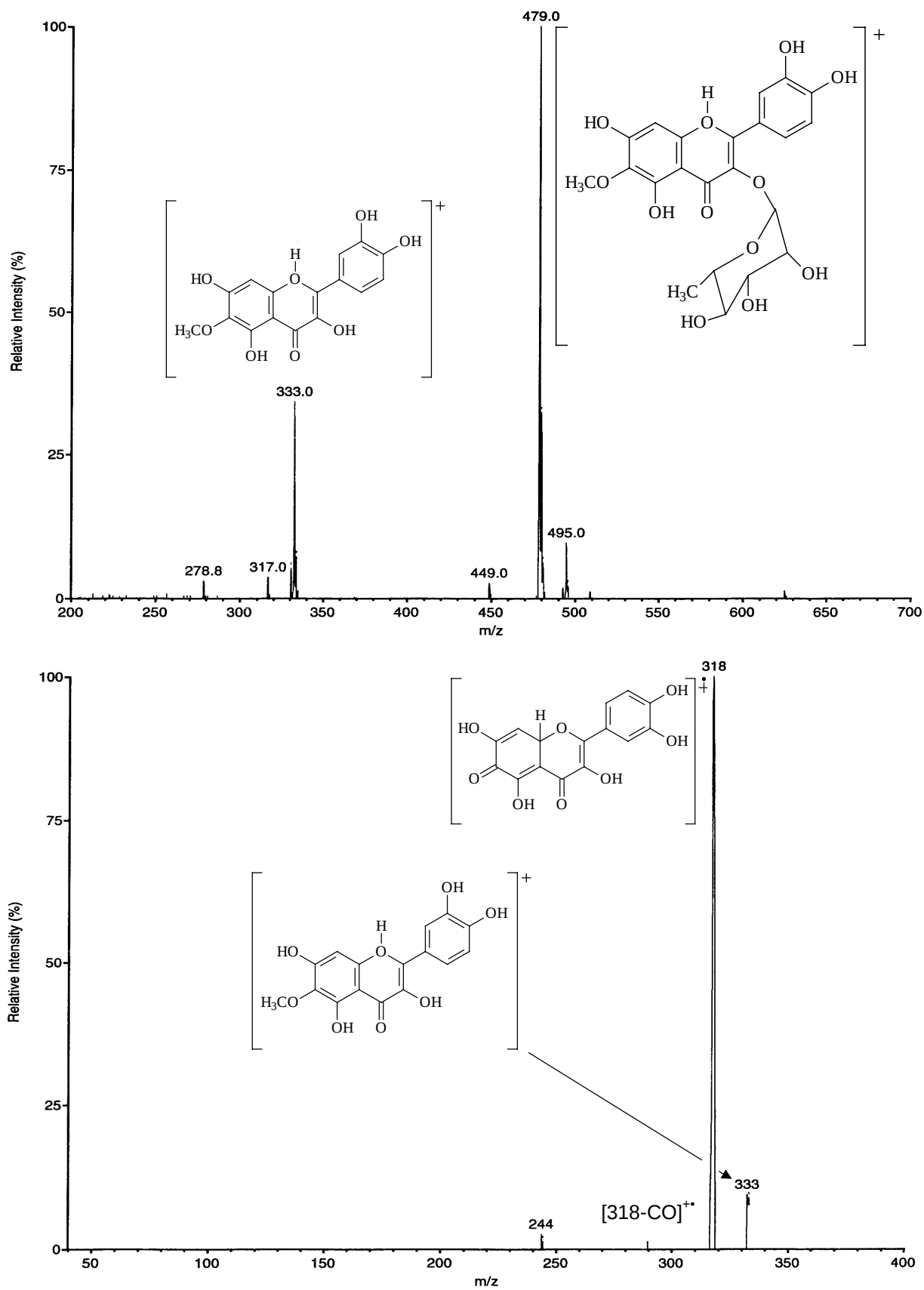


Bild 2.135: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG10**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 317 amu (unten)

Tabelle 2.43: NMR-Daten von Verbindung **FG10** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS); *, = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG10	C	FG10
8	6.50 s	2	157.53*
2'	7.29 d (1.9)	3	134.05
5'	6.87 d (8.2)	4	178.19
6'	7.25 dd (1.9, 8.2)	5	152.64
1''	5.26 d (1.3)	6	131.40
2''	3.98 brs	7	157.56*
3''	3.51 dd (3.2, 8.8)	8	94.05
4''	3.15 dd (4.4, 9.5)	9	151.80
5''	3.21 dd (6.3, 9.5)	10	104.66
6''	0.82 d (5.7)	1'	120.94
6-OCH ₃	3.75 s	2'	115.81
5-OH	12.74 s	3'	145.39
4'-OH	9.34 s	4'	148.61
andere OH	4.94 d (4.4)	5'	115.63
	4.71 d (5.1)	6'	121.29
	4.60 d (5.7)	1''	102.00
		2''	70.23
		3''	70.76
		4''	71.34
		5''	70.52
		6''	17.67
		6-OCH ₃	60.18

Die auch bei den NMR-Daten auftretende Übereinstimmung bestätigt, dass **FG10** und **FG9** hinsichtlich ihres Aglykons übereinstimmen (vergl. Tabelle 2.41, S. 174 mit Tabelle 2.43, S. 181). Lediglich die Signale der Protonen H-2' und H-6' und die der zugehörigen Kohlenstoffatome treten bei **FG10** bei etwas höheren Feld auf. **FG10** trägt im Gegensatz zu **FG9** eine α -Rhamnose an Stelle der Galactose an C-3. Dies geht aus dem Vergleich der Protonen- und Kohlenstoffshifts der Zucker sowie der Signale des C-Ringes mit den entsprechenden Daten von **FG1**, **FG5** und **FG8** hervor (vergl. z.B. Tabelle 2.39, S. 170 mit Tabelle 2.43, S. 181).

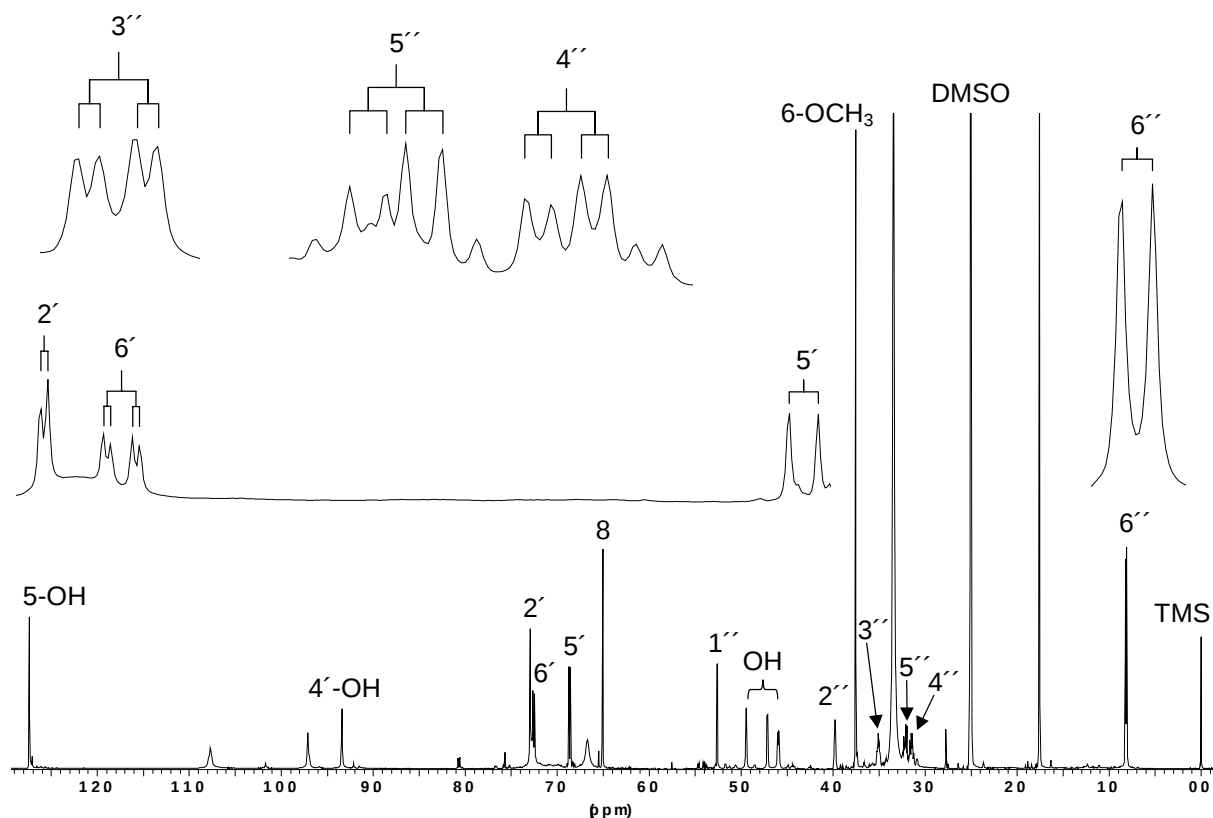


Bild 2.136: Protonenspektrum von **FG10** in DMSO- d_6 : Das vergrößert wiedergegebene dd-Signal des 3''-Protons stammt aus dem Spektrum, welches nach D₂O-Zugabe aufgenommen wurde (500 MHz, DMSO- d_6 bzw. DMSO- d_6 /D₂O, TMS)

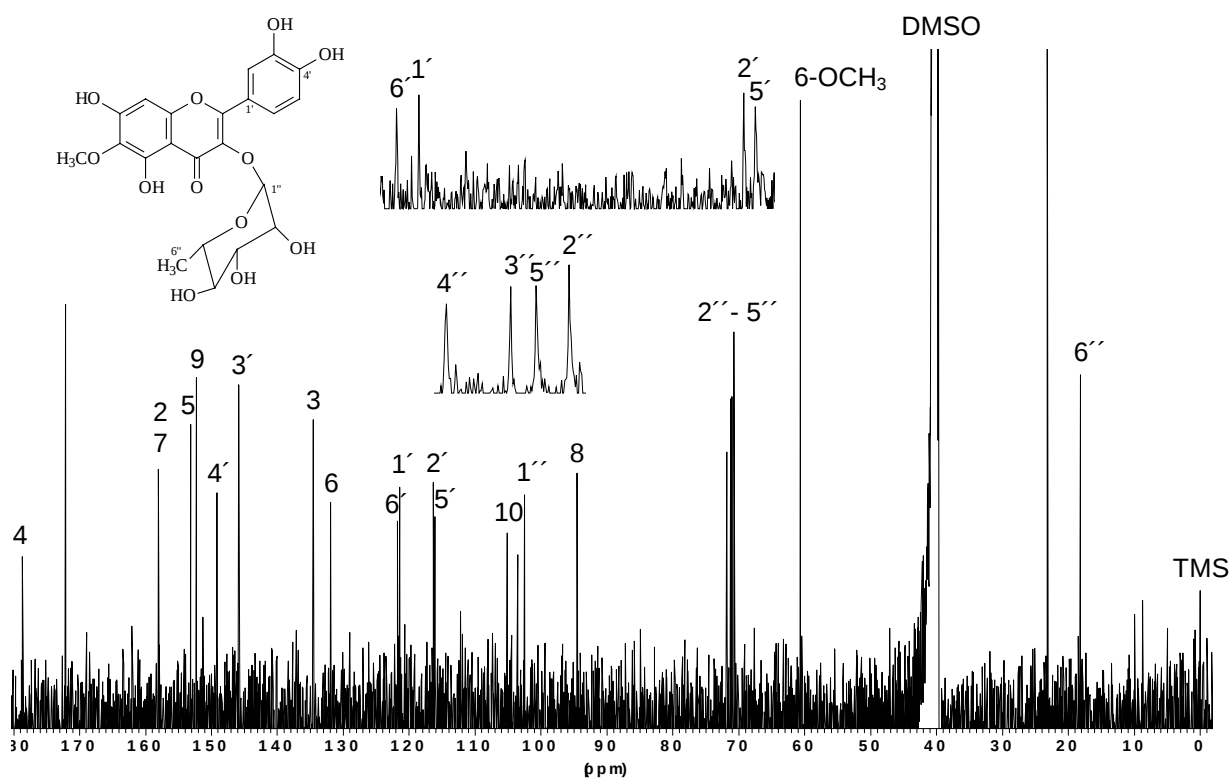


Bild 2.137: ^{13}C NMR-Spektrum der Verbindung **FG10** (125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

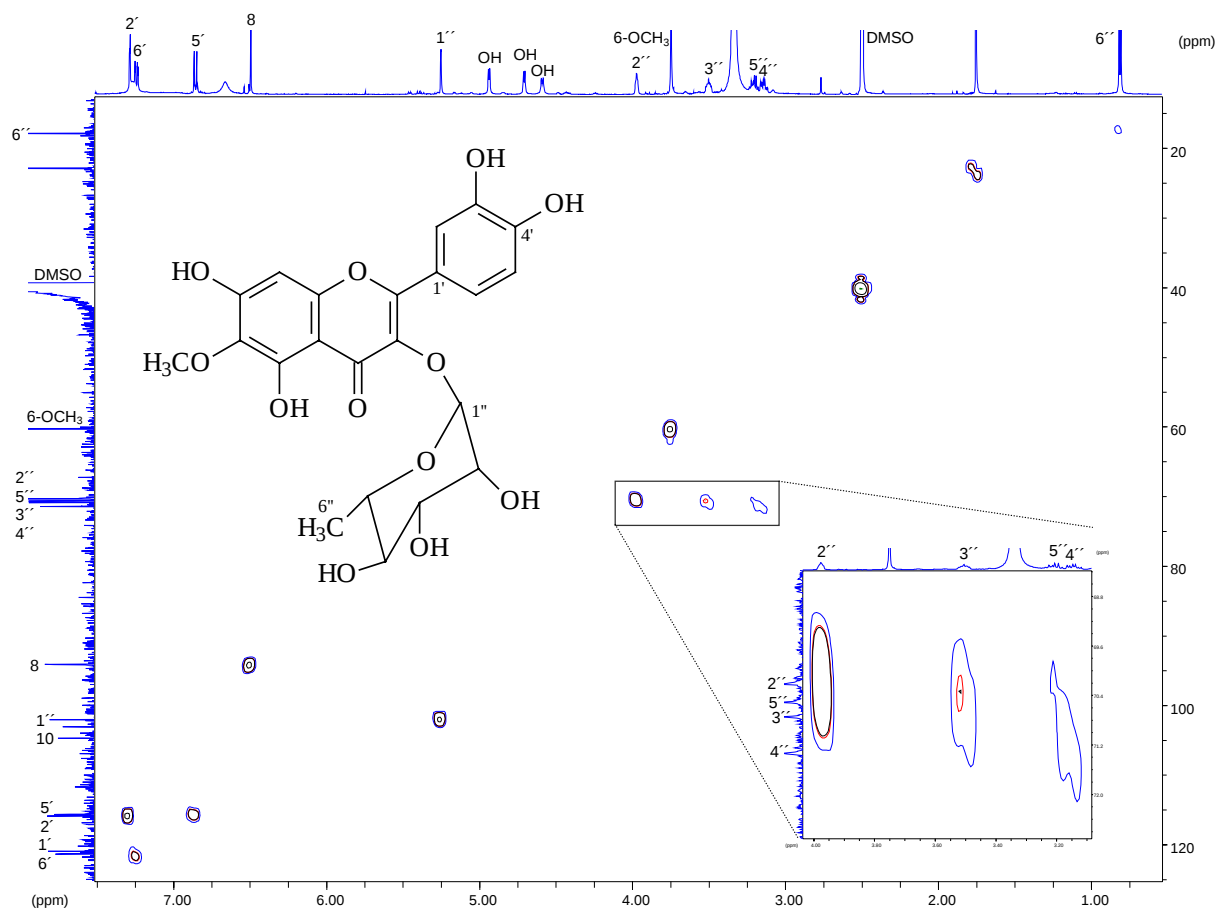


Bild 2.138: HMQC-Spektrum von **FG10** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Es handelt sich bei **FG10** somit um das 3-O- α -Rhamnosyl-Analogue von **FG9** (Patuletin 3-rhamnosid). Es liegen für diese Verbindung zwar Literaturbelege für die Spezies *Brickellia vernicosa* [AHMED et al., 1986], *Lepidophorum repandum* [HARBORNE et al., 1976], *Kalanchoe gracilis* [LIU et al., 1989] und *Vriesea regina* [WILLIAMS, 1978] vor, NMR-Daten wurden bislang jedoch noch nicht publiziert. Für das Vorkommen in *Eupatorium*-Arten existierte vor den eigenen Untersuchungen noch kein Nachweis.

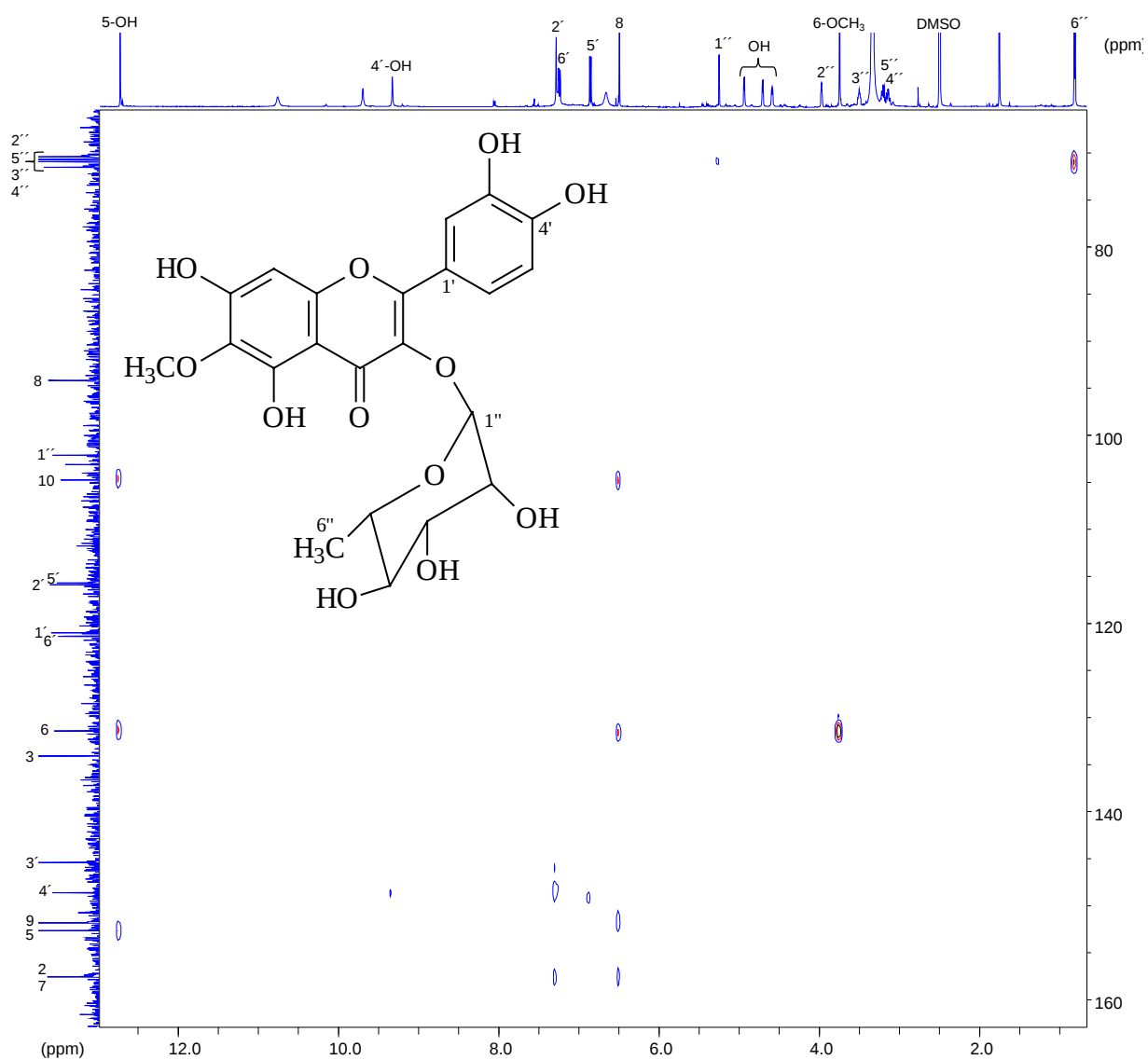
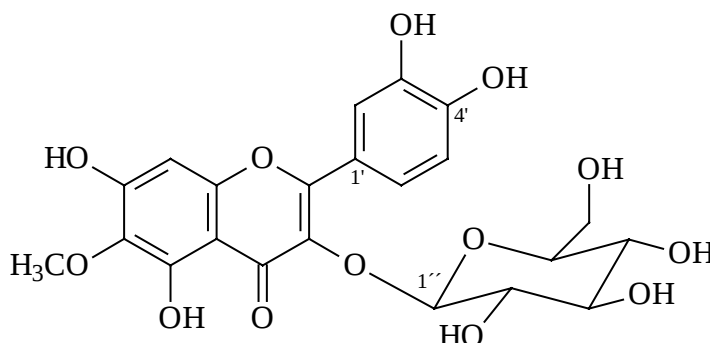


Bild 2.139: HMBC-Spektrum von **FG10** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

2.3.12 Patuletin 3-glucosid =
3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- β -glucopyranosid
(Verbindung FG11)



Ein weiteres Flavonol-Glykosid aus Fraktion M-V ist **FG11**. Es konnten 3 mg DC-rein isoliert werden (siehe Kap. 6.5.6.3, S. 325).

FG11 zeigt bei der DC ähnliche Laufhöhen wie **FG9** und **FG10** (Systeme DC-1, DC-2 und DC-4). Das Färbeverhalten dieser drei Verbindungen ist identisch (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich **FG11** von **FG9** und **FG10** nur hinsichtlich des gebundenen Zuckers unterscheidet.

Zu diesem Ergebnis führt auch die Analyse der Massenspektren, da sich die APCI- bzw. pseudo-MS/MS/MS-Spektren von **FG11** und **FG9** praktisch nicht unterscheiden (vergl. Bild 2.130, S. 173 mit Bild 2.140, S. 186). Aus der dem APCI-Spektrum entnehmbaren Abspaltung eines 162 amu-Fragmentes folgt zusätzlich, dass es sich bei dem Zucker von **FG11** um eine Hexose handeln muß.

Tabelle 2.44: UV-spektroskopische Meßdaten [$\lambda_{\max}$ (nm)] von Verbindung **FG11** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
259	271	271	265	275	270
268 sh	332 sh	312 sh	375	305 sh	300 sh
349	405	383		346 sh	366
				425	405 sh

Die UV-Spektren von **FG11** und **FG9** sind sich so ähnlich, dass sich an Hand dieser Daten kein struktureller Unterschied zwischen beiden Verbindungen ablesen läßt (vergl. Tabelle 2.40, S. 174 mit Tabelle 2.44, S. 185).

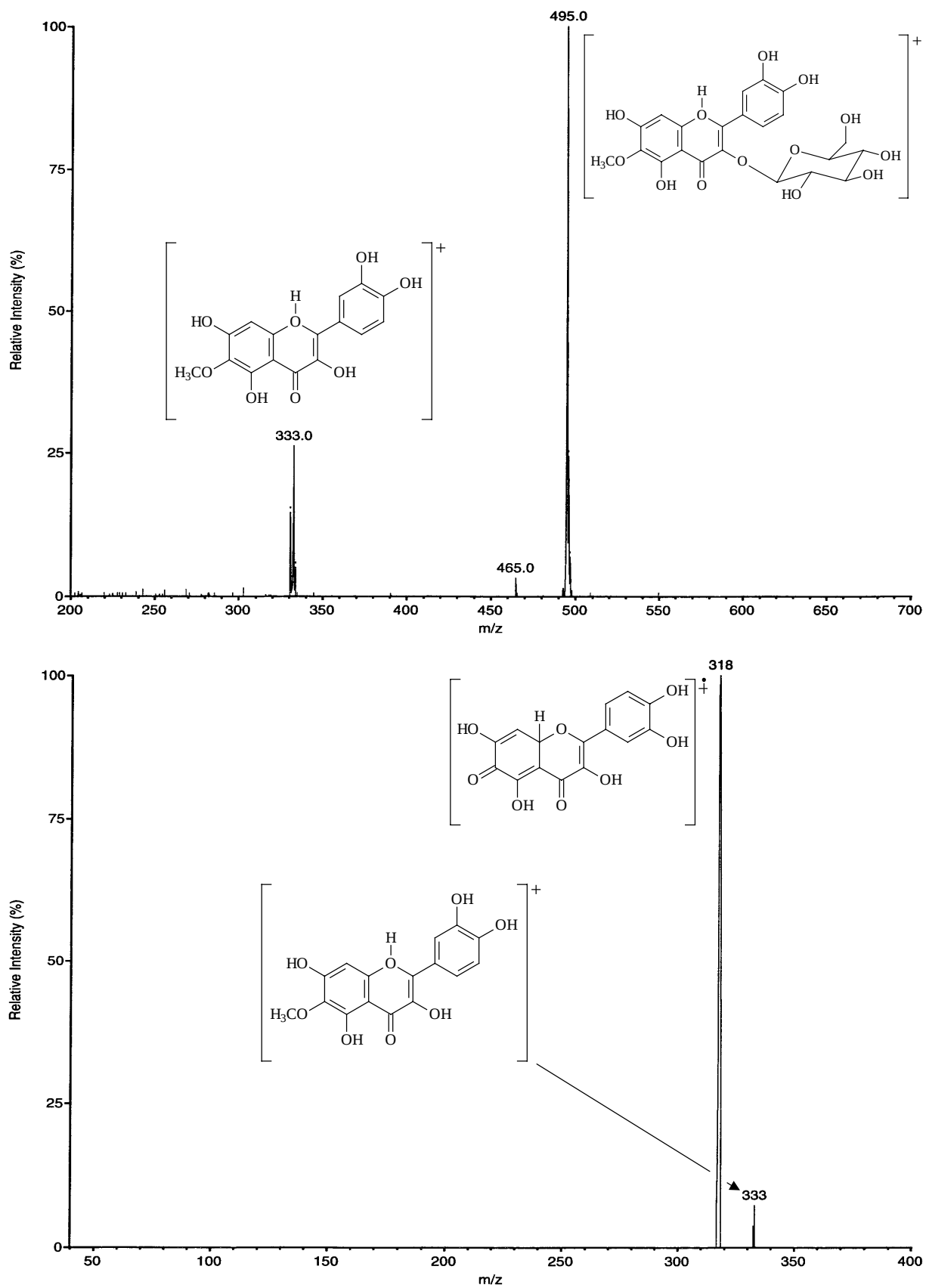


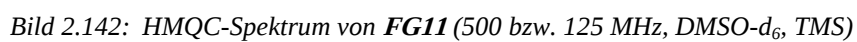
Bild 2.140: LC-MS-Spektren von Verbindung **FG11**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 317 amu (unten)

Tabelle 2.45: NMR-Daten von Verbindung **FG11** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d₆, TMS) im Vergleich zu Angaben für Patuletin 3-glucosid: ¹MERFORT und WENDISCH, 1987 (200 bzw. 90,52 MHz, CD₃OD, TMS); *, #, §, ¥, = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	FG11	Patuletin 3-glucosid ¹	C	FG11	Patuletin 3-glucosid ¹
8	6.51 s	6.491 s	2	156.46	159.243*
2'	7.57 d (2.5)	7.704 d (2)	3	133.15	135.402
5'	6.84 d (8.8)	6.868 d (8.5)	4	177.85	179.761
6'	7.58 dd (2.5, 8.8)	7.580 dd (2, 8.5)	5	152.58	153.962 [#]
1''	5.46 d (7.6)	5.255 d (7.4)	6	131.40	132.824
2''	3.22 m	3.82 m	7	157.59	159.090*
3''	3.34 m	} 3.200 – 3.496 m	8	94.18	94.952
4''	3.08 brs		9	151.69	153.855 [#]
5''	3.09 brs		10	104.53	106.290
6''	3.58 dd (5.1, 11.4)	3.719 dd (2.1, 11.9)	1'	121.10	123.253 [§]
	3.35 dd (5.1, 11.4)	3.576 dd (5, 11.9)	2'	116.35	117.659 [§]
6-OCH ₃	3.75 s	3.870 s	3'	144.99	145.934
5-OH	12.73 s	-	4'	148.63	149.909
			5'	115.38	116.058 [§]
			6'	121.39	123.169 [§]
			1''	101.17	104.500
			2''	74.27	75.772
			3''	76.68	78.400 [¥]
			4''	70.12	71.307
			5''	77.75	78.131 [¥]
			6''	61.16	62.646
			6-OCH ₃	60.17	60.995

Das ¹H NMR-Spektrum von **FG11** gibt neben sieben Signalen für Zuckerprotonen erwartungsgemäß die von **FG9** bekannten Signale eines 3-glykosidierten Patuletins wider (siehe Bild 2.141, S. 188). Der Vergleich der Zucker-Resonanzen mit denen von **FG3** und **FG6** zeigt, dass es sich bei dem Zucker von **FG11** um β-Glucose handelt (vergl. z.B. Tabelle 2.35, S. 159 mit Tabelle 2.45, S. 187). Die getroffene Zuordnung konnte durch das zusätzlich aufgenommene ¹³C NMR-Spektrum in Verbindung mit dem HMQC- (siehe Bild 2.142, S. 188) und dem HMBC-Spektrum (siehe Bild 2.143, S. 189) bestätigt werden.

Bei Verbindung **FG11** handelt es sich damit um 3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon-3-O-β-glucopyranosid (= Patuletin 3-glucosid). Von den drei aus *E. semialatum* isolierten Patuletin-3-O-glykosiden existieren in der Literatur über das Glucosid (**FG11**) die meisten Informationen. Die Erstbeschreibung geht auf THOMAS und MABRY (1968) zurück. Sie isolierten die Verbindung aus der Composite *Hymenoxys scaposa*. Es folgten weitere Funde aus den Asteraceae *Lasthenia conjugens* und *L. fremontii* [SALEH et al., 1971], *Artemisia monosperma* und *A. herba-alba* [SALEH et al., 1985], *Arnica montana* und *A. chamissonis* subsp. *foliosa* var. *incana* [MERFORT und WENDISCH, 1987], den Bromeliaceae *Tillandsia bulbosa* und *Vriesea regina* [WILLIAMS, 1978], den Eupatorieae *Brickellia californica* [MUES et al., 1979], *A. saltillensis* [YU et al., 1986a], *E. areolare* var. *leiocarpum* [YU et al., 1986b], *Brickellia vernicosa* [AHMED et al., 1986] und *A. havanensis* [YU et al., 1987].



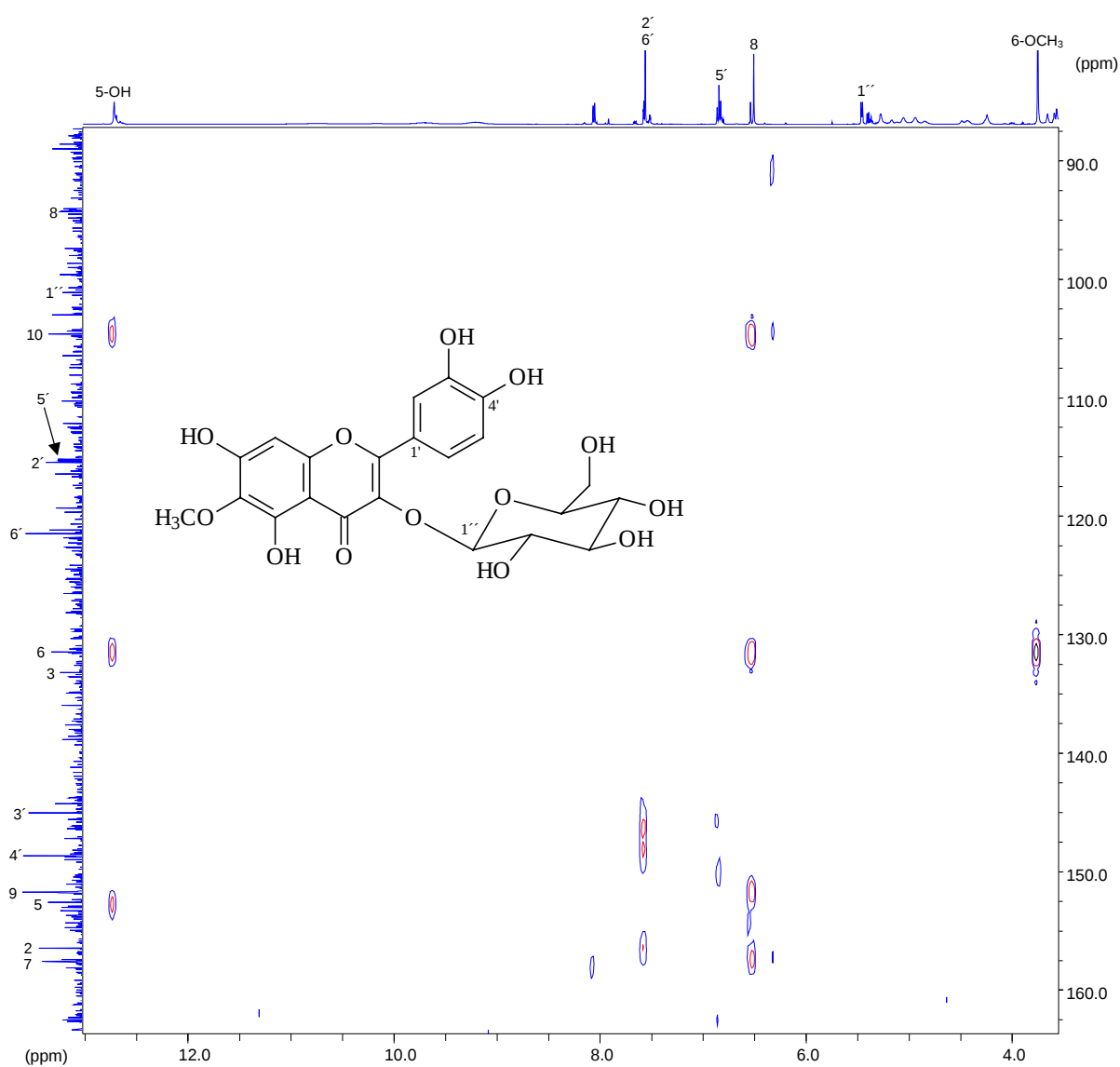


Bild 2.143: HMBC-Spektrum von **FG11** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-*d*₆, TMS)

2.3.13 Erkenntnisse zur Fragmentierung von 6-Hydroxykaempferol-Dimethylethern bei der LC-MS

Nach der Auftrennung des Methanol-Extraktes in die elf Fraktionen M-I bis M-XI wurden diese Fraktionen zunächst mittels LC-MS (siehe Kap. 6.4.2, S. 306) auf das Vorhandensein von Flavonoid-Glykosiden und die Identität der diesen Glykosiden zu Grunde liegenden Aglyka hin untersucht. Die dabei erhaltenen pseudo-MS/MS/MS-Spektren wurden mit der Spektrenbibliothek von Dr. Jan F. Stevens vom Institute of Bioorganic Chemistry (Vrije Universiteit Amsterdam) verglichen. Die dort gespeicherten Spektren von Flavonoid-Aglyka waren von Reinsubstanzen aufgenommen worden, die von Prof. Eckhard Wollenweber vom Institut für Botanik der Technischen Hochschule Darmstadt zur Verfügung gestellt worden waren. Da die Spektrenbibliothek ausschließlich mit Flavonoid-Aglyka aufgebaut worden war, konnten die bei der Analyse der eigenen Proben ermittelten Retentionszeiten der Flavonoid-Glykoside nicht zur Substanzidentifizierung verwendet werden. Beim Screening der Fraktionen M-II und M-III wurde das Aglykon der darin enthaltenen Glykoside **FG1** – **FG4** wegen der hohen Übereinstimmung der zugehörigen pseudo-MS/MS/MS-Spektren mit Daten aus der Spektrenbibliothek als 6-Hydroxykaempferol-3,7-dimethylether identifiziert.

Nachdem einige Zeit später die UV-, MS- und NMR-Spektren der Reinsubstanzen vorlagen, zeigte sich, dass es sich bei den vermeintlichen 3,7-Dimethylethern in Wahrheit um 6,7-Dimethylether handelte. Es wurde zunächst vermutet, dass die Fehlinterpretation der aus den Fraktionen aufgenommenen LC-MS-Spektren auf eine Verwechslung von Vergleichssubstanzen bei der Aufnahme der Referenzspektren zurückzuführen war. Um dies abzuklären wurden die zum Aufbau der Bibliothek gemessenen Verbindungen, nämlich die 3,6-, 3,7- und 6,7-Dimethylether des 6-Hydroxykaempferols, erneut untersucht. Zunächst wurden NMR-Spektren aufgenommen, die eindeutig belegten, dass die Struktur dieser Verbindungen korrekt bestimmt worden war. Anschließend wurden pseudo-MS/MS/MS-Spektren der drei Isomere aufgenommen. Das Resultat der LC-MS-Untersuchung war bemerkenswert und unerwartet zugleich: Das Spektrum des 6-Hydroxykaempferol-3,6-dimethylethers zeigt im Hinblick auf die Fragmentierung zwar deutliche Unterschiede zu den beiden anderen Stellungsisomeren (siehe Bild 2.144, S. 191, oben), die Spektren des 6-Hydroxykaempferol-3,7- und des -6,7-dimethylethers sind jedoch hinsichtlich der Fragmentierung und der relativen Intensitäten der Bruchstücke fast vollständig identisch (siehe Bild 2.144, S. 191, Mitte und unten). Bild 2.145 (S. 192) zeigt zwei hypothetische Fragmentierungswege für den 6-Hydroxykaempferol-3,7- und den -6,7-dimethylether. Danach verlaufen die Zerfallswege der beiden Aglyka zwar verschieden und führen zu unterschiedlich aufgebauten Fragmenten, diese besitzen jedoch zufällig die gleiche Masse und werden, was statistisch gesehen noch unwahrscheinlicher ist, mit fast identischen relativen Intensitäten detektiert. Dies erklärt, warum die Software der Spektrenbibliothek beim Screening der Fraktionen M-II und M-III ein falsches Ergebnis geliefert hatte.

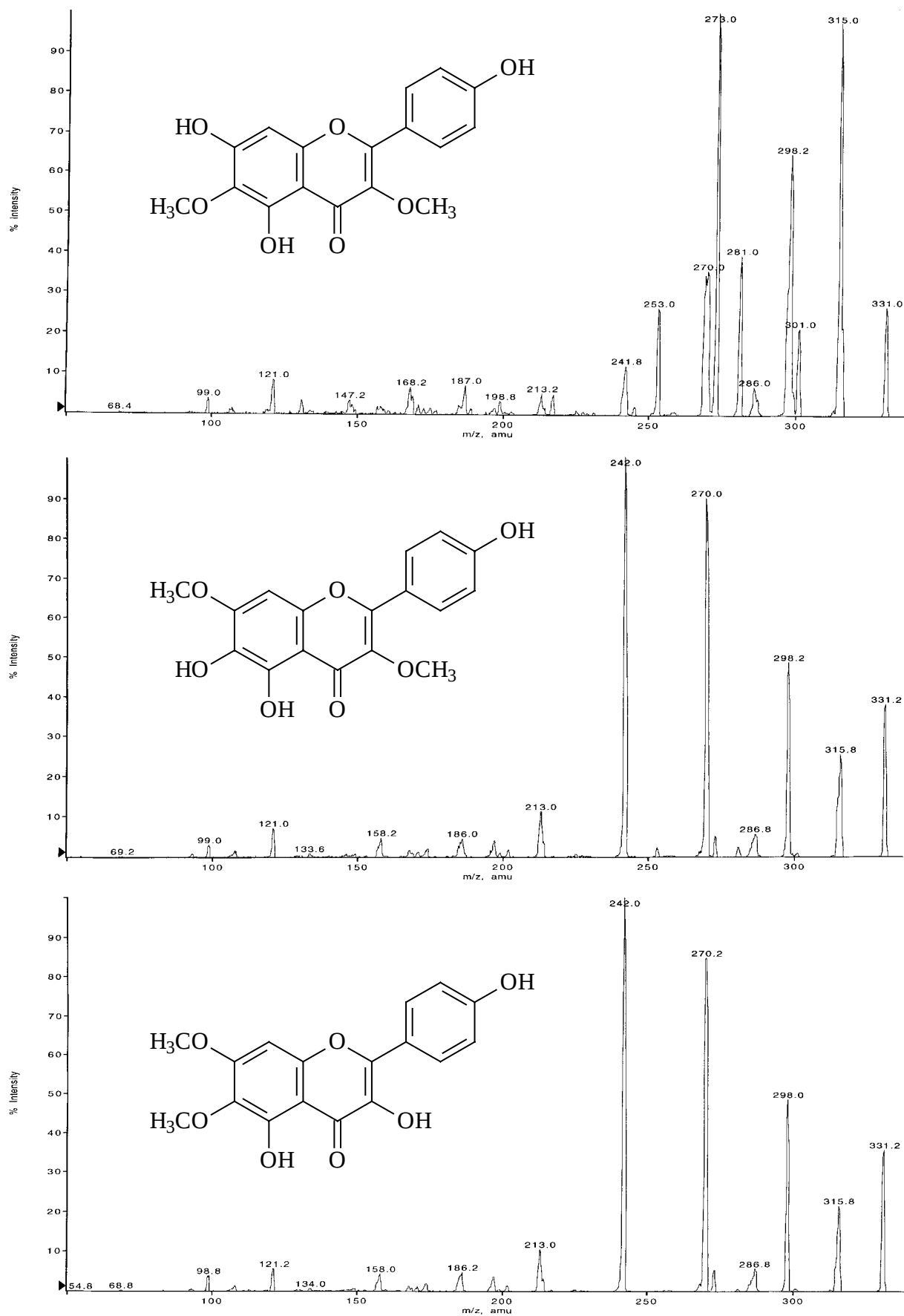


Bild 2.144: Pseudo-MS/MS-Spektren von 6-Hydroxykaempferol-3,6-dimethylether (oben), -3,7-dimethylether (Mitte) und -6,7-dimethylether (unten)

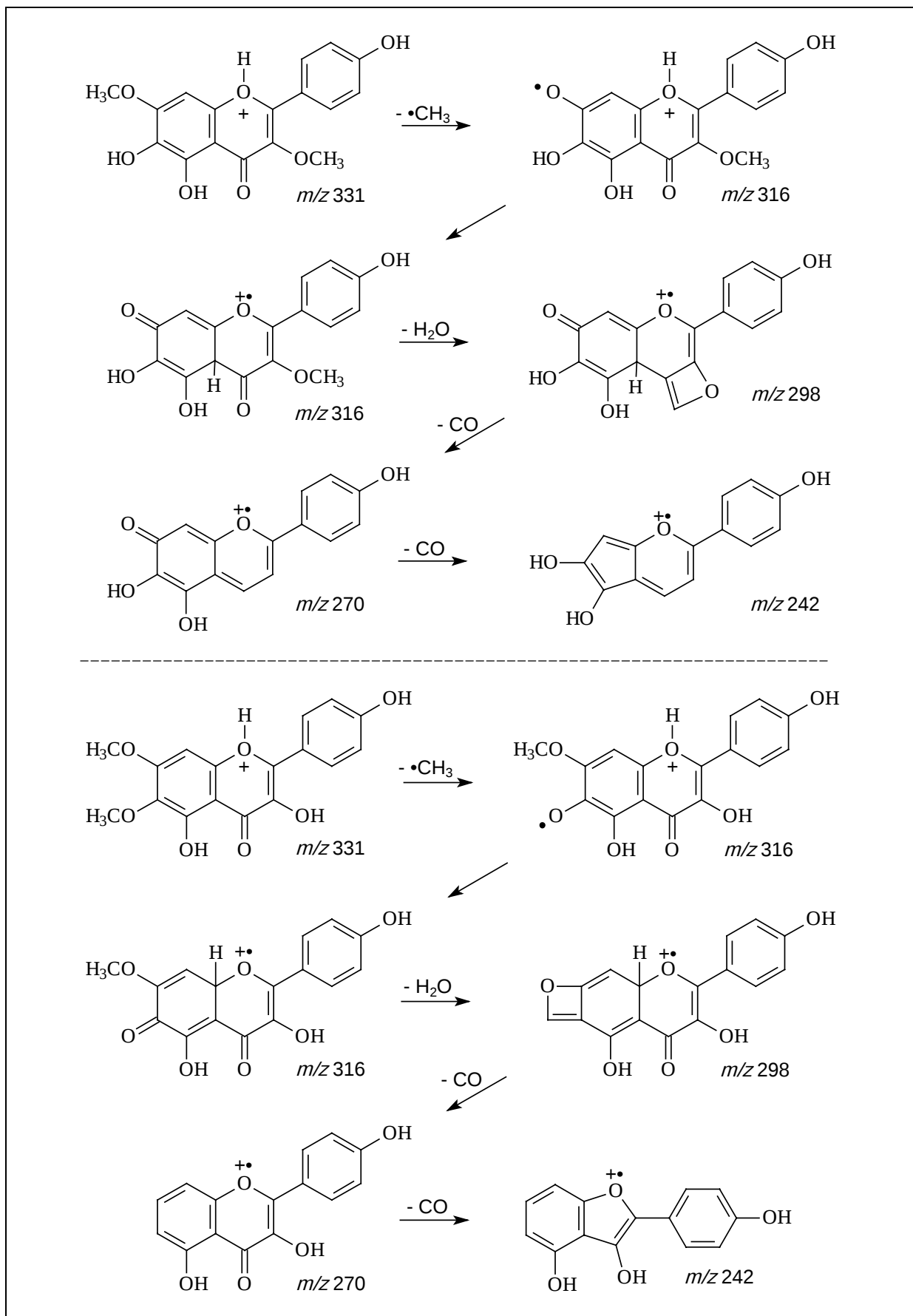


Bild 2.145: Hypothetische Fragmentierung von 6-Hydroxykaempferol-3,7-dimethylether (oben) und 6-Hydroxykaempferol-6,7-dimethylether (unten) unter pseudo-MS/MS/MS-Bedingungen

2.4 Isolierung und Identifizierung von Kaffeoyle-Chinasäuren aus *Eupatorium semialatum*

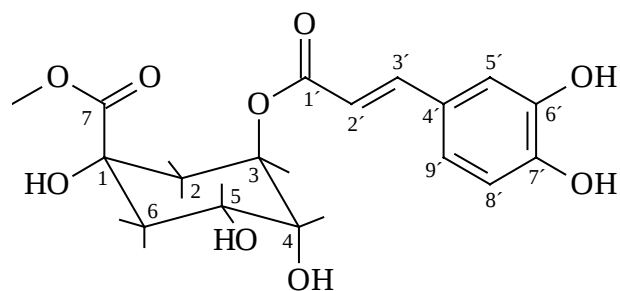
Depside vom Typ der Kaffeoyle-Chinasäuren sind bei den evolutiv höher entwickelten Taxa der Dicotyledonae weit verbreitet. Die Ordnung der Asterales ist jedoch die einzige Ordnung, in der solche Verbindungen in praktisch allen Gattungen nachgewiesen werden konnten. Es wird vermutet, dass in den weiter abgeleiteten Pflanzenfamilien die Kaffeoyle-Chinasäuren und andere Hydroxyzimtsäureester das Lignin aus der Rolle des Hauptphytoalexins bei der Abwehr von Herbivoren und Pathogenen abgelöst haben [MØLGAARD und RAVN, 1988]. Chlorogensäure und etliche strukturell verwandte Mono-, Di- und Triester wurden zuerst aus Kaffeebohnen isoliert [MORISHITA et al., 1984]. Auch bei späteren Funden in anderen Pflanzen konnten neben der Stammverbindung meist mehrere Isomere bzw. Homologe nachgewiesen werden. Angesichts der Beobachtung, dass die Ausbeuten an den verschiedenen Isomeren in hohem Maße von der Extraktionsmethode abhängen, ist es wahrscheinlich, dass es während der Aufarbeitung der Drogenextrakte zu Umesterungen kommt [MØLGAARD und RAVN, 1988].

In jüngster Zeit sind pflanzliche Polyphenole, zu denen auch die Chinasäureester zählen, auf Grund ihrer antioxidativen Eigenschaften vermehrt in den Blickpunkt des Interesses der Pharmazeuten und Mediziner gerückt [GROSS, 1981]. Ihr Potential als Antioxidantien ist mit dem der Ascorbinsäure und des Tocopherols vergleichbar. Es verwundert daher nicht, dass ihnen bei der Prävention der koronaren Herzkrankheit eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird, da sie wie die oben genannten Vitamine antiatherogene Wirkungen entfalten und die Plättchenaggregation hemmen [METZ, 2000]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass pflanzliche Polyphenole die Phospholipase A₂, die Cyclooxygenase, die Lipoxxygenase und die Synthese anderer chemotaktischer und proinflammatorischer Mediatoren hemmen [METZ, 2000]. Außerdem wird die Bioverfügbarkeit von Karzinogenen aus der Nahrung sowie deren metabolische Aktivierung reduziert. Von Chlorogensäure ist bekannt, dass sie einen potenten Inhibitor der Nitrosaminbildung darstellt. Entscheidend bei den dabei ablaufenden Vorgängen ist die Reaktion zu C-Nitroso-Phenolderivaten [HALL und CUPPETT, 1997; METZ, 2000].

2.4.1 Extraktion und Fraktionierung

Wie die Flavonoid-Glykoside entstammen alle Kaffeoyle-Chinasäuren dem Methanol-Extrakt (siehe Kap. 6.5.6, S. 324).

2.4.2 Chlorogensäuremethylester = 3-*O*-Kaffeoylchinasäuremethylester (Verbindung **KC1**¹)



Verbindung **KC1** konnte aus Fraktion M-VII des Methanol-Extraktes isoliert werden. Die Ausbeute betrug 21 mg (siehe Kap. 6.5.6.4, S. 326).

Die Lage der Absorptionsbanden und Schultern in den UV-Spektren von **KC1** (siehe Tab. 2.46, S. 195) spricht im Vergleich mit Angaben aus der Literatur dafür, dass es sich bei der Verbindung um ein Chlorogensäure-Derivat handelt [DRANIK, 1966; JERGA, 1989].

Die Aufnahme eines APCI-MS-Spektrums liefert ein Pseudomolekülion $[MH]^+$ bei m/z 369 (siehe Bild 2.146 oben, S. 196). Dies deutet auf die Veresterung der Carboxylgruppe der Chinasäure mit Methanol hin, da das Molekulargewicht um 14 units größer ist als bei der unveresterten Chlorogensäure. Bei einer Kollisionsenergie von 11 V unter APCI-CID-Bedingungen wird **KC1** in seine beiden Komponenten Chinasäuremethylester und Kaffeesäure gespalten (siehe Bild 2.146 Mitte, S. 196). Bei einer Öffnungsspannung von 80 V und einer Kollisionsenergie von 30 V wurde das Bruchstück mit einer Masse von 163 amu (Kaffeoyl-Ion) selektiv in das letzte der drei gekoppelten Massenspektrometer eingeschleust. Das Ion fragmentiert durch die Abspaltung verschiedener Neutralteilchen weiter und liefert mit den Fragmenten bei m/z 51, 63 und 77 typische Aromatenbruchstücke (siehe Bild 2.146 unten, S. 196).

¹ Die Strukturformel zeigt **KC1** in der in DMSO-d₆ vorliegenden ¹C₄-Konformation

Tabelle 2.46: UV-Daten [$\lambda_{\max}$ (nm)] der Kaffeoyl-Chinasäuren **KC1** – **KC8** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien

Substanz	MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
KC1	242 sh	260 sh	250 sh	255	260	243 sh
	300 sh	307 sh	300 sh	300 sh	305 sh	300 sh
	327	373	337 380 sh	348	358	326
KC2	250 sh	260 sh	250 sh	253 sh	260	247 sh
	300 sh	300 sh	300 sh	300 sh	305 sh	300 sh
	326	370	333 378 sh	347	359	326
KC3	245 sh	262 sh	251 sh	254	259	245 sh
	300 sh	307 sh	300 sh	301 sh	306 sh	301 sh
	328	373	332 383 sh	347	335	327
KC4	245 sh	260	250 sh	255	258	244 sh
	300 sh	307 sh	300 sh	300 sh	305 sh	300 sh
	327	370	330 385 sh	350	350	328
KC5	245 sh	264	250 sh	254	260	245 sh
	300 sh	308 sh	300 sh	300 sh	305 sh	300 sh
	326	375	333 380 sh	345	351	327
KC6	245 sh	268	245 sh	255	258	244 sh
	300 sh	308 sh	300 sh	303 sh	305 sh	300 sh
	327	372	330 383 sh	348	357	328
KC7	245 sh	266	250 sh	256	257	245 sh
	300 sh	310 sh	300 sh	303 sh	305 sh	300 sh
	325	375	331 382 sh	347	346	328
KC8	245 sh	268	252 sh	252	260	242 sh
	300 sh	310 sh	300 sh	300 sh	306 sh	300 sh
	327	376	340	345	347	325

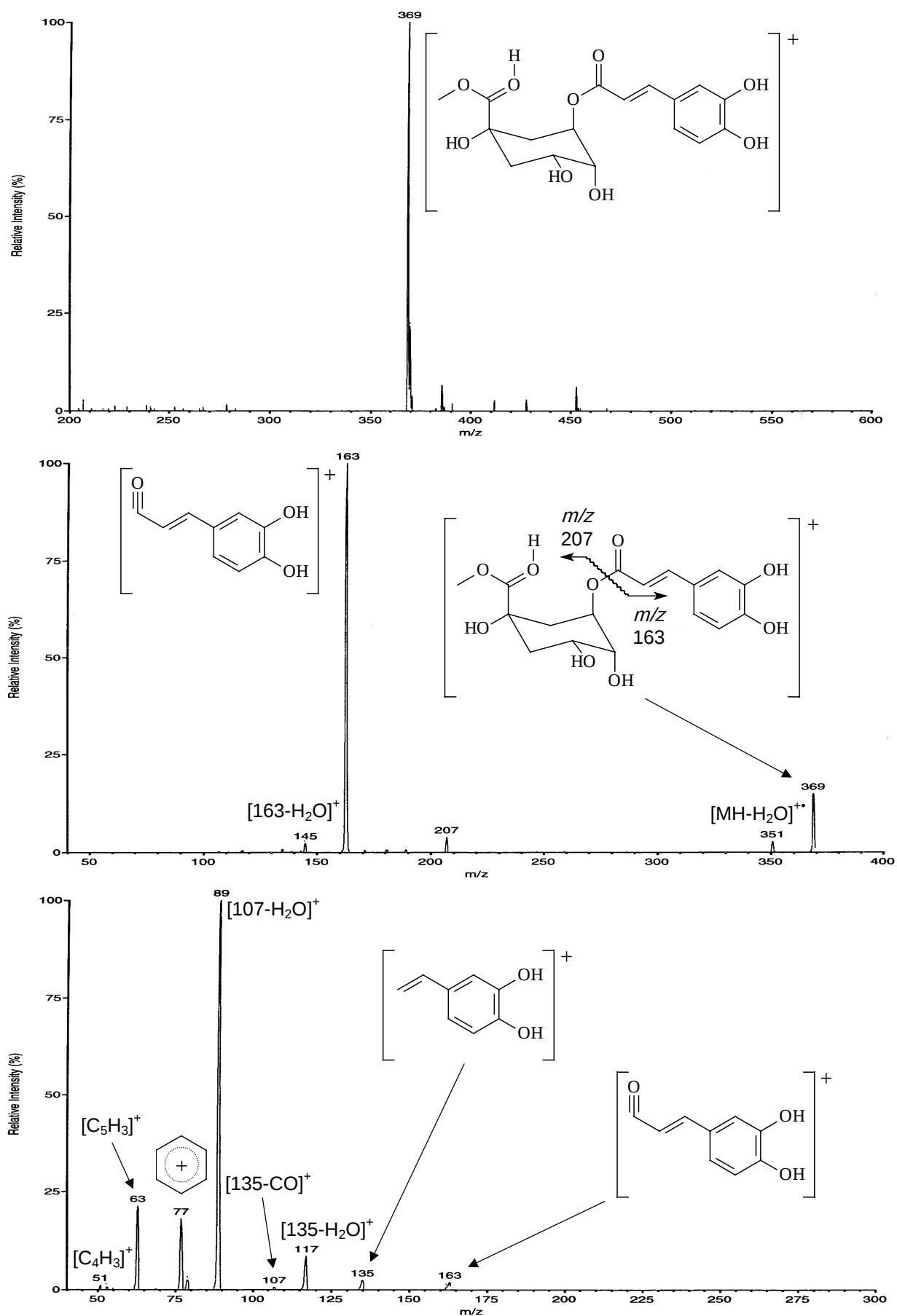
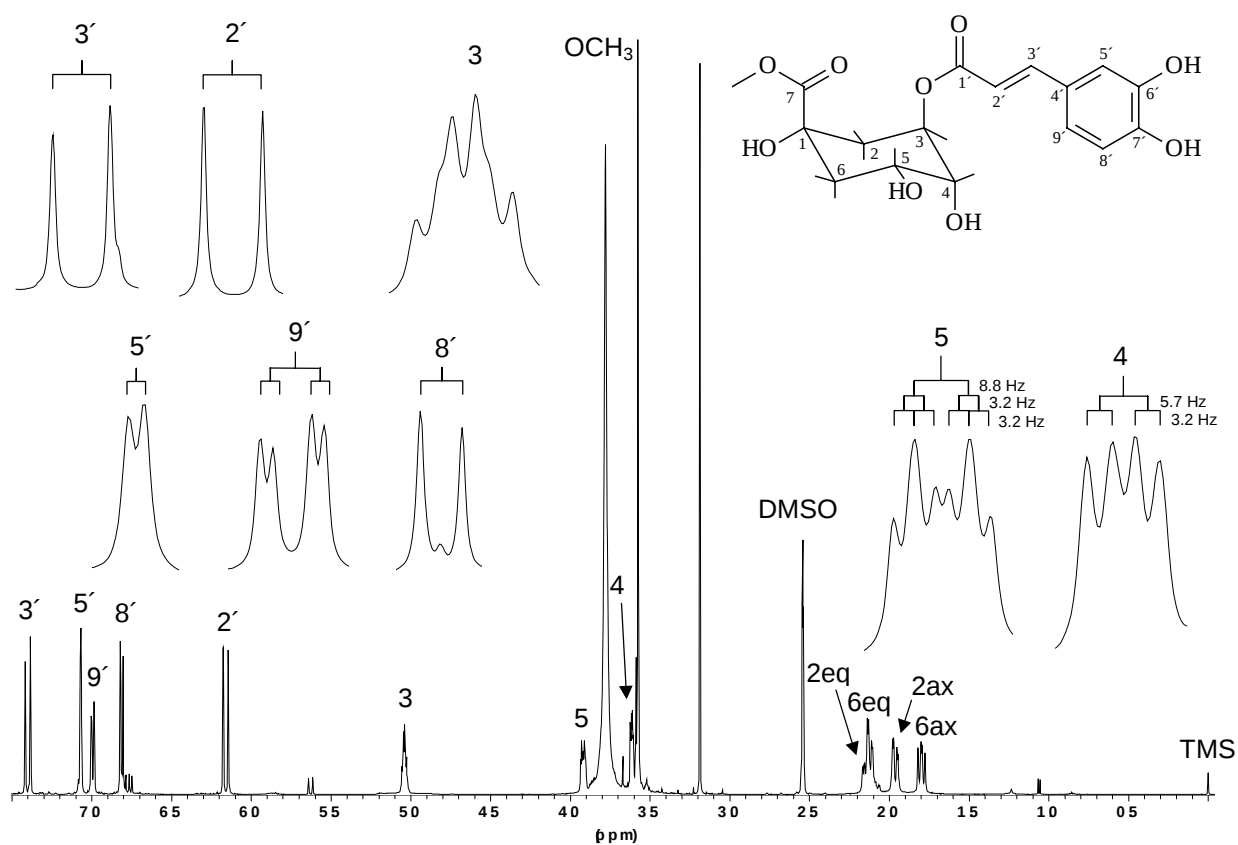
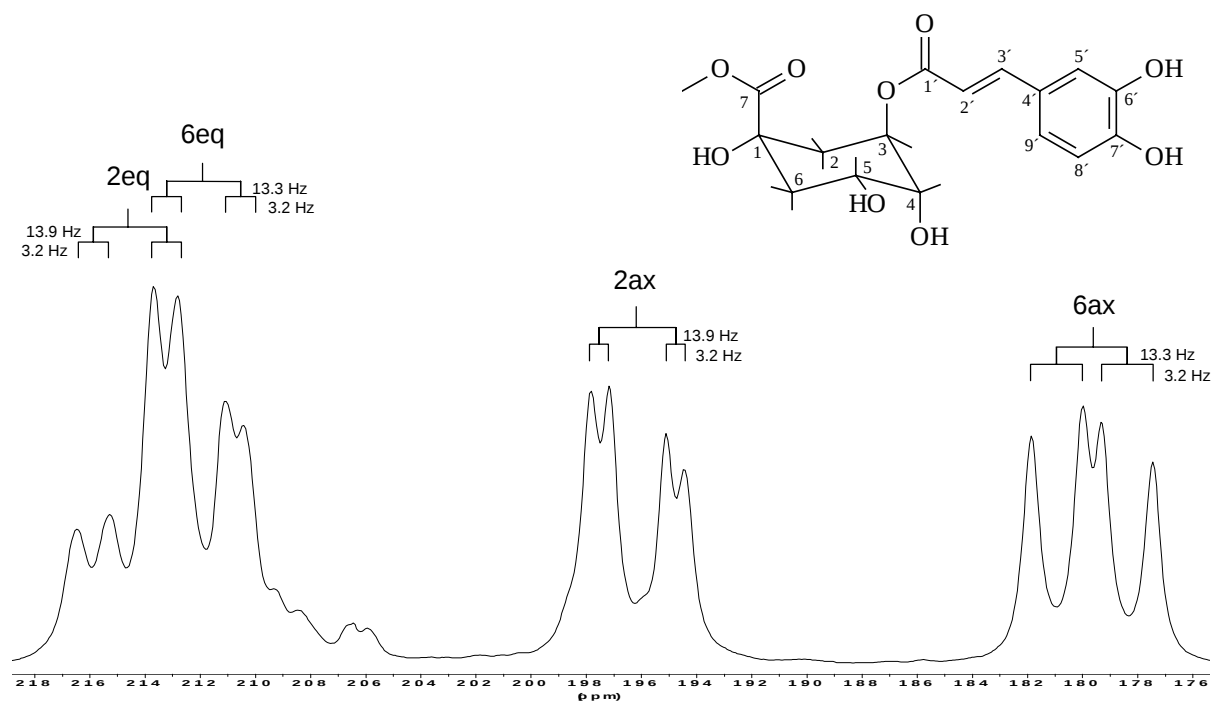


Bild 2.146: Massenspektren von Verbindung **K1**: APCI-Spektrum (oben), APCI-CID-Spektrum (Mitte) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 163 amu (unten)

Tabelle 2.47: ^1H NMR-Daten der Monokaffeoyl-Chinasäuren **KC1** – **KC3** (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS) im Vergleich zu entsprechenden Angaben aus der Literatur: $^1\text{MORISHITA et al., 1984}$ (360 MHz, DMSO-d_6 , TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	KC1	$^1\text{Chlorogensäure}$	KC2
2eq	2.13 dd (3.2, 13.9)	-	2.09 dd (3.8, 13.2)
ax	1.94 dd (3.2, 13.9)		1.85 dd (3.2, 13.2)
3	5.02 <i>m</i>	5.06	4.08 <i>t</i> (3.2, 3.8)
4	3.61 <i>dd</i> (3.2, 5.7)	3.56	4.72 <i>dd</i> (3.2, 6.9)
5	3.89 <i>ddd</i> (3.2, 3.2, 8.8)	3.92	3.96 <i>m</i>
6eq	2.10 <i>dd</i> (3.2, 13.3)	-	1.97 <i>dd</i> (6.9, 13.2)
ax	1.77 <i>dd</i> (9.5, 13.3)		1.80 <i>dd</i> (8.2, 13.2)
2'	6.11 <i>d</i> (15.8)	6.15 <i>d</i> (15.8)	6.27 <i>d</i> (15.8)
3'	7.39 <i>d</i> (15.8)	7.41 <i>d</i> (15.8)	7.49 <i>d</i> (15.8)
5'	7.03 <i>brs</i>	7.03	7.05 <i>d</i> (1.3)
8'	6.78 <i>d</i> (8.2)	6.77 <i>d</i> (7.9)	6.77 <i>d</i> (8.2)
9'	6.98 <i>dd</i> (1.3, 8.2)	6.98 (7.9)	7.00 <i>dd</i> (1.3, 8.2)
OCH ₃	3.57 <i>s</i>	-	3.61 <i>s</i>
H	4-Kaffeoylchinasäure ¹	KC3	Neochlorogensäure ¹
2eq	-	} 1.69 – 1.94 <i>m</i>	-
ax			
3	4.11	3.93 <i>brs</i>	3.86
4	4.71	überlagert	3.55
5	3.86	5.16 <i>brs</i>	5.19
6eq	-	} 1.69 – 1.94 <i>m</i>	-
ax			
2'	6.26 <i>d</i> (15.8)	6.22 <i>d</i> (15.8)	6.20 <i>d</i> (15.9)
3'	7.48 <i>d</i> (15.8)	7.45 <i>d</i> (15.8)	7.46 <i>d</i> (15.9)
5'	7.04	7.04 <i>s</i>	7.02
8'	6.77 <i>d</i> (8.0)	6.75 <i>d</i> (7.6)	6.76 <i>d</i> (8.1)
9'	7.00 (8.0)	6.97 <i>d</i> (7.6)	6.97 (8.1)
OCH ₃	-	3.65 <i>s</i>	-

Im ^1H NMR-Spektrum finden sich dreizehn Signale für fünfzehn Protonen (siehe Bild 2.147, S. 198). Hiervon entfallen zwölf Signale auf die Chlorogensäure [MORISHITA et al., 1984]. Das verbliebene Singulett für drei Protonen bei 3.57 ppm ist typisch für Methoxygruppen und bestätigt, dass die Chlorogensäure als Methylester vorliegt. Da **KC1** dem Methanol-Extrakt entstammt und zu Beginn der Aufarbeitung eine Soxhlet-Extraktion durchgeführt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die genuin vorliegende Chlorogensäure im Zuge der Extraktion in den Methylester überführt wurde [JERGA, 1989].

Bild 2.147: ¹H NMR-Spektrum von **KC1** (500 MHz, DMSO-*d*₆/D₂O, TMS)Bild 2.148: Vergrößerte Darstellung der Methylen-signale von Verbindung **KC1** (500 MHz, DMSO-*d*₆/D₂O, TMS)

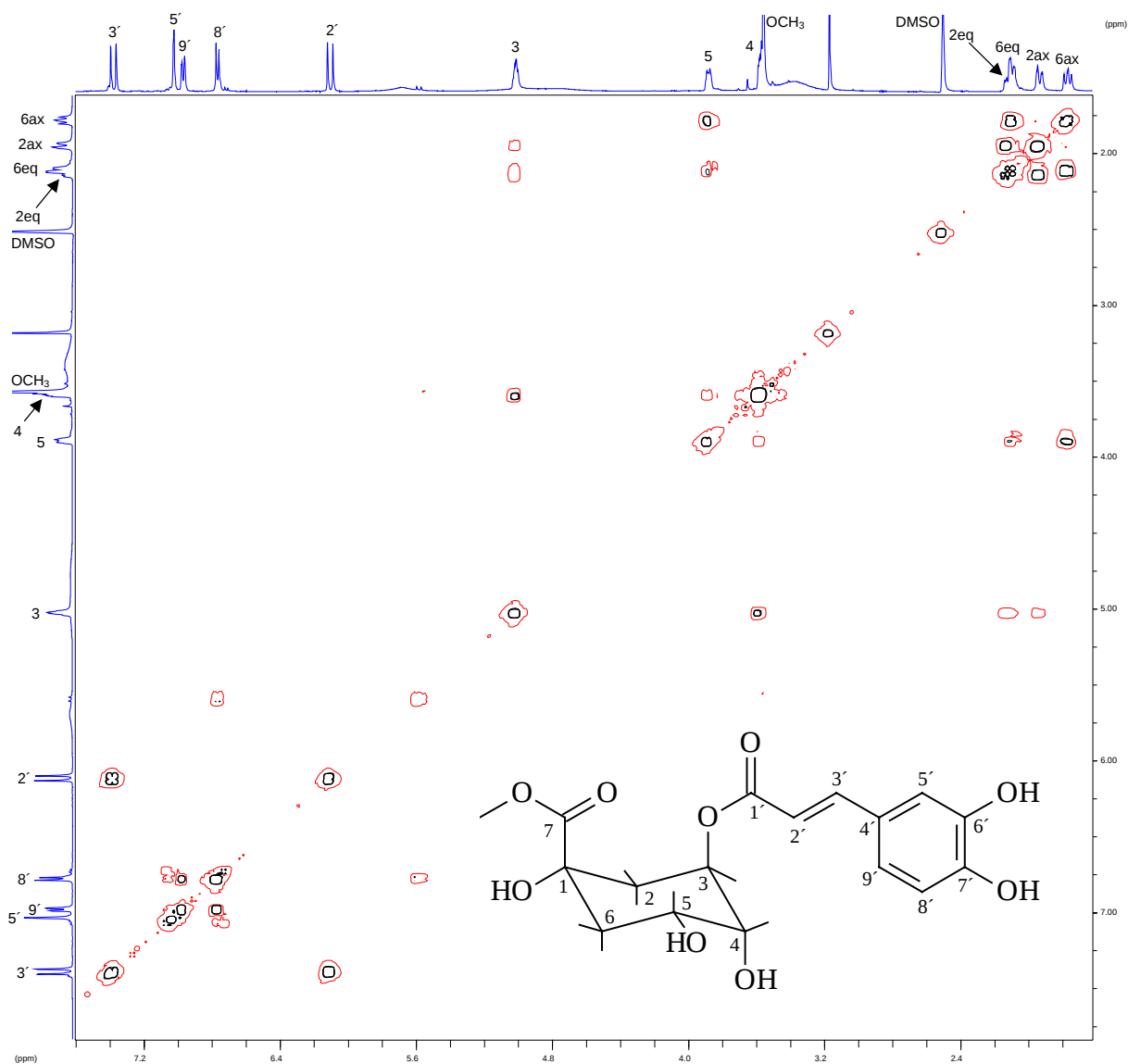


Bild 2.149: COSY-Spektrum von **KC1** (500 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Chlorogensäure stellt formal ein Depsid aus Kaffee- und Chinasäure dar. Die Chinasäure und deren Ester können in den beiden Sesselkonformationen **I** (1C_4) und **II** (1C_4) (siehe Bild 2.150, S. 199) sowie mehreren Boot-Konformationen vorkommen.

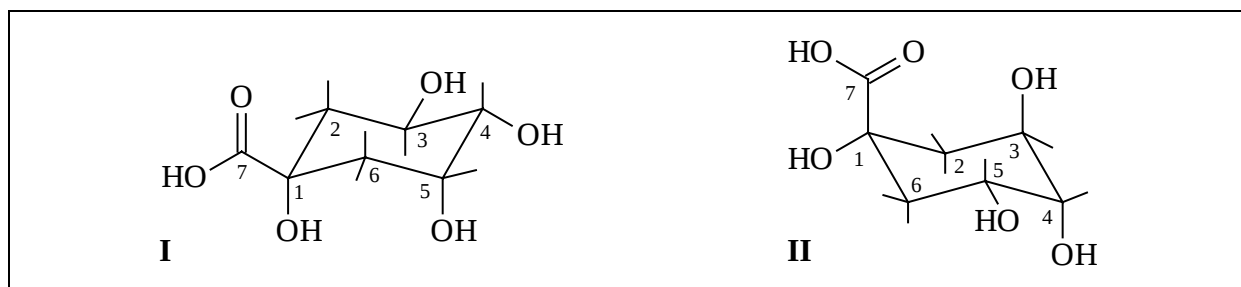


Bild 2.150: Die beiden möglichen Sesselkonformationen der Chinasäure: 1C_4 (**I**) und 1C_4 (**II**)

Die Bootkonformationen sind generell instabiler als die Sesselkonformere und im Falle der Chinasäure auf Grund sterischer Hinderungen durch die funktionellen Gruppen weniger

wahrscheinlich. Aufbauend auf theoretischen und partialsynthetischen Vorarbeiten von mehreren Arbeitsgruppen führten CORSE et al. (1966) sowie HASLAM und TURNER (1971) umfangreiche NMR-Messungen und Spektrensimulationen durch, um zu klären, in welcher der beiden Sesselkonformationen Chinasäureester bevorzugt vorliegen. Die beobachteten Kopplungskonstanten in D₂O bzw. Deuteropyridin waren mit den Ergebnissen der Modellrechnungen kongruent und sprachen eindeutig für die Konformation **I**, in der die Carboxylgruppe eine äquatoriale Lage einnimmt.

Nach der Bestimmung der Kopplungskonstanten an Hand des ¹H NMR-Spektrums von **KC1** und der Überprüfung der Kopplungen an Hand des COSY-Spektrums (siehe Bild 2.149, S. 199) zeigte sich, dass die eigenen Meßwerte nicht mit denen aus der Literatur harmonierten. So besitzen die beiden Dubletts der Methylenprotonen an C-2 eine große geminale Kopplung mit einem Wert von 13.9 Hz. Die zweite ableitbare Kopplungskonstante des axialen Protons an C-2 beträgt jedoch nur 3.2 Hz, was für die Kopplung mit einem äquatorial ausgerichteten Proton spricht (siehe Tabelle 2.47, S. 197 und Bild 2.148, S. 198). Eine solche Kopplung ist jedoch nur mit Konformation **II** vereinbar, da hier das Proton an C-3 eine äquatoriale Lage einnimmt. Ein weiterer Beweis für diese These ist das Fehlen einer *trans*-diaxialen Kopplung von H-4, während das H-5 eine solche Kopplung mit dem axialen H-6 (8.8 Hz) zeigt (siehe Bild 2.147, S. 198). Um zu klären, ob das beobachtete Phänomen Lösungsmittel-abhängig ist, wurde von **KC1** ein ¹H NMR-Spektrum in Methanol-d₄ aufgenommen (siehe Bild 2.151, S. 201). Die Kopplungskonstanten des axial stehenden Methylenprotons H-2ax belaufen sich auf 7.6 und 13.24 Hz. Demnach besitzt das H-2ax neben dem geminalen noch einen axial stehenden vicinalen Kopplungspartner. Dies wird bestätigt durch die Aufspaltung des Signals für H-3. Aus dem Sextett lassen sich die Kopplungskonstanten 4.4 Hz und zweimal 7.6 Hz ableiten. Davon ist eine der großen Kopplungen mit der angesprochenen Kopplung von H-2ax identisch. Die verbleibende kleine Kopplungskonstante gehört zur Kopplung mit H-2eq und die zweite große Kopplung zur Interaktion mit einem axialen H-4. Das Signal dieses Protons spaltet zum Dublett vom Dublett mit den Kopplungskonstanten 3.2 und 7.6 Hz auf. Der Betrag von 3.2 Hz gehört zu einer axial-äquatorialen Kopplung mit H-5. Bei dem Sextett des äquatorial orientierten H-5 findet man die Kopplungskonstanten 3.2 Hz (zweimal) und 6.3 Hz. Die beiden noch nicht zugeordneten Kopplungskonstanten (3.2 Hz und 6.3 Hz) sind den Interaktionen mit den Methylenprotonen an C-6 zuzuordnen. Die Kopplungskonstanten des axial stehenden Methylenprotons H-6ax belaufen sich auf 6.3 und 13.24 Hz. Hierdurch wird bestätigt, dass das H-6ax in H-5 einen äquatorial stehenden vicinalen Kopplungspartner besitzt.

Aus diesen Betrachtungen folgt, dass alle ableitbaren Kopplungskonstanten der Protonen H-2 bis H-6 eindeutig für Konformation **I** in Deuteriomethanol sprechen. Damit ist klar, dass die Konformation **II** mit axialer Carboxylgruppe durch das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid erzwungen wird. MORISHITA et al. (1984) hatten ihre NMR-Messungen an Kaffeoyl-Chinasäure-Derivaten ebenfalls in DMSO-d₆ vorgenommen, jedoch Konformation **I** postuliert. Da sie in ihrer Publikation weder in der Lage waren, die chemischen Verschiebungen der Methylenprotonen noch die Kopplungskonstanten der Chinasäure-Protonen H-3 bis H-5 anzugeben, drängt sich der Verdacht auf, dass die Verfasser dieser Publikation in Ermangelung dieser Daten die Konformation **I** aus früheren Publikationen anderer Autoren, die nicht in in DMSO-d₆ gemessen hatten, übernommen haben.

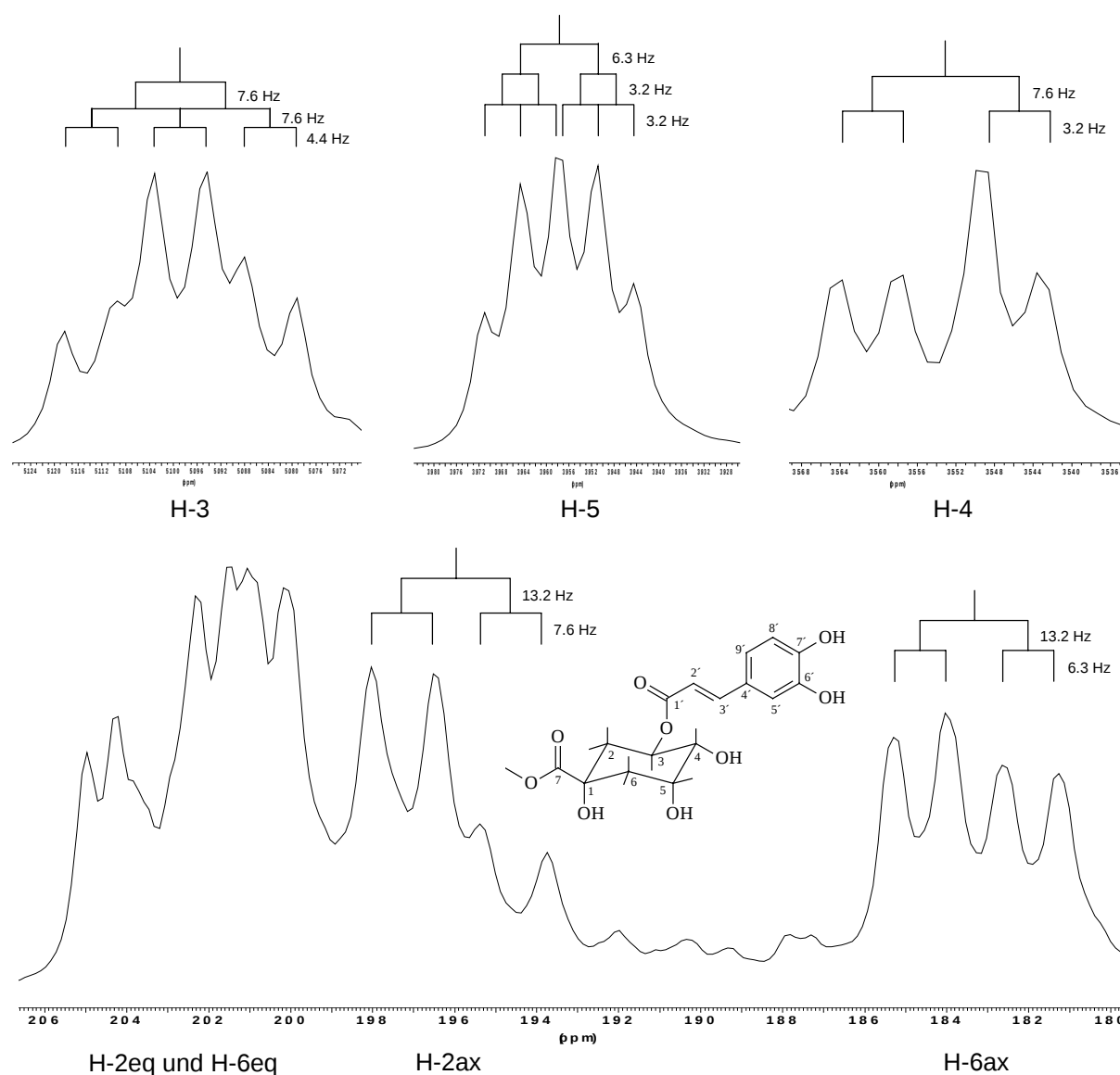


Bild 2.151: Die Signale der Chinasäure-Protonen von **KC1** in Großdarstellung (500 MHz, CD_3OD , TMS); in $\text{Methanol-}d_4$ liegt das Molekül in der $^1\text{C}_4$ -Konformation vor.

Das ^{13}C NMR-Spektrum zeigt erwartungsgemäß siebzehn Signale (siehe Bild 2.152, S. 202), die mit Hilfe des HMQC- (siehe Bild 2.153, S. 203) und des HMBC-Spektrums (siehe Bild 2.154, S. 204) eindeutig zugeordnet werden können. Die ^3J -Kopplung zwischen dem Signal für die Methoxyprotonen bei 3.57 ppm und dem Signal für C-7 bei 173.83 ppm beweist, dass es sich bei **KC1** um den Methylester der Chlorogensäure handelt. Beim Vergleich der ^{13}C NMR-Shifts von **KC1** mit den Literaturangaben für Chlorogensäuremethylester [JERGA, 1989] fiel auf, dass in der genannten Arbeit die Werte für C-3 und C-4 vertauscht wurden (siehe Tabelle 2.48, S. 202). Der Fehler ist auch ohne Kenntnis der in der vorliegenden Arbeit abgebildeten Korrelationsspektren offensichtlich, da dem hydroxylierten Kohlenstoff ein größerer δ -Wert zugeordnet wurde als dem C-Atom mit dem Kaffeoxyloxy-Rest.

Tabelle 2.48: ^{13}C NMR-Daten der Verbindung **KC1** (125 MHz, DMSO-d_6 , TMS) im Vergleich mit Angaben für Chlorogensäuremethylester: $^1\text{JERGA}$, 1989 (90 MHz, DMSO-d_6 , TMS); * = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm]

C	KC1	Chlorogensäure- methylester
1	73.24	73.006
2	35.29	37.155
3	71.24	69.341*
4	69.52	70.891
5	67.05	66.840*
6	37.46	35.155
7	173.83	173.533
1'	165.57	165.376
2'	114.05	113.341
3'	145.35	146.074
4'	125.56	124.861
5'	114.81	114.688
6'	145.85	145.244
7'	147.73	149.282
8'	116.05	115.996
9'	121.54	121.155
OCH_3	52.01	51.694

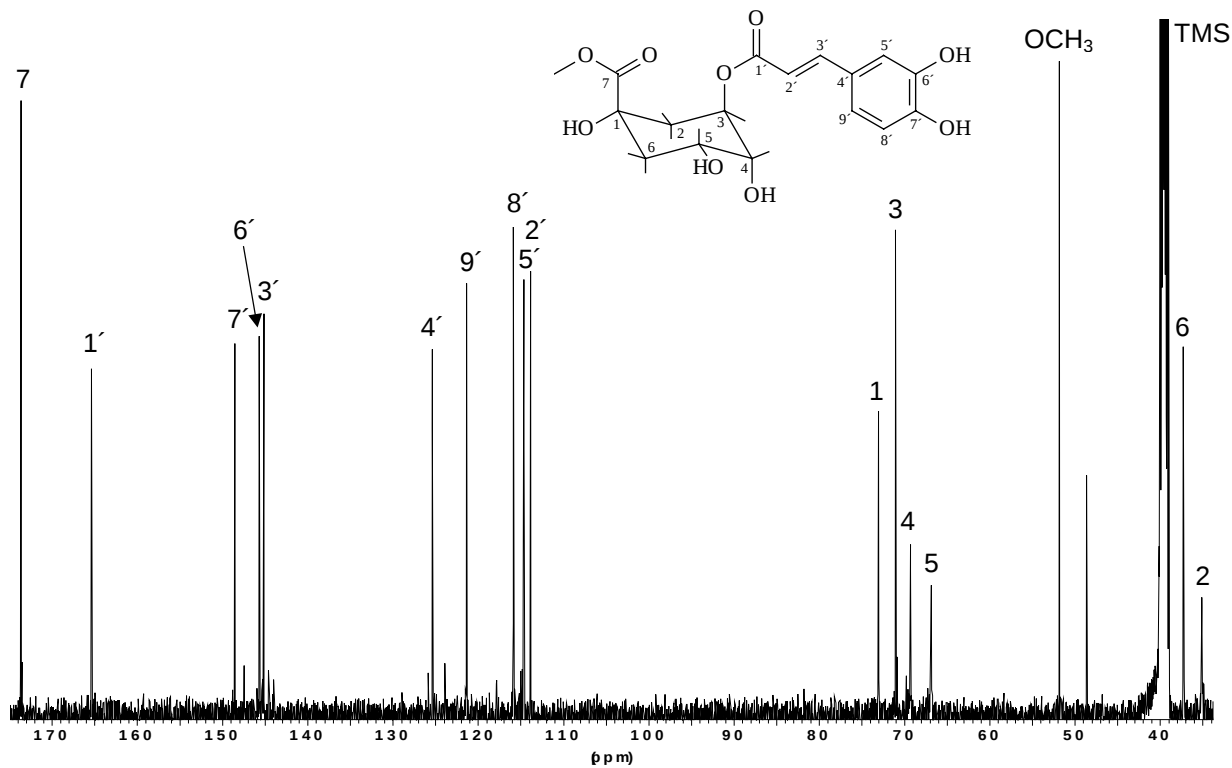


Bild 2.152: ^{13}C NMR-Spektrum der Verbindung **KC1** (125 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

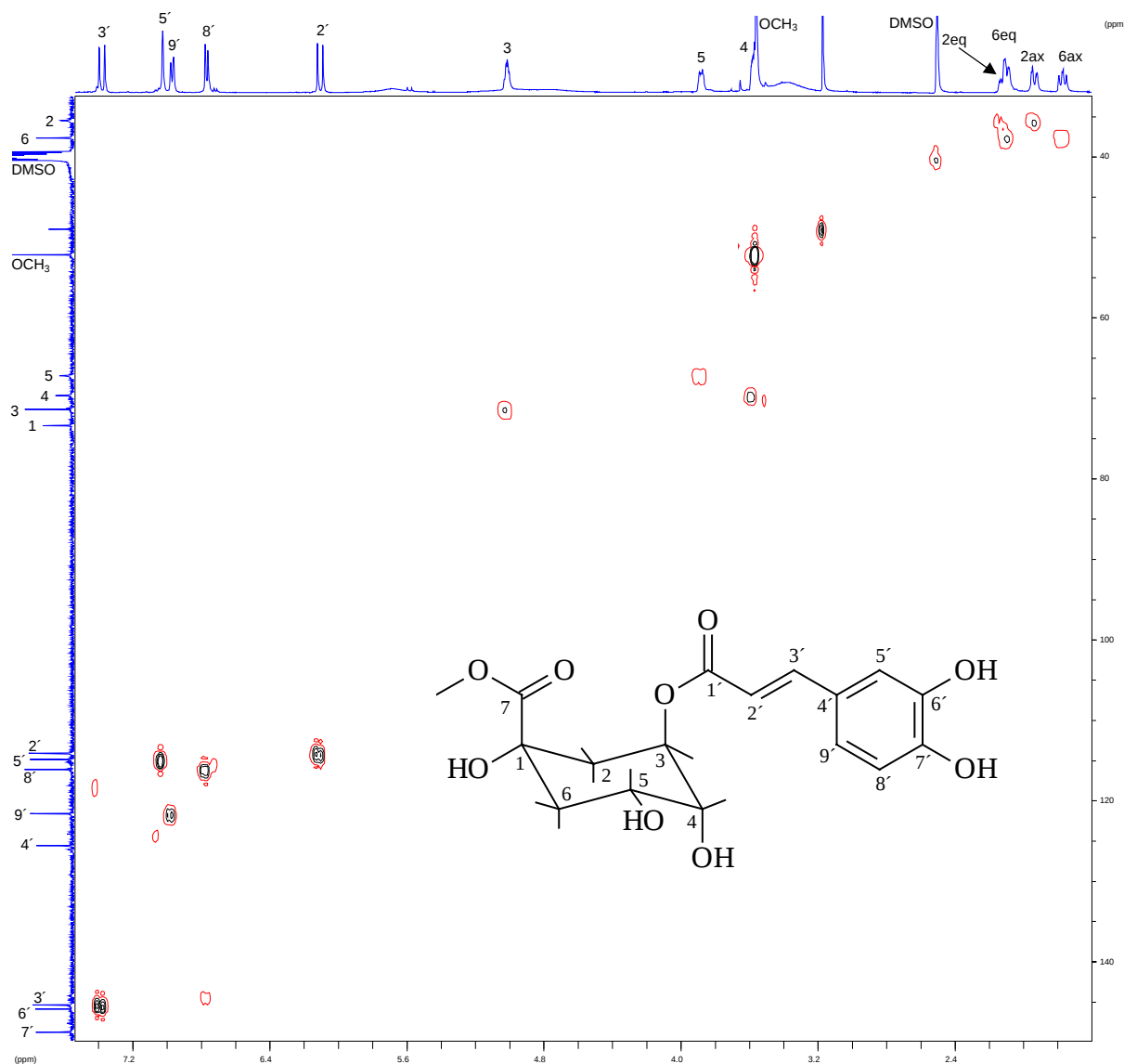


Bild 2.153: HMBC-Spektrum von **KC1** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

Die freie Chlorogensäure wurde ursprünglich aus Kaffeebohnen isoliert, im Laufe der Zeit entdeckte man, dass auch verschiedene Isomere und homologe Verbindungen sowie deren Isomere in den Früchten von *Coffea arabica* vorkommen [MORISHITA et al., 1984]. Bei den Asteraceae kommt die Substanz sehr verbreitet vor, so ist sie z.B. für die Artischocke, *Cynara scolymus* [DRANIK, 1966], oder für *Heterotheca inuloides*, eine mögliche Verfälschung der offizinellen Arnika-Blüten, belegt [JERGA, 1989]. Aus *Heterotheca inuloides* konnte neben der freien Chlorogensäure auch der mit **KC1** identische Methyl ester isoliert werden. Für die Gattungen *Ageratina* und *Eupatorium* existieren bislang lediglich Nachweise für *A. adenophora* [PROKSCH et al., 1990] und *E. cannabinum* [OSWIECIMSKA und SENDRA, 1972; PAGANI und ROMUSSI, 1967; PROKSCH und SIEBERTZ, 1993].

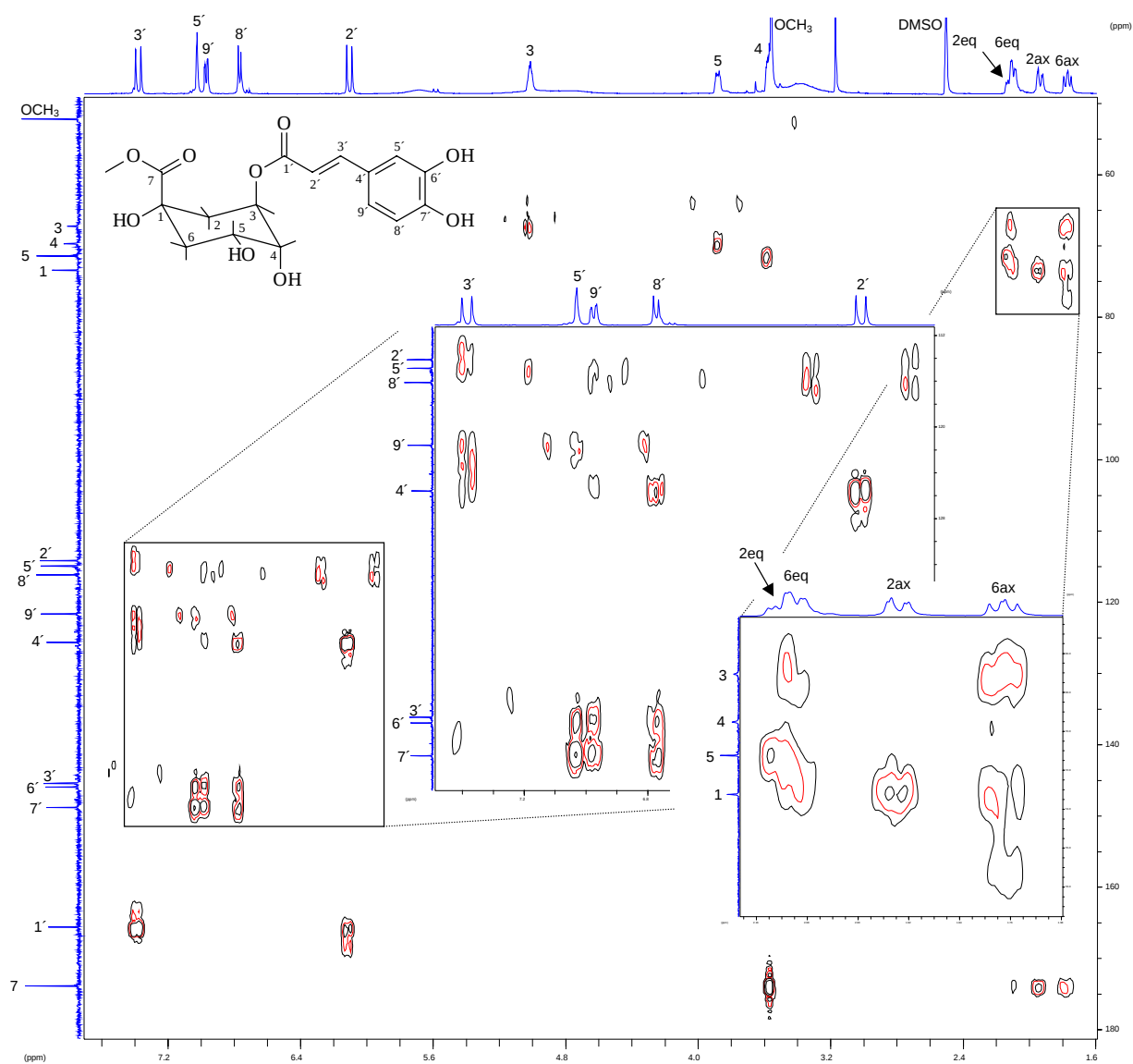
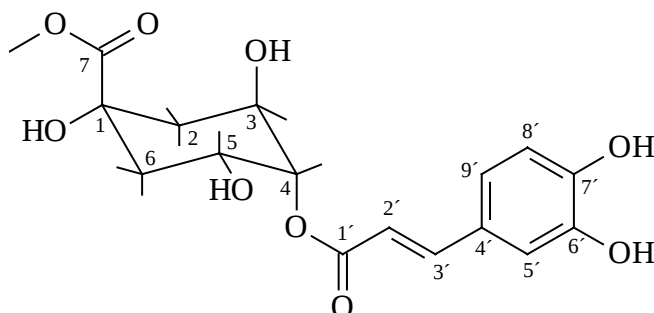


Bild 2.154: HMBC-Spektrum von **KC1** (500 bzw. 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)

2.4.3 Kryptochlorogensäuremethylester 4-*O*-Kaffeoylchinasäuremethylester (Verbindung KC2²)



Die Substanz **KC2** stammt ebenfalls aus Fraktion M-VII des Methanol-Extraktes. Die Ausbeute betrug bei **KC2** 5 mg (siehe Kap. 6.5.6.4, S. 326).

Das Färbeverhalten von **KC2** bei der DC stimmt fast vollständig mit dem des Chlorogensäuremethylesters (**KC1**) überein (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Verbindungen besteht darin, dass **KC2** in den verwendeten Fließmitteln (DC-1, DC-2 und DC-4) etwas höher läuft.

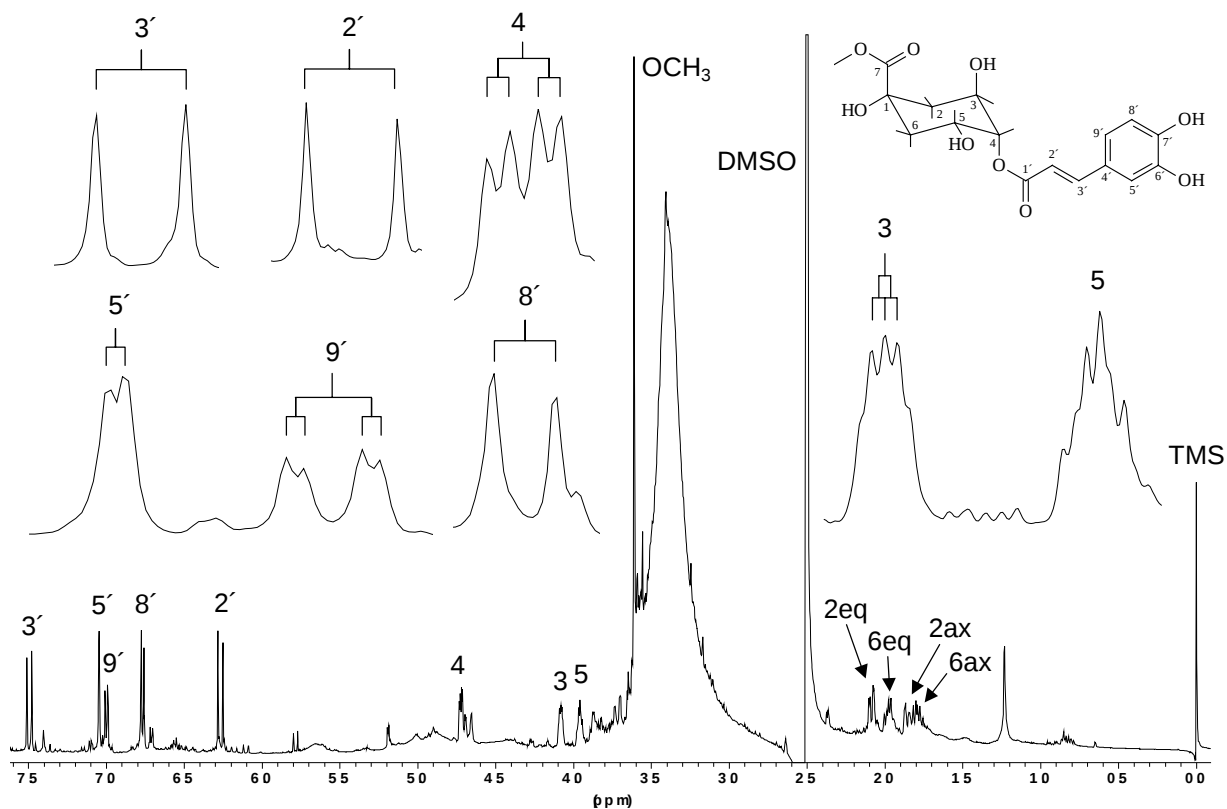
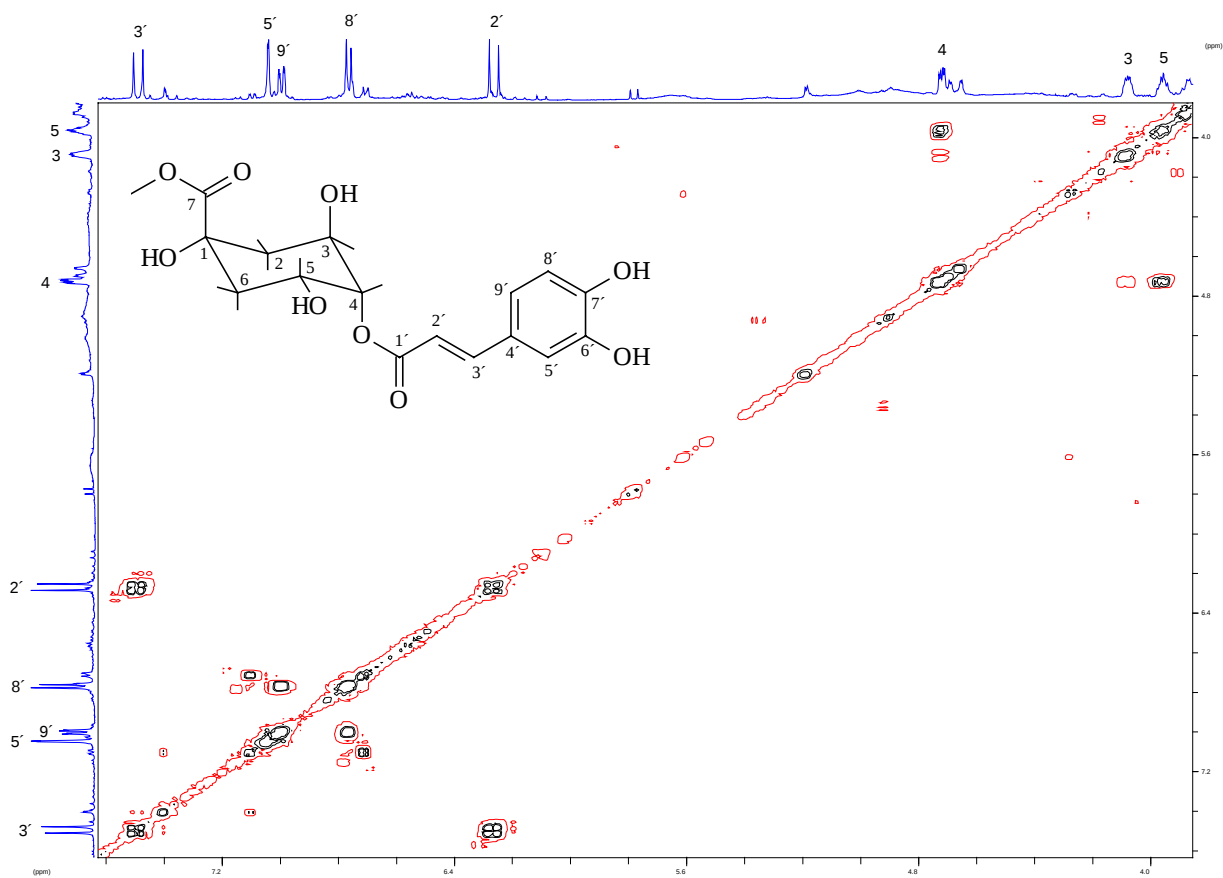
Wie ein Blick in Tab. 2.46, S. 195 zeigt, sind die Unterschiede in den UV-Spektren von **KC2** und **KC1** nur marginal. Dies spricht bei diesen beiden Substanzen für ein hohes Maß an struktureller Übereinstimmung.

Diese Hypothese läßt sich auch aus den MS-Daten ableiten, da die Massenspektren von **KC2** und **KC1** fast identisch sind.

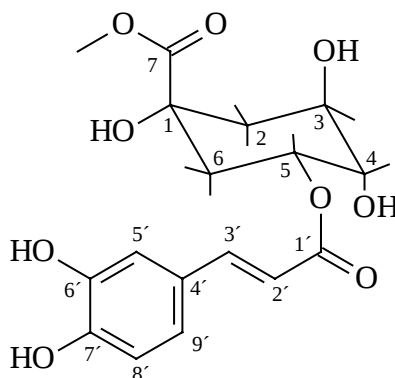
Das Protonenspektrum (siehe Bild 2.155, S. 206) zeigt die dreizehn bei einem Kaffeoylchinasäuremethylester zu erwartenden Signale: Die Signale der Kaffeesäure-Protonen über 6.0 ppm, die Methinprotonen der Chinasäure zwischen 3.5 und 6 ppm, die Methylenprotonen im Bereich um 2 ppm und das Methoxysignal bei 3.61 ppm. Ein Vergleich der Shifts der Methinsignale mit den Daten von MORISHITA et al. (1984) führt zu dem Resultat, dass es sich bei **KC2** um den 4-*O*-Kaffeoylchinasäuremethylester handeln muß (siehe Tabelle 2.47, S. 197). Die Kaffeesäure ist in diesem Fall mit der mittleren der drei benachbarten Hydroxylgruppen der Chinasäure verestert. Hierdurch sind im Vergleich mit der Chlorogensäure die Signale der Methylenprotonen zu höherem Feld verschoben. Analysiert man die Kopplungskonstanten der Chinasäure-Protonen (H-2 bis H-6) an Hand des Protonen- und des COSY-Spektrums (siehe Bild 2.156, S. 206), so kommt man wie bei Substanz **KC1** zu dem Ergebnis, dass auch bei **KC2** die Chinasäure in der Sesselkonformation ¹C₄ vorliegt.

Die freie 4-Kaffeoylchinasäure wurde neben anderen isomeren und homologen Verbindungen aus Kaffeebohnen [MORISHITA et al., 1984] und der Artischocke isoliert [DRANIK, 1966]. Für die Gattung *Eupatorium* lagen bisher keine Nachweise vor.

² Die Strukturformel zeigt **KC2** in der in DMSO-d₆ vorliegenden ¹C₄-Konformation

Bild 2.155: Protonenspektrum der Substanz **KC2** (500 MHz, DMSO- d_6 , TMS)Bild 2.156: COSY-Spektrum von Verbindung **KC2** (500 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

2.4.4 Neochlorogensäuremethylester = 5-*O*-Kaffeoylchinasäuremethylester (Verbindung KC3³)



Die Verbindung **KC3** entstammt der Fraktion M-VIII des Methanol-Extraktes. Nach verschiedenen chromatographischen Reinigungsschritten konnten 3 mg der Substanz rein isoliert werden (siehe Kap. 6.5.6.5, S. 326).

Das Detektionsverhalten von **KC3** auf der DC-Platte stimmt zwar mit Verbindung **KC2** überein, **KC3** zeigt jedoch in allen verwendeten Fließmitteln deutlich kleinere Retentionsfaktoren (siehe Tabelle 6.1, S. 298).

Die UV-Daten von **KC3** zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Spektraldaten von **KC1** und **KC2** (siehe Tab. 2.46, S. 195).

Auch die in den verschiedenen Massenspektren detektierten Ionen sind von den Verbindungen **KC1** und **KC2** her bekannt. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei **KC3** um ein Isomer der genannten Substanzen handelt.

Im ¹H NMR-Spektrum findet man die bekannten Signale der *trans*-Kaffeesäure und das Singulett der Methylestergruppe bei 3.65 ppm (siehe Bild 2.157, S. 208). Für den Chinasäureteil des Moleküls können aufgrund der Überlagerung durch Störsignale nur die Resonanzpeaks der Protonen H-3 und H-5 für den Vergleich mit den Literaturdaten herangezogen werden. Bei den Monokaffeoylchinasäuren ist dies jedoch ohne weiteres möglich, da sich alle Isomere, die sich durch die Position der Veresterung unterscheiden, an Hand dieser Signale eindeutig voneinander abgrenzen lassen. Nach der Gegenüberstellung der Signalshifts mit den Angaben von MORISHITA et al. (1984) kann **KC3** eindeutig als Neochlorogensäuremethylester identifiziert werden (siehe Tabelle 2.47, S. 197). Leider sind die Resonanzpeaks von H-3 und H-5 so stark verbreitert, dass sich keine Kopplungskonstanten ableiten lassen. In Analogie zu den Verbindungen **KC1** und **KC2** wird jedoch davon ausgegangen, dass auch **KC3** in der Sessel-Konformation **II** vorliegt, in der die Methoxycarbonyl-Gruppe eine axiale Position einnimmt.

Wie **KC1** und **KC2** konnte auch **KC3** aus *Coffea arabica* [MORISHITA et al., 1984] und *Cynara scolymus* [DRANIK, 1966] isoliert werden. Für die Gattung *Eupatorium* liegt nur ein Beleg für *E. cannabinum* vor [OSWIECIMSKA und SENDRA, 1972].

³ Die Strukturformel zeigt **KC3** in der in DMSO-d₆ vorliegenden ¹C₄-Konformation

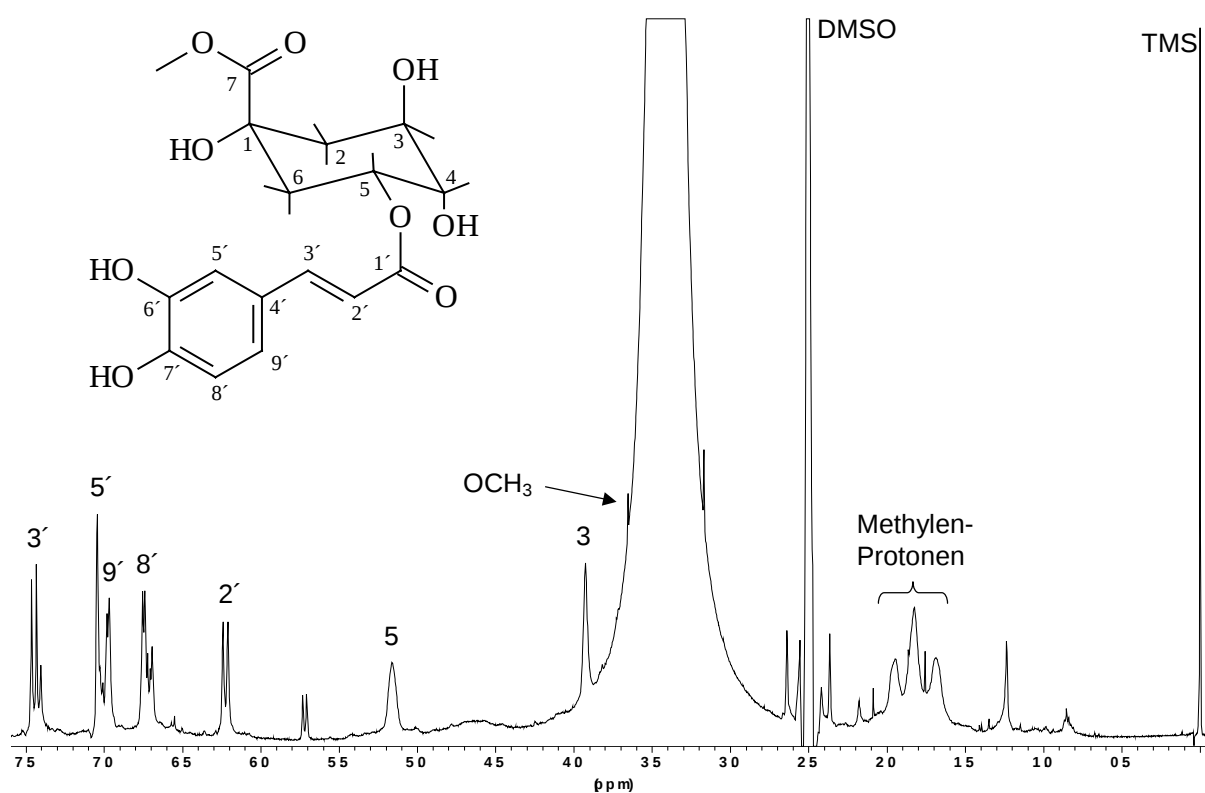
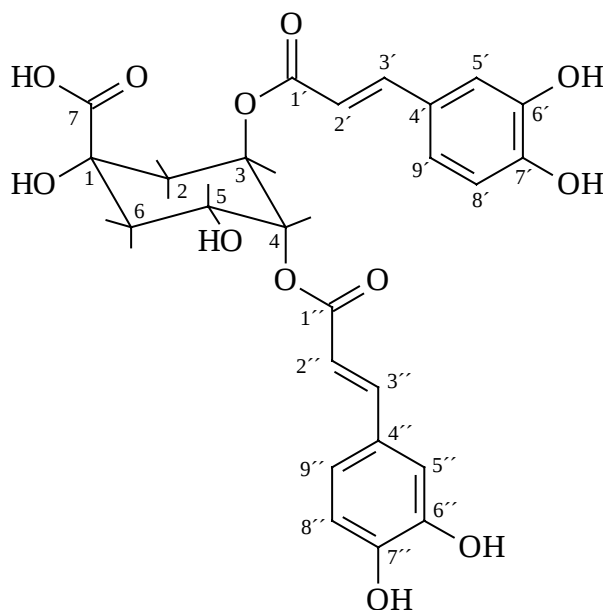


Bild 2.157: Protonenspektrum der Substanz **KC3** (500 MHz, DMSO-d₆, TMS)

2.4.5 Isochlorogensäure **b** = 3,4-Dikaffeoylchinasäure (Verbindung **KC4**⁴)



Auch Verbindung **KC4** wurde aus dem Methanol-Extrakt gewonnen (Fraktion M-VII). Die Ausbeute betrug 7 mg (siehe Kap. 6.5.6.4, S. 326).

In Bezug auf die R_f -Werte und das Detektionsverhalten von **KC4** bei der DC besteht nahe Verwandtschaft zu Verbindung **KC1**. Lediglich in System DC-4, dem unpolarsten der drei verwendeten Fließmittel, ist die Laufhöhe deutlich geringer als beim Chlorogensäuremethylester **KC1** (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Dies spricht für eine gegenüber **KC1** erhöhte Polarität von **KC4**.

Sämtliche UV-Spektren von **KC4** zeigen eine große Ähnlichkeit zu den entsprechenden Spektren der Substanzen **KC1** – **KC4** (siehe Tab. 2.46, S. 195), was auf eine nahe strukturelle Verwandtschaft dieser Verbindungen schließen läßt.

Im APCI-Massenspektrum findet sich das Pseudomolekülion $[MH]^+$ bei m/z 517. An Hand des APCI-CID-Spektrums wird deutlich, dass das Schlüsselbruchstück mit 355 amu durch Abspaltung eines Kaffeoylestere aus dem Pseudomolekülion entsteht (siehe Bild 2.158, S. 210 oben). Hieraus bildet sich durch Abspaltung der Chinasäure als Neutralteilchen ein Kaffeoylestere-Kation mit einer Masse von 163 units. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass es sich bei **KC4** um eine Dikaffeoylchinasäure handeln muß, deren Carboxylgruppe im Gegensatz zu **KC1** – **KC3** frei vorliegt. Das Kaffeoylestere-Ion fragmentiert im pseudo-MS/MS/MS-Spektrum in der schon bei den anderen Kaffeoylestere-Chinasäuren **KC1** – **KC3** beobachteten Weise (vergl. Bild 2.146, S. 196 unten mit Bild 2.158, S. 210 oben).

⁴ Die Strukturformel zeigt **KC4** in der in DMSO- d_6 vorliegenden 1C_4 -Konformation

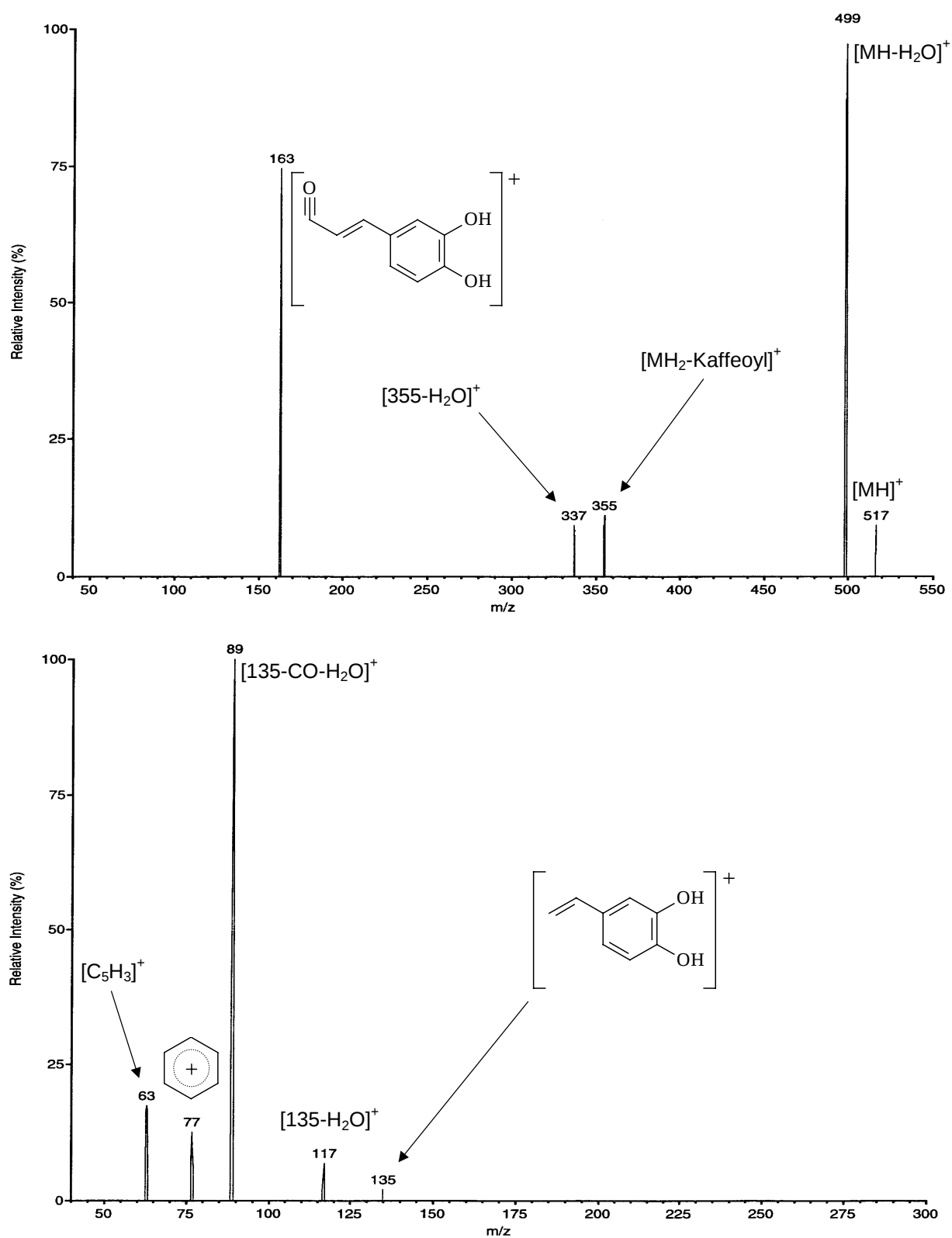


Bild 2.158: LC-MS-Spektren von Verbindung **KC4**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 163 amu (unten)

Tabelle 2.49: ^1H NMR-Daten der Verbindungen **KC4** – **KC8** (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben Isochlorogensäure a, b und c: $^1\text{MORISHITA et al., 1984}$ (360 MHz, DMSO-d_6 , TMS); *, #, §, §, ¥, = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	KC4	Isochlorogen-säure b ¹	KC5	KC6
2eq ax	2.15 <i>d</i> (12.0) 2.02 <i>d</i> (12.0)	-	2.25 <i>m</i> 2.00 <i>dd</i> (3.5, 10.7)	} 1.96 – 2.18 <i>m</i>
3	5.37 <i>brs</i>	5.37	5.27 <i>d</i> (3.5)	
4	4.96 <i>d</i> (5.0)	4.96	4.97 <i>dd</i> (3.2, 6.3)	5.15 <i>dd</i> (3.1, 6.3) 3.85 <i>dd</i> (3.1, 6.3)
5	4.17 <i>brs</i>	4.16	4.15 <i>quint</i> (3.2, 4.1, 8.5)	5.22 <i>quint</i> (3.8, 7.6)
6eq ax	2.15 <i>d</i> (12.0) 1.88 <i>d</i> (6.9)	-	2.21 <i>m</i> 1.89 <i>dd</i> (8.5, 13.0)	} 1.96 – 2.18 <i>m</i>
2'	6.24 <i>d</i> (15.8)	6.24 <i>d</i> (16.4)	6.26 <i>d</i> (15.8)	
3'	7.48 <i>d</i> (15.8)	7.48 <i>d</i> (16.4)	7.51 <i>d</i> (15.8)	6.27 <i>d</i> (15.8)* 7.50 <i>d</i> (15.8) [#]
5'	7.03 <i>d</i> (1.9)*	7.02	7.05 <i>brs</i> *	7.08 <i>d</i> (1.9) [§]
8'	6.75 <i>d</i> (8.2) [#]	6.74	6.77 <i>d</i> (8.2)	6.80 <i>d</i> (8.2) [§]
9'	6.98 <i>dd</i> (1.9, 8.2) [§]	6.98	6.99 <i>d</i> (8.2) [#]	7.01 <i>dd</i> (1.9, 8.2) [¥]
2''	6.15 <i>d</i> (15.8)	6.15 <i>d</i> (16.4)	6.13 <i>d</i> (15.8)	6.18 <i>d</i> (15.8)*
3''	7.43 <i>d</i> (15.8)	7.43 <i>d</i> (16.4)	7.42 <i>d</i> (15.8)	7.47 <i>d</i> (15.8) [#]
5''	7.02 <i>d</i> (1.9)*	7.02	7.03 <i>brs</i> *	7.06 <i>d</i> (1.9) [§]
8''	6.74 <i>d</i> (8.2) [#]	6.74	6.77 <i>d</i> (8.2)	6.79 <i>d</i> (8.2) [§]
9''	6.98 <i>dd</i> (1.9, 8.2) [§]	6.98	6.97 <i>d</i> (8.2) [#]	7.00 <i>dd</i> (1.9, 8.2) [¥]
OCH ₃	-	-	3.60 <i>s</i>	3.60 <i>s</i>
Isochlorogensäure a ¹		KC7	KC8	Isochlorogen-säure c ¹
2eq ax	-	2.09 <i>brs</i> 1.96 <i>brs</i>	2.09 <i>brs</i> 1.96 <i>brs</i>	-
3	5.19	4.15 <i>brs</i>	4.06 <i>brs</i>	4.09
4	3.83	4.93 <i>m</i>	4.99 <i>m</i>	4.92
5	5.11	5.45 <i>brs</i>	5.41 <i>m</i> (3.8)	5.41
6eq ax	-	2.09 <i>brs</i> 1.79 <i>brs</i>	2.23 <i>d</i> (10.8) 1.96 <i>brs</i>	-
2'	6.26 <i>d</i> (15.3)	6.22 <i>d</i> (15.8)*	6.25 <i>d</i> (15.8)*	6.23 <i>d</i> (16.4)
3'	7.47 <i>d</i> (15.3)	7.46 <i>d</i> (15.8) [#]	7.47 <i>d</i> (15.8) [#]	7.45 <i>d</i> (16.4)
5'	-	7.01 <i>s</i>	7.07 <i>s</i> [§]	7.02
8'	-	6.73 <i>d</i> (8.2) [§]	6.76 <i>s</i>	6.75
9'	-	6.96 <i>d</i> (8.2) [§]	6.95 <i>d</i> (7.9) [§]	6.96
2''	6.24 <i>d</i> (15.3)	6.16 <i>d</i> (15.8)*	6.17 <i>d</i> (15.8)*	6.19 <i>d</i> (16.4)
3''	7.44 <i>d</i> (15.3)	7.42 <i>d</i> (15.8) [#]	7.44 <i>d</i> (15.8) [#]	7.45 <i>d</i> (16.4)
5''	-	7.01 <i>s</i>	7.04 <i>s</i> [§]	7.02
8''	-	6.72 <i>d</i> (8.2) [§]	6.76 <i>s</i>	6.75
9''	-	6.95 <i>d</i> (8.2) [§]	6.92 <i>d</i> (7.9) [§]	6.96
OCH ₃	-	-	3.64 <i>s</i>	-

Tabelle 2.50: ^{13}C NMR-Daten der Substanzen **KC4** und **KC5** (125 MHz, DMSO-d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben für Isochlorogensäure b: ¹TIMMERMANN et al., 1989 (CDCl_3 , phenolische OH-Gruppen wurden vor der Messung methyliert); *, #, § = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm]

C	KC4	Isochlorogensäure b ¹	KC5
1	73.42 [*]	75.6	72.97
2	36.81	39.4	35.94
3	67.04	67.1	67.65
4	73.47 [*]	74.9	71.87
5	66.42	69.1	65.16
6	36.81	37.3	37.58
7	175.03	174.4	173.26
1'	166.20	166.8 [*]	165.82
2'	114.04	115.4	113.66
3'	145.76	145.8 [#]	145.67
4'	125.61	127.2	125.26
5'	115.04	109.7	114.74 [*]
6'	145.76	149.2	145.67
7'	148.67	151.3	149.05 [#]
8'	115.98 [§]	111.0	115.72
9'	121.66 [#]	123.0 [§]	121.29
1''	165.78	166.4 [*]	165.12
2''	113.80	115.4	113.52
3''	145.76	145.5 [#]	145.67
4''	125.61	127.2	125.11
5''	115.04	109.7	114.62 [*]
6''	145.76	149.2	145.67
7''	148.67	151.3	148.49 [#]
8''	115.92 [§]	111.0	115.72
9''	121.55 [#]	122.9 [§]	121.29
OCH ₃	-	53.4	51.89

Das ^1H NMR-Spektrum bestätigt, dass es sich bei **KC4** um eine Dikaffeoylchinasäure handeln muß, da die bekannten Signale der Kaffesäure doppelt vorkommen (siehe Bild 2.159, S. 213). Von den Shiftwerten der Methinprotonen H-3 (5.37 ppm), H-4 (4.96 ppm) und H-5 (4.17 ppm) kommt von den möglichen Isomeren nur die 3,4-Dikaffeoylchinasäure in Betracht [MORISHITA et al., 1984]. In den eindimensionalen NMR-Spektren taucht weder das von **KC1** – **KC3** bekannte Methoxysignal noch irgendein anderes Signal für einen potentiellen Substituenten der COOH-Gruppe der Chinasäure auf. Das beweist, dass **KC4** eine freie Carboxylgruppe besitzt. Wie die bisher diskutierten Kaffeoylechinasäuren liegt auch **KC4** in DMSO-d_6 in der $^1\text{C}_4$ -Konformation vor, in der die Carboxylgruppe der Chinasäure axial angeordnet ist.

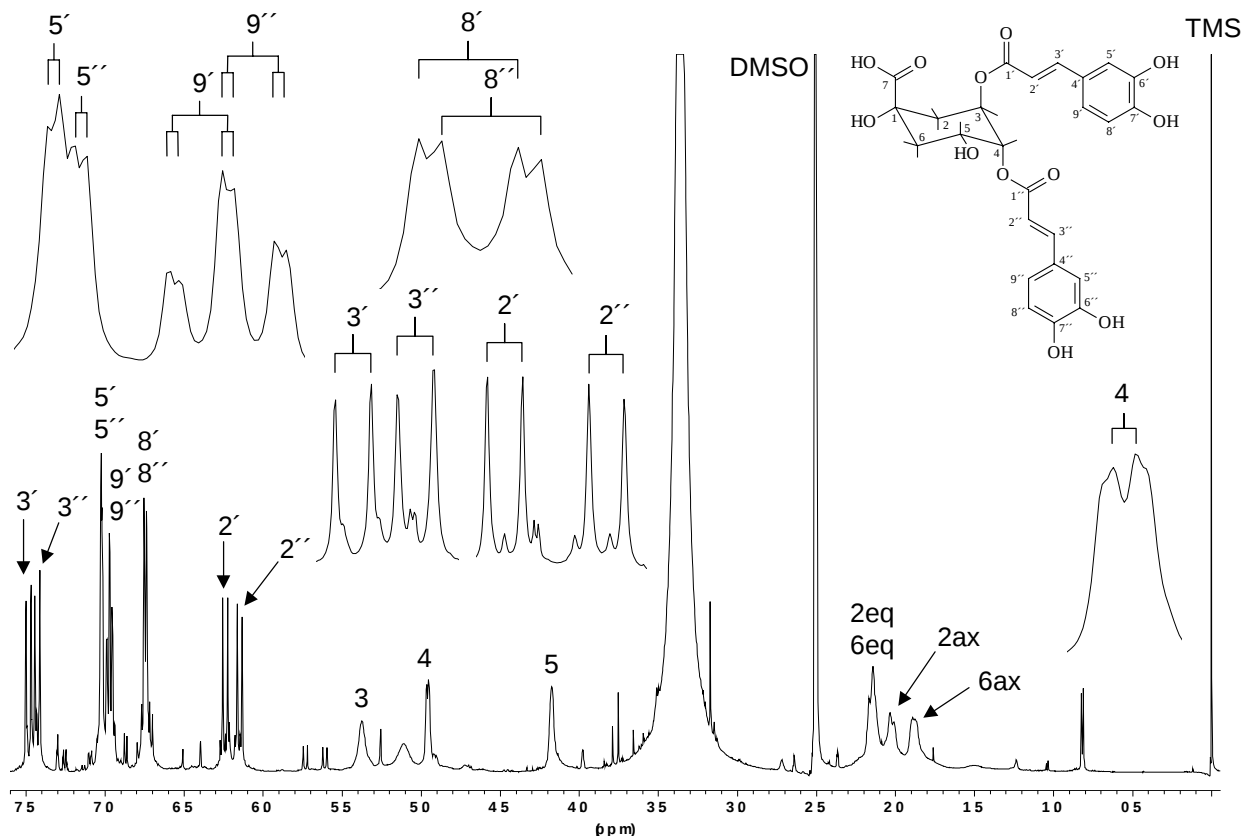


Bild 2.159: ^1H -NMR-Spektrum der Substanz **KC4** (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

Am Beginn der phytochemischen Erforschung der Chinasäure und ihrer Kaffeesäureester wurde ein Dreiergemisch von Diestern isoliert, welches als „Isochlorogensäure“ bezeichnet wurde. Obwohl die Identität der Einzelkomponenten noch nicht bekannt war, wurde jedem der drei beteiligten Verbindungen ein Buchstabe zugeordnet. Erst einige Jahre nach dieser Benennung gelang es, das Gemisch in seine Bestandteile aufzutrennen. Es stellte sich heraus, dass es sich bei „Isochlorogensäure“ um ein Gemisch aus 3,4-, 3,5- und 4,5-Dikaffeoylchinasäure handelt. Die „Isochlorogensäure b“ war mit der 3,4-Dikaffeoylchinasäure identisch.

Die Substanz kommt nicht nur in Kaffeebohnen vor [MORISHITA et al., 1984], sie konnte z.B. auch aus der Asteracee *Chrysothamnus paniculatus* isoliert werden [TIMMERMANN et al., 1983]. Für die Gattung *Eupatorium* existiert bislang lediglich ein Nachweis für *E. cannabinum* [PROKSCH und SIEBERTZ, 1993].

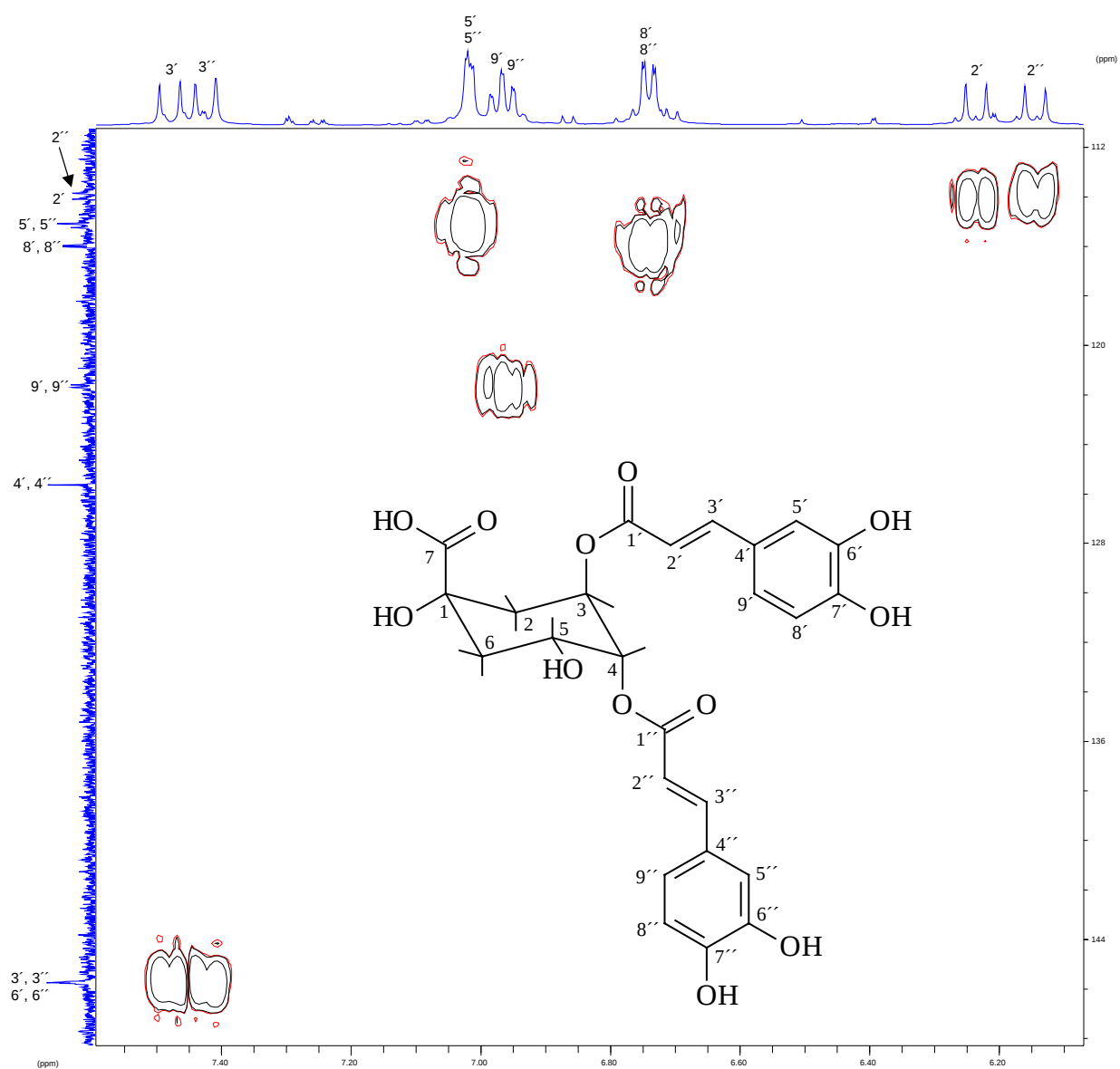
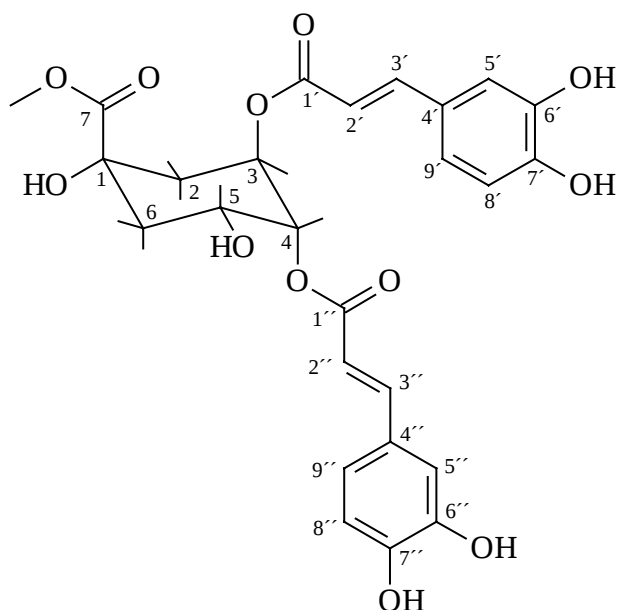


Bild 2.160: Ausschnitt aus dem HMQC-Spektrum von **KC4** mit den Kreuzsignalen der Kaffeesäure-Partialstrukturen (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

2.4.6 Isochlorogensäure b-methylester = 3,4-Dikaffeoylchinasäuremethylester (Verbindung KC5⁵)



KC5 wurde bei der Aufarbeitung von Fraktion M-VII des Methanol-Extraktes in einer Ausbeute von 50 mg erhalten (siehe Kap. 6.5.6.4, S. 326).

Die Substanz **KC5** erscheint bei der DC in den drei verwendeten Fließmitteln (DC-1, DC-2 und DC-4) bei jeweils etwas höheren R_f -Werten als die bisher besprochenen Kaffeoylechinasäure-Derivate (siehe Tabelle 6.1, S. 298).

Die Ergebnisse der UV-spektroskopischen Messungen von **KC5** differieren kaum von denen der Verbindungen **KC1** bis **KC4** (siehe Tab. 2.46, S. 195). Dies spricht dafür, dass **KC5** strukturell nahe mit den genannten Verbindungen verwandt ist.

Im APCI-MS-Spektrum wird der Molpeak bei m/z 531 detektiert (siehe Bild 2.161, S. 216). Damit ist die Substanz um 14 amu schwerer als **KC4**. Die weitere Fragmentierung des Moleküls von **KC5** verläuft analog Verbindung **KC4** (siehe Bild 2.158, S. 210). Dies deutet darauf hin, dass **KC5** der Methylester von **KC4** sein könnte.

Die Bestätigung dieser These ergibt sich durch die Kernresonanzspektren von **KC5**, die denen von **KC4** zwar weitgehend gleichen, jedoch auch den entscheidenden Unterschied zu **KC4** deutlich werden lassen. Im ^1H NMR-Spektrum von **KC5** existiert nämlich ein zusätzliches Singulett für drei Protonen bei 3.60 ppm (siehe Bild 2.162, S. 217). Das korrespondierende Kohlenstoffsignal tritt bei 51.89 ppm im ^{13}C NMR-Spektrum von **KC5** auf (siehe Bild 2.163, S. 217). Es handelt sich dabei um die von **KC1** bis **KC3** bekannten Signale der Methylestergruppe. Die Richtigkeit der Zuordnung wird durch entsprechende Crosspeaks in den aufgenommenen 2D-Spektren bewiesen (siehe Bild 2.164, S. 218 und Bild 2.165, S. 218). Somit scheint es plausibel, dass ein Teil von **KC4** während der Aufarbeitung in den korrespondierenden Methylester **KC5** (3,4-Dikaffeoylchinasäuremethylester) überführt wurde

⁵ Die Strukturformel zeigt **KC5** in der in DMSO- d_6 vorliegenden $^1\text{C}_4$ -Konformation

[JERGA, 1989]. Die Kopplungskonstanten der Protonen H-4 und H-5 in DMSO- d_6 (siehe Tabelle 2.49, S. 211) sprechen auch bei **KC5** für die 1C_4 -Konformation der Chinasäure.

Wie **KC4** konnte auch **KC5** aus *Coffea arabica* [MORISHITA et al., 1984] und *Chrysothamnus paniculatus* [TIMMERMAN et al., 1983] isoliert werden. Der einzige Bericht über eine Isolierung der Substanz aus einer *Eupatorium*-Art liegt für *E. cannabinum* vor [PROKSCH und SIEBERTZ, 1993].

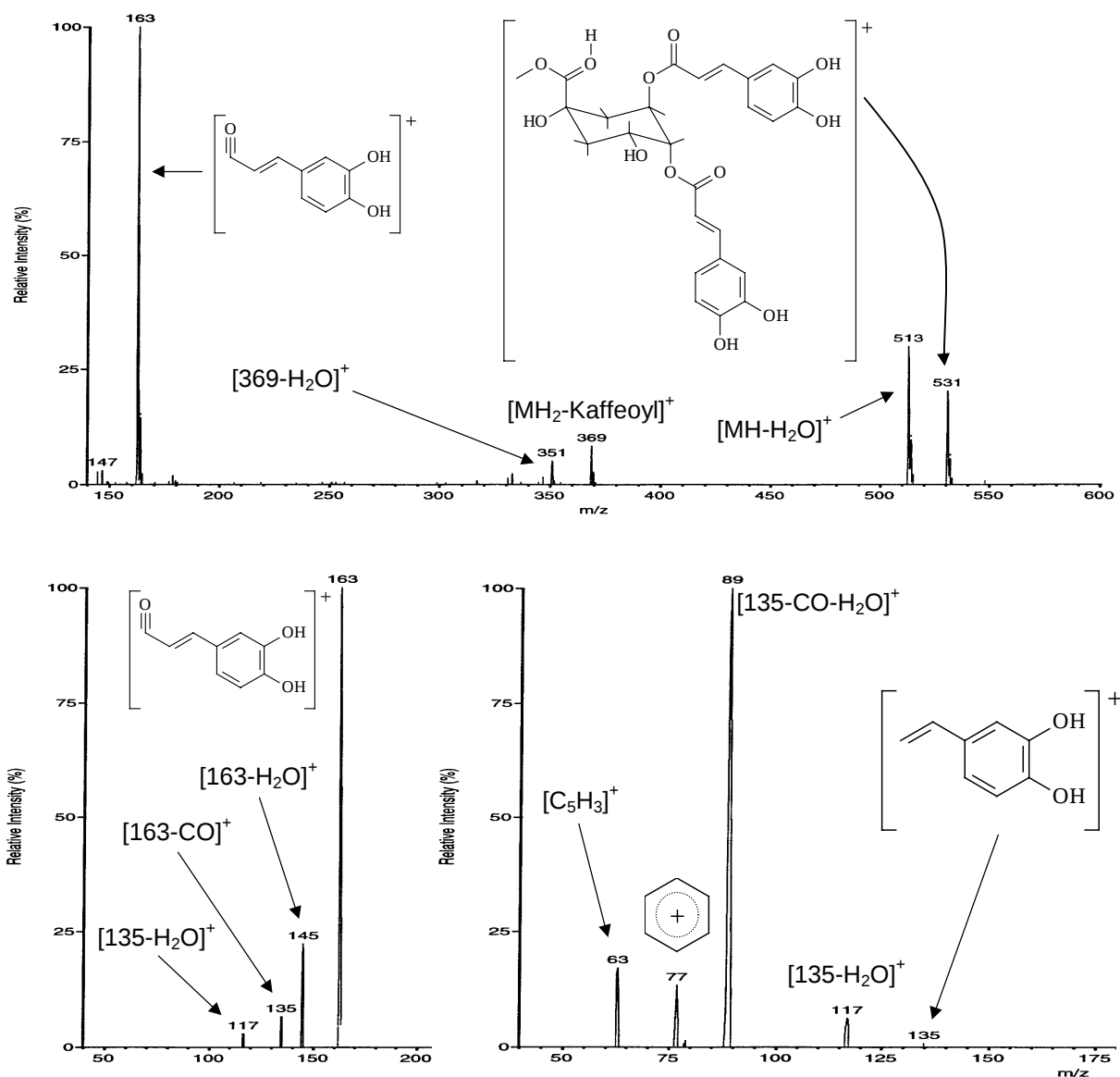
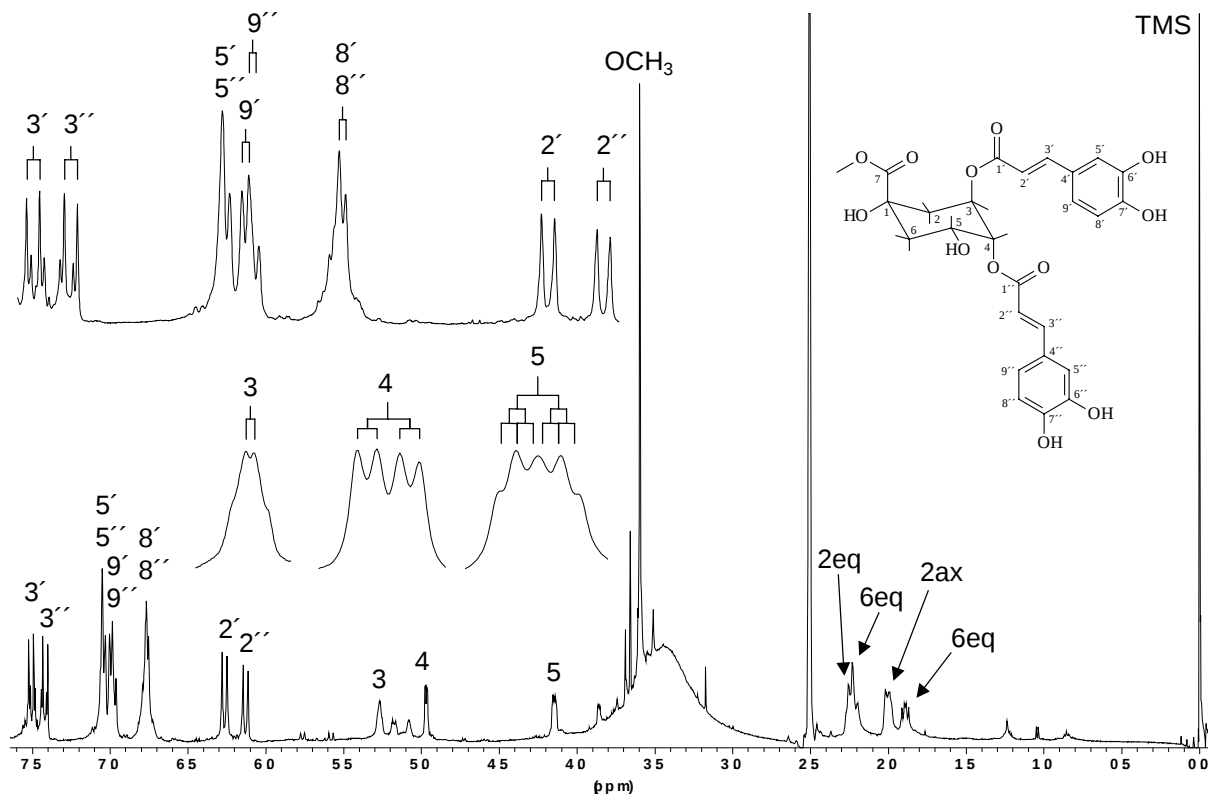
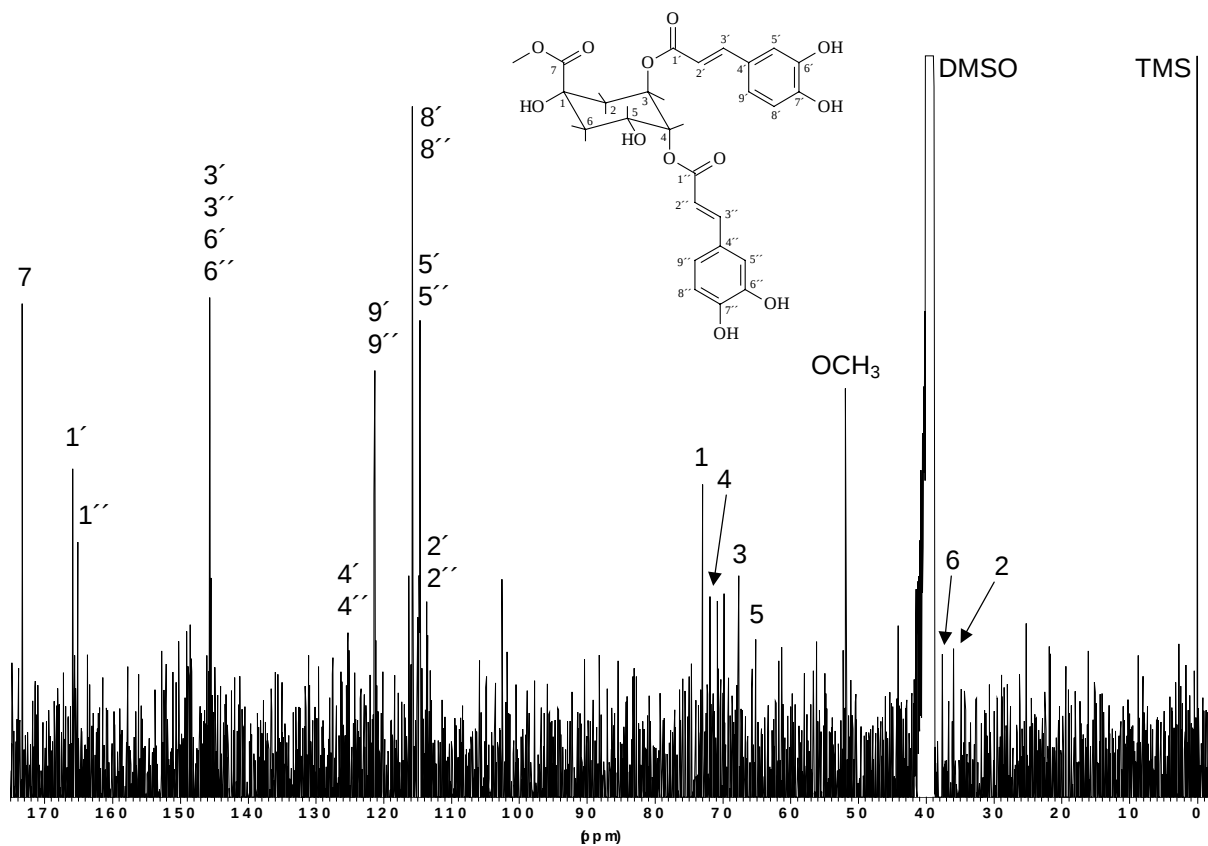
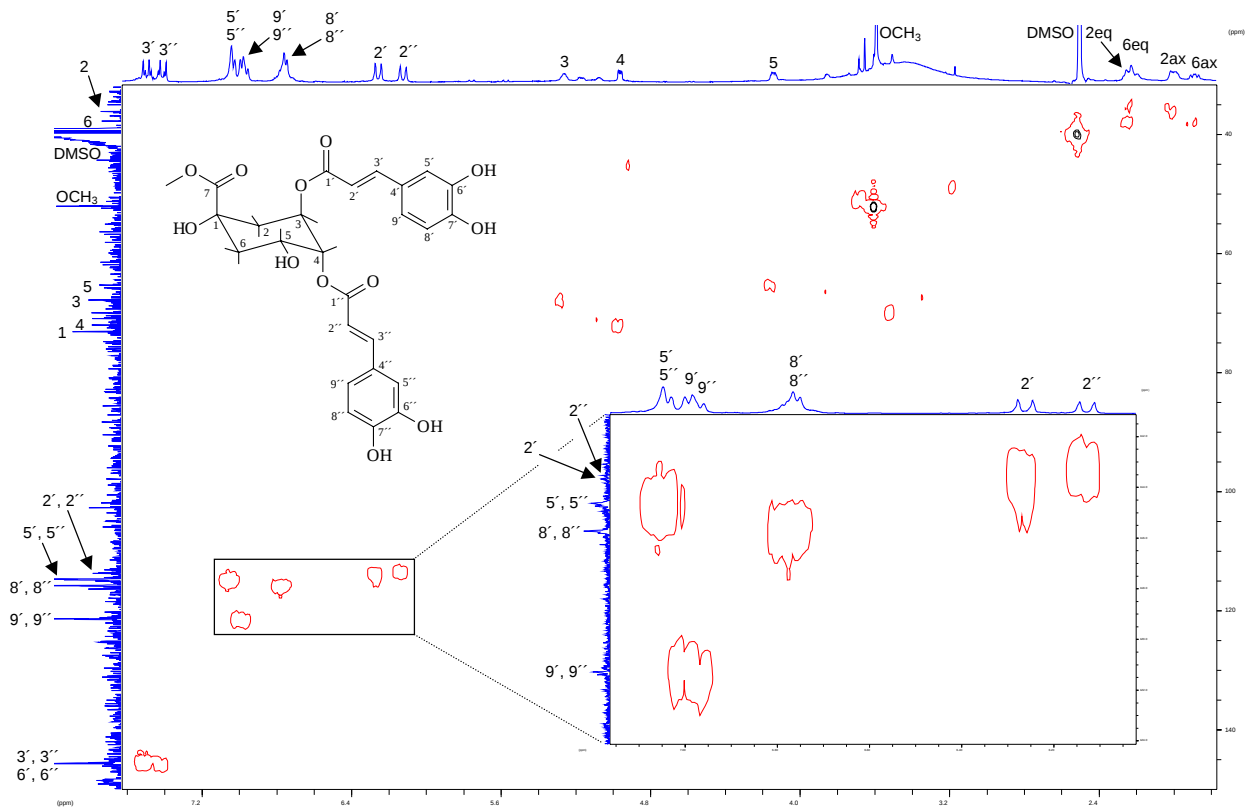
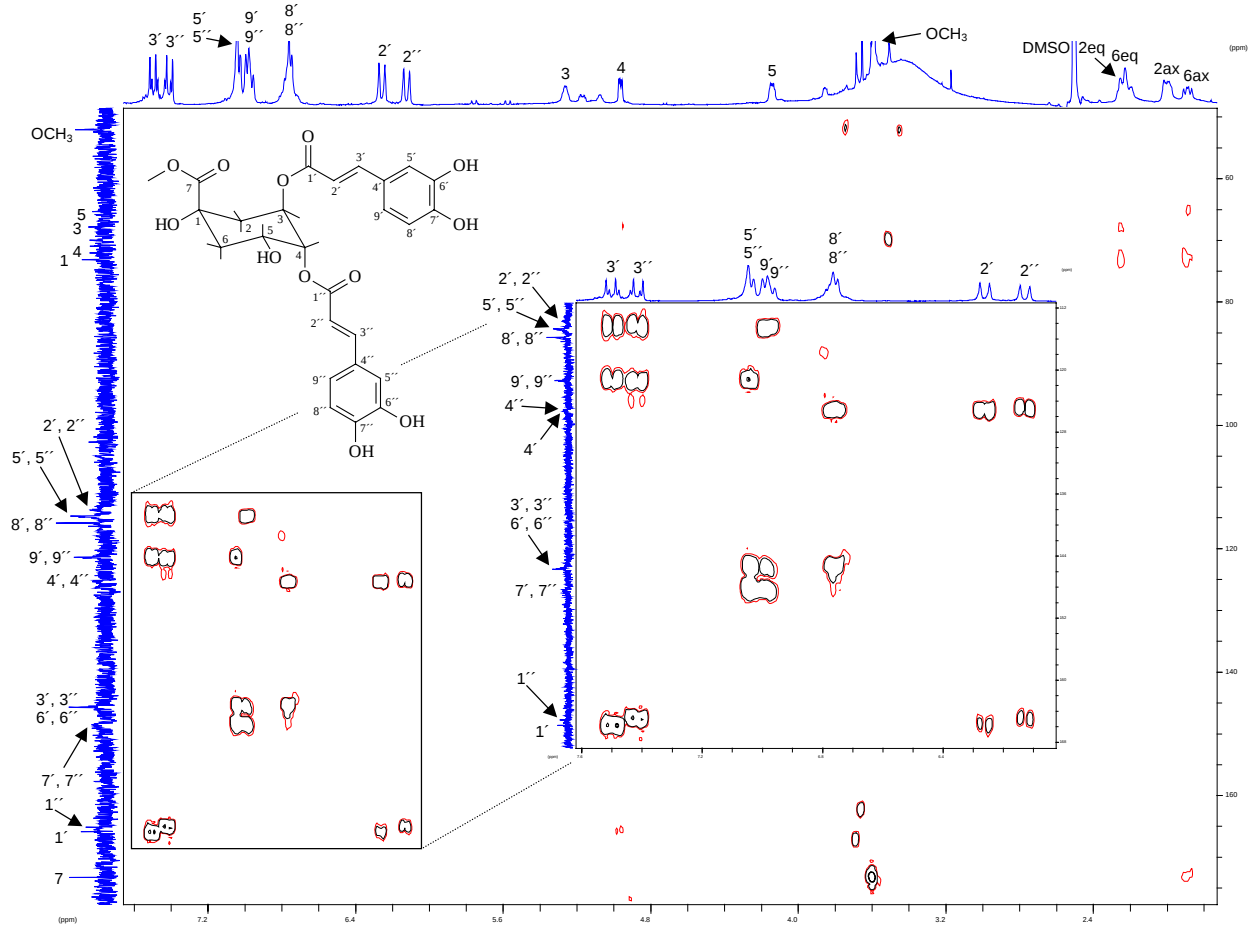
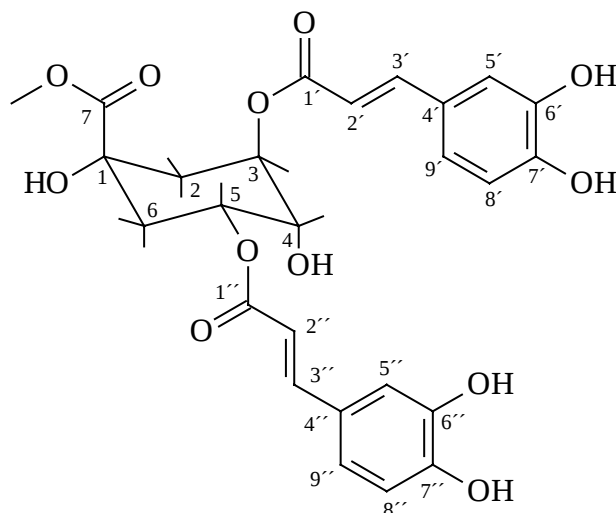


Bild 2.161: LC-MS-Spektren von Verbindung **KC5**: APCI-Spektrum (oben), APCI-CID-Spektren (unten links) sowie pseudo-MS/MS/MS-Spektrum des Fragmentes mit 163 amu (unten rechts)

Bild 2.162: ¹H-NMR-Spektrum der Substanz **KC5** (500 MHz, DMSO-d₆, TMS)Bild 2.163: ¹³C NMR-Spektrum der Verbindung **KC5** (125 MHz, DMSO-d₆, TMS)

Bild 2.164: HMQC-Spektrum von **KC5** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)Bild 2.165: HMBC-Spektrum von **KC5** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

2.4.7 Isochlorogensäure α -methylester = 3,5-Dikaffeoylchinasäuremethylester (Verbindung **KC6**⁶)



Die Verbindung **KC6** konnte aus Fraktion M-VIII des Methanol-Extraktes gewonnen werden. Die dabei erzielte Ausbeute betrug 40 mg (siehe Kap. 6.5.6.5, S. 326).

Das Detektionsverhalten bei der DC stimmt zwar weitgehend mit dem der Substanzen **KC1** bis **KC5** überein, bei den Retentionsfaktoren in den verschiedenen Fließmitteln werden jedoch deutliche Unterschiede sichtbar (siehe Tabelle 6.1, S. 298).

Keine relevanten Abweichungen von den Meßdaten der Substanzen **KC1** bis **KC5** existieren bei den UV-Shifts (siehe Tab. 2.46, S. 195).

Die Massenspektren von **KC6** sind weitgehend mit denen von **KC5** identisch. Das bedeutet, dass **KC6** ebenfalls ein Dikaffeoylchinasäure-Derivat sein sollte, dessen Carboxylgruppe mit Methanol verestert ist.

Die eindimensionalen Kernresonanzspektren von **KC6** zeigen wie bei **KC5** die bei einer Verbindung der postulierten Struktur zu erwartenden Signale (siehe Bild 2.166, S. 220 und Bild 2.167, S. 220). Mit Hilfe des zusätzlich aufgenommenen HMQC-Spektrums lassen sich die Protonensignale den korrespondierenden Kohlenstoffen zuordnen (siehe Bild 2.168, S. 222). Der Vergleich der Protonenshifts mit den Daten von MORISHITA et al. (1984) zeigt, dass es sich bei **KC6** nur um das 3,5-Dikaffeoyl-Isomer handeln kann, wobei allerdings in der genannten Publikation die Shifts für H-3 und H-5 offensichtlich vertauscht worden sind. Die Kopplungskonstanten der Signale für die Methinprotonen der Chinasäure sind wie bei den bereits diskutierten Verbindungen **KC1** bis **KC5** ein Indiz dafür, dass auch **KC6** in DMSO- d_6 in der Konformation mit axialer Methoxycarbonylgruppe vorliegt.

⁶ Die Strukturformel zeigt **KC6** in der in DMSO- d_6 vorliegenden 1C_4 -Konformation

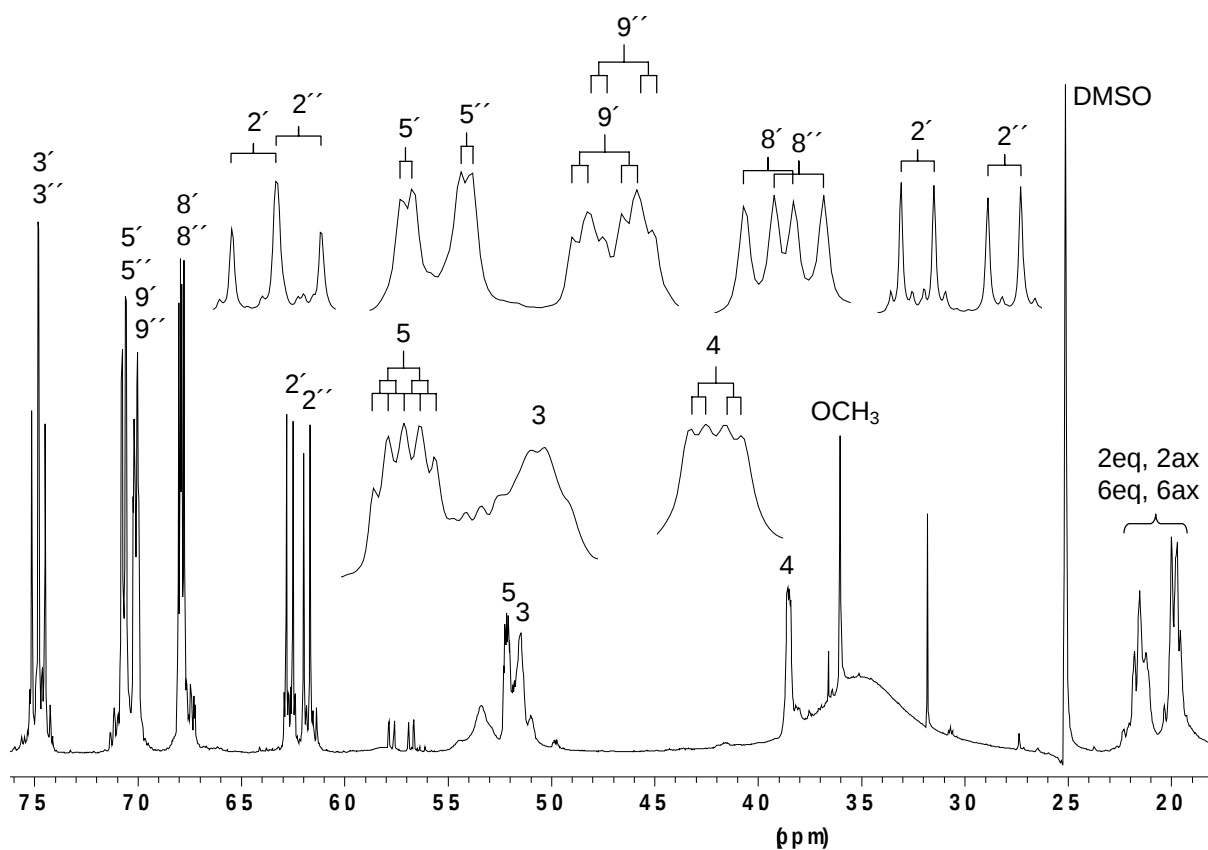


Bild 2.166: ^1H -NMR-Spektrum der Substanz **KC6** (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

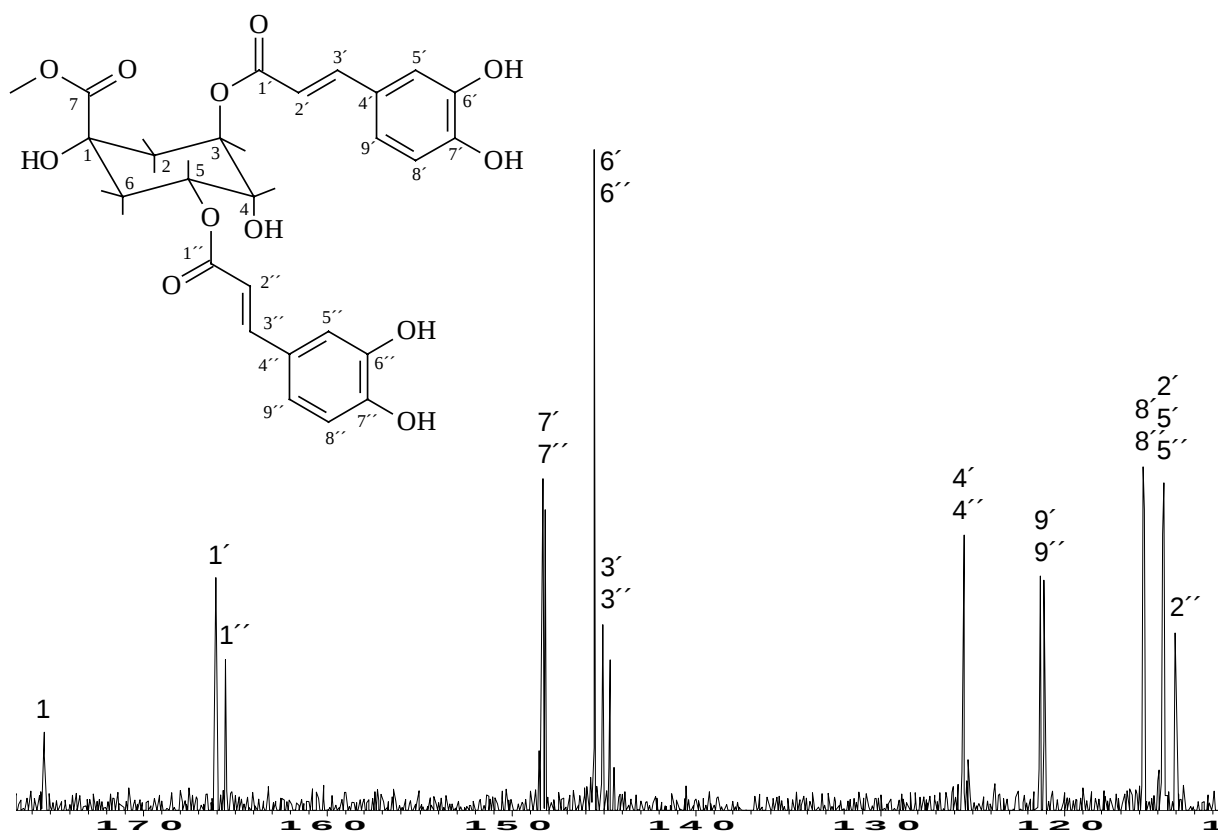


Bild 2.167: Resonanzbereich der Kaffeesäure-Signale aus dem ^{13}C NMR-Spektrum der Verbindung **KC6** (125 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

Tabelle 2.51: ^{13}C NMR-Daten der Substanzen **KC6** bis **KC8** (125 MHz, DMSO- d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben für Isochlorogensäure **a** und **c**: ¹TIMMERMANN et al., 1989 (CDCl₃, phenolische OH-Gruppen wurden vor der Messung methyliert); *, #, §, ¥, ±, †, ‡ = Zuordnung vertauschbar; δ [ppm]

C	KC6	Isochloro- gensäure a ¹	KC7	KC8	Isochloro- gensäure c ¹
1	72.41	74.5	72.69	72.50	74.5
2	34.59*	38.7	36.60	38.71	41.4
3	70.79	71.7	66.10	68.12	65.5
4	67.51	70.4	72.25	72.85	75.8
5	70.55	72.6	67.79	65.33	69.0
6	35.64*	35.8	35.53	35.76	36.5
7	175.31	174.8	175.33	174.31	175.3
1'	166.02 [#]	166.8*	166.28*	166.21*	166.2*
2'	114.61 [§]	115.4 [#]	113.99 [#]	113.68	115.1 [#]
3'	145.04 [§]	145.7 [§]	145.87 [§]	146.31 [#]	145.6 [§]
4'	125.52 [¥]	127.4 [§]	125.97 [§]	125.36 [§]	127.4 [§]
5'	114.70 [§]	110.1 [¥]	115.08 [¥]	115.10 [§]	110.1 [¥]
6'	145.48	149.5	145.67 [±]	145.91 [¥]	149.5
7'	148.30 [±]	151.6	148.65	149.62 [±]	151.6
8'	115.72 [†]	111.3 [±]	115.98 [†]	116.17	111.3
9'	121.33 [‡]	123.1 [†]	121.60	121.67 [†]	122.9
1''	165.49 [#]	167.1*	165.76*	166.05*	166.9*
2''	114.02 [†]	115.4 [#]	113.93 [#]	113.68	115.6 [#]
3''	144.67 [§]	145.9 [§]	145.74 [§]	146.28 [#]	146.0 [§]
4''	125.46 [¥]	127.5 [§]	125.60 [§]	125.28 [§]	127.5 [§]
5''	114.70 [†]	110.2 [¥]	115.02 [¥]	115.01 [§]	110.2 [¥]
6''	145.48	149.5	145.65 [±]	145.66 [¥]	149.5
7''	148.17 [±]	151.6	148.65	149.48 [±]	151.6
8''	115.72 [†]	111.4 [±]	115.93 [†]	116.17	111.3
9''	121.09 [‡]	122.8 [†]	121.60	121.57 [†]	122.9
OCH ₃	51.83	53.3	-	51.96	53.3

Wie **KC4** konnte auch **KC6** z.B. aus Kaffeebohnen [MORISHITA et al., 1984] sowie der Asteraceae *Chrysanthamnus paniculatus* isoliert werden [TIMMERMANN et al., 1983]. Der einzige Vertreter der Gattung *Eupatorium*, aus dem die freie 3,5-Dikaffeoylchinasäure bisher isoliert werden konnte, ist *E. cannabinum* [PROKSCH und SIEBERTZ, 1993].

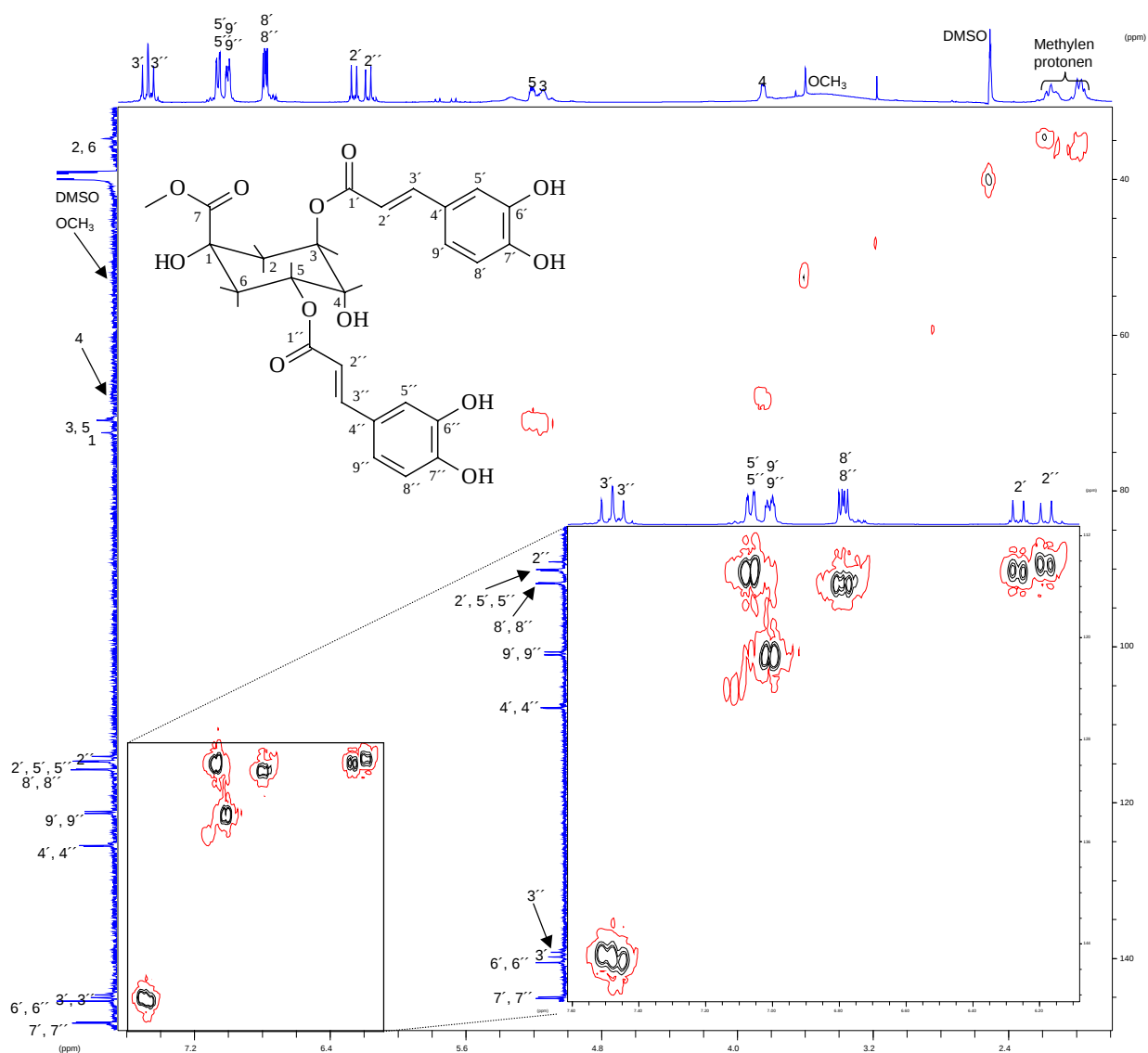
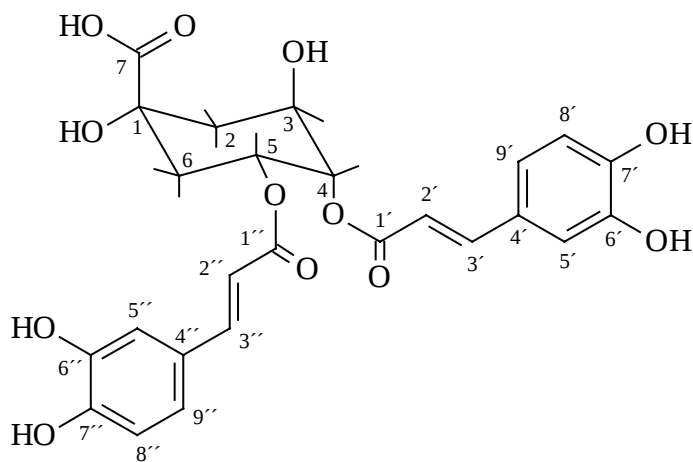


Bild 2.168: HMQC-Spektrum von **KC6** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

2.4.8 Isochlorogensäure c = 4,5-Dikaffeoylchinasäure (Verbindung KC7⁷)



Die Substanz **KC7** fiel bei der Aufreinigung der Fraktion M-VII des Methanol-Extraktes in einer Ausbeute von 6 mg an (siehe Kap. 6.5.6.4, S. 326).

Die Maxima und Schultern in den UV-Spektren von **KC7** erscheinen bei den schon bei **KC1** bis **KC6** beobachteten und für Kaffeoylechinasäure-Ester zu erwartenden Wellenlängen (siehe Tab. 2.46, S. 195).

Die Massenspektren von **KC7** weisen eine sehr große Ähnlichkeit zu denen von Verbindung **KC4** auf. Der Peak für das Pseudomolekülion liegt im APCI-MS-Spektrum bei m/z 517. Dies macht es wahrscheinlich, dass es sich bei **KC7** um ein Dikaffeoylchinasäure-Derivat mit freier Carboxylgruppe handelt.

Das ^1H NMR-Spektrum von **KC7** zeigt die für eine Dikaffeoyl-Chinasäure erwarteten Signale (siehe Bild 2.169, S. 224). Im Falle von **KC7** liegt in der Tat keine zusätzliche Veresterung mit Methanol vor, sowohl in den ein- als auch in den zweidimensionalen Spektren fehlen die entsprechenden Resonanz- bzw. Crosspeaks. Die Signallagen der Protonen H-3 (4.15 ppm), H-4 (4.93 ppm) und H-5 (5.45 ppm) sind vor dem Hintergrund der Literaturdaten nur mit einer 4,5-Dikaffeoyl-Veresterung vereinbar [MORISHITA et al., 1984]. In Analogie zu **KC1** bis **KC6** wurde auch bei der Darstellung der Strukturformel von **KC7** die $^1\text{C}_4$ -Konformation gewählt, obwohl ein direkter Nachweis der Konformation nicht erbracht werden konnte, da die Chinasäure-Signale verbreitert waren und sich demzufolge keine Kopplungskonstanten ableiten ließen.

Wie das 3,4- und das 3,5-Isomere (**KC4** – **KC6**) konnte auch die 4,5-Dikaffeoylchinasäure (**KC7**) aus *Coffea arabica* [MORISHITA et al., 1984] und *Chrysothamnus paniculatus* isoliert werden [TIMMERMAN et al., 1983]. Für die Gattung *Eupatorium* handelt es sich hier um den ersten Nachweis.

⁷ Die Strukturformel zeigt **KC7** in der in DMSO- d_6 vorliegenden $^1\text{C}_4$ -Konformation

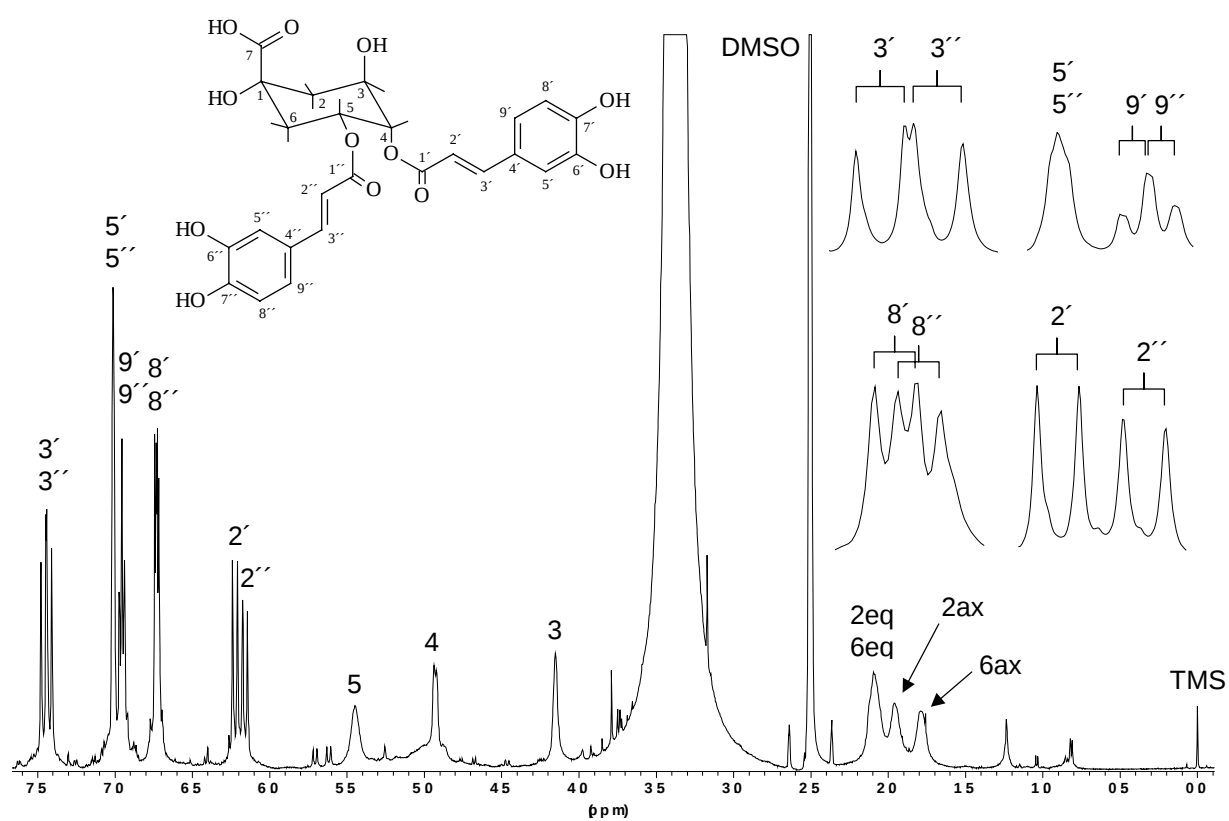
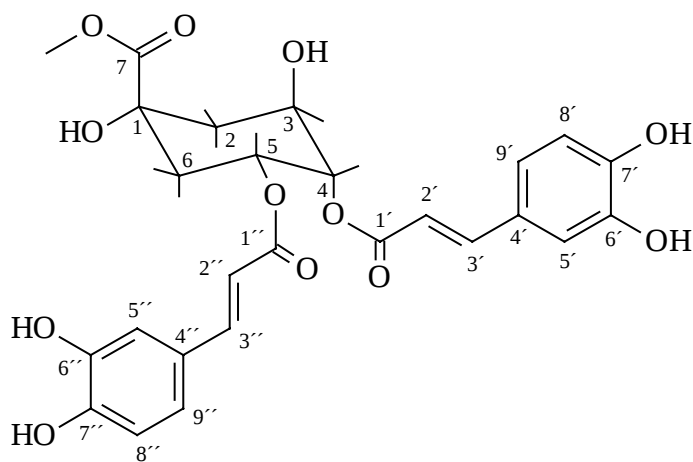


Bild 2.169: ^1H -NMR-Spektrum der Substanz **KC7** (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

2.4.9 Isochlorogensäure c-methylester = 4,5-Dikaffeoylchinasäuremethylester (Verbindung KC8⁸)



Verbindung **KC8** fiel bei der Aufarbeitung der Fraktion M-X des Methanol-Extraktes an. Die Ausbeute an Reinsubstanz betrug 93 mg (siehe Kap. 6.5.7.19, S. 336).

Die Laufhöhen der Substanz in den Fließmitteln DC-1, DC-2 und DC-4 ähneln denen von Verbindung **KC5** (siehe Tabelle 6.1, S. 298). Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich auch bei **KC8** um den Methylester einer Dikaffeoylchinasäure handelt.

Auch die UV-Daten sprechen wegen ihrer großen Ähnlichkeit zu denen von **KC1** bis **KC7** für ein Kaffeoylchinasäure-Derivat (siehe Tab. 2.46, S. 195).

Ein Vergleich der ¹H NMR- und der ¹³C NMR-Daten von **KC8** mit denen von **KC7** sowie mit den Angaben von MORISHITA et al. (1984) führt zu dem Ergebnis, dass es sich auch bei **KC8** um einen Abkömmling der Isochlorogensäure c handeln muß. Die zusätzlichen Signale bei 3.64 ppm im Protonenspektrum (siehe Bild 2.170, S. 226) und bei 51.96 ppm im Kohlenstoff-Spektrum sowie das Kreuzsignal des Methoxysingulets mit dem Signal für das C-7 der Chinasäure (174.31 ppm) im HMBC-Spektrum (siehe Bild 2.172, S. 227) beweisen, dass es sich bei **KC8** um den Methylester von **KC7** handelt. Auch in diesem Fall ist anzunehmen, dass es während der Gewinnung des Methanol-Extraktes zur Bildung des Methylesters gekommen ist [JERGA, 1989]. Wie bei **KC7** erfolgt die Darstellung der Strukturformel von **KC8** in der ¹C₄-Konformation in Analogie zu den Substanzen **KC1** – **KC6**.

Die Literaturangaben für **KC8** sind mit denen von **KC7** identisch (siehe Kap. 2.4.8, S. 223).

⁸ Die Strukturformel zeigt **KC8** in der in DMSO-d₆ vorliegenden ¹C₄-Konformation

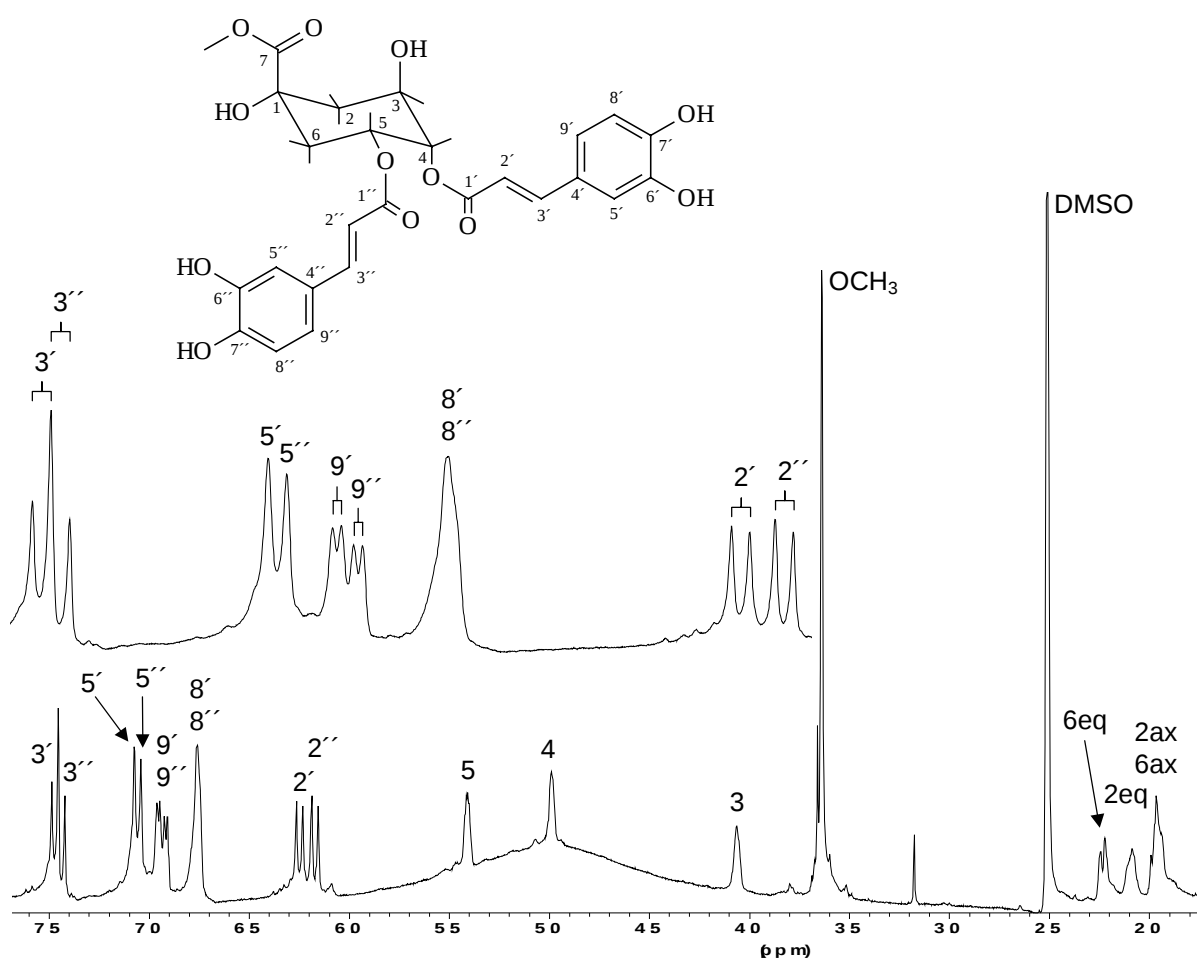
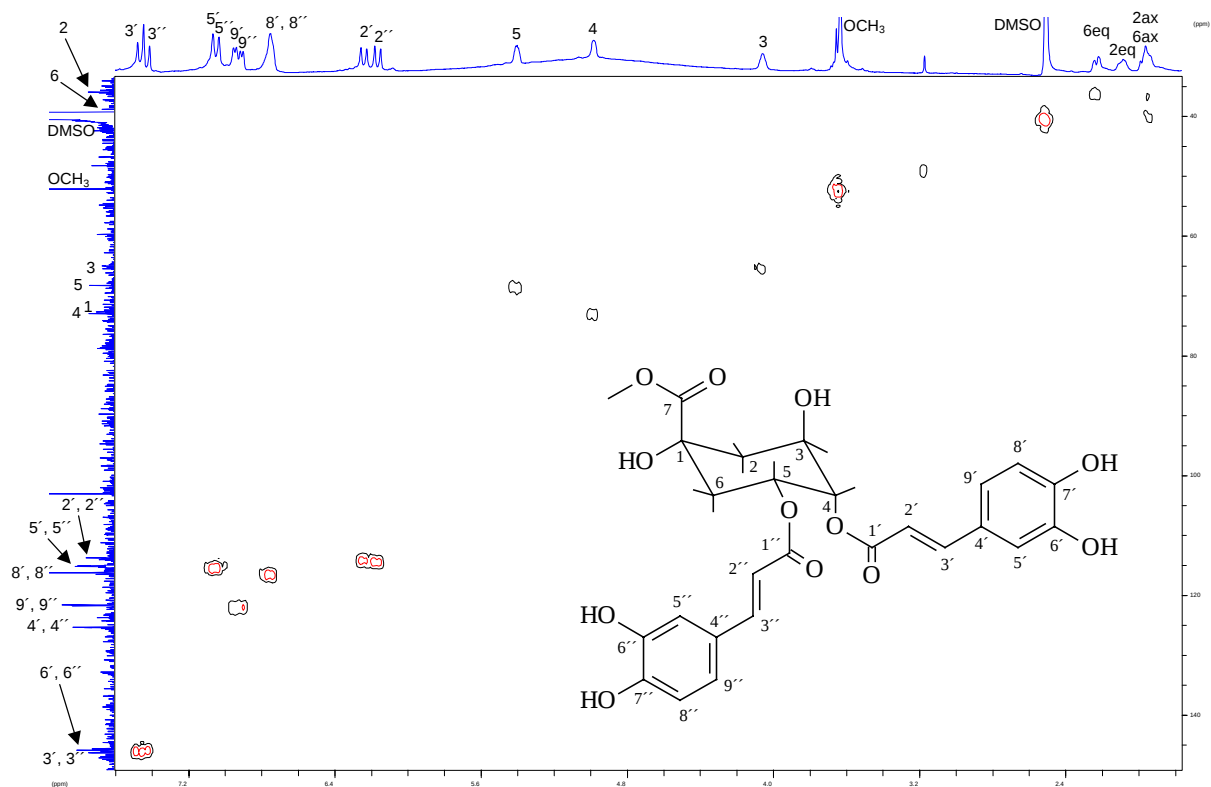
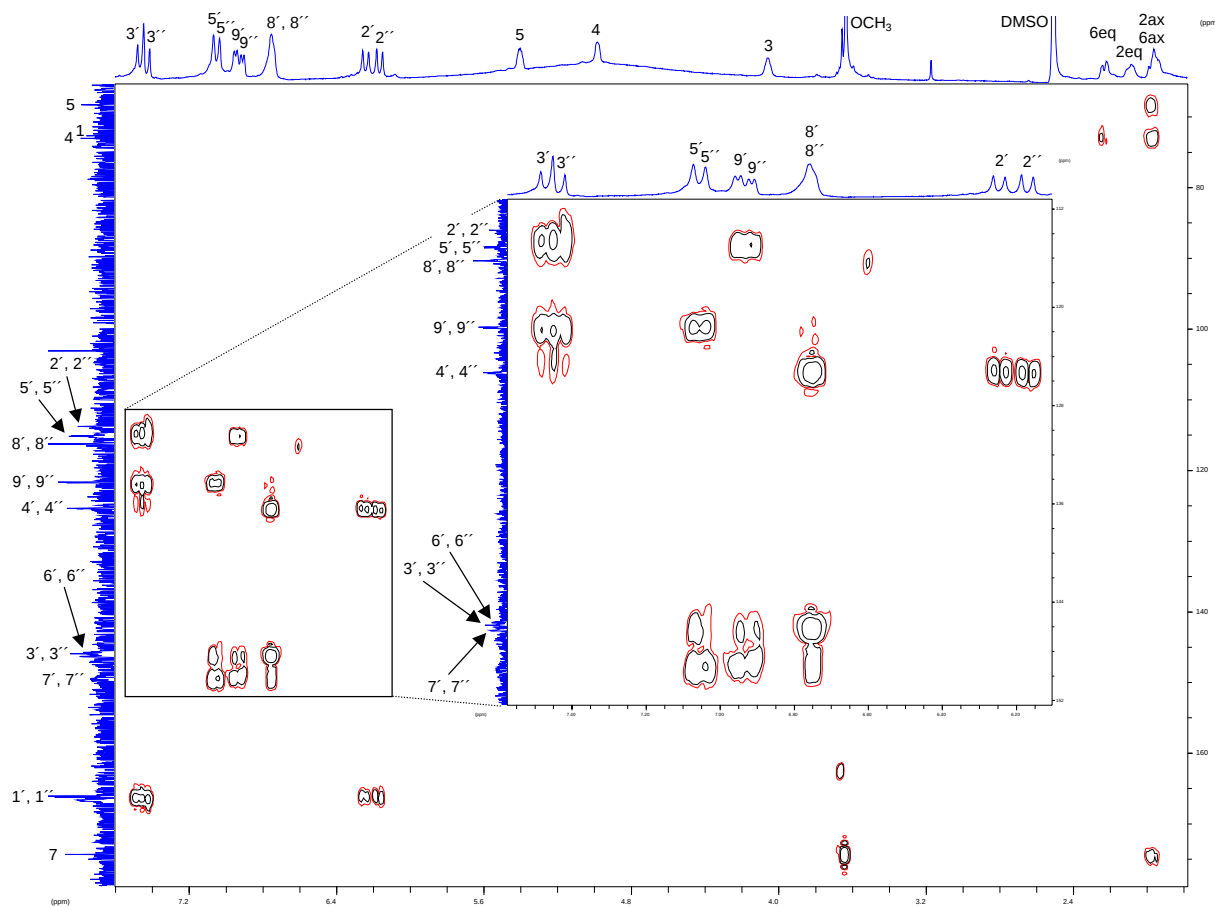


Bild 2.170: ^1H NMR-Spektrum der Substanz **KC8** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)

Bild 2.171: HMQC-Spektrum von **KC8** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-*d*₆, TMS)Bild 2.172: HMBC-Spektrum von **KC8** (500 bzw. 125 MHz, DMSO-*d*₆, TMS)

2.5 Extraktion und Identifizierung von Pyrrolizidin-Alkaloiden und Monoterpenen aus *Eupatorium semialatum*

Pyrrolizidin-Alkaloide (PA) sind bei den Samenpflanzen besonders verbreitet in Gattungen der Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae und Orchidaceae. Bei den Asteraceae konzentriert sich das Vorkommen der Alkaloide auf die Triben Eupatorieae und Senecioneae (z.B. *Adenostyles*, *Eupatorium*, *Ligularia*, *Petasites* und *Senecio*). Die PA sind jedoch nicht auf das Pflanzenreich beschränkt, auch in Pilzen können sie vorkommen [FIGUEIREDO und KAPLAN, 1997; MOLYNEUX, 1993; RÖDER, 1992 und 1995; SCHMELLER et al., 1997].

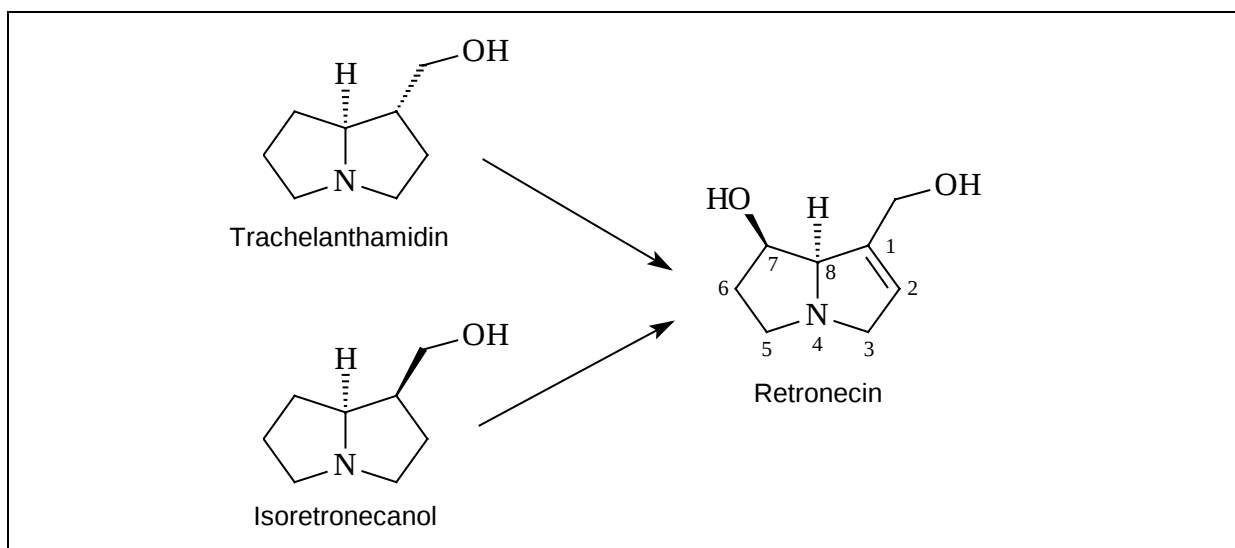


Bild 2.173: Die ersten Verbindungen mit Pyrrolizidingerüst in der Sequenz der PA-Biosynthese

Die Biogenese des heterozyklischen Grundgerüsts der PA beginnt mit der Decarboxylierung der basischen Aminosäuren L-Arginin und L-Ornithin und mündet zunächst in der Bildung der beiden einfachsten Vertreter der PA, nämlich des Trachelanthamidins und des stereoisomeren Isoretronecanols. Die beiden Moleküle können nun durch Dehydrierung und Hydroxylierung (bevorzugt an den Positionen 2, 6 und 7) modifiziert werden. So gelangt man durch Einführung einer $\Delta 1,2$ -Doppelbindung und zusätzliche Hydroxylierung an C-7 beispielsweise zum Retronecin, einem weit verbreiteten Grundkörper der PA (siehe Bild 2.173, S. 228). Die unveresterten basischen Grundkörper werden als Necine bezeichnet. Bei typischen PA sind die Grundgerüste mit sogenannten Necinsäuren, das sind meist verzweigte Mono- oder Dicarbonsäuren mit fünf bis zehn C-Atomen, verestert (siehe Bild 2.174, S. 229). Bei Necinen mit zwei OH-Gruppen kann die Veresterung entweder mit einer Monocarbonsäure an C-7 und/oder C-9 erfolgen, oder beide OH-Gruppen sind mit einer Dicarbonsäure verestert. Hierdurch entsteht ein zusätzliches 11- bis 14-gliedriges makrozyklisches Ringsystem wie beim Senecionin (siehe Bild 2.174, S. 229).

Die Biosynthese der Alkaloide findet in den Wurzeln statt, wo als erstes die N-Oxide gebildet werden. Diese Verbindungen sind wasserlöslich und können danach in die überirdischen Pflanzenteile transportiert werden, wo sie in den Vakuolen gespeichert werden [RÖDER, 1992 und 1995].

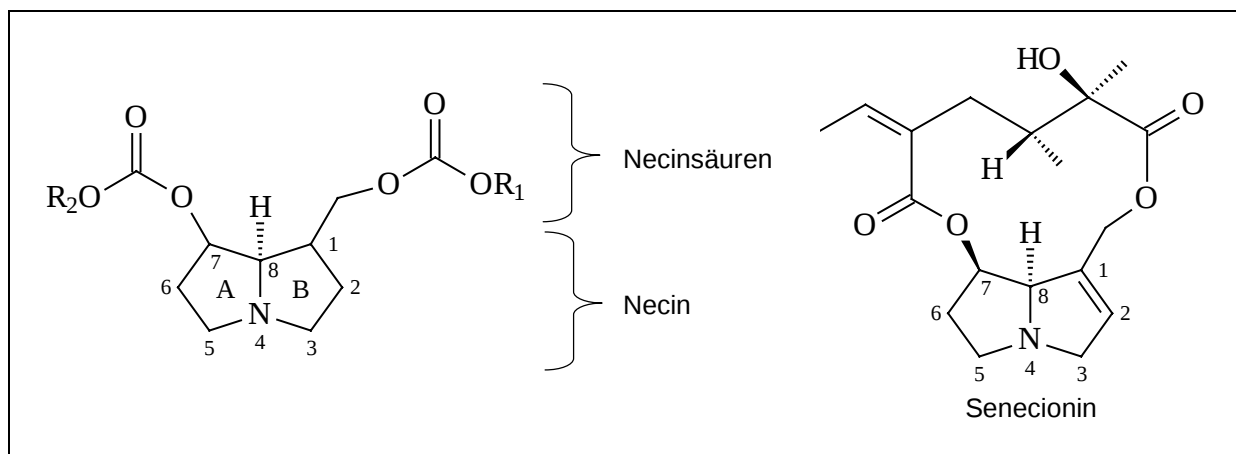


Bild 2.174: Schematischer Aufbau der veresterten Pyrrrolizidin-Alkaloide (links) sowie ein Beispiel für ein makrozyklisches Ester-PA (rechts)

PA, die eine $\Delta 1,2$ -Doppelbindung besitzen und mit mindestens einer verzweigten Necinsäure verestert sind, sind hepato- und nephrotoxisch, karzinogen und mutagen. Es finden sich zahlreiche Berichte über akute und chronische Vergiftungsfälle von Weidevieh, aber auch von Menschen, die PA-haltige Pflanzen verzehrt hatten. Die Giftigkeit ist von der Struktur der Alkaloide abhängig, z.B. steigert eine OH-Gruppe in Position 7 des Necins die Toxizität, besonders dann, wenn sie mit einer Dicarbonsäure verestert ist und eine makrozyklische Seitenkette resultiert. Nach Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt werden die PA in der Leber CYP₄₅₀-abhängig metabolisiert und dabei in hochreaktive Pyrrole umgewandelt, die das toxische Agens darstellen (siehe Bild 2.175, S. 230). In Gegenwart nukleophiler Reaktionspartner findet bei den Pyrrol-Diestern eine einfache oder zweifache bimolekulare nukleophile Substitution statt, die typischerweise zu Addukten mit der DNA und RNA oder mit Enzymen führt. Durch die dadurch eintretende Veränderung der Erbsubstanz und die Blockade verschiedener Enzyme manifestieren sich die oben beschriebenen toxischen Wirkungen der PA. Weil die Alkaloide als mono- bzw. bifunktionelle Alkylantien wirken, hat man versucht, einige von ihnen als Zytostatika zur Tumorthherapie und zur Immunsuppression einzusetzen. Die Nebenwirkungen waren jedoch so gravierend, dass keine der getesteten Verbindungen Eingang in die Therapie gefunden hat [RÖDER, 1992 und 1995].

Da viele traditionelle Heilpflanzen wie z.B. Huflattich, Borretsch oder Beinwell PA enthalten können, hat das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) die Anwendung dieser Pflanzen zum Schutze der Bevölkerung beschränkt. Danach soll die Aufnahme toxischer PA den Grenzwert von 1 µg pro Tag nicht überschreiten. Akute Toxizität entfalten die PA in Mengen größer als 1 mg, vor allem dann, wenn auf einmal mehr als 10 mg inkorporiert werden. Auch die längere Einnahme subtoxischer Dosen (weniger als 1 mg pro Tag) birgt die Gefahr der Entstehung von Tumoren [RÖDER, 1992; WIEDENFELD et al., 1995].

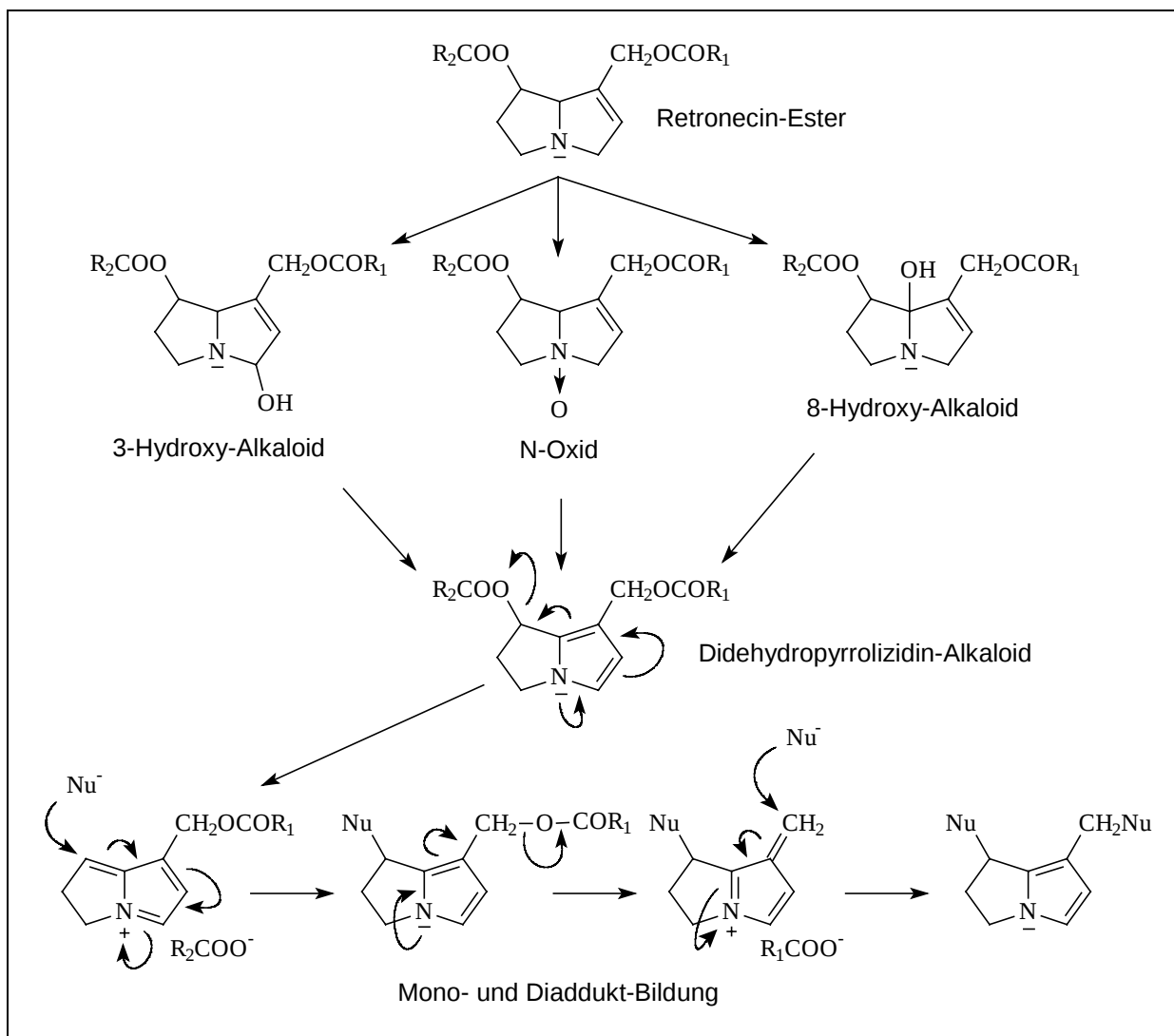


Bild 2.175: Mechanismus der Giftung von PA und der Adduktbildung der reaktiven Metaboliten mit Nucleophilen

2.5.1 Extraktion

140 g des Methanol-Extraktes wurden zur Gewinnung von Pyrrolizidin-Alkaloiden einem typischen Alkaloid-Extraktionsverfahren unterworfen (siehe Kap. 6.5.8, S. 337) [RÖDER et al., 1981 und 1984; WITTE et al., 1993]. Hierbei wurden die Alkaloide durch Ausschüttelung mit einem organischen Lösungsmittel bei verschiedenen pH-Werten aufkonzentriert und von Begleitstoffen befreit. Hieraus resultierten 142 mg eines braunen Extraktes von charakteristischem Geruch. Dieser Alkaloid-Rohextrakt wurde mittels präp. DC und Festphasenextraktion weiter gereinigt. In den dabei gewonnenen beiden Fraktionen wurden die Pyrrolizidin-Alkaloide **PA1** – **PA5** (der Pyrrolidinessigsäuremethylester **PA5** wird zur Vereinfachung der Lesbarkeit des Textes im weiteren ebenfalls als Alkaloid geführt, obwohl dies im biochemischen Sinne eigentlich nicht korrekt ist) und die beiden Monoterpene **MO1** und **MO2** an Hand ihrer GC-Retentionszeiten und Massenspektren im Vergleich mit den Daten authentischer Proben identifiziert.

2.5.2 Identifizierung der Pyrrolizidin-Alkaloide

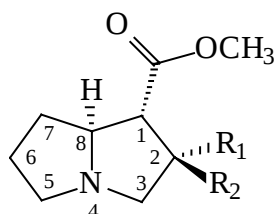
Tussilagin (Verbindung PA1)

Isotussilagin (Verbindung PA2)

Neotussilagin (Verbindung PA3)

Neoisotussilagin (Verbindung PA4)

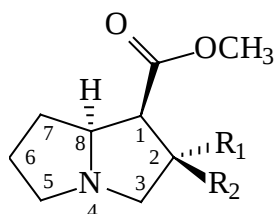
Pyrrolidin-2-essigsäuremethylester (PA5)



R₁ R₂

PA1 OH CH₃

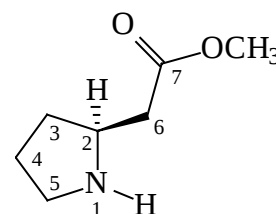
PA2 CH₃ OH



R₁ R₂

PA3 OH CH₃

PA4 CH₃ OH



PA5

Von den beiden durch Alkaloid-Extraktion gewonnenen Fraktionen I und II wurde eine DC angefertigt. Die Detektion erfolgte nach dem für PA etablierten Verfahren nach Dann und Mattocks. [DANN, 1960; MATTOCKS, 1967a, 1967b und 1968]. Hierbei werden die Alkaloide im ersten Schritt mit Wasserstoffperoxid besprüht und eine halbe Stunde auf 120°C erhitzt, wodurch sie in die N-Oxide überführt werden (siehe Bild 2.176, S. 232). Im zweiten Schritt sprüht man Acetanhydrid auf die erkaltete DC-Folie und erhitzt wie bei Schritt eins. Aus den N-Oxiden entstehen so Pyrrol-Derivate, die im UV-Licht bei 365 nm entweder bläulichweiß (gesättigte Ausgangsverbindungen) oder gelblich (ungesättigte Ausgangsverbindungen) fluoreszieren [DANN, 1960]. Im abschließenden Schritt wird mit einer stark sauren *p*-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung besprüht. Die Pyrrole kondensieren beim Erhitzen mit diesem Reagenz zu farbigen Polymethinfarbstoffen, die im Falle der untoxischen gesättigten Ausgangsverbindungen eine rotviolette, im Falle der toxischen Δ 1,2-ungesättigten Ausgangssubstanzen eine blaue Färbung zeigen. Mit diesem Verfahren lassen sich PA auf der DC-Platte noch in Mengen von 0,5 bis 1,0 μ g nachweisen [MATTOCKS, 1967a; RÖDER und NEUBERGER, 1988].

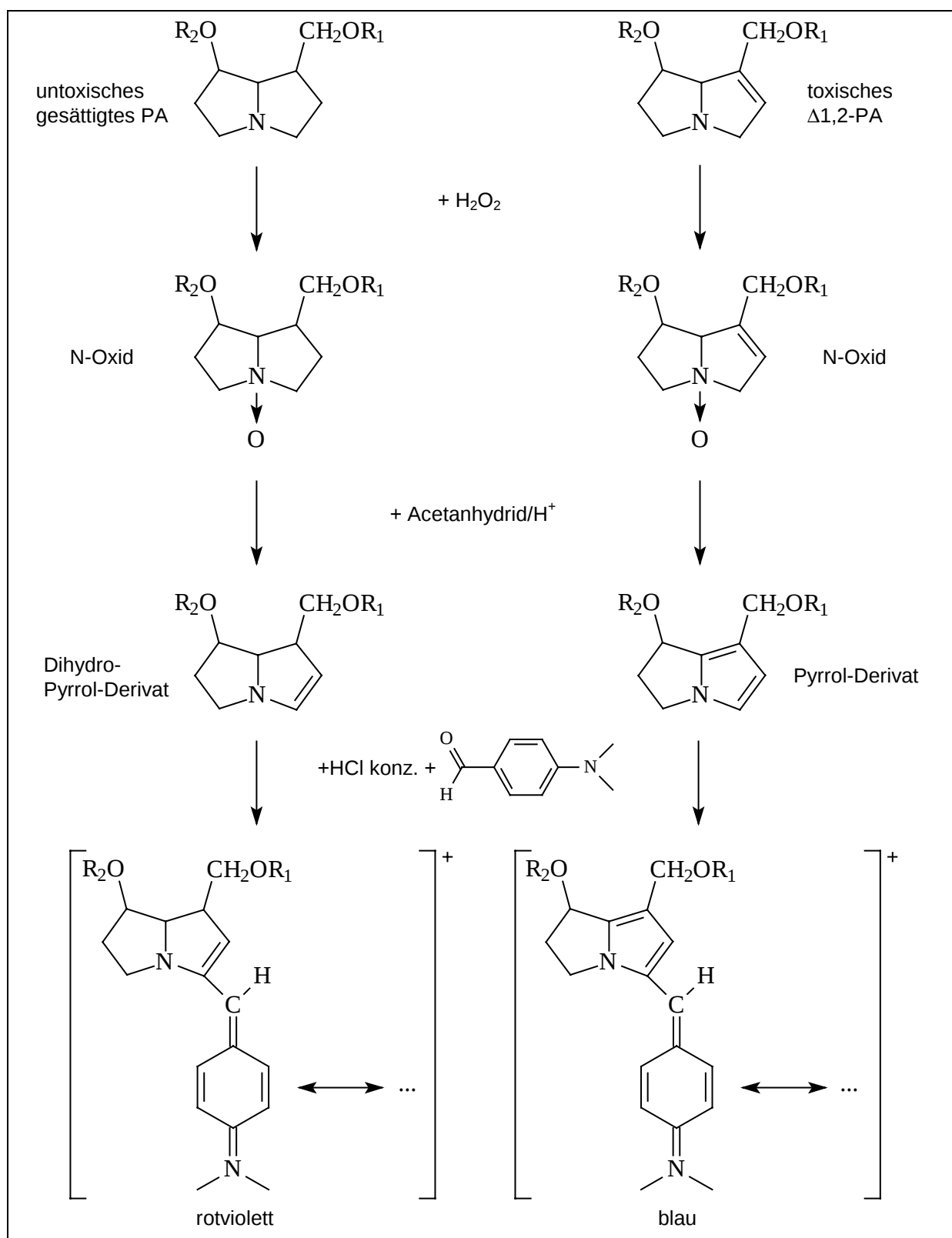


Bild 2.176: Schematische Darstellung der Farbreaktion nach Dann und Mattocks [RÖDER und NEUBERGER, 1988]

Die rosarote Farbe der Substanzbande von Fraktion I sprach eindeutig für untoxische PA, während die blaue Färbung der Reaktionsprodukte von Fraktion II auf toxische PA hindeutete (siehe Kap. 2.5.3, S. 237). Die Feinstruktur der Banden auf der DC sprach für eine Überlagerung mehrerer Verbindungen mit fast gleichen Laufhöhen und identischem Detektionsverhalten.

Auf Grund der geringen Mengen der in den beiden Fraktionen enthaltenen Substanzen war eine Isolierung der Alkaloide **PA1** – **PA5** und der Monoterpene **MO1** und **MO2** ausgeschlossen. Daher wurde eine GC-MS-Untersuchung durchgeführt, bei der alle Proben der authentischen Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen. Im Gaschromatogramm der Fraktion I waren neben immer noch vorhandenen Signalen von nicht vollständig entfernten Begleitstoffen bei den Retentionszeiten der oben angeführten Vergleichsverbindungen deutliche Substanzpeaks zu erkennen (siehe Bild 2.177, S. 233).

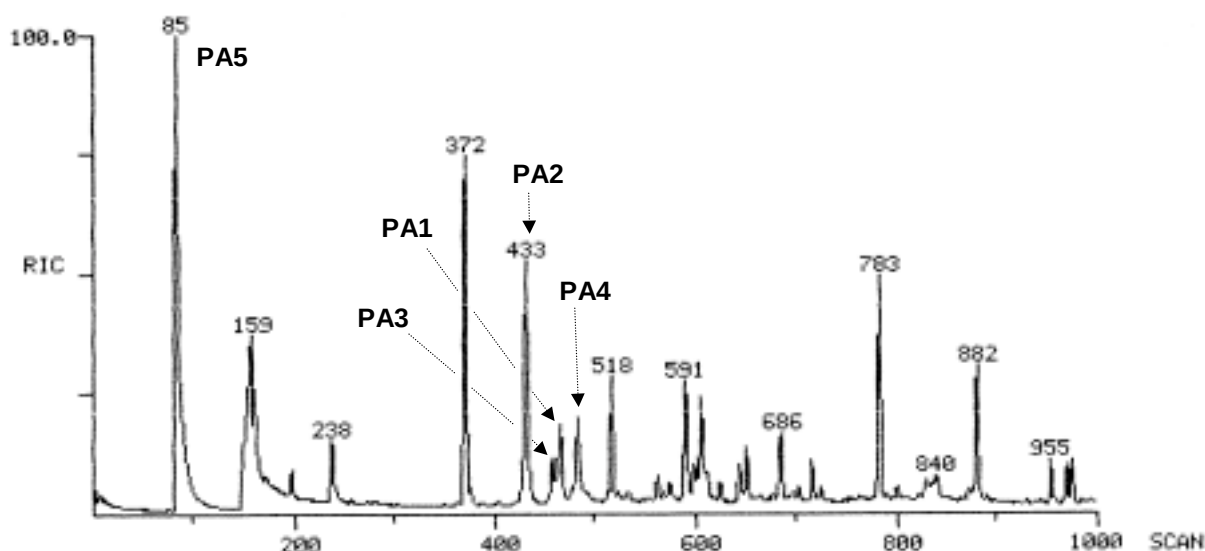


Bild 2.177: Gaschromatogramm der PA-Fraktion I

Der Vergleich der Massenspektren der in der Fraktion nachgewiesenen Alkaloide mit denen der Vergleichssubstanzen beweist in Verbindung mit den Retentionszeiten, dass im Methanol-Extrakt von *E. semialatum* die PA Tussilagin (**PA1**) und dessen C-1- und C-2-Epimere Isotussilagin, Neotussilagin und Neoisotussilagin (**PA2**, **PA3** und **PA4**) vorkommen. Die Verbindungen zeigen den charakteristischen Molpeak bei m/z 199 (siehe Bild 2.179, S. 235). Bild 2.178 auf Seite 234 zeigt am Beispiel von Tussilagin die Fragmentierung der PA-Isomere [AASEN et al., 1969]. Bei einem der beiden möglichen Zerfallswege kommt es unter Verlust eines Neutralteilchens der Masse 43 amu zur Öffnung einer der beiden annellierten Fünfringe zwischen den Atomen C-2 und C-3. Im weiteren Verlauf der Reaktionssequenz werden die Reste dieses Fünfringes komplett abgebaut, bis schließlich Pyrrol-Derivate mit den Massen 68 bzw. 70 amu entstehen. Das intermediär gebildete Radikalkation bei m/z 83 ist von seiner Stabilität her besonders begünstigt, da es Mesomerie-stabilisiert ist. Dies ist wohl auch der Grund dafür, dass dieses Teilchen in den MS-Spektren aller vier Epimere den Basispeak verursacht.

Auf dem zweiten Zerfallsweg kommt es zunächst zu einer Umlagerung des Molekülions in ein monozyklisches Ion gleicher Masse. Auch bei diesem Radikalkation wird der Rest des

geöffneten Fünfringes nach und nach eliminiert. Beide Zerfallswege konvergieren in dem Dihydropyrrol-Derivat mit einer Masse von 70 amu.

Auf eine Abbildung der Massenspektren der Diastereomere von Tussilagin wurde verzichtet, da sich die Spektren untereinander qualitativ kaum unterscheiden. Es existieren lediglich Differenzen, was das Verhältnis der relativen Peakintensitäten angeht.

Neben den Tussilagin-Derivaten konnte der Methylester der nahe verwandten Pyrrolidinessigsäure (**PA5**) nachgewiesen werden. Auch bei dieser Substanz stimmten Retentionszeit und Massenspektrum mit der Referenzsubstanz überein (siehe Bild 2.180, S. 235).

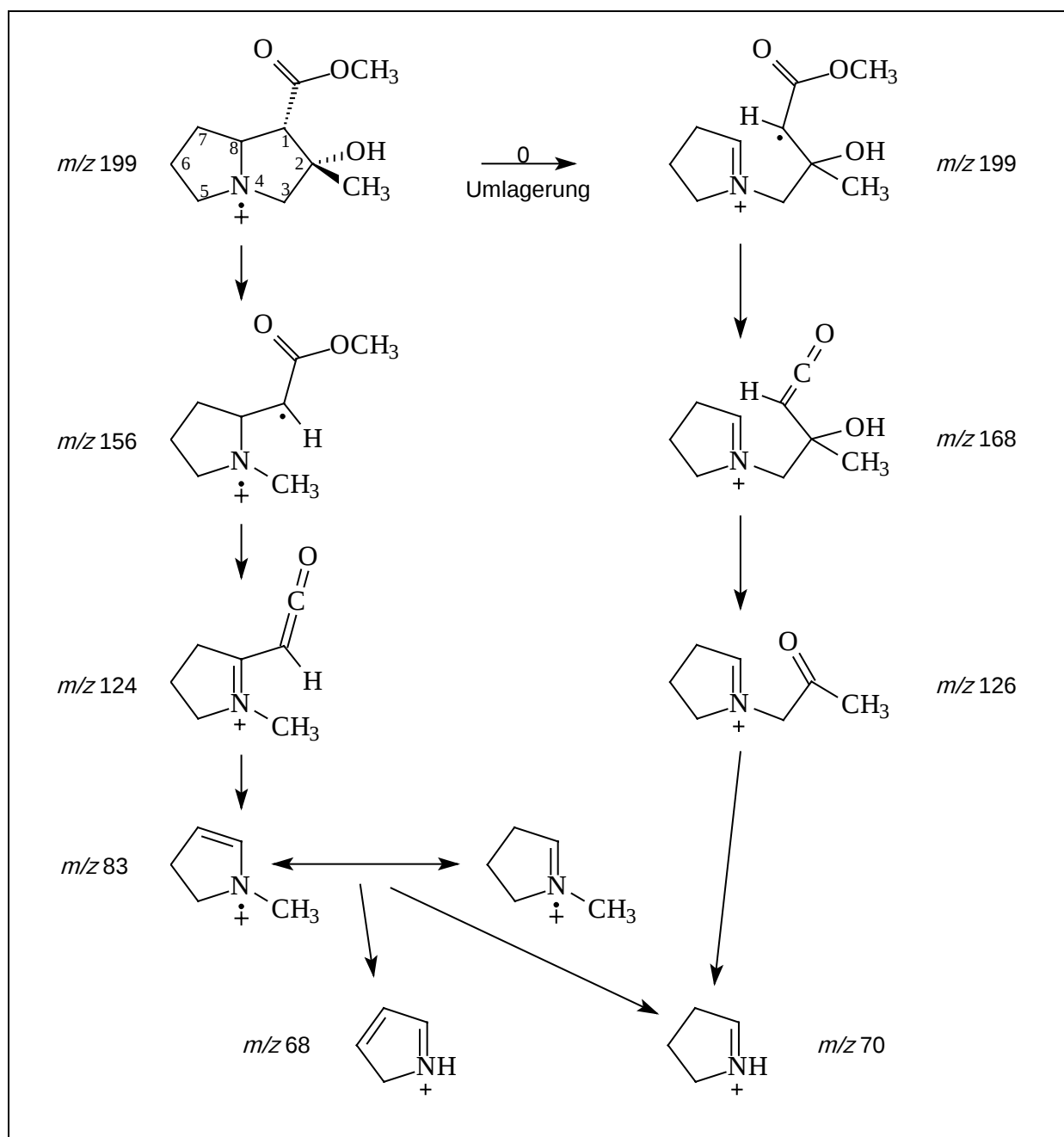


Bild 2.178: MS-Fragmentierung von Tussilagin (**PA1**) bei der EI-Ionisation [AASEN et al., 1969]

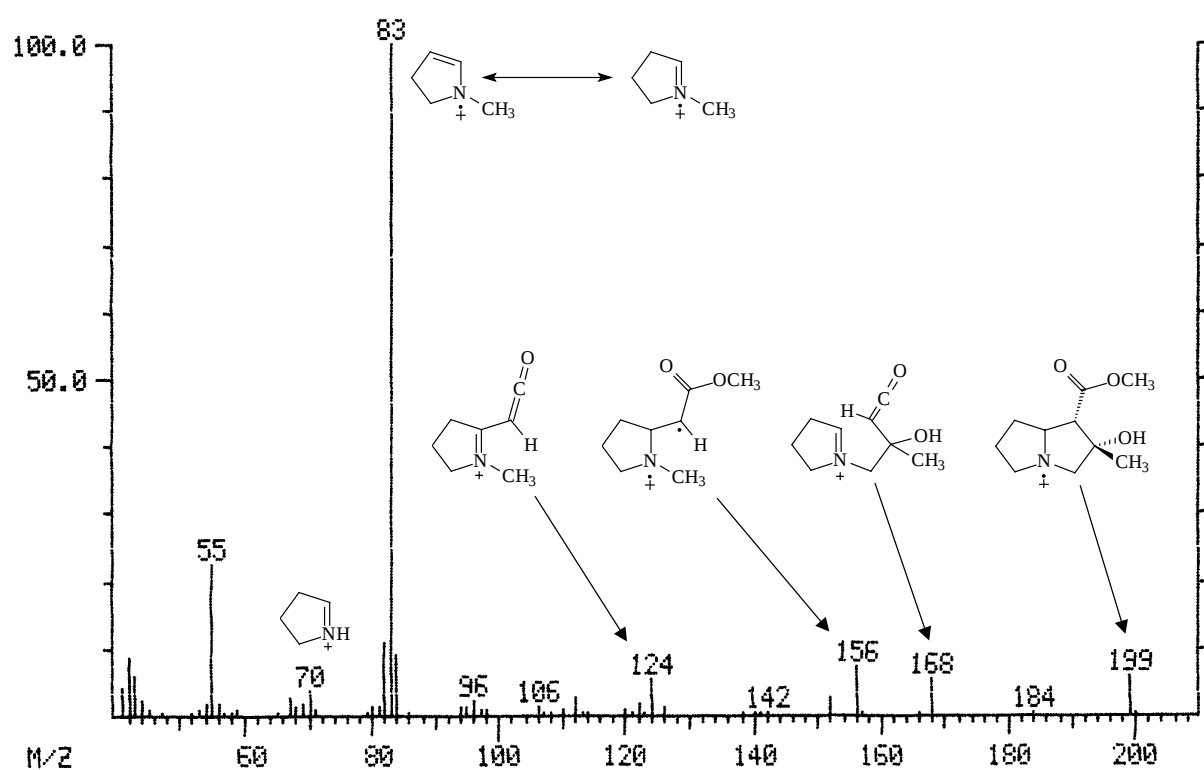


Bild 2.179: EI-Massenspektrum von Tussilagin (PA1)

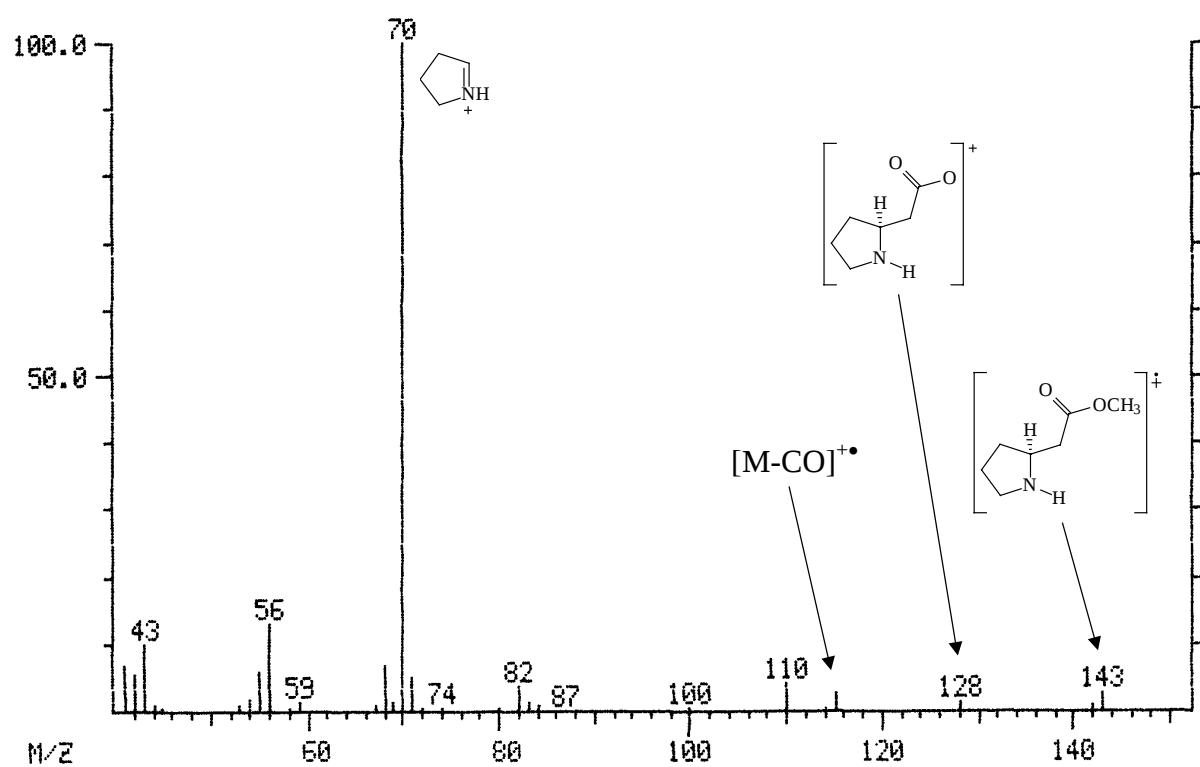


Bild 2.180: EI-Massenspektrum von Pyrrolidin-2-essigsäuremethylester (PA5)

PAßREITER (1992) konnte an Hand seiner Versuche mit Drogenmaterial von *Arnica montana* und *Tussilago farfara* zeigen, dass es sich bei Pyrrolidinessigsäuremethylester (**PA5**) und Tussilagin (**PA1**) sowie dessen Diastereomeren (**PA2**, **PA3** und **PA4**) um Artefakte handelt, die bei der Soxhlet-Extraktion mit Methanol aus den genuinen freien Säuren entstehen.

Für Tussilagin und Isotussilagin sowie für die Pyrrolidinessigsäure wurden von zwei Arbeitsgruppen Synthesen publiziert [CASSAL et al., 1976; RÖDER et al., 1984b]. Was die natürliche Verbreitung der PA vom Typ des Tussilagins angeht, konnten solche Verbindungen bisher ausschließlich in Asteraceae gefunden werden. Für zwölf Arten dieser Familie liegen Funde vor. Alle zwölf Spezies gehören den Triben Inuleae, Heliantheae und Senecioneae an. Es handelt sich um *Arnica amplexicaulis*, *A. chamissonis* ssp. *foliosa*, *A. montana*, *A. sachalinensis* [PAßREITER, 1990 und 1992; PAßREITER et al., 1992], *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea* [RÖDER et al., 1984a], *Iphiona aucheri* [MEIER, 1993; WERNERY et al., 1997], *Melampodium divaricatum* [SCHÜNGEL und PAßREITER, 2000], *Neurolaena lobata* [PAßREITER, 1998], *Petasites hybridus* [SENER und ERGUN, 1996], *Petasites spurius* [RÖDER et al., 1993] und *Tussilago farfara* [PAßREITER, 1992; RÖDER et al., 1981; SENER und ERGUN, 1993; WIEDENFELD et al., 1983 und 1995]. Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Fund im Methanol-Extrakt von *E. semialatum* ist der erste Nachweis für einen Vertreter der Eupatorieae.

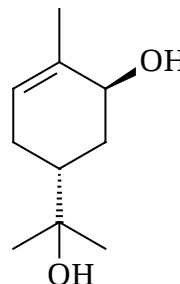
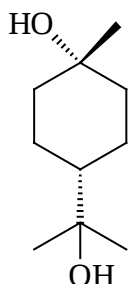
Ein Gespräch mit Prof. Dr. em. E. RÖDER (1998), wonach Tussilagin und seine Epimere ubiquitär in Asteraceae vorkämen, wurde zum Anlaß genommen, kommerziell erhältliches Drogenmaterial von verschiedenen Asteraceae auf die Führung von PA vom Typ des Tussilagins zu untersuchen. Hinzu kamen Blattdrogen der Solanaceae *Datura stramonium* und *Hyoscyamus niger*, da die in diesen Pflanzen akkumulierten Tropan-Alkaloide sich wie die PA vom Arginin und Ornithin herleiten und sich die ersten Biosyntheseschritte beider Alkaloidtypen stark gleichen. Es war daher anzunehmen, dass auch in den Solanaceae Tussilagin-artige Verbindungen vorkommen könnten.

Alle Schnittdrogen wurden von der Firma Galke bezogen und in gleicher Weise wie das Material von *E. semialatum* aufgearbeitet und analysiert. Im einzelnen handelte es sich um getrocknetes Drogenmaterial der folgenden Pflanzen (in Klammern sind die Drogenqualität und die Chargen- bzw. Bestell-Nr. des Lieferanten aufgeführt):

Datura stramonium (Folia conc., 123302), *Eupatorium perfoliatum* (Herba conc., 48702), *Hyoscyamus niger* (Folia conc., 65902), *Senecio fuchsii* (Folia conc., 115302), *Solidago gigantea* (Herba conc., 119202) und *Solidago virgaurea* (Herba conc., 136002).

In allen gewonnenen Alkaloid-Extrakten fanden sich weder Spuren von Pyrrolidinessigsäure, noch von Tussilagin und seinen Epimeren. In den Extrakten der Solanaceae konnten lediglich die bekannten Hygrin- und Tropan-Alkaloide nachgewiesen werden, bei den Asteraceae fanden sich nur die für diese Arten bereits beschriebenen konventionellen PA, aber keine vom Typ des Tussilagins.

2.5.3 Identifizierung der beiden Monoterpene *trans*-Terpin (MO1) und *trans*-Sobrerol (MO2)



Die beiden Substanzen wurden bei der GC-MS-Untersuchung der Unterfraktion des PA-Extraktes, die sich auf der DC-Folie mit dem Verfahren nach Dann und Mattocks blau anfärben ließ (Fraktion II) durch Vergleich ihrer Massenspektren mit denen authentischer Vergleichsproben identifiziert (siehe Bild 2.182, S. 238 und Bild 2.183, S. 238). Das Gaschromatogramm von Fraktion II ist in Bild 2.181, S. 237 wiedergegeben. Die Fraktion setzt sich danach zum größten Teil aus den Monoterpenen **MO1** und **MO2** sowie einem dritten Terpen, dessen Struktur nicht aufgeklärt werden konnte, zusammen. Dieses Ergebnis war sehr erstaunlich, da die blaue Färbung der Fraktionsbande mit dem Dann/Mattocks-Reagenz als ein sicheres Indiz dafür anzusehen war, dass die Fraktion toxische $\Delta^{1,2}$ -ungesättigte PA enthält. Es konnten jedoch weder solche noch andere PA in dieser Fraktion nachgewiesen werden.

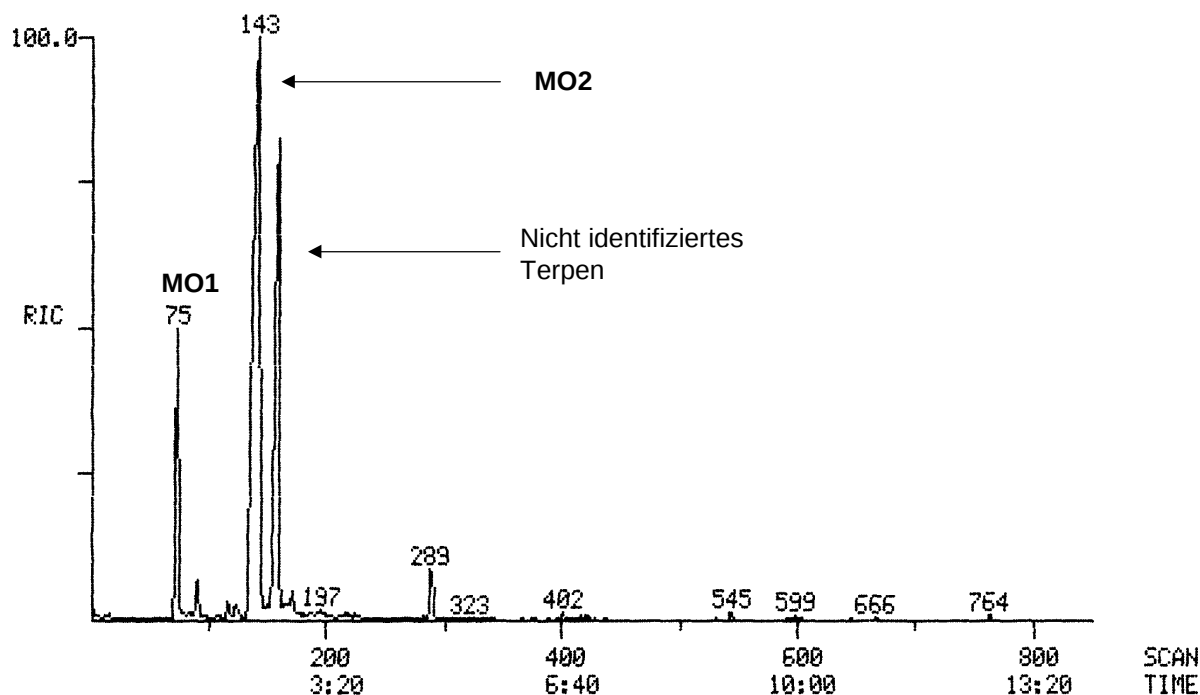
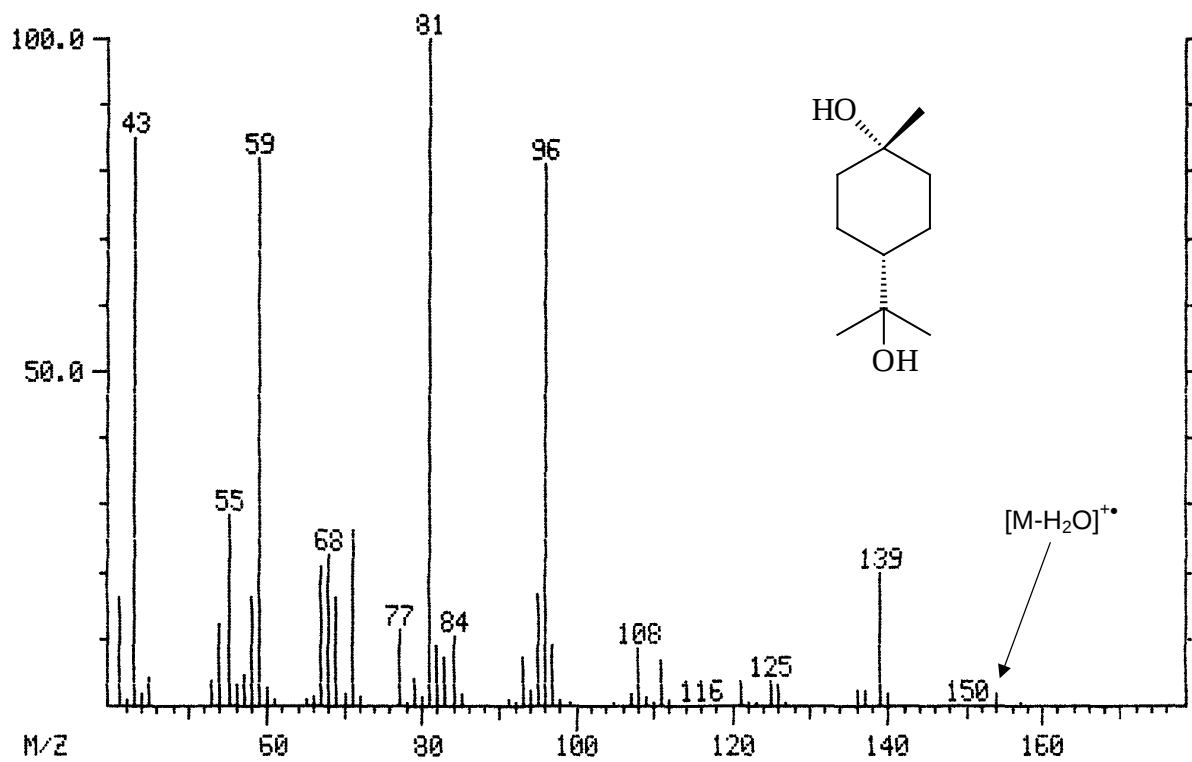
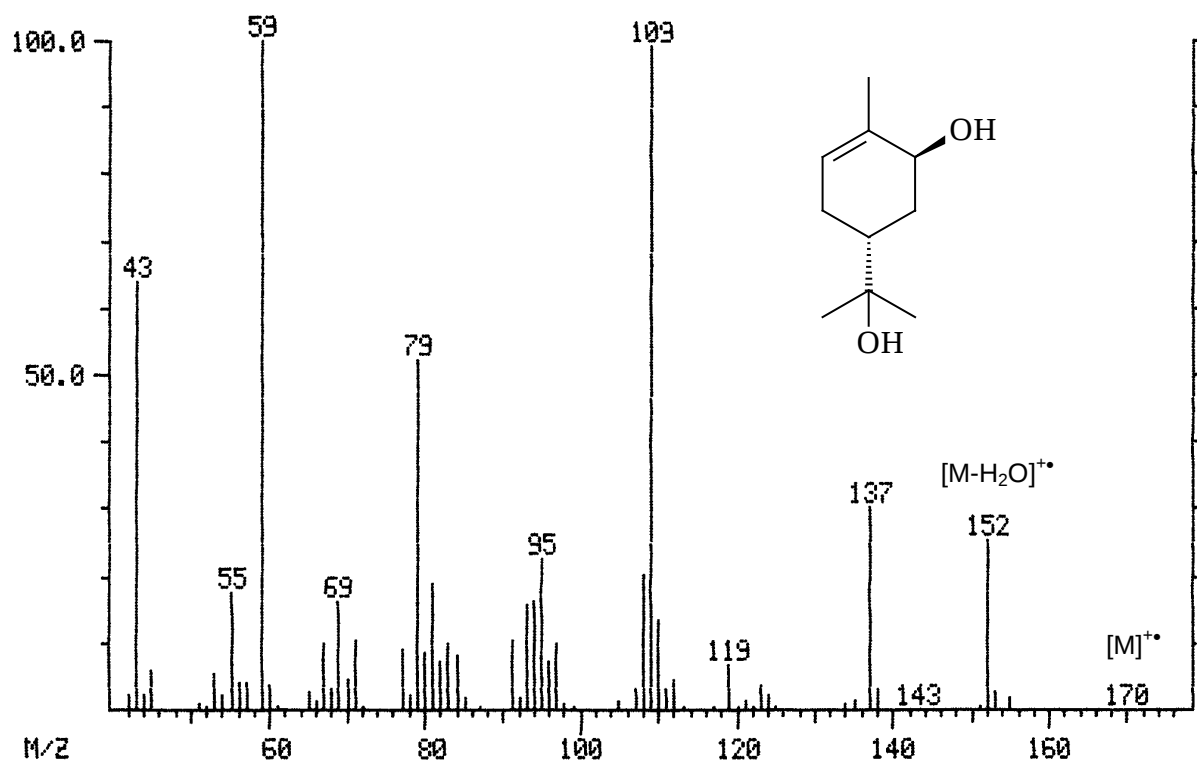


Bild 2.181: Gas-Chromatogramm der mit dem Reagenz nach Dann und Mattocks blau gefärbten Unterfraktion II des PA-Extraktes

Bild 2.182: EI-Massenspektrum von trans-Terpin (**MO1**)Bild 2.183: EI-Massenspektrum von trans-Sobrerol (**MO2**)

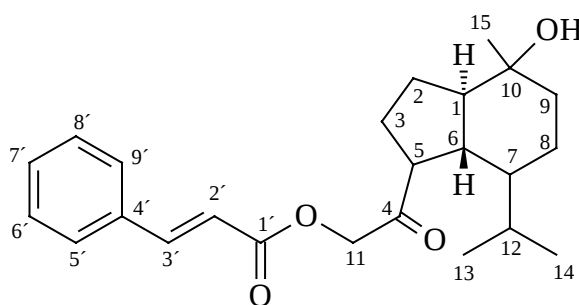
2.6 Isolierung und Identifizierung weiterer Verbindungen aus *Eupatorium semialatum*

2.6.1 Extraktion und Fraktionierung

Die Verbindungen **SE1** und **TR1** konnten aus dem Dichlormethan-Extrakt isoliert werden. Sie fielen bei der Aufreinigung von Fraktion D-II an (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309).

Die Substanz **CU1** dagegen entstammt dem Methanol-Extrakt. Sie konnte durch Aufreinigung der Fraktion M-II gewonnen werden (siehe Kap. 6.5.6.1, S. 324).

2.6.2 11-Cinnamoyloxyoplopanon (Verbindung SE1)



Verbindung **SE1** konnte aus der Fraktion D-II-2-2 des Dichlormethan-Extraktes mittels semipräparativer HPLC isoliert werden (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309). Die Ausbeute betrug 4 mg.

Das UV-Spektrum der Substanz in Methanol zeigt zwei Absorptionsmaxima: Ein kleines bei 219 nm und größeres bei 282 nm (siehe Bild 2.184, S. 239). Die Lage des Maximums bei 282 nm liegt im für unsubstituierte Zimtsäure-Derivate erwarteten Bereich [HESSE et al., 1995].

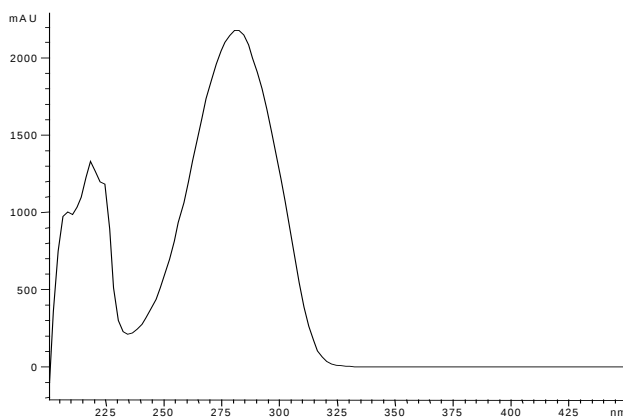


Bild 2.184: UV-Spektrum von **SE1** in Methanol

Das DCI-MS-Spektrum von **SE1** zeigt das Quasimolekülion bei m/z 402, woraus folgt, dass die molare Masse von **SE1** 384 g/mol beträgt. Dieser Befund wird durch den $[M+H]^+$ -Peak bei m/z 385 gestützt. Im GC-MS-Spektrum derselben Substanz (siehe Bild 2.185, S. 240) ist der Molpeak zwar auch zu finden, jedoch nur mit der geringen relativen Intensität von 0,03%. Das Spektrum wird deutlich vom Basepeak bei m/z 131 dominiert. Dieses Fragment sowie dessen Decarbonylierungsprodukt $[131-CO]^+$ bei m/z 103 sind typisch für Zimtsäure-Derivate [HESSE et al., 1995]. Diese Beobachtung macht es wahrscheinlich, dass es sich bei **SE1** um einen Ester dieser Säure handelt. Durch den Verlust eines vollständigen Zimtsäuremoleküls entsteht aus dem Molekülion das Radikalkation bei m/z 236 im Bereich für Sesquiterpene.

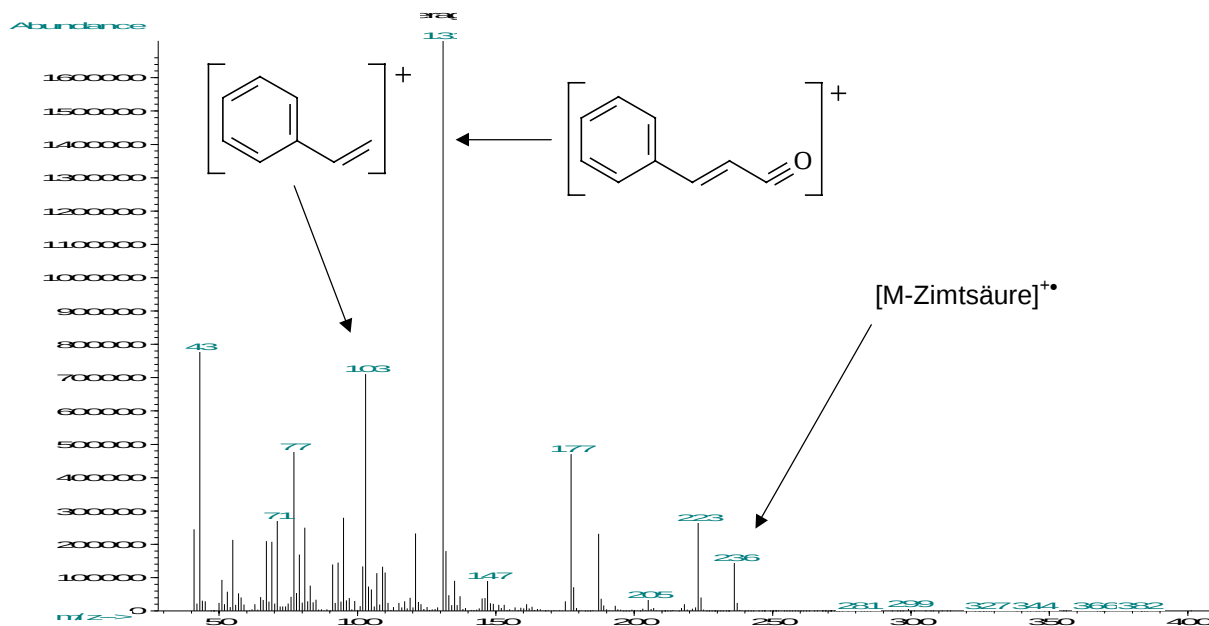


Bild 2.185: GC-MS-Spektrum von **SE1**

Das ^{13}C NMR-Spektrum von **SE1** zeigt die Peaks für vierundzwanzig Kohlenstoffatome (siehe Bild 2.187, S. 243). Die neun Signale im mittleren Bereich des Spektrums zwischen 115 und 170 ppm können einer Zimtsäurestruktur zugeordnet werden, während die restlichen C-Atome zu einem Sesquiterpenalkohol gehören. Über die Crosspeaks im HMQC-Spektrum lassen sich den Kohlenstoffatomen der Zimtsäure und des Sesquiterpens die zugehörigen Protonen zuordnen (siehe Bild 2.190, S. 245). Aufgrund der wechselseitigen Überlagerung der Aromatensignale im Protonenspektrum lassen sich keine Kopplungskonstanten ableiten (siehe Bild 2.186, S. 242). Die olefinischen Signale der Zimtsäure sind zu Dubletts mit einer Kopplungskonstanten von 16 Hertz aufgespalten, woraus folgt, dass es sich um *trans*-Zimtsäure handeln muß [HESSE et al., 1995].

Der Carbonylkohlenstoff der Zimtsäurekomponente (C-1' bei 166.07 ppm) koppelt im HMBC-Spektrum (siehe Bild 2.191, S. 246) mit den beiden Dubletts einer CH_2 -Gruppe bei 4.80 bzw. 4.89 ppm (H-11a und H-11b). Da die beiden Signale nur geminal miteinander koppeln ($J=17$ Hz), muß die CH_2 -Gruppe an Position 11 ein weiteres quartäres Kohlenstoffatom als direkten Nachbarn besitzen.

Tabelle 2.52: NMR-Daten von Verbindung **SE1** (600 bzw. 150 MHz, CDCl₃, TMS) im Vergleich zu Angaben für 11-Cinnamoyloxyoplopanon: ¹TAMAYO-CASTILLO et al., 1988 (400 MHz, CDCl₃); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	SE1	11-Cinnamoyloxy- oplopanon ¹	C	SE1
1	1.51 <i>dd</i> (5.4, 12.1)	-	1	57.06
2a	1.83 <i>m</i>	-	2	25.48
b	1.45 <i>m</i>	-	3	29.12
3a	1.98 <i>m</i>	-	4	206.19
b	1.71 <i>m</i>	-	5	50.77
5	2.70 <i>ddd</i> (5.3, 9.4, 11.7)	2.71 <i>ddd</i> (5.5, 9, 11.5)	6	46.30
6	1.95 <i>m</i>	1.73 <i>dt</i> (5.5, 11.5)	7	49.37
7	1.09 <i>m</i>	1.97 <i>m</i>	8	23.01
8a	1.60 <i>m</i>	-	9	42.05
b	1.08 <i>m</i>	-	10	73.09
9a	1.79 <i>m</i>	-	11	67.81
b	1.39 <i>dd</i> (3.6, 12.8)	-	12	29.92
11 a	4.89 <i>d</i> (16.9)	4.91 <i>d</i> (17.0)	13	22.02
b	4.80 <i>d</i> (16.9)	4.81 <i>d</i> (17.0)	14	15.56
12	1.42 <i>m</i>	1.47 <i>m</i>	15	20.38
13	0.91 <i>d</i> (6.8)	0.92 <i>d</i>	1'	166.07
14	0.69 <i>d</i> (6.8)	0.69 <i>d</i>	2'	116.98
15	1.19 <i>s</i>	1.20 <i>s</i>	3'	146.12
2'	6.53 <i>d</i> (16.0)	-	4'	134.27
3'	7.76 <i>d</i> (16.0)	-	5'	128.96
5'	7.39 <i>m</i>	-	6'	128.26
6'	7.53 <i>m</i>	-	7'	130.58
7'	7.39 <i>m</i>	-	8'	128.26
8'	7.53 <i>m</i>	-	9'	128.96
9'	7.39 <i>m</i>	-		

Es handelt sich dabei um den Kohlenstoff bei 206.19 ppm (C-4), bei dem es sich aufgrund der tiefen Lage um ein CO-Signal eines aliphatischen Ketons handeln muß. Dieses CO-Signal zeigt im HMBC noch drei weitere Kopplungen, unter anderem eine ²J-Kopplung zu dem charakteristischen Signal für ein Proton bei 2.70 ppm (H-5). Die Art der Aufspaltung (*ddd*) sowie die drei im COSY-Spektrum sichtbaren Kopplungspartner sprechen dafür, dass dieses Atom zwei Methylen- (H-3) und ein Methinproton (H-6) als direkte Nachbarn besitzt (siehe Bild 2.189, S. 244). Mit Hilfe des HMQC-Spektrums erhält man die Signallagen der zugehörigen C-Atome (siehe Bild 2.190, S. 245), die entsprechende Signale für Methylen- (C-3) bzw. Methinkohlenstoffe (C-6) im DEPT-Spektrum zeigen (siehe Bild 2.188, S. 243). Das Methinproton (H-6) koppelt im COSY-Spektrum mit zwei weiteren Protonen bei δ 1.09 (H-7) und 1.51 ppm (H-1). Diese können in Verbindung mit dem HMQC- und dem DEPT-Spektrum ebenfalls als Methinprotonen identifiziert werden. Das H-1 koppelt im COSY-Spektrum noch mit einer CH₂-Gruppe (H-2), die ihrerseits mit einer weiteren CH₂-Gruppe koppelt (H-3). Diese Methylengruppe wurde weiter oben schon erwähnt, da sie im COSY-Spektrum mit dem charakteristischen *ddd*-Signal bei 2.70 ppm (H-5) interagiert. Es handelt sich daher um einen fünfgliedrigen Carbozyklus, der am C-5 eine mit der Zimtsäure veresterte α -Hydroxyketon-Seitenkette trägt.

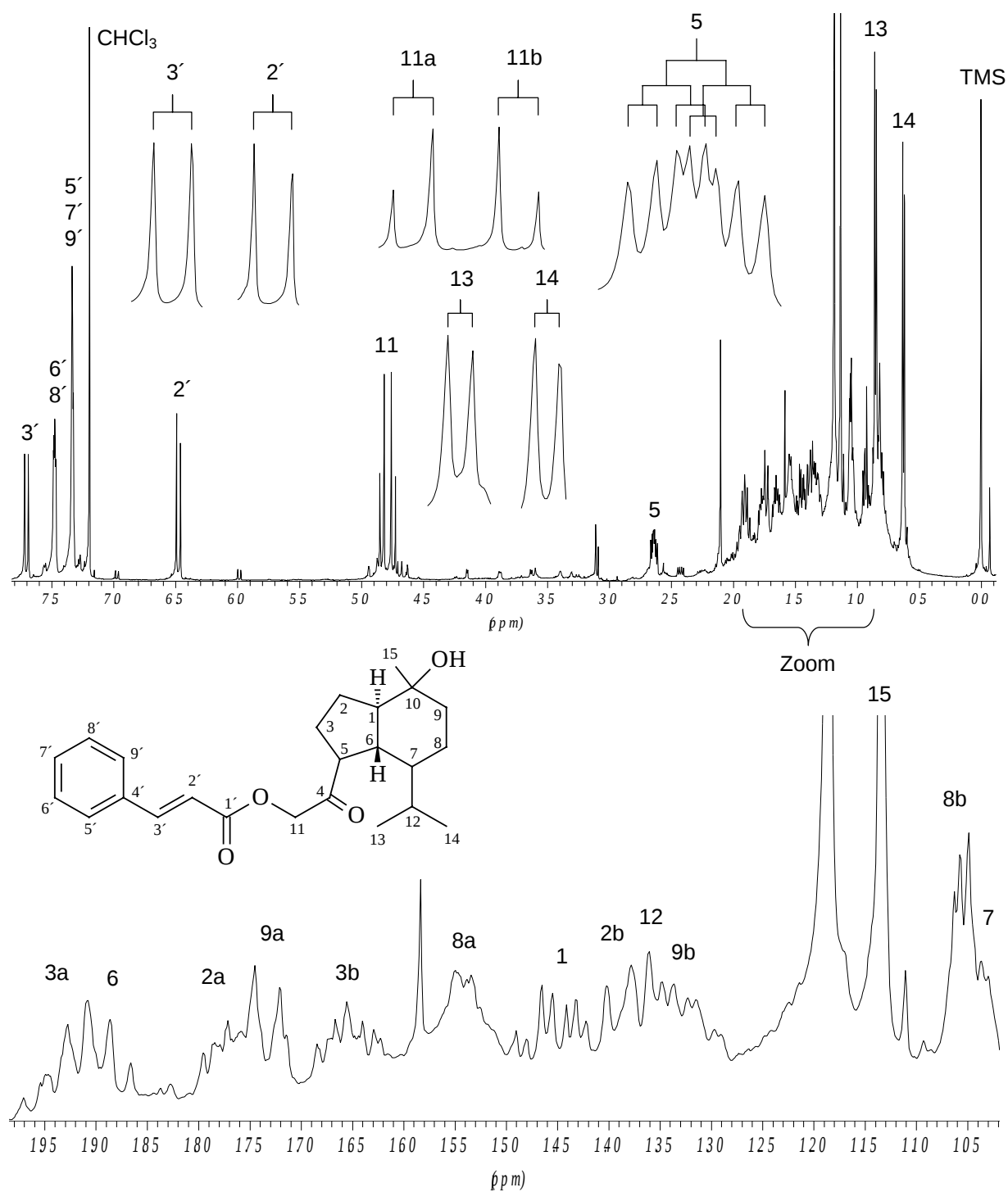
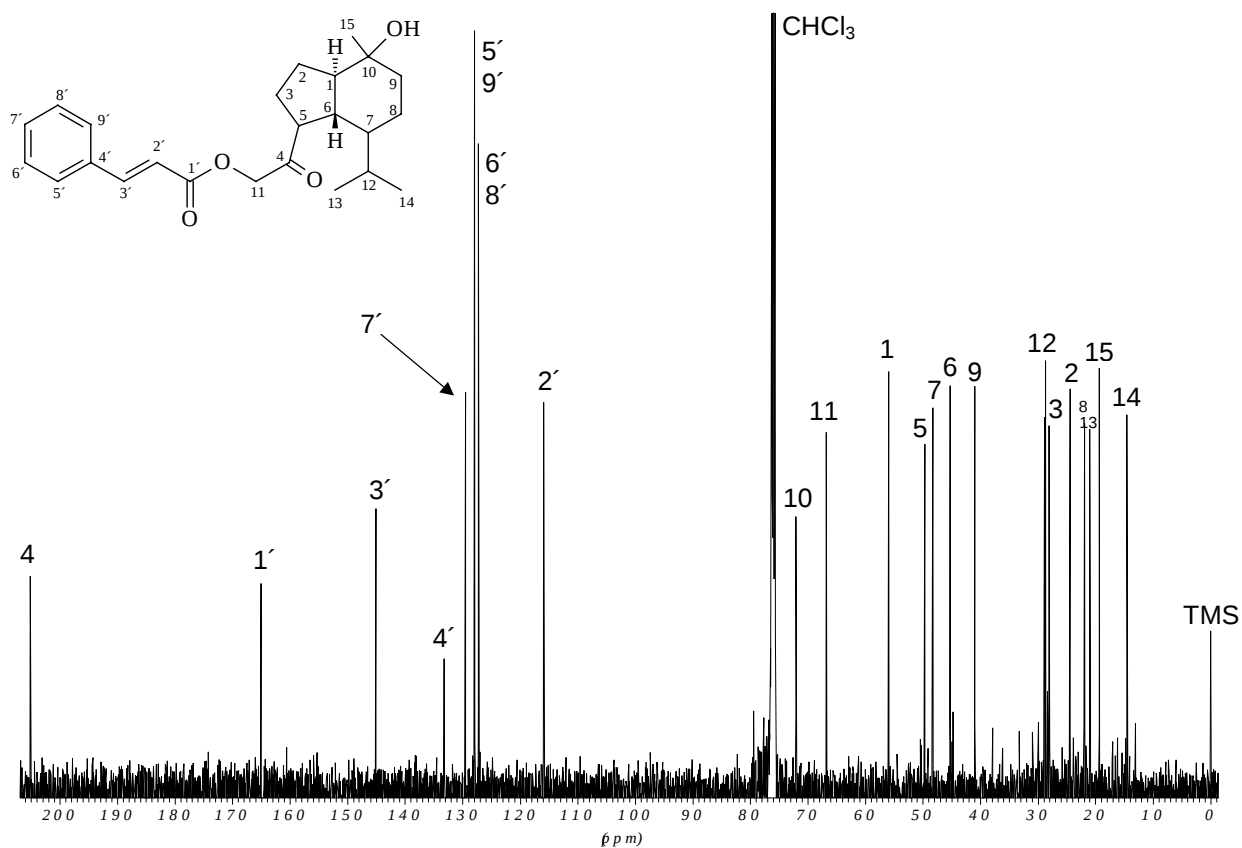
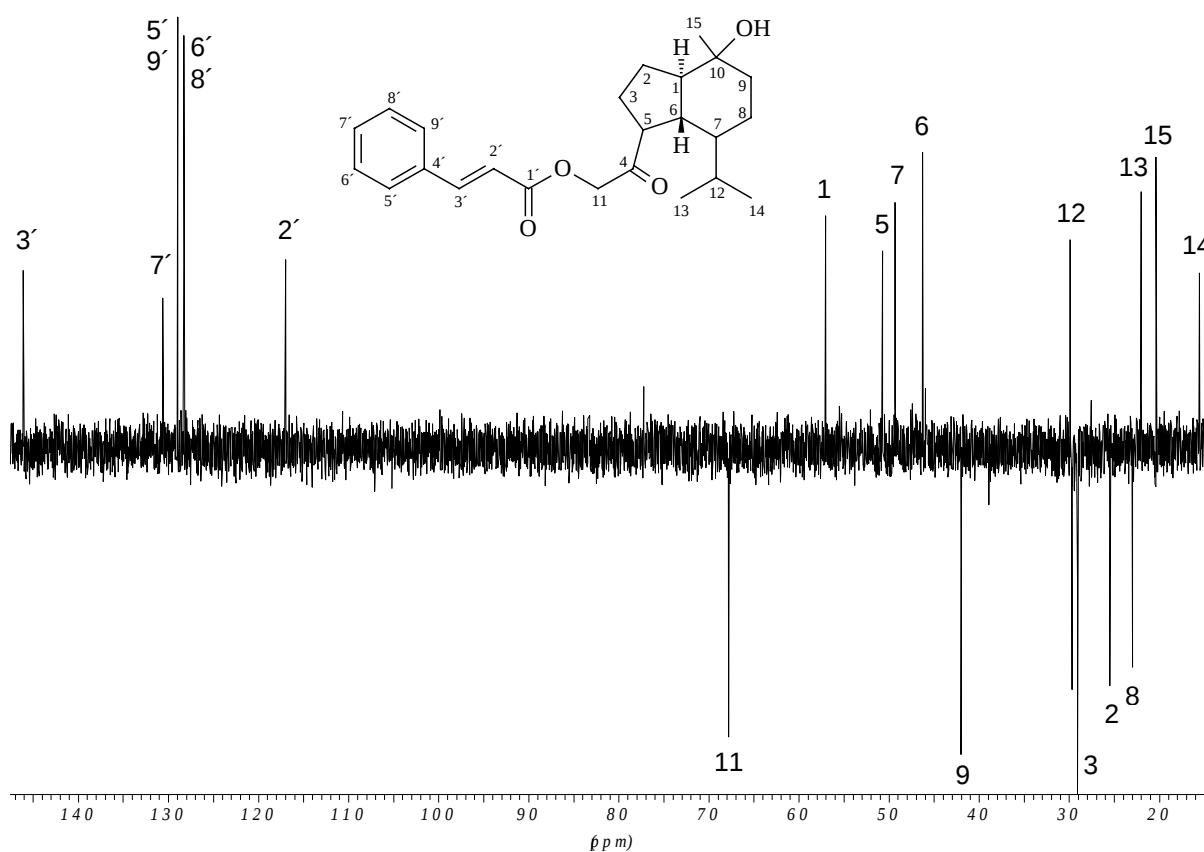


Bild 2.186: ^1H NMR-Spektrum der Substanz **SE1** (500 MHz, CDCl_3 , TMS); der untere Teil zeigt in vergrößerter Darstellung den Spektrenausschnitt zwischen 1.0 und 2.0 ppm

Bild 2.187: ^{13}C NMR-Spektrum der Verbindung **SE1** (125 MHz, CDCl_3 , TMS)Bild 2.188: DEPT-Spektrum der Substanz **SE1** (125 MHz, CDCl_3 , TMS)

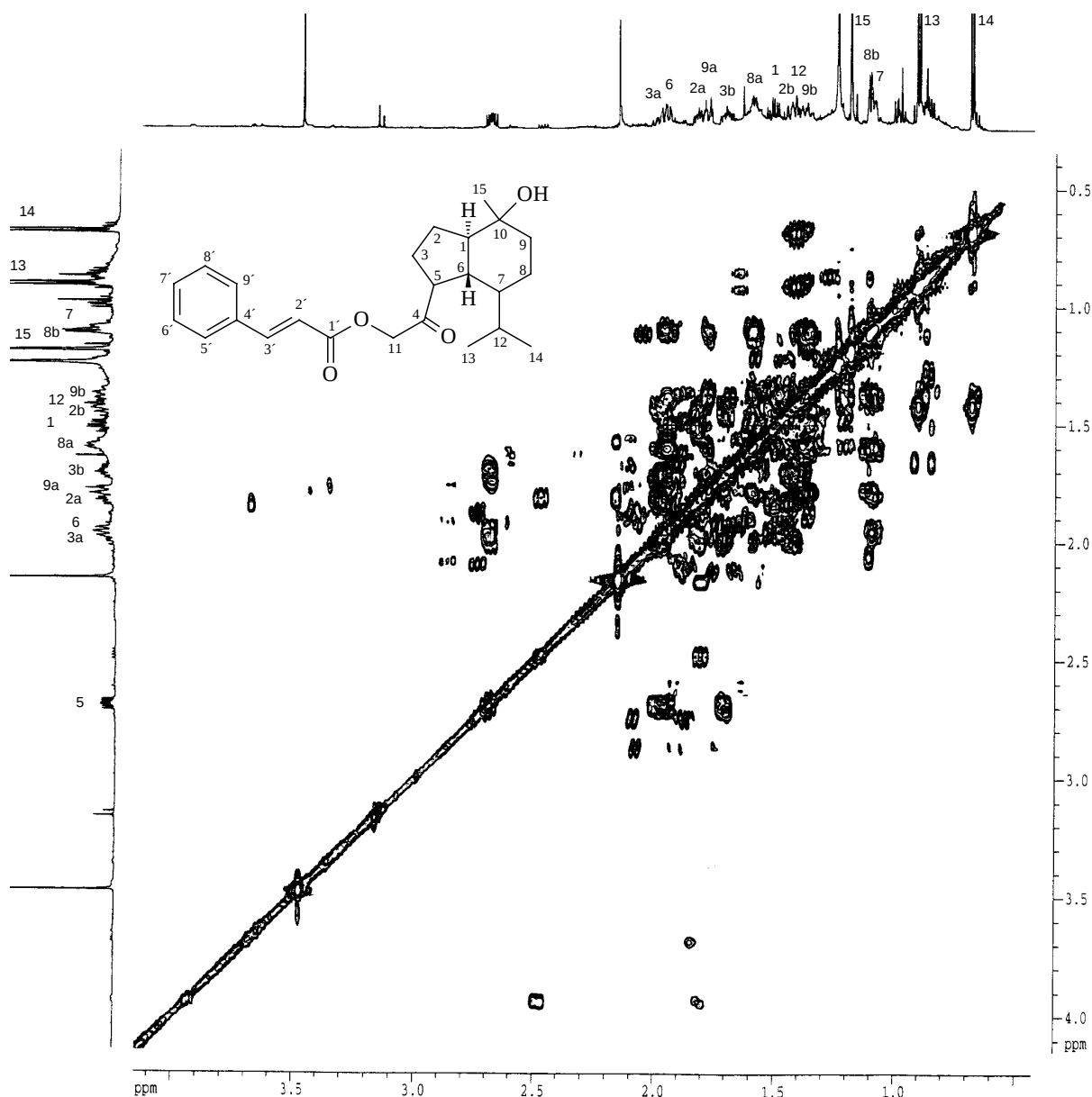


Bild 2.189: COSY-Spektrum der Sesquiterpensignale von **SE1** (600 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

H-7 (1.09 ppm) koppelt im COSY-Spektrum noch mit den beiden Protonen einer Methylengruppe (H-8, 1.08 und 1.60 ppm) sowie mit dem Methinproton einer Isopropyl-Seitenkette (H-12, 1.42 ppm). Die zugehörigen Methylsignale finden sich bei 0.69 (H-14) und 0.91 ppm (H-13). Verfolgt man die Kopplungen weiter, so findet man im COSY-Spektrum bei 1.79 bzw. 1.39 ppm noch eine weitere Methylengruppe (H-9), die dann aber keine weiteren Kopplungspartner mehr besitzt. Das zugehörige Kohlenstoffsignal (C-9, 42.05 ppm) kann mit Hilfe des HMQC-Spektrums bestimmt werden. Es zeigt im HMBC-Spektrum Kopplungen mit einem 3-Protonen-Singulett für eine Methylgruppe an C-10 (H-15, 1.19 ppm) und dem zum Fünfring gehörigen H-1. Auch dessen Kohlenstoffsignal (57.06 ppm) besitzt im HMBC-Spektrum eine deutliche Kopplung mit der Methylgruppe an C-10. Alle weiteren Kohlenstoffe lassen sich aus dem ^{13}C NMR- in Verbindung mit dem DEPT, dem HMQC- und dem HMBC-Spektrum eindeutig zuordnen (siehe Tabelle 2.52, S. 241). Die Konnektivitäten zeigen, dass der Pentazyklus mit einem Sechsring annelliert ist, wobei C-1 und C-6 als Brückenköpfe dienen.

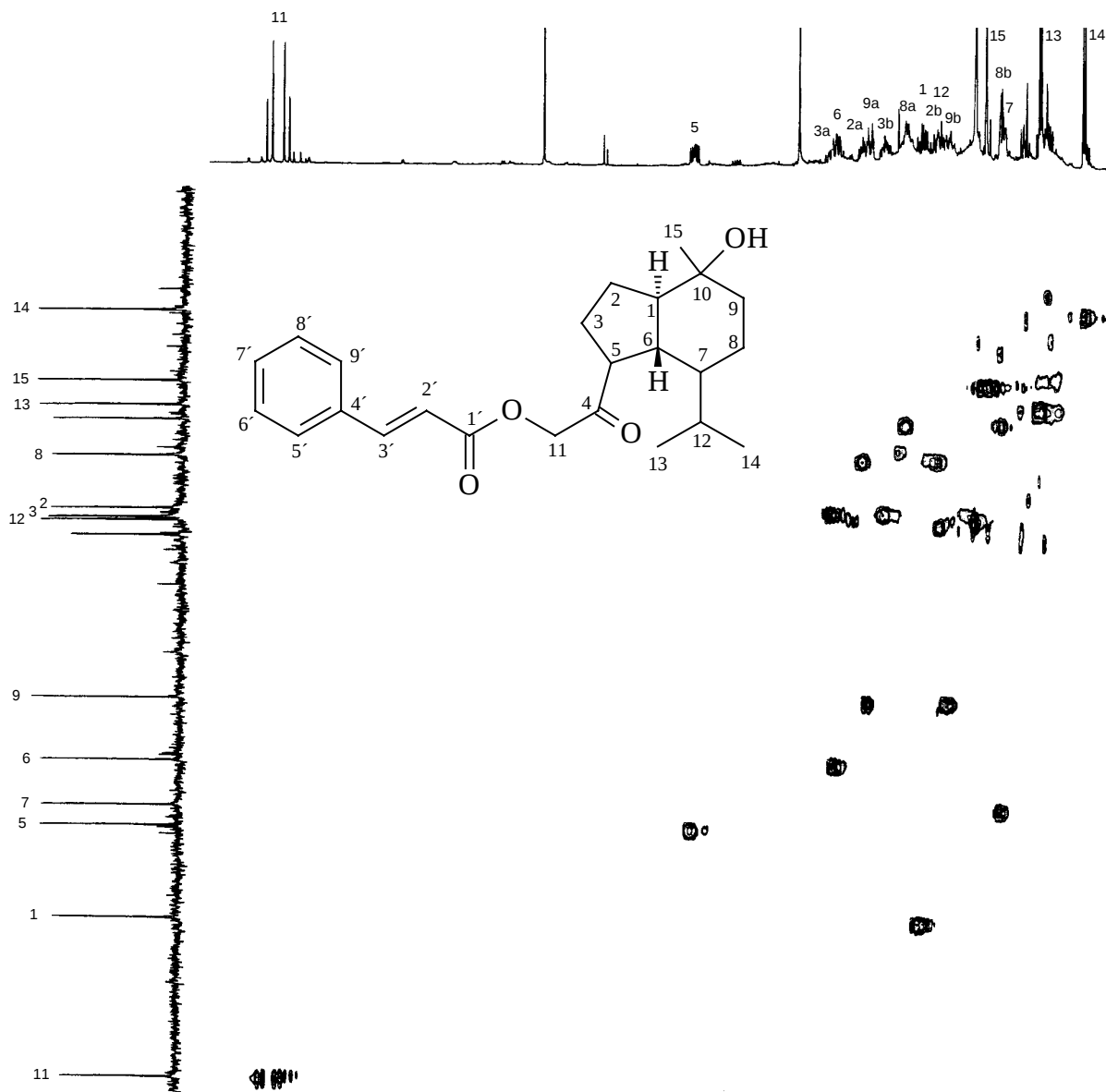


Bild 2.190: HMQC-Spektrum der Sesquiterpensignale von **SE1** (600 bzw. 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)

Das quartäre C-10 bei 73.09 ppm zeigt dabei ^2J -Kopplungen mit H-1, H-9a/b und H-15, wodurch seine Position im Ringgerüst zweifelsfrei festgelegt ist. Die Lage des Signals im ^{13}C NMR-Spektrum deutet darauf hin, dass noch eine Hydroxylgruppe mit dem Atom verknüpft ist. Damit handelt es sich bei der Alkoholkomponente von **SE1** in der Tat um ein Sesquiterpen, und zwar um ein zweifach hydroxyliertes bitykisches Derivat. Die *trans*-Anellierung der beiden Ringe wird durch eine Kopplungskonstante von 12.1 Hz des Signals für H-1 angezeigt.

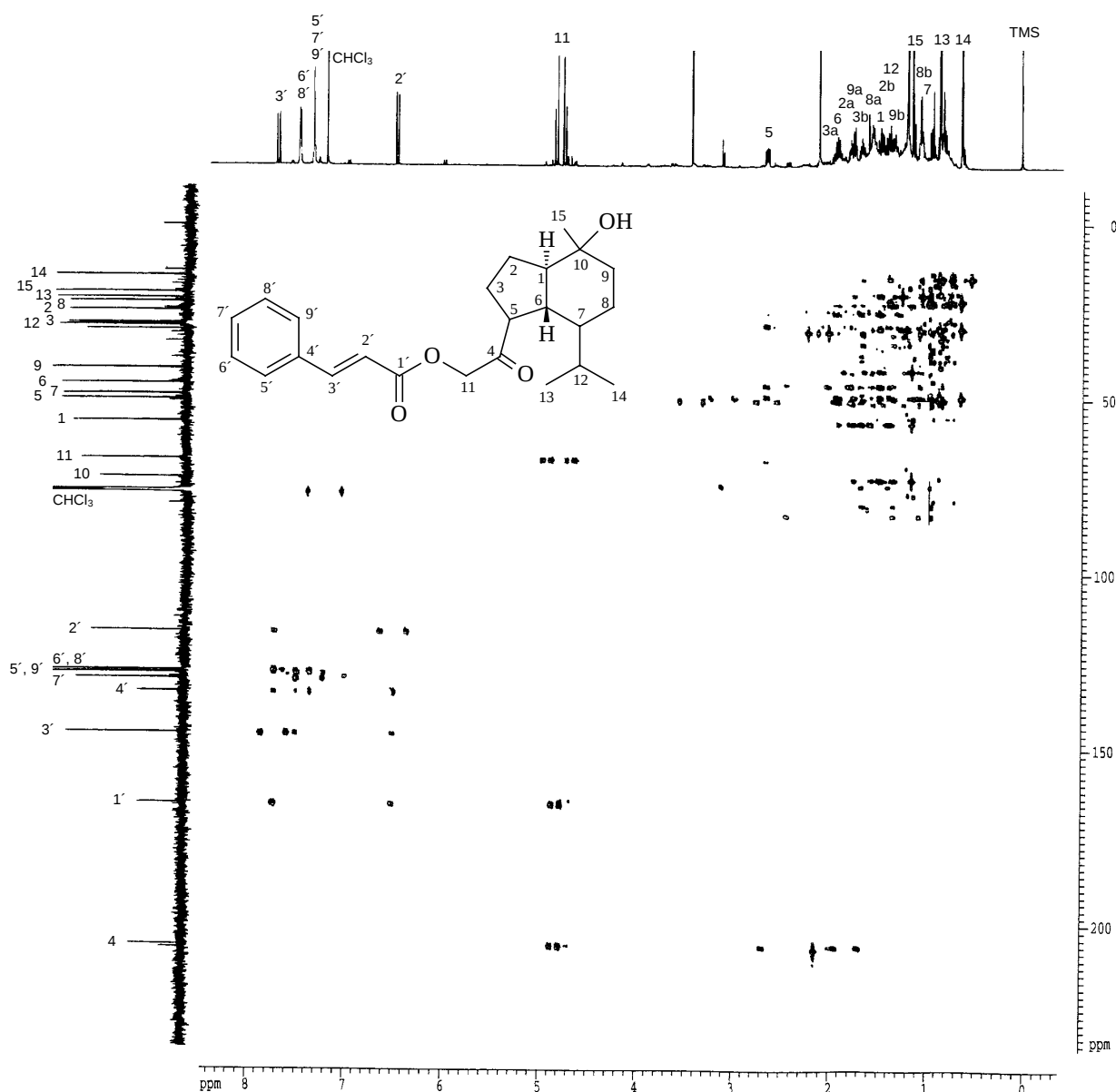
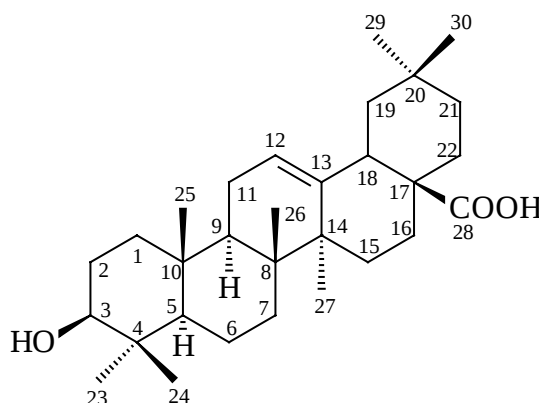


Bild 2.191: HMBC-Spektrum von **SE1** (600 bzw. 150 MHz, DMSO-d_6 , TMS)

Das Grundgerüst von **SE1** wird als Oplopan bezeichnet und leitet sich von Sesquiterpenen des Cadinan-Typs ab. Die seltsam erscheinende Bezifferung der Atome (siehe die Strukturformel am Beginn dieses Kapitels) erklärt sich aus der irregulären Verknüpfung der Isopreneinheiten während der Biosynthese der Substanz. Der Erstfund der hier beschriebenen Verbindung gelang TAMAYO-CASTILLO et al. (1988) bei der Bearbeitung von *A. ligustrina*. Die in dieser Arbeit publizierten ^1H NMR-Daten sind unvollständig, ^{13}C NMR-Shifts wurden gar nicht veröffentlicht. Diese Lücken konnten mit den hier vorgestellten eigenen Arbeiten geschlossen werden.

2.6.3 Oleanolsäure = 3 β -Hydroxy-12-oleanen-28-säure (Verbindung TR1)



Nach Auftrennung der Fraktion D-II-3-2 lagen von Verbindung **TR1** 10 mg DC-rein vor (siehe Kap. 6.5.3.1, S. 309).

Im ^{13}C NMR-Spektrum der Substanz **TR1** sind die Signale für dreißig Kohlenstoffatome eines Triterpens vorhanden (siehe Bild 2.193, S. 250). Mit Hilfe der Übersichtsarbeit von MAHATO und KUNDU (1994), in der sich die Autoren mit den Charakteristika der ^{13}C NMR-Spektren der verschiedenen Triterpentypen ausführlich beschäftigen, konnte **TR1** sicher als Oleanolsäure identifiziert werden. Alle hier gefundenen Signalshifts stimmen mit den Werten aus der Literatur überein [MAHATU und KUNDU, 1994; MAILLARD et al., 1992]. Mit Hilfe des DEPT- (siehe Bild 2.194, S. 251) und des HMQC-Spektrums (siehe Bild 2.195, S. 251) lassen sich alle Protonensignale (siehe Bild 2.192, S. 249) eindeutig den korrespondierenden Kohlenstoffen zuordnen (siehe Bild 2.193, S. 250). Ein direkter Vergleich mit authentischer Oleanolsäure (DC und NMR) konnte die Identität von **TR1** zusätzlich bestätigen.

Obwohl die Substanz im Pflanzenreich weit verbreitet ist, konnten aus *Eupatorium*-Arten neben Triterpenen anderer Grundgerüste bislang nur mit β -Amyrin verwandte Oleanan-Derivate isoliert werden. Oleanolsäure ist damit als neu für die genannten Gattungen einzustufen.

Tabelle 2.53: NMR-Daten von Verbindung **TR1** (500 bzw. 125 MHz, CDCl₃, TMS) im Vergleich zu Angaben für Oleanolsäure: ¹MAILLARD et al., 1992 (50,1 MHz, CDCl₃, TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	TR1	C	TR1	Oleanolsäure ¹
1a	1.61 m	1	38.39	38.5
b	0.97 m	2	27.17	27.4
2a	1.60 m	3	79.04	78.7
b	1.14 m	4	38.75	38.7
3	3.22 dd (4.4, 11.4)	5	55.21	55.2
5	0.74 m	6	18.30	18.3
6a	1.56 m	7	32.61	32.6
b	1.46 m	8	39.27	39.3
7a	1.56 m	9	47.63	47.6
b	1.44 m	10	37.08	37.0
9	1.56 m	11	22.91	23.1
11 a	1.90 m	12	122.63	122.1
b	1.65 m	13	143.60	143.4
12	5.28 t (3.2)	14	41.58	41.6
15 a	1.09 m	15	27.69	27.7
b	0.98 m	16	23.40	23.4
16 a	1.87 m	17	46.53	46.6
b	1.58 m	18	40.96	41.3
18	0.97 m	19	45.88	45.8
19 a	1.61 m	20	30.68	30.6
b	1.16 m	21	33.80	33.8
21 a	1.35 m	22	32.44	32.3
b	1.20 m	23	28.10	28.1
22 a	1.78 m	24	15.54	15.6
b	1.31 m	25	15.32	15.3
23	0.98 s	26	17.13	16.8
24	0.77 s	27	25.94	26.0
25	0.91 s	28	183.59	181.0
26	0.75 s	29	33.08	33.1
27	1.13 s	30	23.58	23.6
29	0.90 s			
30	0.93 s			

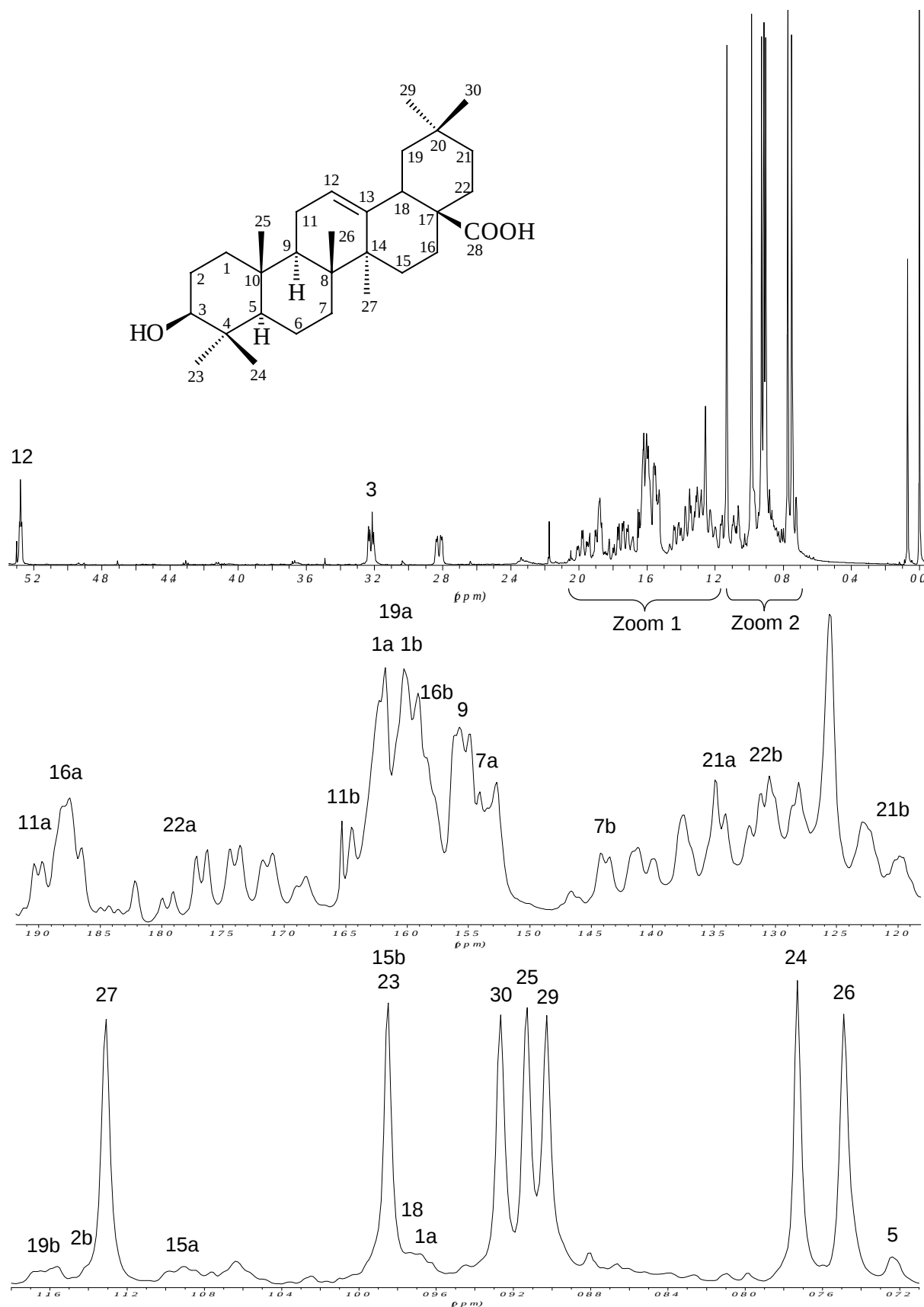


Bild 2.192: ^1H NMR-Spektrum der Substanz **TR1** (500 MHz, CDCl_3 , TMS); der mittlere Teil (Zoom 1) zeigt in vergrößerter Darstellung den Spektrenausschnitt zwischen 1.2 und 1.9 ppm, der untere Teil (Zoom 2) den Bereich zwischen 0.72 und 1.2 ppm

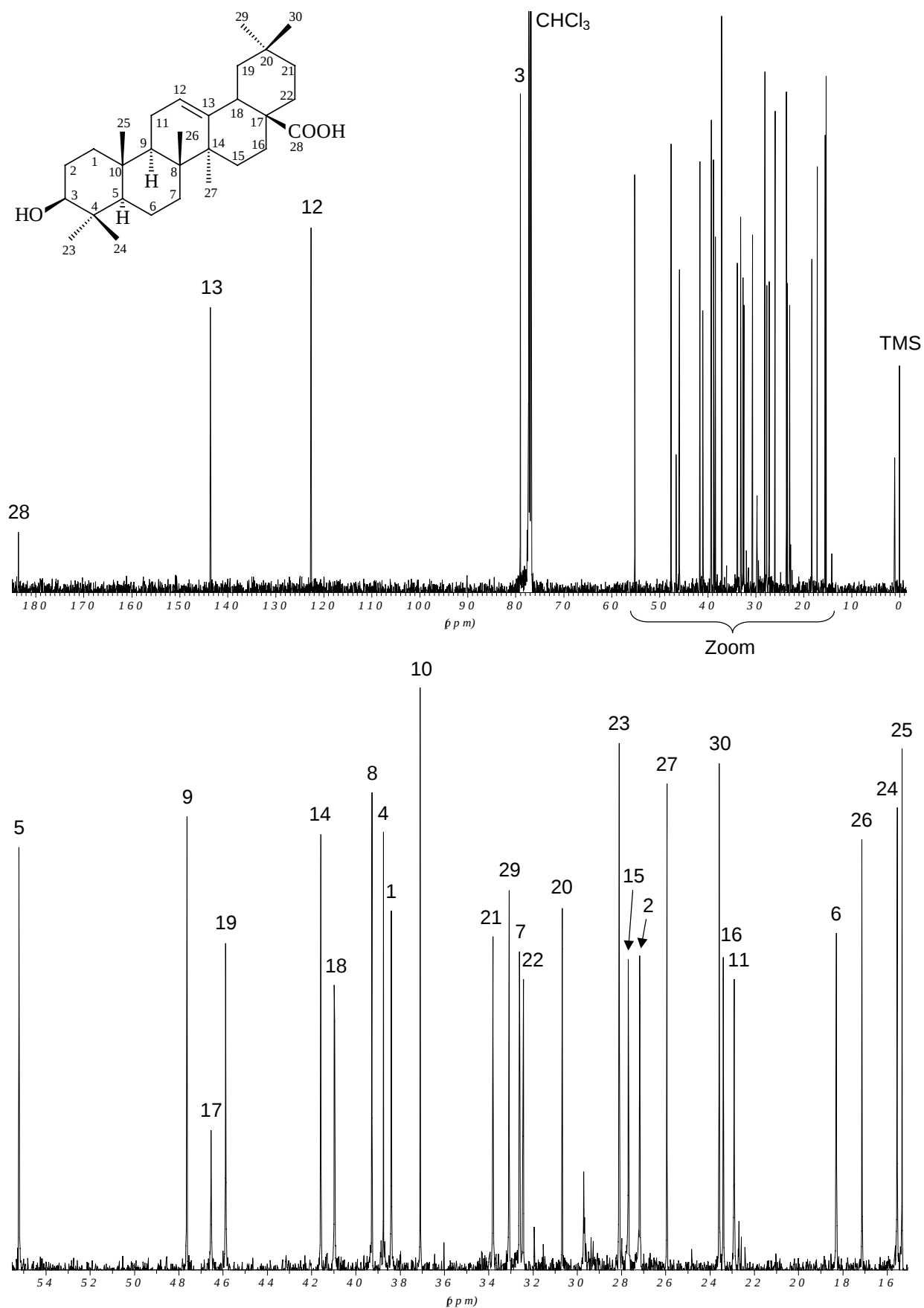
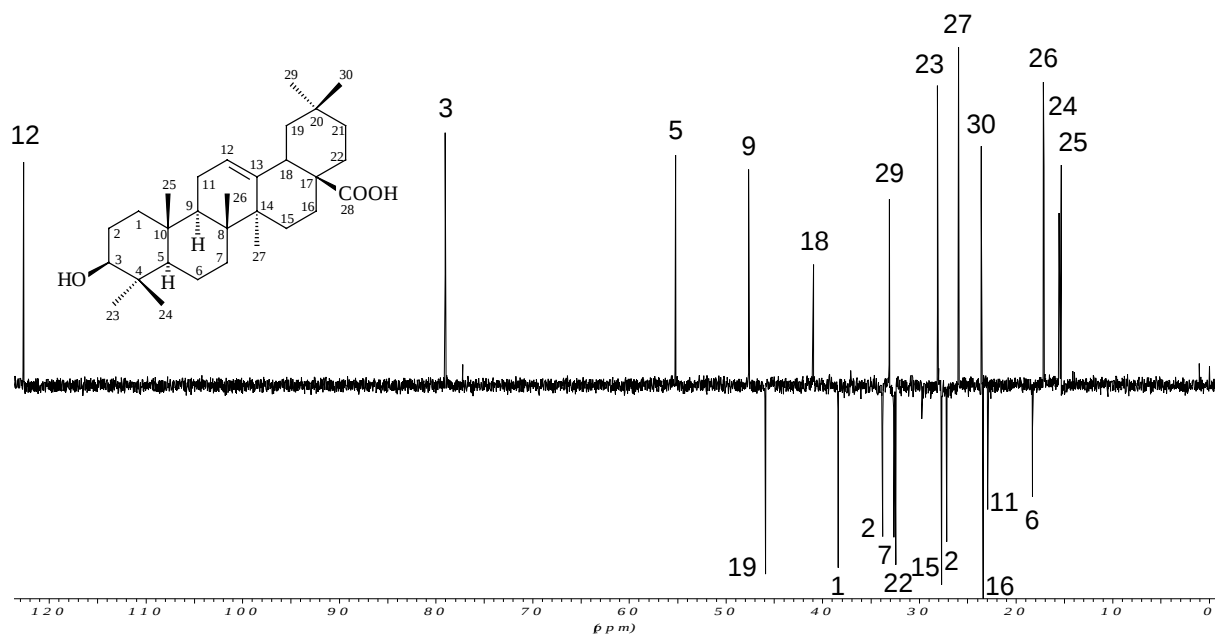
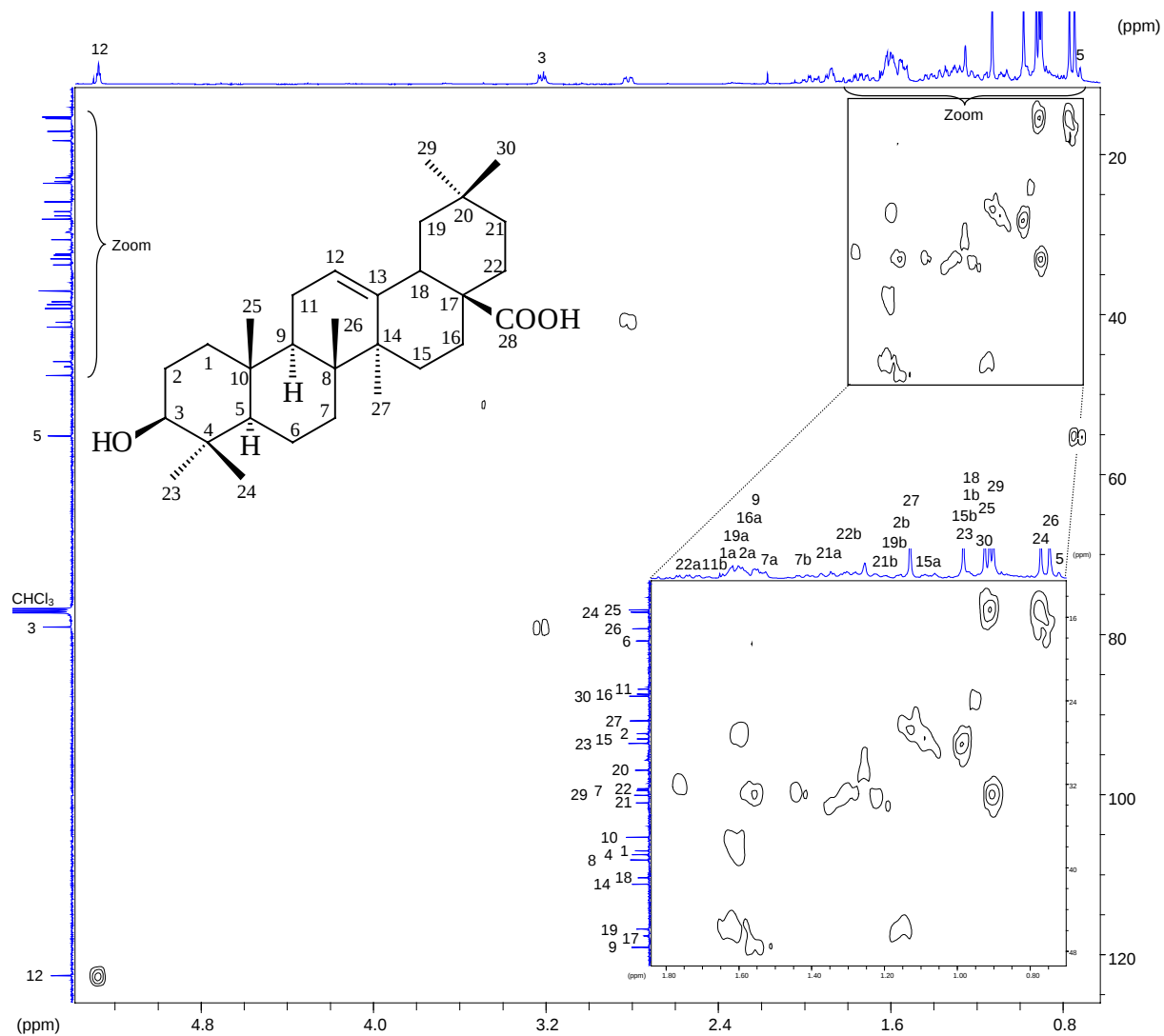
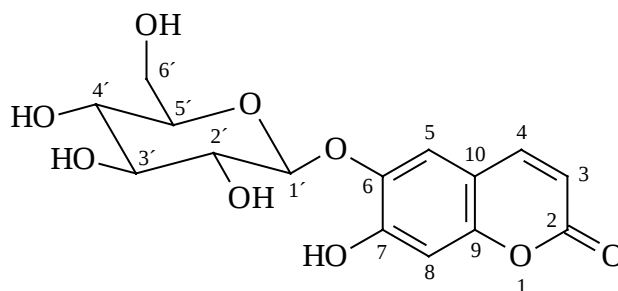


Bild 2.193: ^{13}C NMR-Spektrum der Substanz **TR1** (125 MHz, CDCl_3 , TMS); der untere Teil der Abbildung zeigt in vergrößerter Darstellung den Spektrenausschnitt zwischen 15 und 60 ppm

Bild 2.194: DEPT-Spektrum der Substanz **TRI** (125 MHz, CDCl_3 , TMS)Bild 2.195: HMQC-Spektrum der Verbindung **TRI** (500 bzw. 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)

2.6.4 Aesculin = 6,7-Dihydroxy-2*H*-1-benzopyran-2-on-6-*O*- β -glucopyranosid (Verbindung CU1)



Die Verbindung **CU1** entstammt Fraktion M-II des Methanol-Extraktes (siehe Kap. 6.5.6.1, S. 324). Die Ausbeute betrug 12 mg.

Die Substanz zeigte eine charakteristische blaue Fluoreszenz, die nicht nur auf der DC-Folie, sondern schon in methanolischer Lösung auffiel.

Die UV-Absorptionsmaxima deuten auf ein Coumarin-Derivat hin, zu dem die beobachtete Fluoreszenz gut paßt [DUBOIS et al., 1990; SHAFIZADEH und MELNIKOFF, 1970].

Das intensive Maximum bei 337 nm ist in Verbindung mit den Banden bei 250 und 294 nm ein Kennzeichen von 6,7-dioxygenierten Coumarinen. Zu diesem Substitutionsmuster paßt auch die zusätzlich beobachtete bathochrome Verschiebung der Hauptabsorptionsbande unter dem Einfluß von Natriumacetat oder Natriummethanolat. Eine der beiden OH-Gruppen muß substituiert vorliegen, da der bei einer freien *ortho*-Dihydroxygruppe zu erwartende Shift mit AlCl_3 ausbleibt. Dasselbe gilt für die Komplexbildung mit Borsäure [MURRAY et al., 1982].

Tabelle 2.54: UV-spektroskopische Meßdaten [λ_{max} (nm)] von Verbindung **CU1** in Methanol und unter Verwendung der üblichen Shiftreagenzien; eine Zersetzung mit den basischen Reagenzien wurde nicht beobachtet

MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/ H_3BO_3	AlCl_3	AlCl_3/HCl
250 sh	273 sh	275 sh	258 sh	250 sh	250 sh
294	377	292 sh	275 sh	293 sh	293 sh
337		373	292 sh	331	311
384 sh			339		
			387 sh		

Das APCI-CID-MS-Spektrum zeigt neben dem Peak des protonierten Molekülkations bei m/z 341 einen weiteren bei m/z 179. Die Massendifferenz von 162 amu zwischen beiden Teilchen läßt es sehr wahrscheinlich erscheinen, dass das Pseudomolekülion ein Molekül einer Hexose verliert. Nach der Fokussierung des 179 amu-Fragments in das dritte Massenspektrometer zerfällt auch dieses Ion weiter. Dabei werden hauptsächlich Neutalmoleküle wie CO und Wasser eliminiert. Die Fragmente bei m/z 105 und m/z 77 sprechen für eine Zimtsäure-Partialstruktur und damit für den aromatischen Charakter des Genins [HESSE et al., 1995].

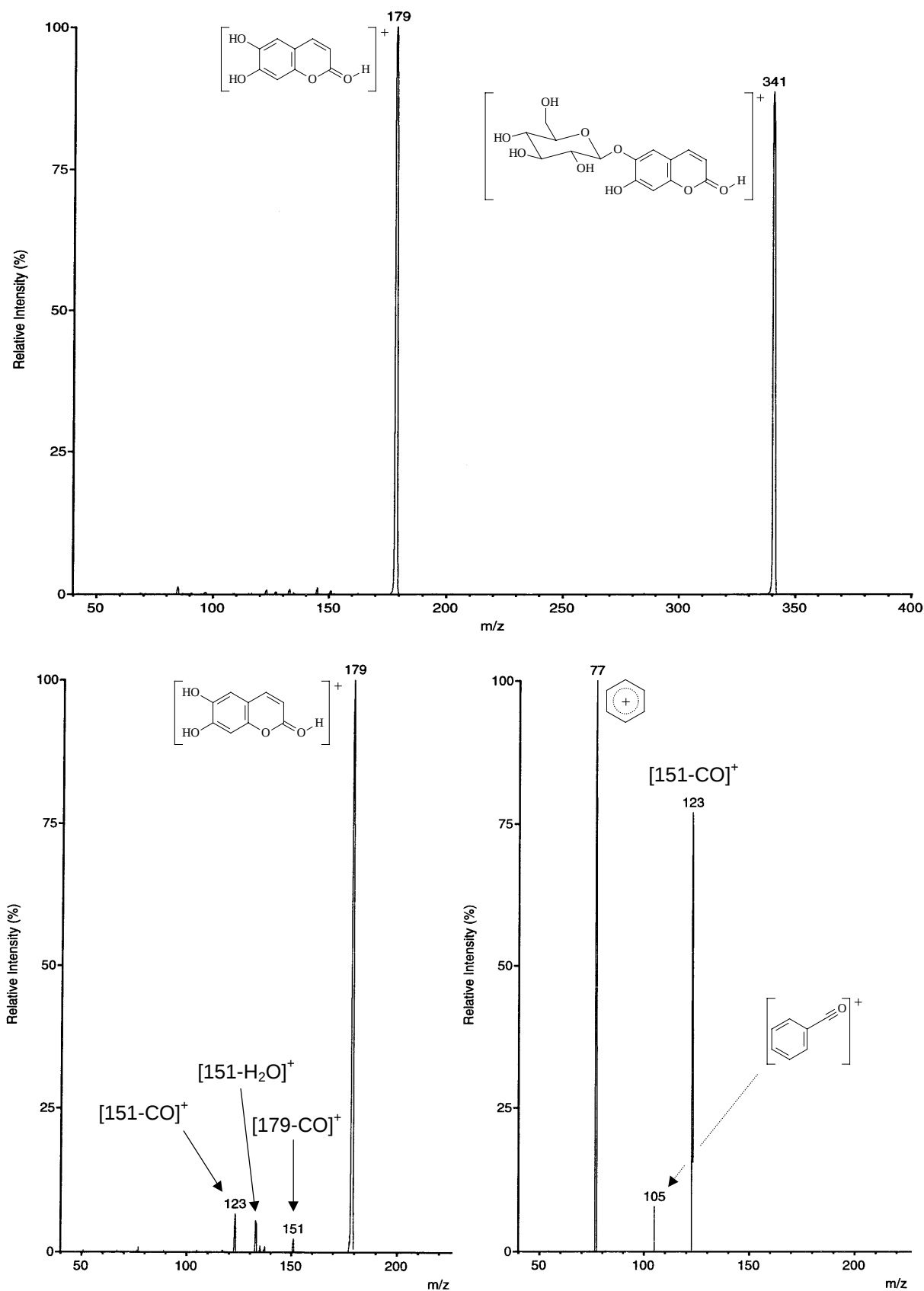


Bild 2.196: LC-MS-Spektren von Verbindung **CU1**: APCI-CID-Spektrum (oben) und pseudo-MS/MS/MS-Spektren des Fragmentes mit einer Masse von 179 amu (unten links: Kollisionsenergie: 11 V; unten rechts: Kollisionsenergie 30 V)

Tabelle 2.55: NMR-Daten von Verbindung **CU1** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS) im Vergleich zu Angaben für Aesculin: ¹DUBOIS et al., 1990 (90 MHz, CDCl₃ + TFA- d_6 , TMS); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H	CU1	C	CU1	Aesculin ¹
3	5.98 d (9.5)	2	161.36	161.3
4	7.74 d (9.5)	3	108.27	112.3
5	7.23 s	4	144.86	144.9
8	6.54 s	5	116.02	115.8
1'	4.61 d (6.9)	6	144.58	143.4
2'	3.24 m	7	152.46	152.1
3'	3.24 m	8	103.67	104.0
4'	3.16 dd (3.2, 8.2)	9	152.46	151.5
5'	3.24 m	10	107.57	111.7
6'	3.72 d (11.4)	1'	103.67	103.5
	3.50 dd (5.4, 11.4)	2'	73.54	74.0
		3'	76.59	76.7
		4'	69.88	70.6
		5'	77.51	78.0
		6'	60.98	61.5

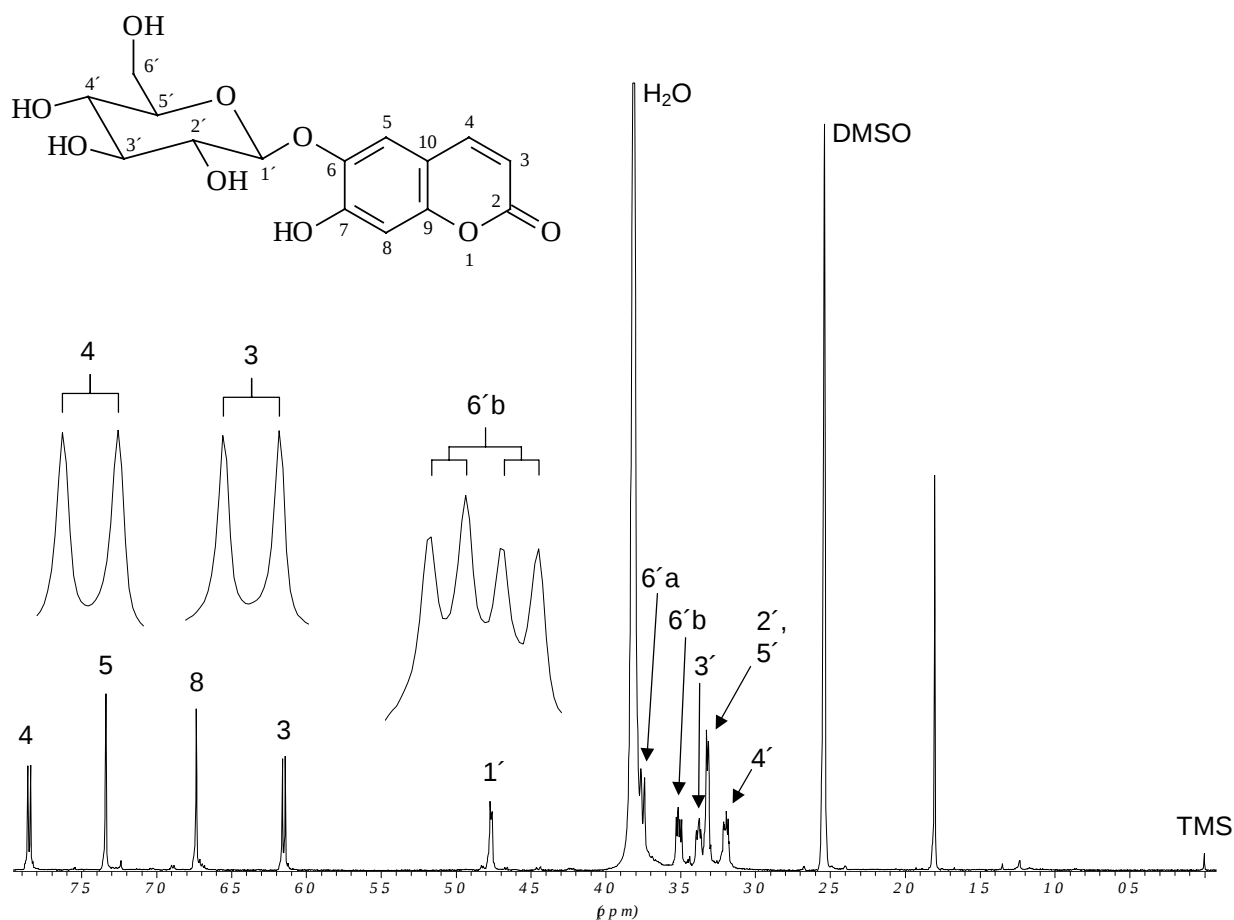


Bild 2.197: ¹H NMR-Spektrum der Verbindung **CU1** (500 MHz, DMSO- d_6 /D₂O, TMS)

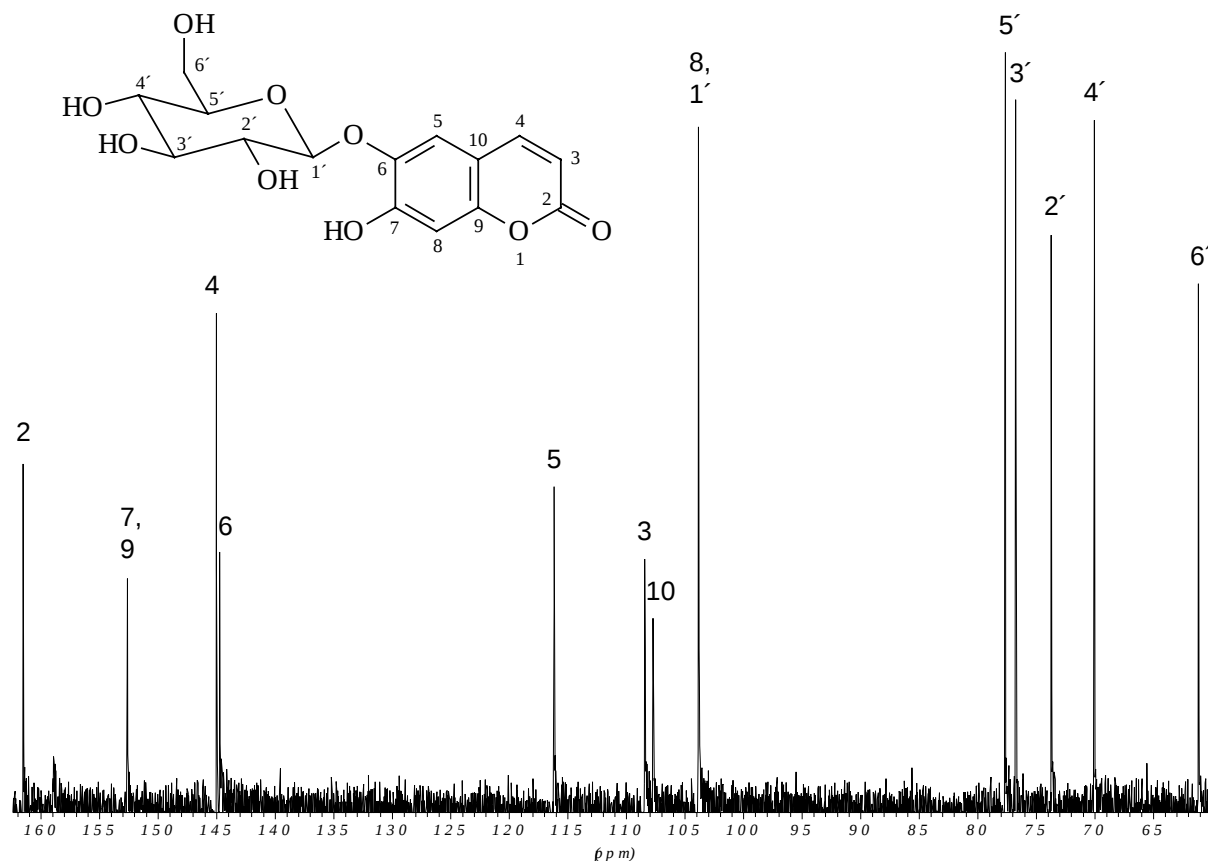


Bild 2.198: ^{13}C NMR-Spektrum von Substanz **CU1** (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS)

Die Analyse der NMR-Daten bestätigt nicht nur, dass das Aglykon von **CU1** mit einer Hexose verknüpft ist, sondern zeigt auch, dass es sich bei diesem Zucker um β -Glucose handeln muß (siehe Tabelle 2.55, S. 254). Die Protonen (siehe Bild 2.197, S. 254) und Kohlenstoffe (siehe Bild 2.198, S. 255) des Genins lassen sich eindeutig dem Coumarin Aesculetin zuordnen [CUSSANS und HUCKERBY, 1975; DUBOIS et al., 1990; KHAN et al., 1968; MURRAY et al., 1982]. Die Frage, welche der beiden phenolischen OH-Gruppen des Aesculetins glucosidiert ist, ließ sich an Hand der NMR-Daten nicht beantworten, da kein HMBC-Spektrum ausreichender Qualität aufgenommen werden konnte. Bemerkenswerter Weise gestattete das Detektionsverhalten auf der DC-Folie eine eindeutige Entscheidung. So gehören die beiden Verbindungen Aesculin (6-Glucosid des 6,7-Dihydroxycoumarins) und Cichoriin (7-Glucosid des 6,7-Dihydroxycoumarins) zu den wenigen natürlich vorkommenden Stellungsisomeren, die sich in ihrem Fluoreszenzverhalten grundlegend voneinander unterscheiden. Und zwar zeigt das Aesculin die beobachtete intensive blaue Fluoreszenz, während das Cichoriin gar nicht fluoresziert [HÄNSEL et al., 1999]. Demnach muß es sich bei **CU1** um das Coumarin-Glucosid Aesculin handeln.

Das Aesculin ist schon seit geraumer Zeit bekannt, Belege finden sich für etliche Taxa aus verschiedenen Familien [DUBOIS et al., 1990; SHAFIZADEH und MELNIKOFF, 1970]. In *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten scheinen Coumarine jedoch allgemein nicht weit verbreitet zu sein, unter den wenigen Belegen ist das Aesculin nur einmal vertreten. Es konnte per DC in einem Extrakt aus den Achänen von *E. pauciflorum* nachgewiesen werden [FIGUEIREDO, 1975].

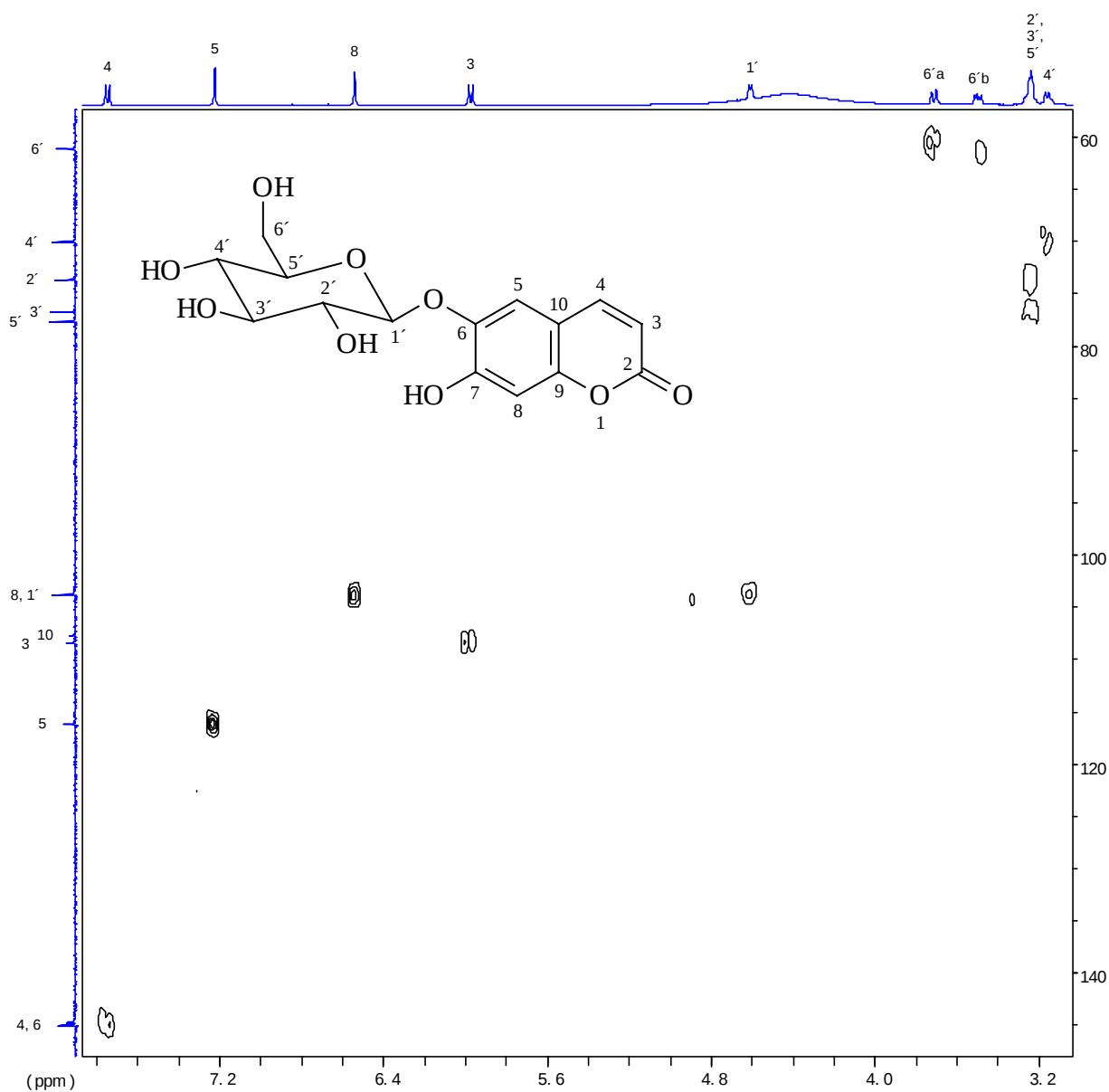


Bild 2.199: HMQC-Spektrum von **CU1** (500 bzw. 125 MHz, DMSO- d_6 , TMS)

3 Eigene pharmakologische Untersuchungen

3.1 Malaria – eine Geißel der Menschheit

Einführung

Die durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* hervorgerufene, als Malaria bezeichnete Erkrankung, ist seit den partiellen Erfolgen ihrer Bekämpfung in den fünfziger und sechziger Jahren wieder auf dem Vormarsch und stellt nach wie vor eine lebensbedrohende Erkrankung für einen großen Teil der Erdbevölkerung dar. Vor allem in den Ländern der dritten Welt leiden mehrere Hundert Millionen Menschen an der Erkrankung, weltweit sterben nach Schätzungen der WHO jährlich etwa 0,5 bis 2,5 Millionen daran.



Bild 3.1: Blutsaugende *Anopheles*-Mücke nach FELDMEIER, 1996

Geschichtliches

Das Krankheitsbild der Malaria ist schon seit der Antike bekannt, der Name dieser Infektion leitet sich von „mal aria“ ab, was soviel wie „schlechte Luft“ bedeutet. Man nahm an, dass die Erkrankung durch die feucht-schwüle Luft in den Sumpfgebieten verursacht wird. Obwohl in Mittelalter und Antike nichts über den Übertragungsweg der Malariaerreger bekannt war, berichtet bereits Herodot im 5. Jahrhundert v. Chr., dass Bewohner der ägyptischen Sumpfgebiete in turmähnlichen Konstruktionen oder unter Netzen schliefen, um sich den Moskitos zu entziehen. In der Volksmedizin vergangener Jahrhunderte finden sich schon früh Zeugnisse effektiver pflanzlicher Arzneimittel gegen die Malaria. Bekannte Beispiele sind die Chinarinde aus Südamerika oder ein Infus von Qinghao, einer chinesischen Beifuss-Art (siehe Kap. 0, S. 262). Es gelang allerdings erst im frühen 19. Jahrhundert den Apothekern Pelletier und Caventou, reines Chinin aus der Chinarinde zu isolieren. Der Erreger der Malaria wurde im Jahre 1880 von Laveran entdeckt, der 27 Jahre später für diese Leistung den Nobelpreis für Medizin erhielt. An der Schwelle zum 20. Jahrhundert, im Jahre 1897,

konnte Ross zeigen, dass Moskitos als Übertragungsvektor fungieren. Nach der Entdeckung des DDT während des zweiten Weltkrieges stand der Menschheit erstmals ein mächtiges Werkzeug zur Vernichtung des Überträgers zur Verfügung. Die WHO hatte sich zum Ziel gesetzt, in ihrem „WHO Global Malaria Eradication Programme“ die Malaria auf der ganzen Welt auszurotten. Die vielversprechenden Anfangserfolge machten die sich immer deutlicher abzeichnende Erkenntnis, dass das Programm scheitern würde, um so bitterer. 1969 gab man den Kampf auf. Warum hatte das DDT versagt? Zum einen hatte man nicht mit der erstaunlichen Anpassungsfähigkeit der Moskitos gerechnet. Zu schnell wurden viele Stämme des Insekts gegen das Insektizid immun. Zum anderen erging es den Strategen der WHO so wie etlichen Feldherren vor ihnen: Sie hatten die gewaltige Dimension ihres Vorhabens unterschätzt. Die Endemiegebiete in Afrika und Asien sind einfach von ihrer geographischen Ausdehnung her zu ausgedehnt, als dass eine flächendeckende Ausbringung von DDT mit beschränkten Mitteln möglich wäre. Wenige Jahre später eroberte *Plasmodium* weiteres Terrain in der weltweiten Malariaschlacht zurück, da die Waffen der Medizin, also die neu entwickelten synthetischen Malariamittel, aufgrund von Resistenzentwicklungen immer stumpfer wurden.

[WHO-Online-Informationen unter <http://www.who.int/ctd/html/malariadat.html>, 1998]

Entwicklungszyklus des Malariaerregers

Der Entwicklungszyklus der vier human-pathogenen *Plasmodium*-Arten ist mit einem obligaten Wirtswechsel zwischen der *Anopheles*-Mücke und dem Menschen sowie einem Wechsel von asexueller zu sexueller Fortpflanzung verbunden (siehe Bild 3.2, S. 259). Die Infektion erfolgt durch den Stich weiblicher *Anopheles*-Mücken (siehe Bild 3.1, S. 257), die sich zuvor an menschlichen *Plasmodium*-Trägern infiziert haben. Infektiöse Erregerstadien aus dem Speichel der Insekten (Sporozoitien), werden dabei in die Blut- oder Lymphbahn abgegeben und gelangen auf diesem Wege in die Leber, wo in den Hepatozyten nach kurzer Zeit die asexuelle Vermehrung dieser als „Gewebeschizonten“ bezeichneten Parasitenstadien einsetzt. Nach etlichen Teilungs- und Differenzierungsschritten kommt es unter Freisetzung von „Merozoiten“ zur Ruptur der Hepatozyten. Die Merozoiten gelangen so wieder in den Blutstrom und befallen die Erythrozyten, wo sie zu Blutschizonten heranreifen. Die Einzeller ernähren sich von den Glucosevorräten der Wirtszellen und dem Eiweiß des erythrozytären Haemoglobins. Die nicht verwertbaren Komponenten des Haemoglobins werden von den Plasmodien zu dem braunschwarzen Pigment Hämozoin abgebaut, welches in der Nahrungsvakuole des Parasiten abgelagert wird. Diese metabolische Inaktivierung ist für die Parasiten lebensnotwendig, da das aus der Häm-Komponente hervorgehende Abbauprodukt Ferriprotoporphyrin IX für die Plasmodien toxisch ist. Durch Zellteilungsvorgänge entstehen neue Merozoiten, die nach der Ruptur der befallenen roten Blutkörperchen in das Blutplasma gelangen und sofort andere Erythrozyten befallen können. Auf diese Weise wird der erythrozytäre asexuelle Vermehrungszyklus („Schizogoniezyklus“) aufrecht erhalten. Nach mehreren Merozoitengenerationen differenzieren sich einige Plasmodien zu Geschlechtsformen, die dann von den weiblichen *Anopheles*-Mücken wieder aufgenommen werden können und dort einem sexuellen Entwicklungszyklus unterliegen. Der Kreis schließt sich, wenn die am Ende der sexuellen Vermehrung stehenden Sporozoitien in die Speicheldrüsen der Mücken wandern und von dort durch den Stich der Mücke in einen weiteren potentiellen Wirt gelangen können [BOGITSH und CHENG, 1998; KAYSER, 1998].

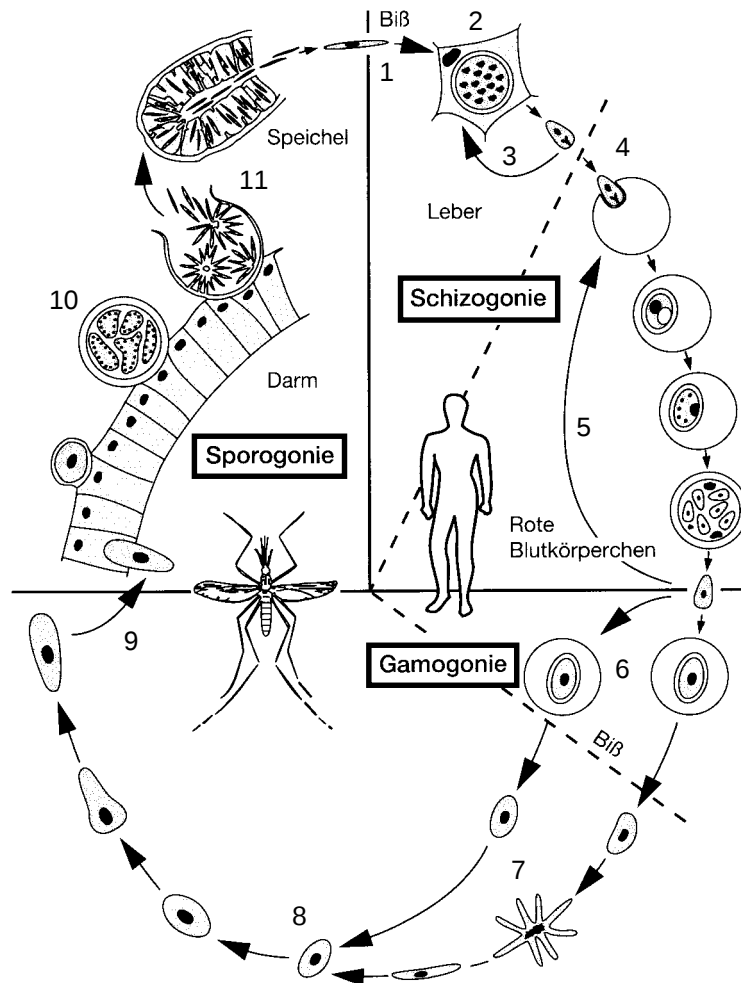


Bild 3.2: Entwicklungs-Zyklus der Malariaerreger nach FELDMEIER, 1994

- 1 Sporozoit aus dem Speichel einer Anopheles-Mücke gelangt beim Stich in die menschliche Blutbahn
- 2 Befall von Hepatozyten durch die Sporozoiten und Differenzierung in Gewebeschizonten
- 3 Infektion weiterer Hepatozyten; Umwandlung eines Teils der Gewebeschizonten in Hypnozoiten
- 4 Befall von Erythrozyten und Differenzierung in Blutschizonten
- 5 Infektion weiterer Erythrozyten durch Merozoiten
- 6 Umwandlung einiger Merozoiten in geschlechtlich differenzierte Plasmodien
- 7 Differenzierung in Mikro- und Makrogameten
- 8 Befruchteter Makrogamet (Ookinete)
- 9 Einwanderung des Ookineten in die Darmwand des Insekts
- 10 Differenzierung in Oozyte mit Sporozoiten
- 11 Freigabe der Sporozoiten und Migration in die Speicheldrüsen

Symptomatik

Die Initial-Symptome einer Malariainfektion können leicht mit typischen Grippesymptomen verwechselt werden. Aus diesem Grunde gilt auch heute noch die mikroskopische Untersuchung eines Tropfens Kapillarblut als Methode der Wahl für die Diagnose. Eine auch bei Laien bekannte klinische Manifestation ist das „Wechselfieber“. Es handelt sich dabei um heftige intermittierende Fieberschübe, die nach gleichen Beschwerde-freien Zeitintervallen auftreten. Man kennt die „Malaria tertiana“, die durch *P. vivax* und *P. ovale* ausgelöst werden kann. Bei dieser Form des Fiebers liegen 48 Stunden zwischen den Fieberschüben, d.h. das Fieber tritt jeden dritten Tag auf. Bei der durch *P. malariae* ausgelösten „Malaria quartana“

tritt der Fieberschub jeden vierten Tag auf. Das Wechselfieber ist eine Folge der Ausschüttung von Zytokinen, mit der humane Makrophagen und Monozyten auf die Freisetzung von plasmodialem Glykolipidmaterial bei der Ruptur der Erythrozyten reagieren. Die Regelmäßigkeit der Fieberanfälle beruht auf der Synchronisierung der Erreger, die sich nach einer gewissen Zeit alle im gleichen Stadium befinden. Bei Infektionen durch *P. falciparum* beobachtet man häufig einen fulminanten bis letalen Krankheitsverlauf („Malaria tropica“), bei dem die Fieberattacken in unregelmäßigen Intervallen auftreten. Besonders bedrohlich sind hypoxische Organschädigungen, die vor allem das ZNS betreffen. Sie entstehen dadurch, dass sich befallene Erythrozyten mit spezifischen Antigenen an Rezeptoren von Endothelzellen heften und dadurch Kapillaren verstopfen. Gefürchtet sind auch akute oder chronisch-progredient auftretende Nephritiden durch die Ablagerung von Immunkomplexen in den Nierenkapillaren. Monate bis Jahre nach der akuten Erkrankung kann es zu Rekrudeszenzen durch persistierende erythrozytäre *Plasmodium*-Formen oder zu Rezidiven durch die Reaktivierung hepatischer Dauerstadien (Hypnozoiten) kommen [BOGITSH und CHENG, 1998; KAYSER, 1998].

Pharmakotherapie- und Prophylaxe

Für die Chemotherapie der Malaria stehen verschiedene Wirkstoffe aus den Klassen der 4-substituierten Chinoline (siehe Bild 3.3, S. 261), 8-Aminochinoline, Phenanthrene (siehe Bild 3.4, S. 261), Tetracycline (siehe Bild 3.6, S. 262) und der den Folsäurestoffwechsel beeinflussenden Pharmaka (siehe Bild 3.5, S. 261) zur Verfügung. An Hand ihres Wirkspektrums teilt man diese Substanzen in fünf Gruppen ein, da kein derzeit verfügbares Pharmakon gegen alle Entwicklungsstadien von *Plasmodium* eingesetzt werden kann:

1. Gewebeschizontozide

Diese Stoffe wirken kausalprophylaktisch, indem sie die frühen hepatischen Entwicklungsstadien hemmen, bevor diese die Erythrozyten befallen können. Beispiele sind Primaquin, Pyrimethamin, Sulfonamide und Proguanil.

2. Hypnozoitozide

Mit Primaquin existiert zur Zeit nur ein Wirkprinzip gegen die Ruheformen der Parasiten in der Leber. Man setzt das Primaquin zur Rezidivprophylaxe bzw. Rezidiv-freien Ausheilung ein.

3. Blutschizontozide

Zu dieser Gruppe gehört der Großteil der verfügbaren Wirkstoffe: Chloroquin, Mefloquin, Chinin, Halofantrin, Pyrimethamin, Sulfonamide, Sulfone, Proguanil und Doxycyclin. Sie hemmen die Vermehrung der Plasmodien in den Erythrozyten und werden zur Suppressionsbehandlung beim akuten Malariaanfall und zur Prophylaxe eingesetzt. Bei den Chinolinen und bei Halofantrin beruht die Wirkung auf der Hemmung der Häm-Polymerase. Dieses Enzym benötigt der Parasit zur Synthese des Hämozins aus den toxischen Häm-Metaboliten.

4. Gametozide

Auch hier ist nur das Primaquin zu nennen. Es entfaltet seine Wirkung gegen die Geschlechtsformen der Parasiten und verhindert dadurch die Übertragung vom Menschen auf die Mücke.

5. Sporontozide

Zu dieser Reihe zählen Substanzen, die nach der Aufnahme von infiziertem Blut durch die Mücke die Entwicklung von Oozyste und Sporozoiten im Insekt unterbinden. Eine derartige Wirkqualität besitzen Primaquin und Pyrimethamin.

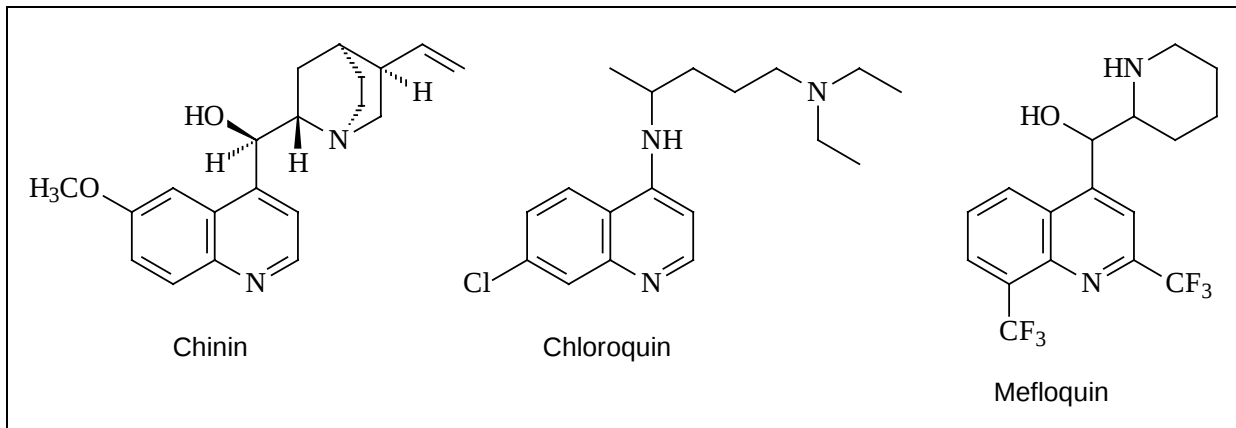


Bild 3.3: Blutschizontozide vom Typ der 4-substituierten Chinoline

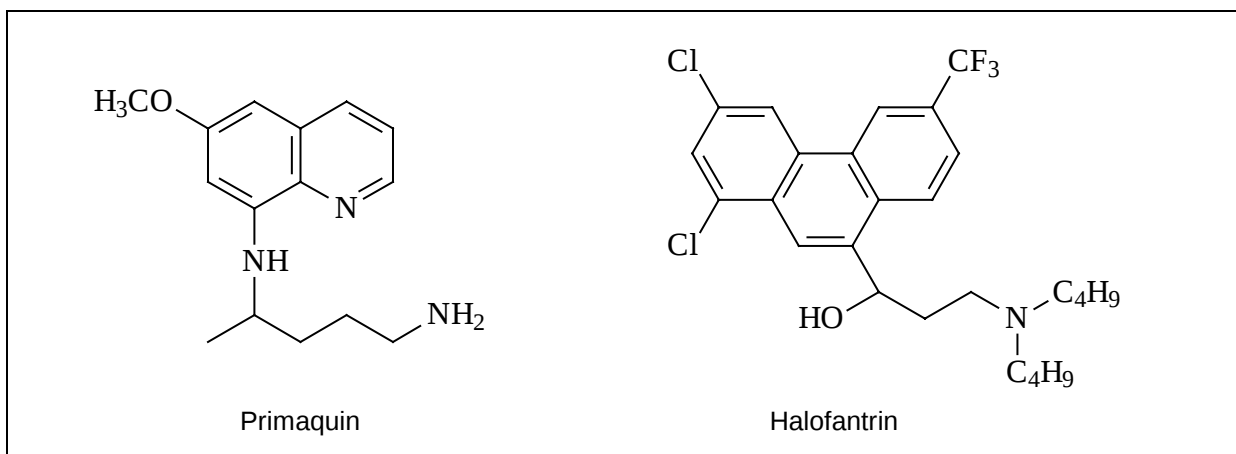


Bild 3.4: Das 8-Aminochinolin Primaquin und das Phenanthren-Derivat Halofantrin

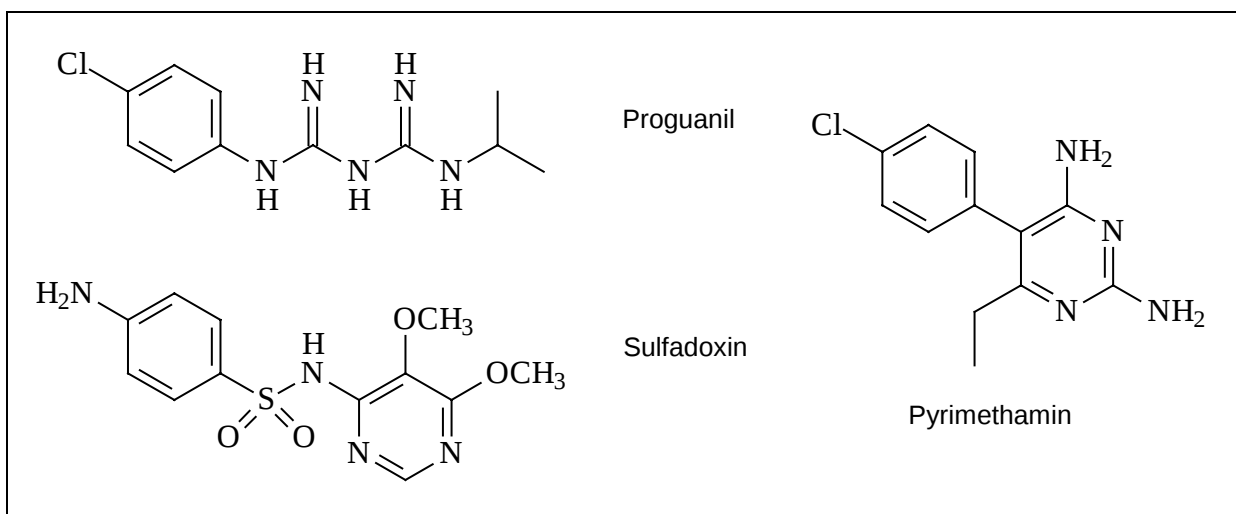


Bild 3.5: Den Folsäurestoffwechsel beeinflussende Malariamittel

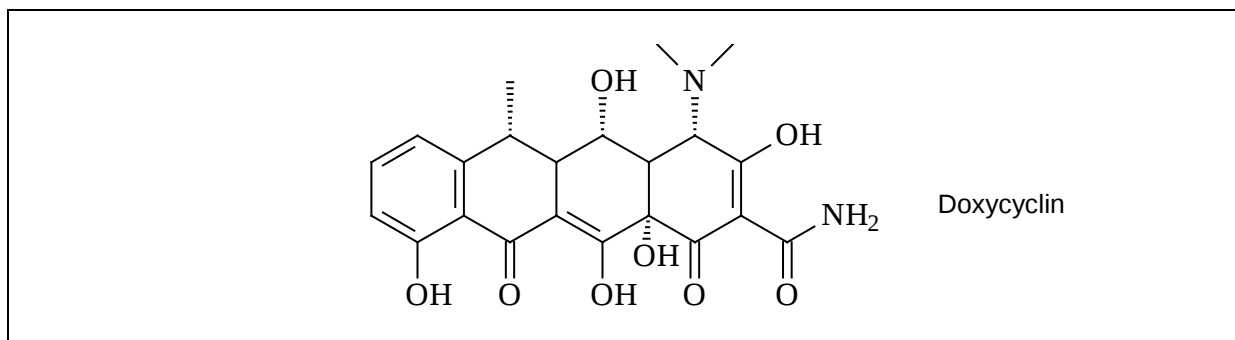


Bild 3.6: Das auch in der Malariatherapie etablierte Tetracyclin Doxycyclin

Aktuelle Trends in der Malariaforschung

Artemisinin

Im Jahr 1972 publizierten chinesische Wissenschaftler einen Artikel über ein Sesquiterpenlacton aus der auf der ganzen Welt verbreiteten Beifuß-Art *Artemisia annua*. Sie nannten es Qinghaosu, es wurde jedoch in der westlichen Welt einige Jahre später unter dem Namen Artemisinin bekannt (siehe Bild 3.7, S. 262).

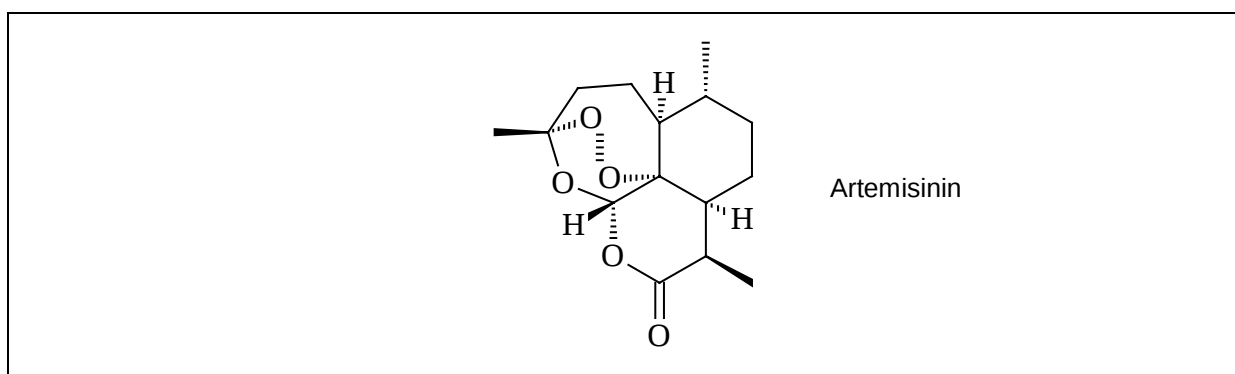


Bild 3.7: Struktur des stark antiplasmodial wirksamen SL's Artemisinin

Dieses Sesquiterpenlacton mit dem seltenen Cadinanolid-Grundkörper und einer Endoperoxidstruktur machte schnell durch seine hohe antiplasmodiale Aktivität und das Fehlen von Resistenzen auf sich aufmerksam. Bald kamen besser steuerbare Derivate dazu, bis heute hat man mehrere Hundert partial- und vollsynthetische Abkömmlinge mit veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften und besserer Wirksamkeit synthetisiert. Während Artemisinin-Derivate in Europa und den USA noch keine Zulassung besitzen, werden sie in mehreren asiatischen Ländern bei Infektionen mit multiresistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen, den Erregern der oft tödlich verlaufenden Malaria tropica, eingesetzt. Man nimmt an, dass Artemisinin durch Interaktion mit freiem oder Häm-gebundenem Eisen in Kohlenstoff-zentrierte Radikale überführt wird, die selektiv bestimmte Proteine der Plasmodienmembran alkylieren und so den Tod des Erregers herbeiführen. Im Tierversuch unter hohen Artemisinin-Dosen beschriebene neurotoxische Effekte konnten in der Praxis noch nicht bestätigt werden, dennoch soll Artemisinin nicht zur Prophylaxe und nur unter strenger Indikationsstellung angewandt werden. Durch diese Maßnahmen möchte man das bisher ausgebliebene Auftreten von Resistenzen verhindern. Artemisinin ist ein Beispiel dafür, dass auch heute noch potente Wirkstoffe aus der Phytotherapie hervorgehen und

unseren Arzneischatz bereichern können [CARVALHO et al., 1991; MESHNICK et al., 1996; VALECHA und TRIPATHI, 1997; VAN AGTMAEL et al., 1999; VROMAN et al., 1999].

DOXP-Reduktoisomerase-Hemmer

Eine Arbeit von JOMAA et al. in der Zeitschrift Science (1999) sorgte für großes Aufsehen. Dieser Arbeitsgruppe gelang der Nachweis, dass *P. falciparum* einen Mevalonat-unabhängigen Weg zur Isoprenbiosynthese beschreitet (siehe Bild 3.8, S. 264). Sie identifizierten die Gene für zwei Enzyme dieses Stoffwechselweges im Genom des Parasiten: Die DOXP-Synthase und die DOXP-Reduktoisomerase. DOXP ist die Abkürzung für 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat, einen Schlüsselmetaboliten dieser Biosynthesekaskade. In Säugetieren und Pilzen leitet sich das Isopentenylidiphosphat, aus dem alle höhermolekularen Isoprenoide entstehen, von der Mevalonsäure ab. Andere Arbeitsgruppen hatten entdeckt, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer bei Plasmodien keine Wirkung zeigten. Nachdem nun in manchen Eubakterien, Algen und Pflanzen ein alternativer Weg zur Synthese von Isoprenoiden entdeckt worden war, lag die Vermutung nahe, dass dies auch bei den Erregern der Malaria der Fall sein könnte. Charakteristisch für den DOXP-Weg ist die Kondensation von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu DOXP sowie dessen nachfolgende Umwandlung in 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) durch die Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase. Der neu entdeckte Stoffwechselweg erhielt danach die Bezeichnung „Methyl-Erythritol-Phosphat-Stoffwechselweg“ (MEP). Plasmodien besitzen nur die Enzymausstattung für diese Möglichkeit der Isoprenbiosynthese, die Nutzung des Mevalonatweges ist ihnen verwehrt. Das Erstaunliche ist jedoch nicht die Identifizierung der beiden Gene im Genom von *Plasmodium*, sondern die Entdeckung, dass die beiden ursprünglich als antiinfektive und herbizide Pharmaka entwickelten Substanzen Fosmidomycin und FR-900098 rekombinante DOXP-Reduktoisomerase hemmen. Ausserdem unterdrücken sie *in vitro* das Wachstum von multiresistenten *P. falciparum*-Stämmen. Darüber hinaus konnten die Giessener Forscher mit den beiden Substanzen Mäuse heilen, die mit dem Nager-pathogenen Malariaerreger *P. vinckei* infiziert worden waren. Fosmidomycin und FR-900098 ähneln strukturell dem 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat, dem Substrat der DOXP-Reduktoisomerase und hemmen deshalb dieses Enzym (siehe Bild 3.9, S. 264). Die Behandlungsmethode ist so elegant, weil Fosmidomycin und FR-900098 relativ untoxisch sind und die Isoprenbiosynthese des Wirtes nicht beeinflussen, da dieser das Isopentenylidiphosphat anders biosynthetisiert und somit die Targets der beiden Wirkstoffe gar nicht besitzt. Die beiden DOXP-Reduktoisomerase-Hemmer sind peroral wirksam. Als problematisch werden noch die kurze HWZ und die geringe Bioverfügbarkeit von 30% angesehen. Am Design besser steuerbarer Derivate wird jedoch schon intensiv gearbeitet. Da der MEP-Weg, wie bereits angedeutet, auch in höheren Pflanzen und manchen photosynthetischen Algen vorkommt, können diese Organismen bzw. deren Enzyme als ungefährliche und gut kontrollierbare Modelle bei der Entwicklung dieser Derivate dienen. Nach neueren Erkenntnissen verläuft die Isoprenbiosynthese auch bei Mycobakterien, den Erregern der Tuberkulose, über den MEP-Weg [JOMAA et al., 1999; LICHTENTHALER et al.; 2000; MÜLLER-BOHN, 2000; RIDLEY, 1999; RÜCKER, 1999].

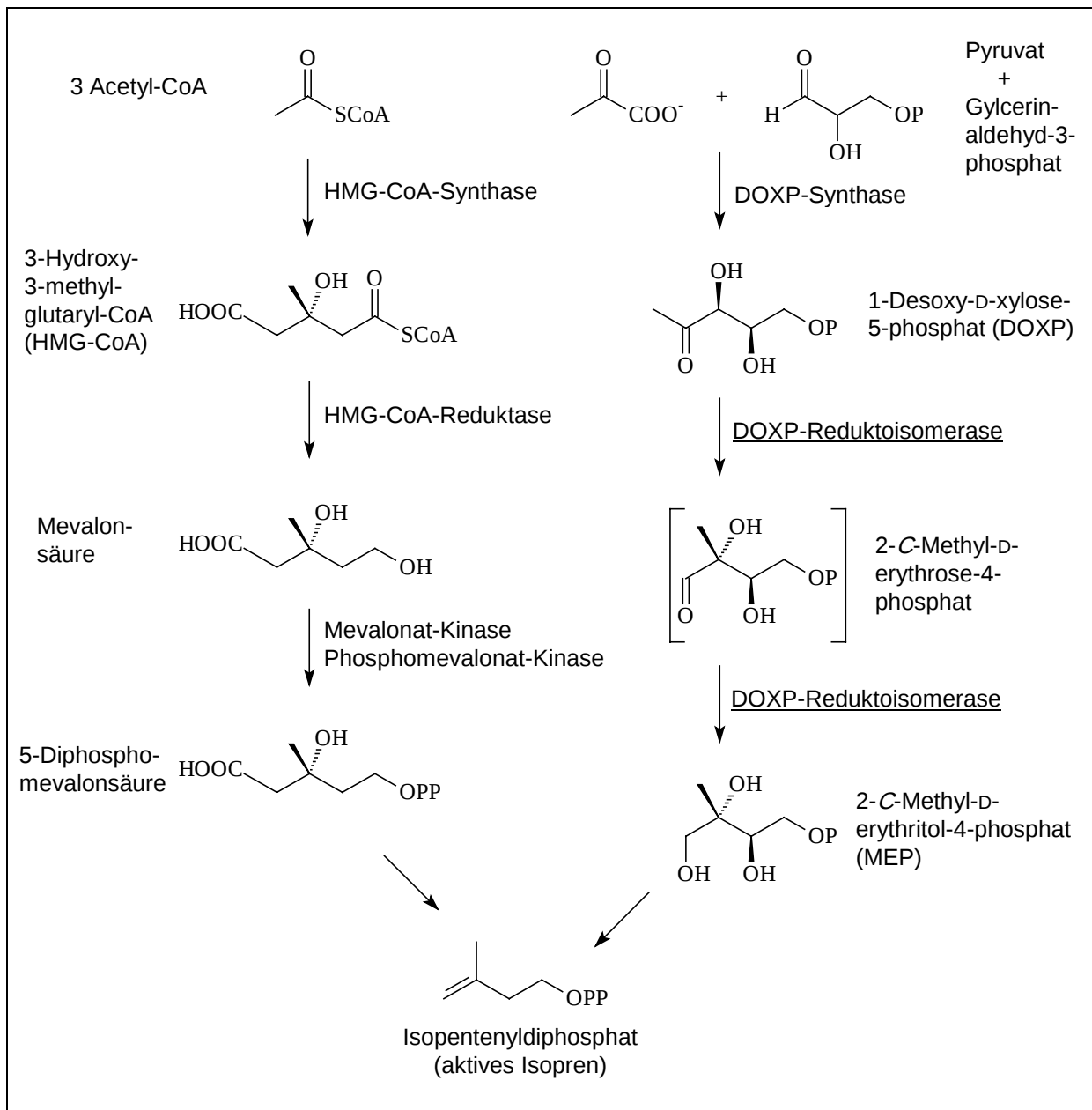


Bild 3.8: Biosynthese von Isopentenyl diphosphat, der Stammverbindung der Isoprenoide; links nach dem Mevalonat-, rechts nach dem Methyl-Erythritol-Phosphat-Stoffwechselweg [RIDLEY, 1999]

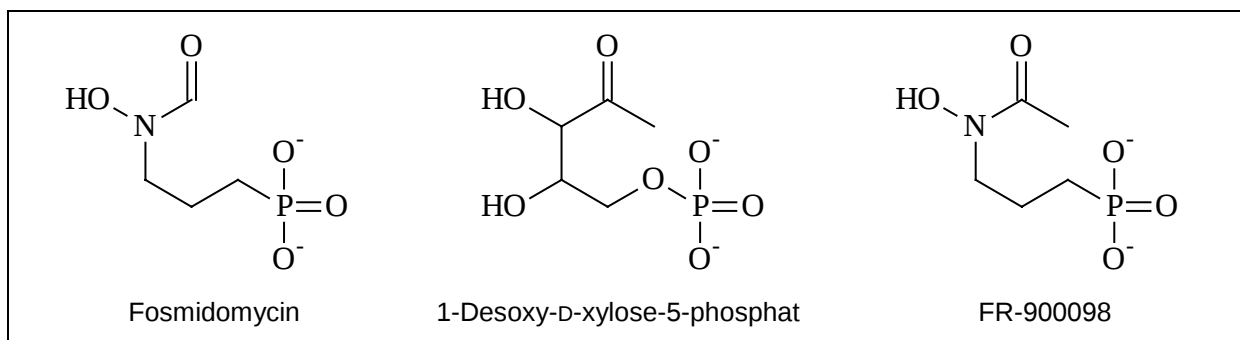


Bild 3.9: Strukturanalogie zwischen den beiden DOXP-Reduktoisomerase-Hemmern Fosmidomycin und FR-900098 sowie dem natürlichen Substrat des Enzyms, 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat

Tafenoquin

Bei Tafenoquin handelt es sich um ein mit dem Primaquin verwandtes 8-Aminochinolin (siehe Bild 3.10, S. 265), welches sich durch eine bemerkenswert lange Halbwertszeit von 14 Tagen auszeichnet und gegen Gewebe- und Blutschizonten von *Plasmodium* wirksam ist.

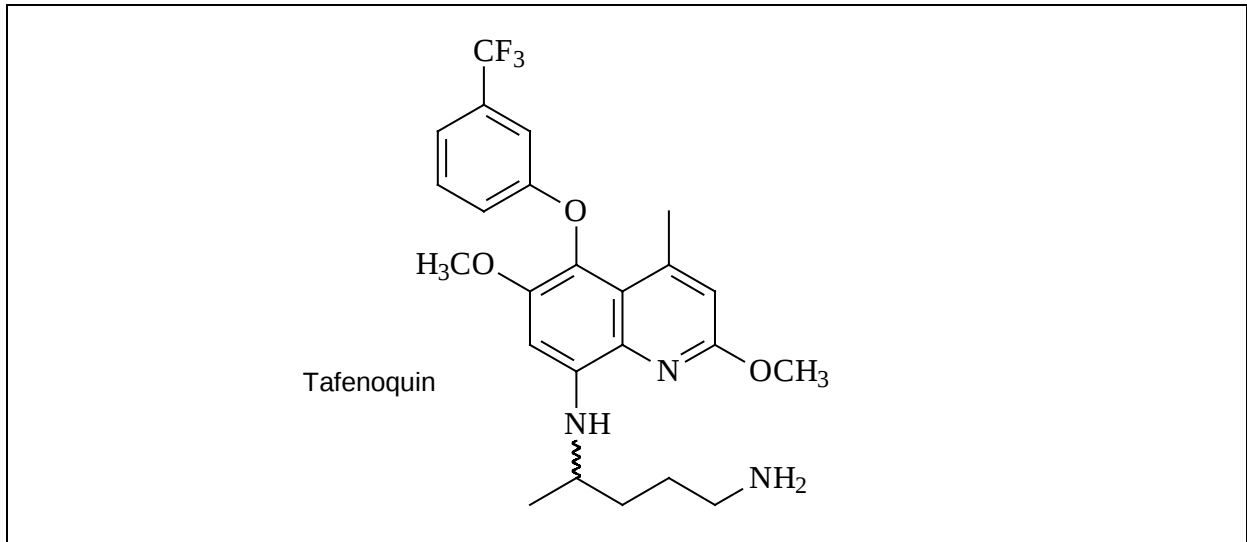


Bild 3.10: Das neue 8-Aminochinolin-Derivat Tafenoquin

Die Ergebnisse einer vor kurzem veröffentlichten Studie an 410 gesunden Schülern aus dem afrikanischen Staat Gabun sprechen dafür, dass nach der Gabe von jeweils 250 mg Tafenoquinsuccinat an drei aufeinander folgenden Tagen ein sicherer mehrwöchiger Schutz vor einer Infektion mit *P. falciparum* gewährleistet ist [LELL et al., 2000]. Dabei waren die Nebenwirkungen nicht signifikant häufiger als unter Placebo und wurden allgemein als mild bezeichnet. Die gute Verträglichkeit, die nur dreimal notwendige Einnahme, die wochenlange Wirkdauer und die Wirksamkeit gegen verschiedene *Plasmodium*-Arten und –Stadien könnten Tafenoquin zu einem idealen Kurzzeitprophylaktikum machen. Da sich die Substanz noch in der klinischen Prüfung befindet, steht sie zur Zeit noch nicht zur breiten Anwendung zur Verfügung [JUNGMAIR, 2000].

Immunologische und gentechnische Ansätze

Trotz etlicher vielversprechender Versuche, beim Menschen eine aktive Immunisierung gegen Plasmodien zu erzielen [AMADOR und PATARROYO, 1996], werden noch etliche Jahre vergehen, bis eine verlässliche Vakzine zur Verfügung steht. Hindernisse auf dem Weg dorthin sind die große genetische Variabilität des Erregers und die komplexe und nicht ausreichende humane Immunantwort. Polyvalente DNA-Vakzinen gegen mehrere Entwicklungsstadien scheinen die vielversprechendsten Kandidaten für die klinische Praxis zu sein [BROWN, 1999; KWIATKOWSKI und MARSH, 1997; RILEY, 1997].

Vor kurzer Zeit gelang mexikanischen Wissenschaftlern die Entdeckung, dass Plasmodien durch ein bestimmtes Skorpiongift abgetötet werden. Die genetische Information für die Giftproduktion hatten die Forscher in das Genom von Fruchtfliegen eingebaut und den transgenen Tieren anschließend Malaria-Plasmodien injiziert. Das verblüffende Ergebnis: Nur noch in 12% der Fliegen konnten sich die Erreger vermehren, bei allen anderen wurde die Vermehrung durch das „zelleigene“ Skorpiongift gehemmt. Was bei Fruchtfliegen

funktioniert, sollte auch bei *Anopheles*-Mücken möglich sein. Zum Zeitpunkt der mexikanischen Forschungsarbeiten war indes noch nicht bekannt, wie ein Eingriff in das Erbgut von *Anopheles* zu bewerkstelligen sei. Dieses Problem konnte jedoch inzwischen von Wissenschaftlern vom Imperial College in London gelöst werden. Sie berichteten vor kurzem erstmals über eine transgene *Anopheles*-Mücke. Die Ergebnisse der beiden Arbeitskreise lassen den lange gehegten Wunsch, die natürlichen *Anopheles*-Populationen nach und nach durch Malaria-freie gentechnisch veränderte Tiere ersetzen zu können, in greifbare Nähe rücken [BOYCE, 2000].

Vielversprechende Neuigkeiten gibt es auch aus Frankreich. Wissenschaftler vom Institute Louis Pasteur in Paris injizierten Schimpansen ein Sporozoiten-Antigen von *P. falciparum* und erzielten damit bei den Versuchstieren einen zuverlässigen Infektionsschutz vor den Malariaerregern. An der Weiterentwicklung des Serums wird intensiv gearbeitet [DAUBERSIES et al., 2000].

3.2 Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität von Sekundärstoffen aus dem Dichlormethan-Extrakt von *E. semialatum*

3.2.1 Der pLDH-Test (Parasiten-Lactatdehydrogenase-Test)

Plasmodien beziehen ihre chemische Energie in Form von ATP ausschließlich aus der Glykolyse. Die Nutzung des Citrat-Zyklus ist den Einzellern nicht möglich, da ihnen die entsprechenden Enzyme fehlen. Der letzte Reaktionsschritt der Glykolyse besteht in der $\text{NADH} + \text{H}^+$ -abhängigen Reduktion von Pyruvat zu Lactat. Das diese Reaktion katalysierende Enzym ist die Lactatdehydrogenase von *P. falciparum* (pLDH). Bei dieser Umsetzung wird das im früheren Verlauf der Glykolyse während der oxidativen Phosphorylierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Diphosphoglycerat eingesetzte NAD^+ regeneriert (siehe Bild 3.11, S. 267) [WRIGHT und PHILLIPSON, 1990]. Durch den Austausch von NAD gegen 3-Acetylpyridinadenindinucleotid (APAD) kann man bei NAD-abhängigen Enzymreaktionen die Lage des Gleichgewichts verschieben. Das Gleichgewicht wird dabei umso weiter zu Gunsten der Substratoxidation verschoben, je positiver das Redoxpotential des $\text{APAD}^+/\text{APADH} + \text{H}^+$ -Systems im Vergleich zu dem des $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ -Systems ist [KAPLAN et al., 1956].

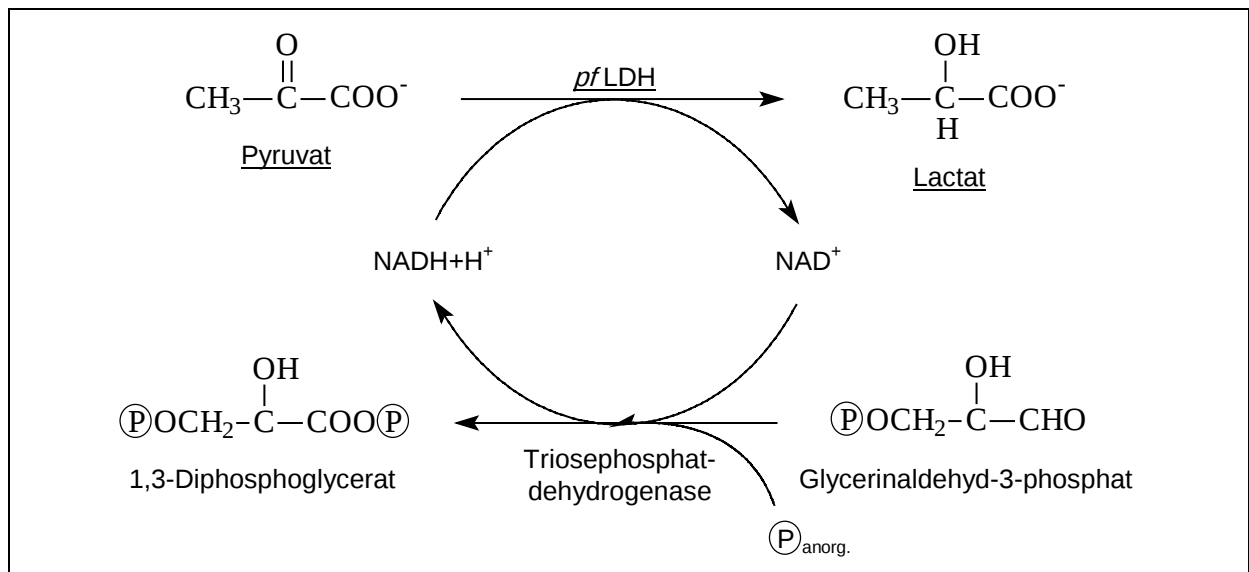
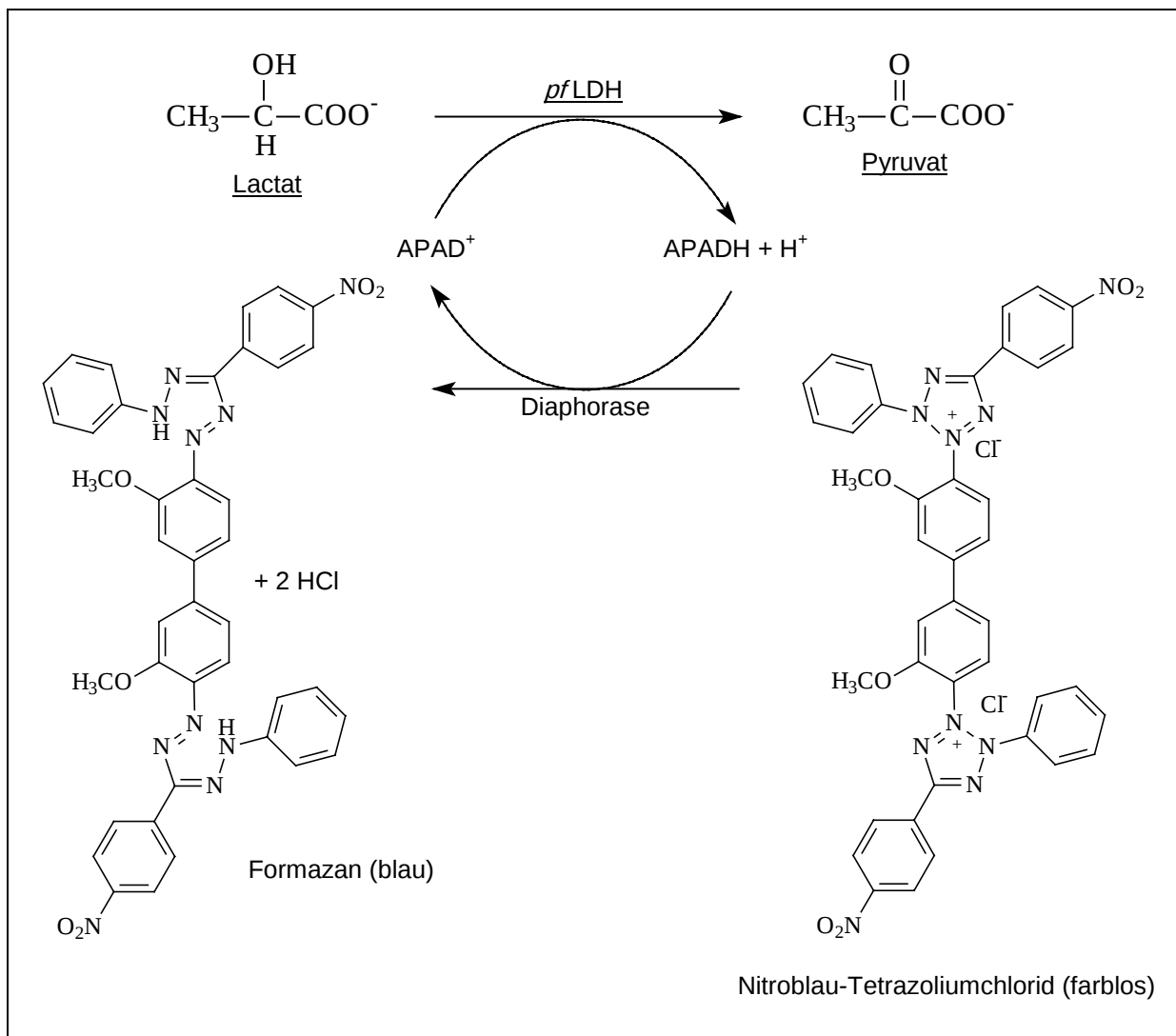


Bild 3.11: Die für den pLDH-Test entscheidende Reaktionssequenz aus der Glykolyse

Weitere Arbeiten führten zu dem Ergebnis, dass die LDH der avipathogenen *Plasmodium*-Art *P. lophurae* mit Hilfe von APAD von der LDH des Wirtes unterschieden werden kann. Die Unterscheidung beruht auf der Tatsache, dass unter APAD-Zusatz die plasmodiale LDH das Substrat viel schneller umsetzt als die in den Erythrozyten der Kultur ubiquitär vorkommende LDH des Wirtes. Somit konnte auch in Gegenwart der Wirts-LDH die Enzymaktivität der *Plasmodium*-LDH selektiv bestimmt werden [SHERMAN, 1966]. Schließlich gelang mit einer Weiterentwicklung der Methode auch die Differenzierung zwischen humaner LDH und pLDH sowie eine Korrelation zwischen der Parasitaemie humaner infizierter Blutproben und den gemessenen APADH+H⁺-Konzentrationen [MAKLER und HINRICHS, 1993]. Aus den dabei gewonnenen Erkenntnissen entwickelten Wissenschaftler des selben Arbeitskreises den pLDH-Test für die Bestimmung der *in vitro*-Aktivität von Arzneistoffen gegen *P. falciparum* [MAKLER et al., 1993]. Die dabei erzielten Ergebnisse bei der Bestimmung der IC₅₀ verschiedener Malariamittel korrelierten hervorragend mit den Resultaten aus dem nur in Sicherheitslabors durchführbaren Hypoxanthin-Test mit radioaktivem Tritium und der zeitaufwendigen mikroskopischen Methode. Die Vorteile im Hinblick auf Geschwindigkeit, Kosten und Sicherheit lagen jedoch eindeutig auf Seiten des pLDH-Tests.

Der im Zuge dieser Arbeit durchgeführte pLDH-Test basiert auf den von MAKLER und HINRICHS (1993) angegebenen Methoden. Er wurde von Dr. Colin W. Wright von der School of Pharmacy der University of Bradford und seinen Mitarbeitern im Hinblick auf das Pipettierschema und die Zusammensetzung der eingesetzten Reagenzien optimiert. Alle mit dem pLDH-Test verbundenen eigenen Arbeiten wurden während eines Forschungsaufenthalts in Bradford im Labor von Dr. Wright durchgeführt.

Bild 3.12: Indikatorreaktion beim modifizierten *p*LDH-Assay

Bei der für den Test entscheidenden enzymatischen Reaktion (siehe Bild 3.12, S. 268) nimmt das zugesetzte APAD^+ als Coenzym den Wasserstoff auf, der bei der *p*LDH-katalysierten Oxidation von Lactat zu Pyruvat frei wird. Bei der Reoxidation von $\text{APADH} + \text{H}^+$ dient ein Gemisch aus Nitroblau-Tetrazoliumchlorid und Phenazinethosulfat als Elektronenakzeptor. Das Tetrazoliumsalz wird dabei zum blauen Formazan reduziert, dessen Absorption bei 550 nm spektralphotometrisch bestimmt werden kann. Die Reduktion des Farbstoffes wird durch das mit dem APAD-Reaktionsgemisch zugeführte Enzym Diaphorase katalysiert. Eine intensive Blaufärbung erhält man bei den Vergleichsproben, die nur das Kulturmedium mit den infizierten Erythrozyten, aber keinen Arzneistoff enthalten. In diesen Proben wurde das Wachstum der Plasmodien nicht beeinflusst und die Enzymaktivität der *p*LDH ist entsprechend hoch. So entsteht viel $\text{APADH} + \text{H}^+$ und ein entsprechend großer Teil des farblosen Tetrazoliumsalzes wird zum farbigen Formazan reduziert. Farblose oder nur schwach gefärbte Proben weisen dagegen auf eine geringe *p*LDH-Aktivität durch Abtötung der Erreger hin. Somit ist die gemessene Absorption ein Maß für die Überlebensrate der Plasmodien. Es lässt sich also schon optisch schnell ein erster Eindruck davon gewinnen, ob und in welcher Verdünnung eine Testsubstanz wirksam war.

3.2.2 Ergebnisse

Bis auf die Verbindungen **SL3**, **SL4** und **SL10** wurden alle aus *E. semialatum* isolierten Sesquiterpenlactone in den modifizierten pLDH-Assay eingesetzt. Bei den nicht getesteten Substanzen war die Ausbeute zu gering, um sie in hinreichender Redundanz testen zu können. Aus den gemessenen Absorptionen der acht Versuchsansätze (jeweils sechs Wiederholungen) wurden die IC_{50} -Werte berechnet (siehe Kap. 6.6.9, S. 344). Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Substanzen vergleichen und bewerten zu können, wurde bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse (siehe Kap. 6.6.10, S. 344) neben der Ermittlung der üblichen Kennzahlen der deskriptiven Statistik (siehe Tabelle 3.1, S. 269) auch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt [BÜHL und ZÖFEL, 2000; SACHS, 1999; ZÖFEL, 2001]. Dieses Verfahren dient dem Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben hinsichtlich ihrer Mittelwerte. Hierbei soll geprüft werden, ob sich ein oder mehrere Werte signifikant vom Gesamtmittelwert aller Stichproben unterscheiden. Ziel des Verfahrens ist es, die Nullhypothese H_0 , welche eine zufällige Streuung der Mittelwerte postuliert, zu verwerfen. Gelingt dies, so ist auf dem gewählten Signifikanzniveau ein signifikanter Einfluß der unabhängigen Variable auf die abhängige Variable vorhanden. In diesem Falle ist die Varianz zwischen den Stichproben größer als die Varianz innerhalb der Stichproben. Signifikanz wird dann erreicht, wenn das Verhältnis dieser Varianzen größer als ein für eine bestimmte Anzahl von Freiheitsgraden tabellierter Wert der Prüfvariable F ist. Die Bezeichnung „Varianz-Analyse“ wird im Zusammenhang mit dem Vergleich von Mittelwerten oft als irreführend empfunden, da sie einen Test der Varianzen auf signifikante Unterschiede impliziert. Der Name rührt jedoch daher, dass eine Zerlegung der Gesamt-Varianz Grundlage des Verfahrens ist.

Tabelle 3.1: IC_{50} -Werte und daraus abgeleitete statistische Kennzahlen der mit dem modifizierten pLDH-Assay getesteten Sesquiterpenlactone aus *E. semialatum*

Substanz	n	IC_{50} [μ M] Mittelwert	Standard- abweichung	Standard- fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
					Untergrenze	Obergrenze
SL1	6	31,73	9,78	3,99	21,47	41,99
SL2	6	28,53	7,92	3,23	20,22	36,84
SL5	6	27,02	9,06	3,70	17,51	36,53
SL6	6	26,15	3,65	1,49	22,32	29,98
SL7	6	16,32	4,65	1,90	11,44	21,20
SL8	6	8,85	4,28	1,75	4,36	13,34
SL9	6	13,31	10,10	4,12	2,71	23,91
SL11	6	11,40	5,75	2,35	5,37	17,43

Bei der vorliegenden Untersuchung war als Nullhypothese anzunehmen, dass die Identität des getesteten SL's keinen Einfluß auf die Wirkung gegen *P. falciparum* hat, d.h. dass sich für alle getesteten SL die IC_{50} -Werte nicht signifikant voneinander unterscheiden. Bei der Berechnung ergab sich jedoch bei (7,40) Freiheitsgraden und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,001 für die Prüfvariable ein signifikanter Wert von $F = 8,839$. Hieraus folgt, dass die Nullhypothese verworfen werden kann und sich damit mindestens ein IC_{50} -Wert von den anderen signifikant unterscheidet. Die Frage, welche der getesteten Substanzen für diesen

Effekt verantwortlich ist bzw. sind, kann mit Hilfe der ANOVA nicht beantwortet werden. Dies gelingt erst durch die Anwendung eines sogenannten „Post-hoc-Tests“ [ZÖFEL, 2001]. In diesem Fall wurde der bei pharmakologischen Untersuchungen häufig eingesetzte Post-hoc-Test nach Duncan durchgeführt.

Durch Anwendung dieses Verfahrens konnten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 zwei homogene Untergruppen A und B gebildet werden, deren mittlere IC_{50} -Werte sich signifikant von denen der jeweils anderen Untergruppe unterscheiden (siehe Bild 3.13, S. 270).

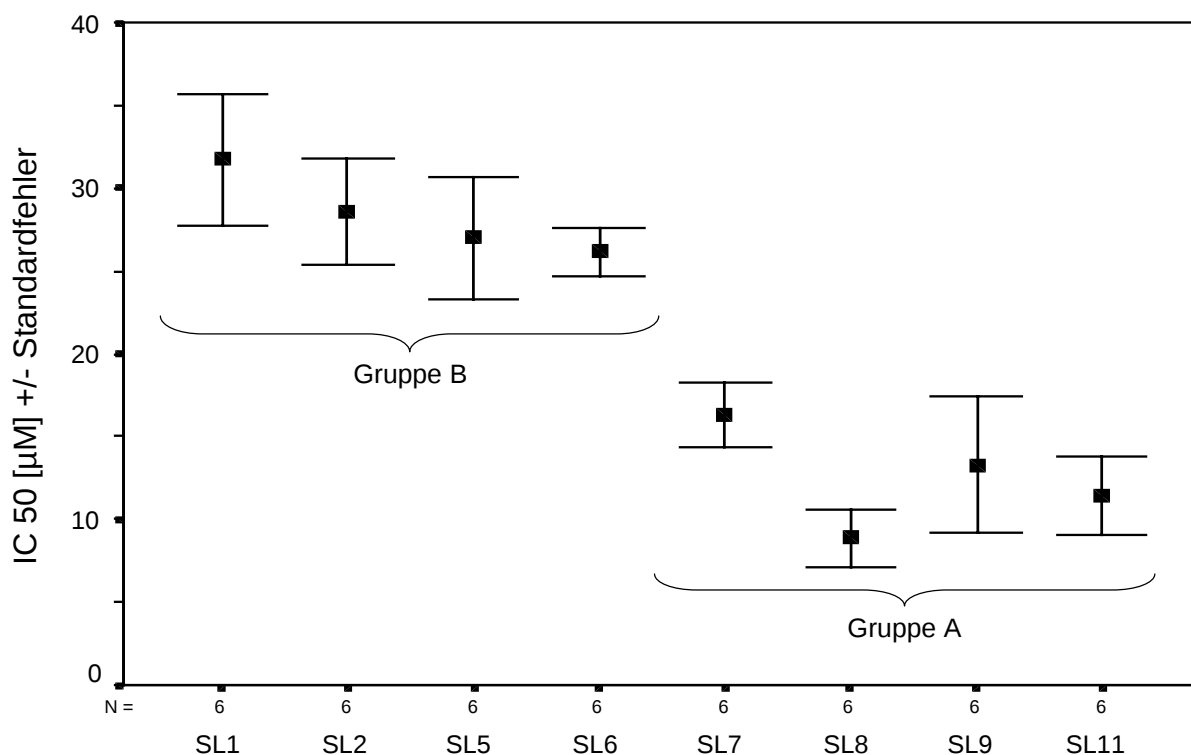


Bild 3.13: IC_{50} -Werte der im modifizierten pLDH-Assay getesteten Sesquiterpenlactone aus *E. semialatum*; die Fehlerbalken umfassen den Bereich des einfachen Standardfehlers um den jeweiligen Mittelwert

Gruppe A enthält die Substanzen mit den niedrigeren IC_{50} -Werten (SL7, SL8, SL9 und SL11), Gruppe B die mit den höheren Werten (SL1, SL2, SL5 und SL6). Bei den Substanzen der Gruppe A liegen die mittleren IC_{50} -Werte zwischen 8,85 (SL8) und 16,32 µM (SL7), bei den Vertretern der Gruppe B findet man Werte zwischen 26,15 (SL6) und 31,73 µM (SL1). Da für das als Positivkontrolle mitgetestete Chloroquin eine IC_{50} von $0,43 \pm 0,1$ µM bestimmt worden war, ist die wirksamste Verbindung von Gruppe A (SL8) etwa zwanzig Mal schwächer und die am schwächsten wirkende Verbindung von Gruppe B (SL1) etwa fünfundsiebzig Mal schwächer wirksam als Chloroquin. Betrachtet man die Struktur der getesteten SL, so fällt auf, dass Gruppe A die Eudesmanolide mit endozyklischer Doppelbindung (SL7 bis SL9) sowie das Guaianolid SL11 enthält. Zur Gruppe B gehören die Derivate des 8β-Hydroxyreynosins mit exozyklischer Doppelbindung (SL1, SL2, SL5 und SL6). Hieraus folgt, dass bei den getesteten Eudesmanoliden mit einer Verschiebung der Doppelbindung von Δ4,15 (SL1, SL2, SL5 und SL6) nach Δ3,4 (SL7 und SL8) oder Δ4,5 (SL9) eine Wirksamkeitssteigerung einhergeht. Bei den Reynosin-Derivaten der Gruppe B,

die sich nur hinsichtlich der Länge und der Stereochemie der Esterseitenkette unterscheiden, ließ sich feststellen, dass die Struktur dieser Kette keinen signifikanten Einfluß auf die Wirkung hat. Das zur Gruppe A gehörende Guaianolid **SL11** zeigte sich im Hinblick auf seine Wirkstärke mit den Eudesmanoliden mit endozyklischer Doppelbindung (**SL7** bis **SL9**) vergleichbar.

4 Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchte Pflanze *Eupatorium semialatum* Benth. wird innerhalb der Asteraceae in die Tribus Eupatorieae eingeordnet. Eine vollständig neue Bearbeitung der Eupatorieae wurde im Jahre 1987 publiziert [KING und ROBINSON, 1987]. Sie ist gleichsam das Lebenswerk der beiden renommierten Botaniker Robert Merrill King und Harold Robinson vom Naturhistorischen Museum in Washington. Die Tribus Eupatorieae ist im Laufe der letzten beiden Jahrhunderte schon von mehreren namhaften Systematikern nach unterschiedlichen Gesichtspunkten bearbeitet worden. Vor dem Beginn der Studien von King und Robinson herrschte in der botanischen Literatur ein Wirrwar von mehreren Tausend zu den Eupatorieae gerechneten Spezies. Allein unter dem Genus *Eupatorium* führte der Index Kewensis über 1000 Arten. Die Ursache für die breite Interpretation des *Eupatorium*-Komplexes ist in der Tatsache begründet, dass die Gattung von Linné erstmals beschrieben wurde und seine Auffassung des Genus *Eupatorium* von nachfolgenden Botanikern adaptiert wurde. Linnés Merkmale galten jedoch nur für die einzige in Europa vorkommende Art (*Eupatorium cannabinum* L.), während die späteren Bearbeiter der Tribus die vielen ähnlichen, in Mittelamerika neu entdeckten Pflanzen mit in dieses Konzept einbezogen. Dieser Inflation der unter dem Genus *Eupatorium* geführten Spezies begegneten King und Robinson mit der Eliminierung synonyme Taxa und der Einführung eines einheitlichen kladistischen Systems auf der Basis moderner Erkenntnisse auf den Gebieten der Anatomie, Cytologie und Geobotanik. Das Fundament ihres Klassifizierungssystems bilden 18 Subtriben mit insgesamt 180 Gattungen. Arten, die man bis zu diesem Zeitpunkt unter dem Gattungsnamen *Eupatorium* zusammenfaßte, wurden auf 11 Subtribus verteilt, vor allem auf die Gattung *Ageratina* im Subtribus Oxyllobinae, daneben auch auf die Gattungen *Ayapana*, *Chromolaena*, *Critonia*, *Fleischmannia*, *Koanophyllon* und *Neomirandea*. Die eigentliche Gattung *Eupatorium* wurde auf systematisch klar abgegrenzte Arten mit arкто-tertiärem Verbreitungsgebiet (Europa, Ostasien und das östliche Nordamerika) reduziert und mit ihren verbliebenen 44 Spezies in die Subtribus der Eupatoriinae gestellt. Die Gattung *Ageratina*, in der unzählige *Eupatorium*-Arten aufgegangen sind, unterscheidet sich von der Gattung *Eupatorium* vor allem durch die höhere Basis-Chromosomenzahl (17 statt 10), einige Merkmale der Einzelblüten und die geographische Verbreitung. *Ageratina*-Arten kommen in Zentralamerika, den Anden, im Osten der Vereinigten Staaten und auf den Westindischen Inseln vor. Zur weiteren Differenzierung der 248 *Ageratina*-Arten führten King und Robinson fünf Subgenera ein: *Ageratina*, *Andina*, *Apoda*, *Klatiella* und *Neogreenella* [KING und ROBINSON, 1970a, 1970b und 1987; ROBINSON und KING, 1985].

Zum 90 Spezies umfassenden Subgenus *Neogreenella* zählt auch *Ageratina ligustrina* (DC.) R. King & H. Robinson, die von den beiden Autoren als identisch mit der *Eupatorium*-Art *E. ligustrinum* angesehen wird [KING und ROBINSON, 1970a]. Aus ihrer später veröffentlichten Monographie über die Eupatorieae geht zudem hervor, dass auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Spezies *E. semialatum* mit *A. ligustrina* identisch sein soll [KING und ROBINSON, 1987]. Die Orientierung innerhalb dieser Gruppe von vorgeblich gleichen Arten wird ferner durch den Gebrauch einiger weiterer synonyme Bezeichnungen erschwert (siehe Tabelle 4.1, S. 274).

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der Synonyme für *E. semialatum* Benth.

Spezies	Quelle
<i>A. caeciliae</i> (B.L. Rob.) King H. Rob.	TURNER, 1997
<i>A. ligustrina</i> (DC.) R. King & H. Robinson	BERENDSOHN und DE GONZÁLEZ, 1989; CÁCERES, 1996; CLEWELL, 1975; DIESELDORFF, 1977; KING und ROBINSON, 1987; MORTON, 1981
<i>A. plethadenia</i> King & Robinson	CÁCERES, 1996; NASH und WILLIAMS, 1976
<i>A. semialata</i> (Benth.) K. et R.	BOHLMANN et al., 1977b
<i>E. biceps</i> Klotzsch ex Vatke	KING und ROBINSON, 1987
<i>E. caeciliae</i> B.L. Rob.	TURNER, 1997
<i>E. erythropappum</i> B. Robinson	KING und ROBINSON, 1987
<i>E. glabellum</i> Hort. Ex Sieber & Voss	KING und ROBINSON, 1987
<i>E. ligustrinum</i> DC.	BERENDSOHN und DE GONZÁLEZ, 1989; CÁCERES, 1996; CLEWELL, 1975; DIESELDORFF, 1977; KING und ROBINSON, 1987
<i>E. micranthum</i> Less.	KING und ROBINSON, 1987
<i>E. myriadenium</i> Schauer	KING und ROBINSON, 1987
<i>E. odoratissimum</i> Hort. Ex Sieber & Voss	KING und ROBINSON, 1987
<i>E. plethadenium</i> Standl. & Steyer.	CÁCERES, 1996; NASH und WILLIAMS, 1976
<i>E. vetularum</i> Standl. & Steyer.	TURNER, 1997
<i>E. weinmannianum</i> Regel & Koern.	KING und ROBINSON, 1987

Im Gegensatz zu King und Robinson geht Louis O. Williams (Field Museum of Natural History, Chicago) von einem weiter gefaßten generischen Konzept der Eupatorieae aus [NASH und WILLIAMS, 1976]. Seiner Meinung nach umfaßt das Genus *Eupatorium* weltweit ungefähr 600 Arten, wovon mehr als 85 allein auf Guatemala entfallen. An Hand einiger Beispiele kommt er zu dem Schluß, King und Robinson hätten möglicherweise oberflächlich gearbeitet [WILLIAMS, 1975]. Auch seine Sichtweise des *Ageratina ligustrina*-Komplexes und der Identität von *E. semialatum* weicht von der der Washingtoner Wissenschaftler ab. Er betrachtet *E. semialatum* Benth. als eigenständige Art, die nicht mit *A. ligustrina* verwandt oder mit den anderen von King und Robinson genannten Spezies synonym ist. Er betont, dass in der Vergangenheit der überwiegende Teil des Pflanzenmaterials von *E. semialatum* Benth. fälschlicherweise als *E. ligustrinum* DC. bestimmt worden ist. Williams ist überzeugt, dass *E. ligustrinum* DC. eine nordmexikanische Art repräsentiert, die sich deutlich von der in Guatemala heimischen Spezies *E. semialatum* Benth. unterscheidet. Er untermauert seine These durch die Untersuchung vieler selbst gesammelter Pflanzen und die Begutachtung eines Herbarbelegs von *E. ligustrinum* aus dem Delessert Herbarium in Genf. Die Gattung *Ageratina* ist in seiner „Flora of Guatemala“ gar nicht vertreten.

King und Robinson reagierten darauf mit einer negativen Rezension von Williams' „Flora von Guatemala“, in der sie ihm diverse Fehler vorwerfen [KING und ROBINSON, 1977]. Späte Unterstützung erhielten die beiden Wissenschaftler von dem texanischen Botaniker B.L. Turner, der im Jahre 1997 eine Monographie über die Asteraceae von Mexiko publizierte und

sich darin ausdrücklich von Williams' Sichtweise distanziert [TURNER, 1997]. Antonio Molina R. schließt sich in seiner Bearbeitung der Flora von Honduras der Sichtweise von Williams an, indem er sich auf die eine Spezies *E. semialatum* beschränkt [MOLINA R., 1975]. Ebenso verfährt Sutherland in seiner Flora von Honduras [SUTHERLAND, 1986]. Morton adaptiert die Washingtoner Meinung der Entsprechung von *E. semialatum* und *A. ligustrina* [MORTON, 1981], während die Synonymliste von Armando Cáceres [CÁCERES, 1996] eine Synthese der Meinungen der konkurrierenden Botaniker darstellt, weil er als Synonyme von *E. semialatum* nicht nur *A. ligustrina* und *E. ligustrinum* [KING und ROBINSON, 1970a und 1987], sondern auch die von Williams erwähnten Spezies *A. plethadenia* und *E. plethadenium* nennt [NASH und WILLIAMS, 1976].

Die Inhaltsstoffführung der Gattungen *Ageratina* und *Eupatorium* ist insbesondere in den siebziger und achtziger Jahren sehr intensiv erforscht worden. Hier sind vor allem die zahlreichen Publikationen der Arbeitskreise Bohlmann, Herz, Kupchan und Wollenweber zu nennen [BOHLMANN et al., 1977b; HERZ, 1977; KUPCHAN et al., 1973; WOLLENWEBER et al., 1996]. Im Mittelpunkt des Interesses stand zunächst die einzige in Mitteleuropa heimische *Eupatorium*-Art, *E. cannabinum* [HENDRIKS et al., 1983; WOERDENBAG, 1986]. Bald beschäftigten sich die meisten Arbeitsgruppen jedoch Spezies-übergreifend mit den Terpen-Derivaten, allen voran den Sesquiterpenlactonen [Übersichten in DOMÍNGUEZ, 1977; HASSON et al., 1995, 1996 und 1997, sowie HERZ, 1978]. Eine eigene Recherche der seit 1950 erschienenen Literatur über Sekundärstoffe aus den beiden Gattungen ergab, dass bis heute um die 40 *Ageratina*- und knapp 100 *Eupatorium*-Arten phytochemisch untersucht worden sind. Die Zahl der tatsächlich untersuchten Arten ist jedoch geringer, da – wie oben diskutiert – die beiden Gattungsbezeichnungen oft synonym verwendet wurden und sich die systematische Behandlung der Tribus im Laufe der Zeit beträchtlich gewandelt hat. Legt man das System von King und Robinson zu Grunde, so kommt man auf 40 *Ageratina*- und nur noch 31 *Eupatorium*-Arten [KING und ROBINSON, 1987]. Bisher fand man neben wenigen Vertretern anderer Strukturklassen in der Hauptsache Verbindungen aus den Sekundärstoff-Gruppen der Alkaloide [RIZK, 1991], Benzofurane [PROKSCH und RODRIGUEZ, 1983], Chromene [PROKSCH und SIEBERTZ, 1993], Coumarine [CALLE A. et al., 1985], Flavonoide [HARBORNE et al., 1975; HARBORNE und MABRY, 1982; HARBORNE, 1988; HARBORNE, 1994], Lignane [DOMÍNGUEZ et al., 1988], Sesquiterpenlactone [SEAMAN, 1982] und Zimtsäurederivate [BOHLMANN et al., 1977b und 1985a].

Vor dem Hintergrund des oben beschriebenen systematischen Problems wurden die Blätter der in Guatemala heimischen Pflanze *Eupatorium semialatum* Benth. einer umfassenden phytochemischen Untersuchung zugeführt. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Sesquiterpenlactone gelegt, die sich gut als chemotaxonomische Marker eignen [SEAMAN, 1982].

In *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten wurden bisher 170 verschiedene SL gefunden, darunter 88 Germacranolide, 66 Guaianolide, 12 Eudesmanolide, 3 Elemanolide sowie das Jhanilacton, ein SL irregulärer Struktur [GONZÁLEZ et al., 1978]. Die größte Untergruppe der Germacranolide stellen mit 61 Verbindungen die Germacrolide, welche meist einfach oder doppelt hydroxyliert und oft verestert sind. Daneben fand man auch seltenere 4,5-Epoxy- und 11,13-Dihydroderivate [BUDEŠÍNSKÝ und ŠAMAN, 1995]. Ähnliches gilt für die 20 beschriebenen Heliangolide, an die Stelle der 4,5-Epoxide sind jedoch 1,10-Epoxide getreten,

11,13-Dihydroverbindungen und Glykoside sind nicht vertreten. Darüber hinaus kennt man sechs ungewöhnliche 4(5),9(10)-*cis,cis*-Germacranolide [KUPCHAN et al., 1973] sowie ein 1(10),4(5)-*cis,cis*-Germacranolid [ITO et al., 1979a]. Das reiche Vorkommen von Heliangoliden unterscheidet die Eupatorieae wie auch die Heliantheae von allen anderen Triben der Asteraceae [HERZ, 1977; FISCHER et al., 1979; SEAMAN, 1982].

Neben den Germacranoliden wurden bisher 66 Guaianolide identifiziert [HERZ, 1977; FISCHER et al., 1979; SEAMAN, 1982], darunter Di-Epoxide, Hydroperoxide [ITO et al., 1982] und Verbindungen mit Chlorsubstituenten [KUPCHAN et al., 1969a].

Aus den beiden Genera sind auch zwölf unveresterte Eudesmanolide (siehe Bild 4.5, S. 279) und vier Elemanolide [BOHLMANN et al., 1985b; SEAMAN, 1982] beschrieben worden. Die genuine Existenz der bizyklischen Elemanolide in frischem Pflanzenmaterial ist in vielen Fällen umstritten, da diese SL bei erhöhter Temperatur relativ leicht im Zuge einer Cope-Umlagerung aus Germacroliden hervorgehen können (siehe Bild 4.1, S. 276). Es liegt demnach der Verdacht nahe, dass Elemanolide, deren 1(2)- und 3(4)-Doppelbindungen keine oxidativen Veränderungen erfahren haben, Artefakte darstellen. Dies könnte auf die drei aus *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten bekannten Elemanolide zutreffen.

Aus den angeblich mit *E. semialatum* identischen Arten *A. ligustrina* bzw. *E. ligustrinum* wurden acht SL (fünf Germacrolide, zwei Guaianolide und ein Heliangolid, siehe Bild 1.5, S. 6) isoliert [ROJAS et al., 1988; ROMO et al., 1968; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988].

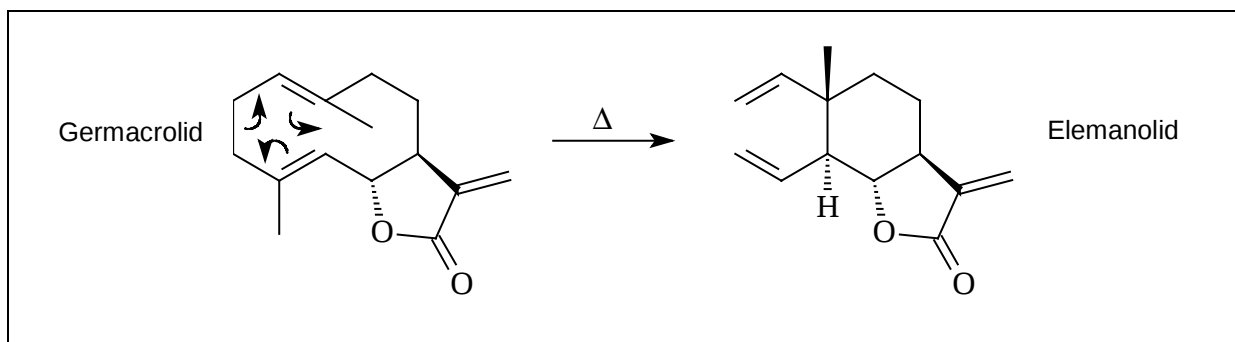
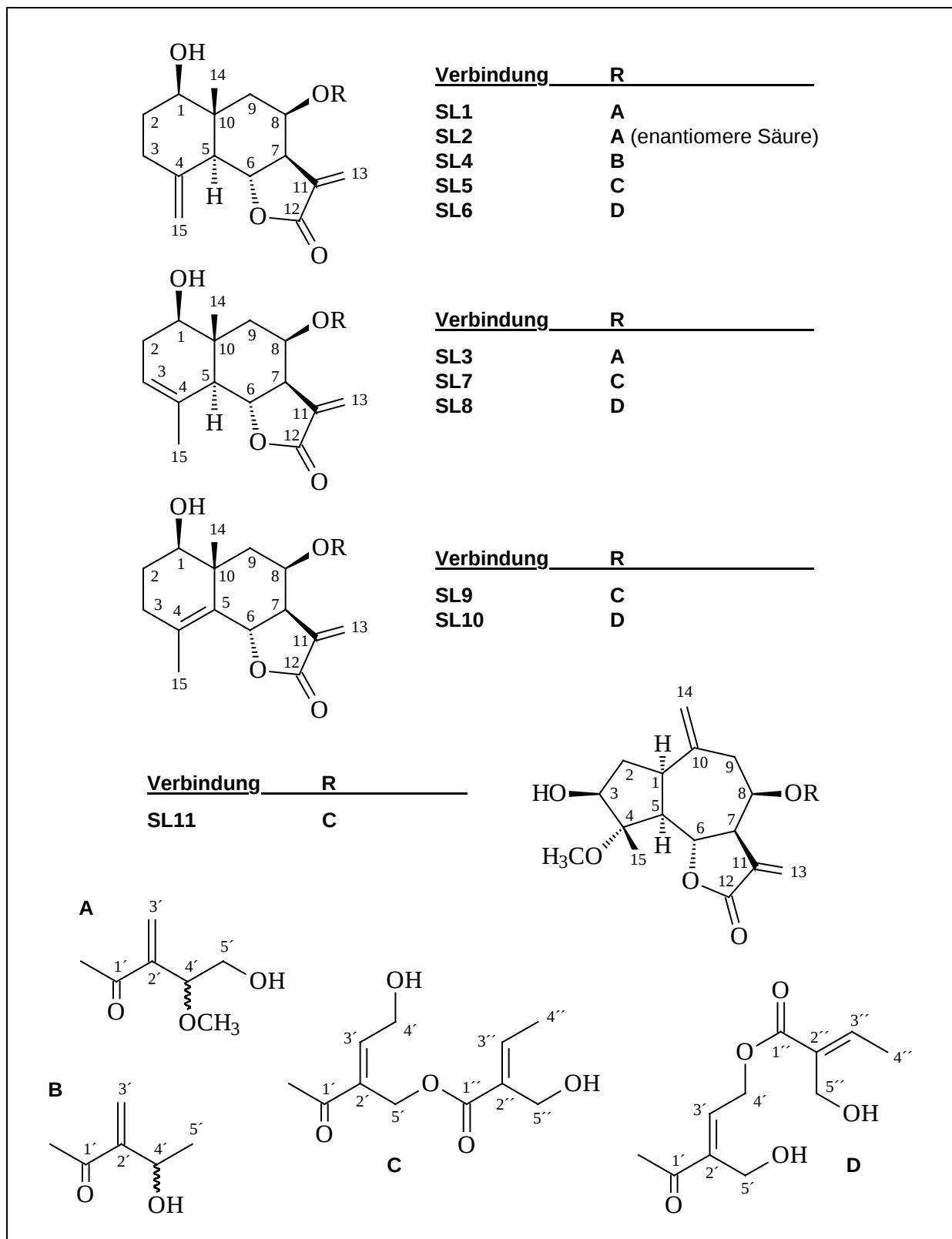


Bild 4.1: Cope-Umlagerung von Germacroliden zu Elemanoliden

Im Zuge der vorliegenden Untersuchung konnten insgesamt elf Sesquiterpenlactone (**SL1** – **SL11**) aus den Blättern von *E. semialatum* isoliert werden (siehe Bild 4.2, S. 277). Die Strukturaufklärung erfolgte durch eingehende IR, EI-MS, CI-MS, ^1H NMR- und ^{13}C NMR-Analysen. Bei den NMR-Untersuchungen kamen neben selektiven Spinentkopplungs-Experimenten insbesondere auch zweidimensionale Techniken wie ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^{13}C -HETCOR, HMQC, HMBC und NOESY zum Einsatz. Bis auf Verbindung **SL4** (Trichomatolid D) handelt es sich um neue, bislang nicht beschriebene Naturstoffe. Von den elf aus *E. semialatum* isolierten SL gehören zehn dem Eudesmanolid- (**SL1** – **SL10**) und eines dem Guaianolid-Typ an (**SL11**). Alle isolierten SL verfügen über einen *trans* annellierten 7 β (12),6 α -Lactonring und besitzen eine zusätzliche Doppelbindung im Grundgerüst, welches entweder zwei (**SL1** – **SL10**, an C-1 und C-8) oder drei Sauerstoff-Substituenten (**SL11**, an C-3, C-4 und C-8) trägt. Alle Verbindungen sind an der β -ständigen sekundären Alkoholfunktion an C-8 entweder mit einer (**SL1** bis **SL4**) oder mit zwei untereinander veresterten C_5 -Säuren verestert (**SL5** bis **SL11**). Bei den C_5 -Säuren handelt es sich um hydroxylierte 2-Ethylacryl- bzw. Tiglinsäure-Derivate.

Bild 4.2: Aus *E. semialatum* isolierte Sesquiterpenlactone

Die Eudesmanolide leiten sich von den Grundkörpern 8 β -Hydroxyreynosin (SL1, SL2, SL4, SL5 und SL6), 8 β -Hydroxybalchanin (SL3, SL7 und SL8) bzw. 8 β -Hydroxymagnolialid (SL9 und SL10) ab und zeigen hinsichtlich ihrer Substituenten Ähnlichkeit zu einigen aus *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten bekannten Germacroliden (vergl. Bild 4.2, S. 277 mit Bild

4.3, S. 278). Sie unterscheiden sich jedoch strukturell beträchtlich von allen bisher aus *Eupatorium*-Arten isolierten SL gleichen Grundtyps (vergl. Bild 4.2, S. 277 mit Bild 4.5, S. 279), da die zwölf bekannten Eudesmanolide weder freie Hydroxylgruppen noch Esterseitenketten besitzen, dafür aber teilweise die hier nicht beobachtete 7(12),8-Lactonisierung aufweisen. *E. semialatum* besitzt damit die komplexesten bis heute in *Eupatorium*-Arten gefundenen Eudesmanolide.

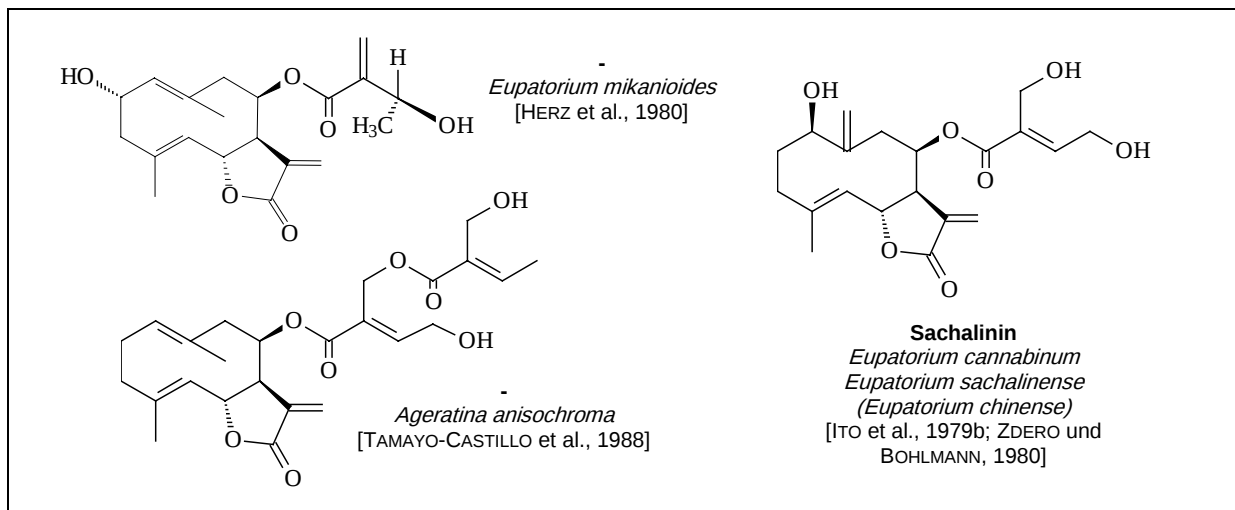


Bild 4.3: Verschiedene Germacrolide aus *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten mit struktureller Verwandtschaft zu den Eudesmanoliden **SL1** – **SL10** aus *E. semialatum*; in Klammern ist die Speziesbezeichnung nach King und Robinson (1987) angegeben, wenn sie von der in der betreffenden Publikation verwendeten Diktion abweicht

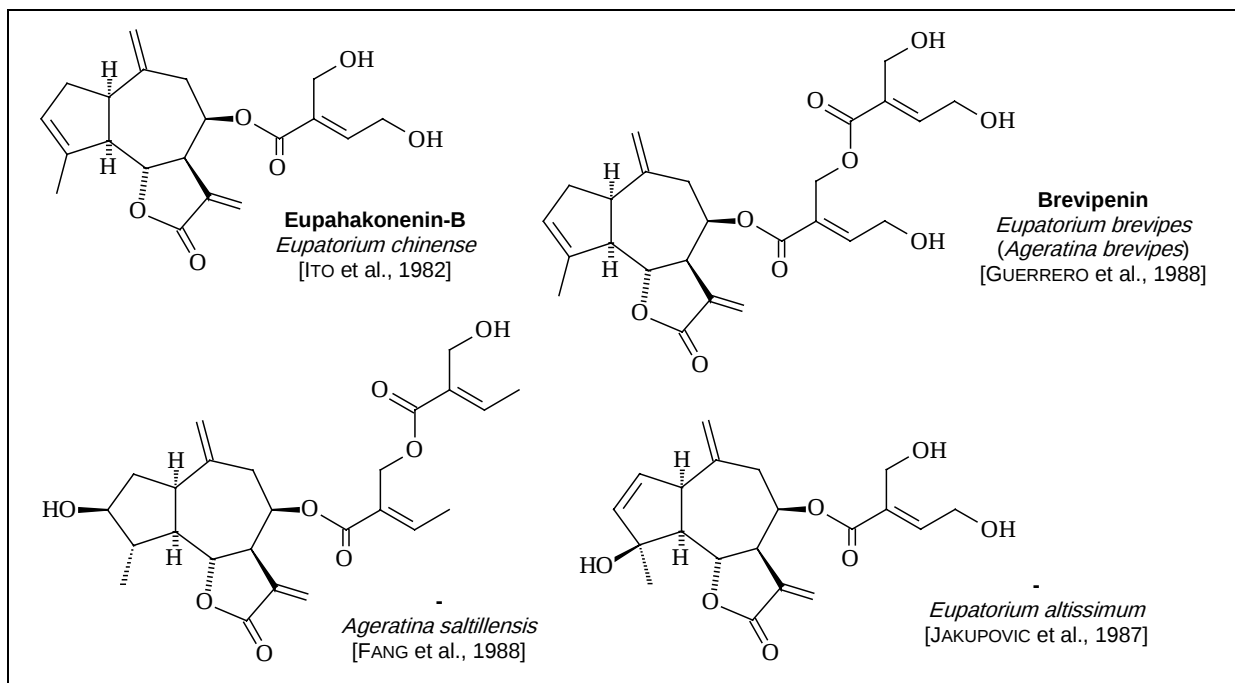


Bild 4.4: Verschiedene Guaianolide aus *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten mit struktureller Verwandtschaft zu **SL11** aus *E. semialatum*; in Klammern ist die Speziesbezeichnung nach King und Robinson (1987) angegeben, wenn sie von der in der betreffenden Publikation verwendeten Diktion abweicht

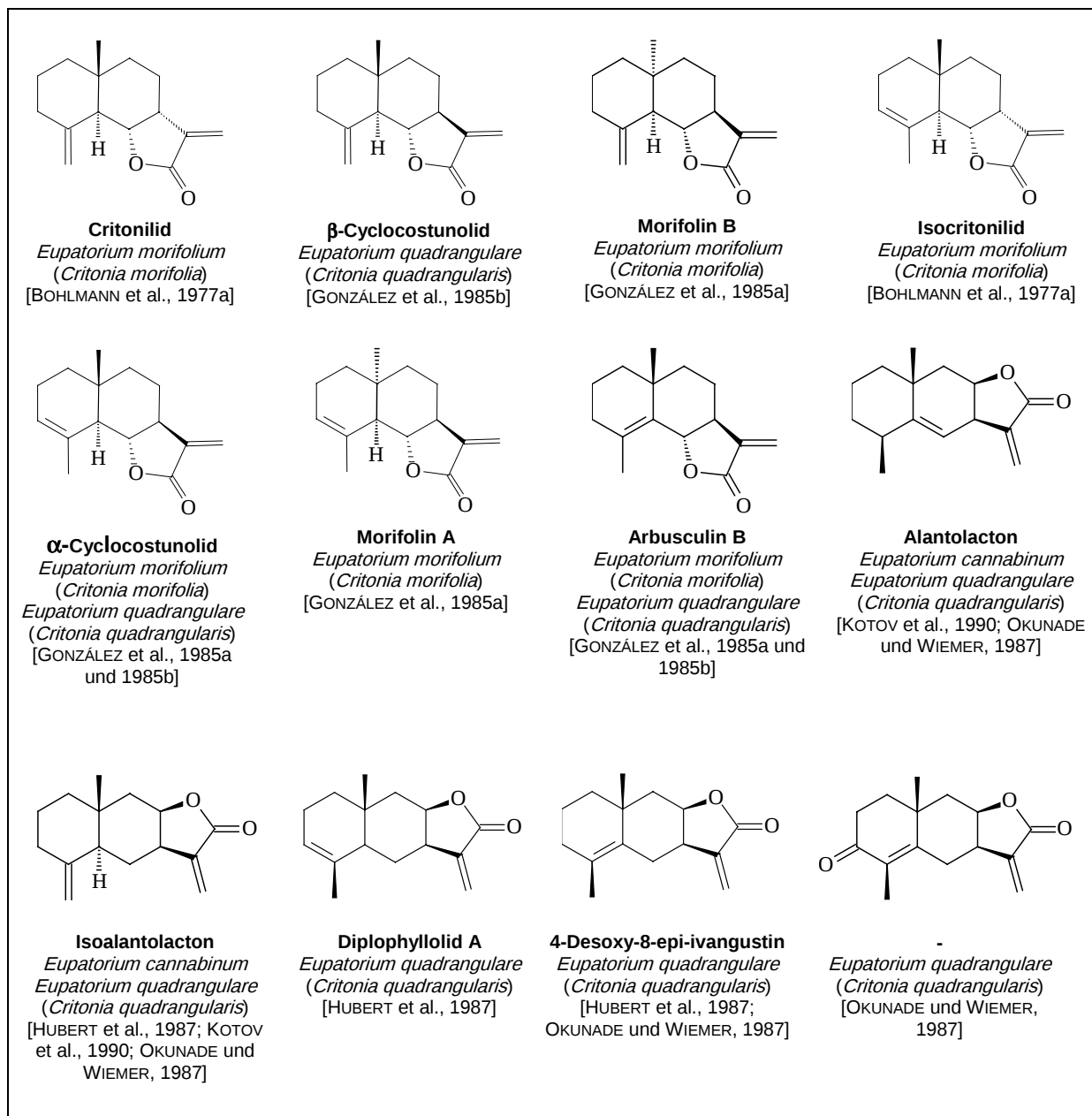


Bild 4.5: Bisher aus *Eupatorium*-Arten isolierte Eudesmanolide; in Klammern ist die Speziesbezeichnung nach King und Robinson (1987) angegeben, wenn sie von der in der betreffenden Publikation verwendeten Diktion abweicht

Das Guaianolid **SL11** zeigt in vielerlei Hinsicht Ähnlichkeiten mit einigen aus *A. saltillensis*, *E. altissimum*, *E. brevipes* und *E. chinense* bekannten SL mit gleichem Grundgerüst (vergl. Bild 4.2, S. 277 mit Bild 4.4, S. 278). Es unterscheidet sich jedoch deutlich von den beiden aus *A. ligustrina* isolierten Guaianoliden 8 β -Hydroxykauniolid und Ligustrin, da das 8 β -Hydroxykauniolid im Gegensatz zu **SL11** im Cycloheptanring eine endozyklische $\Delta^{1,10}$ -Doppelbindung besitzt und beim Ligustrin die beiden carbozyklischen Ringe im Gegensatz zum *cis*-annellierten **SL11** *trans* verknüpft sind (vergl. Bild 1.5, S. 6 mit Bild 4.2, S. 277).

Insgesamt lassen die hier erhaltenen Ergebnisse folgende Schlüsse zu:

1. Die untersuchte Spezies *E. semialatum* ist offensichtlich nicht mit *A. ligustrina* bzw. *E. ligustrinum* identisch, da sich in beiden Fällen die beschriebenen SL im Hinblick auf ihre Struktur klar von den hier gefundenen Verbindungen unterscheiden (vergl. Bild 1.5, S. 6 mit Bild 4.2, S. 277). So findet sich unter den von *A. ligustrina* bzw. *E. ligustrinum* bekannten SL kein einziges Eudesmanolid. Darüber hinaus konnte trotz intensiver Nachsuche keines der für diese beiden Spezies belegten Germacranolide im Drogenmaterial von *E. semialatum* gefunden werden. Da mit **SL1** – **SL11** die im Dichlormethan-Extrakt von *E. semialatum* mengenmäßig dominierenden SL isoliert worden sind, ist davon auszugehen, dass die für *A. ligustrina* bzw. *E. ligustrinum* als Hauptkomponenten beschriebenen Germacranolide gefunden worden wären, wenn sie in nennenswerter Menge im Extrakt vorgelegen hätten. Dies spricht für die Sichtweise von Williams, der die guatemaltekische Art *E. semialatum* für eine eigene Spezies hält, die sich klar von der in Mexiko heimischen Art *A. ligustrina* abgrenzen läßt [NASH und WILLIAMS, 1976].
2. Die gefundenen SL passen sowohl hinsichtlich ihrer Grundgerüste als auch im Hinblick auf die komplexen hydroxylierten und ungesättigten Carbonsäuren in den Esterketten gut zu den ursprünglich als *Eupatorium*-Arten erachteten Spezies. In *Ageratina*-Arten sind dagegen bisher noch keine Eudesmanolide gefunden worden, so dass *E. semialatum* sich von daher stark von den Spezies dieser Gattung unterscheidet. Es ist demnach nicht sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der untersuchten Pflanze um eine *Ageratina*-Art handelt. Die hier vorliegenden phytochemischen Daten stehen damit im Widerspruch zu der von King und Robinson (1987) vertretenen Ansicht, dass *E. semialatum* in das Genus *Ageratina* eingeordnet werden muß. Da die Zuordnung von King und Robinson ausschließlich auf botanischen Merkmalen beruht, müssen weitere Untersuchungen zeigen, zu welchem Genus die hier bearbeitete Pflanze wirklich gehört. Dabei sollte neben den Genera *Ageratina* und *Eupatorium* auch *Critonia* berücksichtigt werden, da - bis auf einen zweifelhaften und von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduzierbaren Fund in *E. cannabinum* [KOTOV et al., 1990] - alle *Eupatorium*-Arten, für die Eudesmanolide beschrieben worden sind (siehe Bild 4.5, S. 279), heute zur Gattung *Critonia* gezählt werden [KING und ROBINSON, 1987].

Die Flavonoidführung von *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten ist in den letzten 30 Jahren eingehend erforscht worden. Die Zahl der bekannten Strukturen beläuft sich auf etwa 100 Aglyka und 50 Glykoside. Den Hauptanteil an den Aglyka machen Flavone (32) aus, es folgen die 3-Methoxyflavone, Flavanone und Flavonole zu jeweils etwa gleichen Anteilen (etwa 20). Selten sind dagegen Chalcone und Isoflavonoide, sie scheinen in den meisten Spezies der beiden Gattungen zu fehlen [HARBORNE et al., 1975; HARBORNE und MABRY, 1982; HARBORNE, 1988; HARBORNE, 1994]. Der überwiegende Teil der beschriebenen Glykoside gehört neben fünf Flavanon-Derivaten und einem Chalcon-Glykosid [YU et al., 1987] zu den Flavonol-Abkömmlingen. Die dominierenden Zuckerkomponenten sind Glucose, Galactose und Rhamnose, lediglich ein Glykosid verfügt über eine Apiose [FANG et al., 1986]. Neben wenigen Bis-Mono- und Di-Glykosiden kommen hauptsächlich Monoglykoside vor. Die Hauptanknüpfungsstelle der Zucker ist dabei die Hydroxylgruppe an C-3, daneben kommen allerdings auch C-5-O- [YU et al., 1987], C-7-O- sowie zwei C-4'-O-

Glykoside vor [AQIL, 1995]. Als generelles Kennzeichen der meisten Flavonoide der Gattungen *Ageratina* und *Eupatorium* wird die 6-Methoxylierung angesehen [STEVENS et al., 1995]. Andere Autoren halten auch die 7-Methoxylierung und die 6,7-Dimethoxylierung für Charakteristika der Hauptevolutionslinie der beiden Genera [YU et al., 1986a].

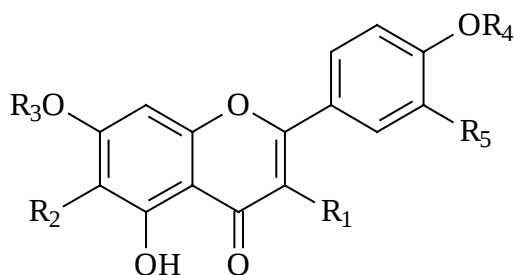
Über das Flavonoidmuster von *A. ligustrina* und den als synonym angesehenen Arten war vor Beginn der eigenen Untersuchungen wenig bekannt. In den Arbeiten, die sich mit dem *A. ligustrina*-Komplex beschäftigen, werden neun Flavonoide beschrieben (siehe Bild 1.4, S. 5). Es handelt sich dabei um das Flavanonol 7-*O*-Methylaromadendrin [SAGAREISHVILI, 1985], das Flavon Cirsimaritin [ROJAS et al., 1988; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988], die beiden Flavonole Kaempferol-5-methylether und Rhamnocitrin [SAGAREISHVILI, 1985; TALAPATRA et al., 1985], die drei Flavanonolglucoside Eupathronosid, Glucoferid und Micranthosid [RODRÍGUEZ et al., 1974; SAGAREISHVILI et al., 1981; TALAPATRA et al., 1985] sowie die beiden Flavonol-3-*O*- α -rhamnoside Eupalin und Eupatolin [QUIJANO et al., 1970]. Der prozentuale Anteil der Flavanonol-Derivate an diesen Verbindungen ist, verglichen mit den Funden in anderen *Ageratina*- und *Eupatorium*-Spezies, recht hoch. Auffällig ist weiterhin, dass bei diesen Substanzen sowie den Flavonolen Kaempferol-5-methylether und Rhamnocitrin die typische 6-Methoxygruppe nicht vorkommt und bei den Glykosiden Eupathronosid und Micranthosid die seltene 5-*O*-Glykosidierung auftritt. Wegen ihrer 6,7-Dimethoxylierung sind das Flavon Cirsimaritin sowie die beiden Flavonol-3-*O*- α -rhamnoside Eupalin und Eupatolin jedoch als typisch für die Genera *Ageratina* und *Eupatorium* anzusehen [QUIJANO et al., 1970; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988].

Im Zuge der hier durchgeführten Untersuchung konnten aus dem Dichlormethan- bzw. Methanol-Extrakt neun Aglyka (**FA1** – **FA9**) und aus dem Methanol-Extrakt elf Glykoside (**FG1** – **FG11**) isoliert bzw. identifiziert werden (siehe Bild 4.6, S. 282). Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung dieser Verbindungen erwiesen sich insbesondere die zweidimensionalen Techniken als große Hilfe bei der eindeutigen Bestimmung der Position der Methoxygruppen und Zucker-Reste. Unter den Aglyka finden sich fünf Flavone (**FA1** – **FA5**), drei Flavonole (**FA6** – **FA8**) und ein 3-Methoxy-Flavon (**FA9**). Bis auf das Flavon Acacetin (**FA5**), welches nur in Spuren nachgewiesen werden konnte, verfügen alle Aglyka über eine 6-Methoxygruppe. Mikanin (**FA8**) ist zusätzlich an Position 7 methoxyliert. Bei allen Aglyka liegt die 5-Hydroxylgruppe unsubstituiert vor und die Kohlenstoffe C-8, C-2', C-5' und C-6' tragen keine funktionellen Gruppen. Der B-Ring ist entweder mono- (**FA1**, **FA2**, **FA5** und **FA8**) oder disubstituiert (**FA3**, **FA4**, **FA6**, **FA7** und **FA9**), wobei man die folgenden Substitutionsmuster findet: 4'-Hydroxy (**FA1**), 4'-Methoxy (**FA2**, **FA5** und **FA8**), 3',4'-Dihydroxy (**FA3**, **FA6** und **FA9**) und 3'-Hydroxy-4'-methoxy (**FA4** und **FA7**). Bis auf das Acacetin (**FA5**) sind die in *E. semialatum* identifizierten Aglyka damit als typische Vertreter für *Ageratina*- bzw. *Eupatorium*-Flavonoide zu betrachten [HARBORNE et al., 1975; HARBORNE und MABRY, 1982; HARBORNE, 1988; HARBORNE, 1994]. Die Verbindungen **FA1** – **FA3** sowie **FA5** und **FA6** konnten bereits aus einigen anderen *Ageratina*- bzw. *Eupatorium*-Arten isoliert werden (siehe Tabelle 4.2, S. 283), die Substanzen **FA4** und **FA7** – **FA9** wurden hier erstmals nachgewiesen.

Bei allen elf identifizierten Flavonoid-Glykosiden (**FG1** – **FG11**) handelt es sich um Flavonol-Derivate. Die darin enthaltenen Zucker (β -Glucose, β -Galactose und α -Rhamnose) sind stets mit der Hydroxylgruppe an C-3 verknüpft. Verbindung **FG2**, bei der es sich um einen neuen Naturstoff handelt, unterscheidet sich von den anderen Glykosiden durch eine

zusätzliche 4'- β -Glucosidierung. Die Verbindungen besitzen im A-Ring entweder die 5-Hydroxy-6-methoxy- (**FG6** – **FG11**) oder die 5-Hydroxy-6,7-dimethoxy-Substitution (**FG1** – **FG5**). Der B-Ring ist entweder 4'-mono- (**FG1** – **FG4** und **FG6** – **FG8**) oder 3',4'-dihydroxyliert (**FG5** und **FG9** – **FG11**). Somit sind auch alle Glykoside typische *Ageratina*- bzw. *Eupatorium*-Flavonoide [HARBORNE et al., 1975; HARBORNE und MABRY, 1982; HARBORNE, 1988; HARBORNE, 1994]. **FG1**, **FG3** – **FG9** und **FG11** wurden bereits in anderen *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten gefunden (siehe Tabelle 4.2, S. 283), der neue Naturstoff **FG2** sowie Patuletin 3-O- α -rhamnosid (**FG10**) sind dagegen für die Gattung *Eupatorium* noch nicht beschrieben worden.

Vergleicht man die in den Blättern von *E. semialatum* gefundenen Flavonoide mit den bisher für den *A. ligustrina*-Komplex beschriebenen Substanzen, so fällt auf, dass sich unter den Verbindungen aus *E. semialatum* kein einziges Flavanon findet. Auch die 5-methoxylierten sowie die 5-O- und 7-O-glucosidierten Derivate treten hier nicht auf. Lediglich die beiden 3-O- α -Rhamnose Eupalin und Eupatolin wurden auch in *E. semialatum* gefunden. Darüber hinaus besitzt nur ein Teil der bereits publizierten Verbindungen die typischen 6-mono- bzw. 6,7-Dimethoxygruppen, die bei praktisch allen *E. semialatum*-Flavonoiden beobachtet werden konnten.



R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	Verbindung
H	OCH ₃	H	H	H	FA1 (Hispidulin)
H	OCH ₃	H	CH ₃	H	FA2 (Pectolinarigenin)
H	OCH ₃	H	H	OH	FA3 (Eupafolin)
H	OCH ₃	H	CH ₃	OH	FA4 (Desmethoxycentaureidin)
H	H	H	CH ₃	H	FA5 (Acacetin)
OH	OCH ₃	H	H	OH	FA6 (Patuletin)
OH	OCH ₃	H	CH ₃	OH	FA7 (Laciniatin)
OH	OCH ₃	CH ₃	CH ₃	H	FA8 (Mikanin)
OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	FA9 (Axillarin)
O- α -Rha	OCH ₃	CH ₃	H	H	FG1 (Eupalin)
O- α -Rha	OCH ₃	CH ₃	β -Glu	H	FG2
O- β -Glu	OCH ₃	CH ₃	H	H	FG3
O- β -Gal	OCH ₃	CH ₃	H	H	FG4
O- α -Rha	OCH ₃	CH ₃	H	OH	FG5 (Eupatolin)
O- β -Glu	OCH ₃	H	H	H	FG6
O- β -Gal	OCH ₃	H	H	H	FG7
O- α -Rha	OCH ₃	H	H	H	FG8
O- β -Gal	OCH ₃	H	H	OH	FG9
O- α -Rha	OCH ₃	H	H	OH	FG10
O- β -Glu	OCH ₃	H	H	OH	FG11

Bild 4.6: Aus *E. semialatum* isolierte bzw. identifizierte Flavonoide

Tabelle 4.2: Übersicht über die Ageratina- und Eupatorium-Arten, für die auch die in *E. semialatum* gefundenen Flavonoide belegt sind; die nicht gelisteten Substanzen sind neu für die beiden Genera; in Klammern ist die Spezies-Bezeichnung nach King und Robinson (1987) angegeben, wenn sie von der in der betreffenden Publikation verwendeten Diktion abweicht

Verbindung	Spezies	Quelle
FA1 (Hispidulin)	<i>A. angustifolia</i> (<i>A. asclepiadea</i>)	[DE VILLARAGA und DE PÉREZ, 1994]
	<i>A. calophylla</i>	[FANG et al., 1986]
	<i>A. tomentella</i>	[FANG und MABRY, 1986]
	<i>E. cannabinum</i>	[ELEMA et al., 1989]
	<i>E. cuneifolium</i>	[KUPCHAN et al., 1969b]
	<i>E. sachalinense</i> (<i>E. chinense</i>)	[TAKAHASHI et al., 1979]
	<i>E. semiserratum</i>	[HERZ et al., 1981]
	<i>E. serotinum</i>	[HERZ et al., 1979]
FA2 (Pectolinarigenin)	<i>E. subhastatum</i> (<i>Chromolaena hirsuta</i>)	[FERRARO et al., 1987]
	<i>A. angustifolia</i> (<i>A. asclepiadea</i>)	[DE VILLARAGA und DE PÉREZ, 1994]
	<i>A. calophylla</i>	[FANG et al., 1986]
	<i>E. cannabinum</i>	[STEVENS et al., 1995]
	<i>E. hyssopifolium</i>	[WOLLENWEBER et al., 1996]
	<i>E. salvia</i> (<i>Aristeguietia salvia</i>)	[GONZÁLEZ et al., 1990]
	<i>E. semiserratum</i>	[KUPCHAN et al., 1969b]
FA3 (Eupafolin)	<i>E. serotinum</i>	[HERZ et al., 1979]
	<i>A. glyptophlebia</i>	[DE PÉREZ und DE PINILLA, 1990]
	<i>A. tomentella</i>	[FANG und MABRY, 1986]
	<i>E. altissimum</i>	[WOLLENWEBER et al., 1996]
	<i>E. cannabinum</i>	[ELEMA et al., 1989]
	<i>E. cuneifolium</i>	[KUPCHAN et al., 1969b]
FA5 (Acacetin)	<i>E. subhastatum</i> (<i>Chromolaena hirsuta</i>)	[FERRARO und COUSSIO, 1973]
	<i>A. stevioides</i> (<i>A. jahnii</i>)	[MENDEZ und ROSQUETE, 1988]
	<i>E. buniifolium</i> (<i>Acanthostyles buniifolius</i>)	[CAULA et al., 1991]
	<i>E. glabratum</i> (<i>A. glabrata</i>)	[GUERRERO et al., 1978]
	<i>E. hookerianum</i> (<i>Chromolaena hookeriana</i>)	[FERRARO et al., 1983]
	<i>E. odoratum</i> (<i>Chromolaena odorata</i>)	[BOSE et al., 1974]
	<i>E. subhastatum</i> (<i>Chromolaena hirsuta</i>)	[FERRARO et al., 1987]
FA6 (Patuletin)	<i>E. tinifolium</i> (<i>A. tinifolia</i>)	[MORENO et al., 1980]
	<i>A. calophylla</i>	[FANG et al., 1986]
	<i>A. havanensis</i>	[YU et al., 1987]
	<i>A. saltillensis</i>	[YU et al., 1986a]
	<i>E. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]
FG1 (Eupalin)	<i>E. gracile</i> (<i>A. gracilis</i>)	[TORRENEGRA et al., 1984]
	<i>A. calophylla</i>	[FANG et al., 1986]
	<i>A. saltillensis</i>	[YU et al., 1986a]
FG3	<i>E. ligustrinum</i> (<i>A. ligustrina</i>)	[QUIJANO et al., 1970]
	<i>A. glyptophlebia</i>	[HIGUERA und DE PÉREZ, 1989]
FG4	<i>E. adenophorum</i> (<i>A. adenophora</i>)	[LI et al., 1997]
	<i>A. calophylla</i>	[FANG et al., 1986]
FG5 (Eupatolin)	<i>E. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]
	<i>A. calophylla</i>	[FANG et al., 1986]
	<i>A. saltillensis</i>	[YU et al., 1986a]
FG6	<i>E. ligustrinum</i> (<i>A. ligustrina</i>)	[QUIJANO et al., 1970]
	<i>A. calophylla</i>	[FANG et al., 1986]
	<i>A. havanensis</i>	[YU et al., 1987]
	<i>A. saltillensis</i>	[YU et al., 1986a]
FG7	<i>E. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]
	<i>E. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]
FG8	<i>E. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]
	<i>A. saltillensis</i>	[YU et al., 1986a]
FG9	<i>A. arbutifolia</i>	[DE PÉREZ und MOLINA, 1995]
	<i>E. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]
FG11	<i>A. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]
	<i>A. havanensis</i>	[YU et al., 1987]
	<i>A. saltillensis</i>	[YU et al., 1986a]
FG11	<i>E. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]
	<i>E. areolare</i> (<i>Piptothrix areolaris</i>)	[YU et al., 1986b]

Da die Analyse der Flavonoide von *E. semialatum* so gründlich und umfassend wie möglich durchgeführt wurde, das Ergebnis aber stark von dem für *A. ligustrina*, *E. erythropappum*, *E. ligustrinum* und *E. micranthum* beschriebenen Flavonoidmuster abweicht, ist auch vom Standpunkt der Flavonoide her davon auszugehen, dass *E. semialatum* nicht mit *A. ligustrina* und den anderen synonym geführten Arten identisch sein kann. Da die in Vertretern der Eupatorieae gefundenen Flavonoide eine strukturell sehr homogene Gruppe bilden, können an Hand des Flavonoidmuster von *E. semialatum* darüber hinaus leider keine weiteren Schlüsse gezogen werden.

Als weitere hydrophile Bestandteile der Blätter von *E. semialatum* konnten aus dem Methanol-Extrakt mehrere Isomere der Mono- (**KC1** – **KC3**) bzw. Dikaffeoylchinasäure (**KC4** – **KC5**) isoliert werden (siehe Bild 4.7, S. 284). Die Verbindungen fielen dabei meist in Form der Methylester an und sind damit als Artefakte der genuin vorliegenden freien Säuren zu betrachten, die während der Herstellung des Methanol-Extraktes mit dem Lösungsmittel zu den entsprechenden Methylestern reagiert haben [JERGA, 1989]. Darüber hinaus wird vermutet, dass die verschiedenen Stellungsisomere der Mono- und Dikaffeoylchinasäure durch Umesterungsvorgänge während der Aufarbeitung des Drogenmaterials entstehen. Depside zwischen Kaffee- und Chinasäure sind in einigen Familien der Angiospermae gefunden worden, ihr Vorkommen konzentriert sich jedoch auf Vertreter der Asteraceae sowie die Spezies *Coffea arabica* aus der Familie der Rubiaceae [MØLGAARD und RAVN, 1988]. Für die Gattungen *Ageratina* und *Eupatorium* existieren lediglich Belege für das Vorkommen solcher Verbindungen in den beiden Arten *A. adenophora* (Chlorogensäure) [PROKSCH et al., 1990] und *E. cannabinum* (Chlorogensäure, Neochlorogensäure, Isochlorogensäure a und b) [OSWIECIMSKA und SENDRA, 1972; PAGANI und ROMUSSI, 1967; PROKSCH und SIEBERTZ, 1993]. Damit werden Kryptochlorogensäure und Isochlorogensäure c hier zum ersten Mal für das Genus *Eupatorium* beschrieben.

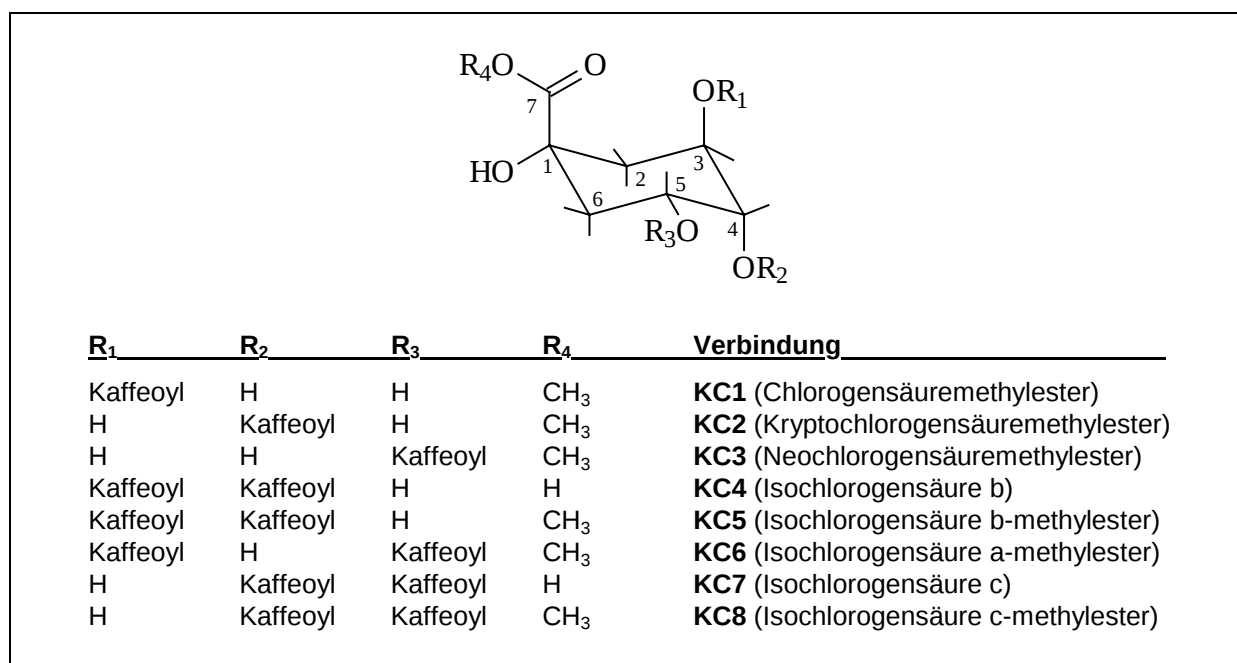


Bild 4.7: Aus *E. semialatum* isolierte Kaffeoyl-Chinasäuren

Bei der Auswertung der ^1H NMR-Spektren der Substanzen **KC1** – **KC8** konnte aus den Kopplungskonstanten der Chinasäure-Protonen zweifelsfrei abgeleitet werden, dass die Chinasäure-Partialstruktur der Verbindungen in dem zur Messung eingesetzten Lösungsmittel DMSO- d_6 jeweils in der $^1\text{C}_4$ -Konformation vorliegt. Dies war sehr erstaunlich, da die $^1\text{C}_4$ -Konformation aufgrund der höheren Anzahl axial stehender Substituenten gegenüber der in anderen Solventien wie D_2O oder Methanol- d_4 beobachteten $^1\text{C}^4$ -Konformation energetisch benachteiligt ist [CORSE et al., 1966; HASLAM und TURNER, 1971]. Zur Erklärung dieses Phänomens wären weitergehende Untersuchungen wünschenswert, insbesondere rechnergestützte Methoden zur Simulation der Molekülkonformation unter dem Einfluß verschiedener Lösungsmittel.

In verschiedenen Arten der Gattungen *Ageratina* und *Eupatorium* konnten bis heute einunddreißig Alkaloide gefunden werden. Hiervon gehören alleine achtundzwanzig zum Pyrrolizidin-Typ [RIZK, 1991]. Bei den restlichen drei Verbindungen handelt es sich um einfache Piperidin-Derivate, die nur aus einer einzigen *Eupatorium*-Art (*E. fortunei*) isoliert werden konnten [SEKIOKA et al., 1995]. Bei den beschriebenen Pyrrolizidin-Alkaloiden handelt es sich zum großen Teil um toxische Ester mit der charakteristischen $\Delta 1,2$ -Doppelbindung und der C-1-Hydroxymethyl-Partialstruktur (siehe Bild 4.8, S. 285). Offenkettige Diester wurden nur sehr wenige gefunden, makrozyklische Diester vom Typ des Senecionins fehlen ganz.

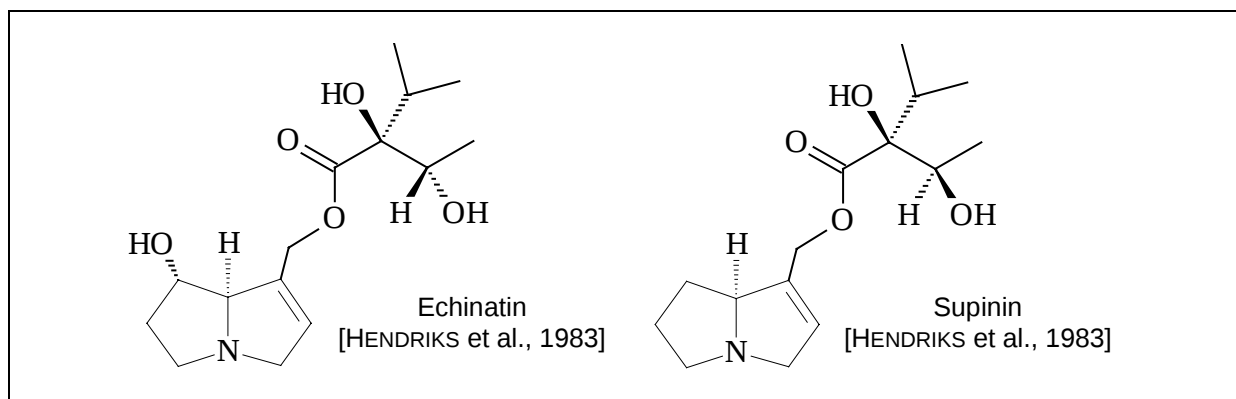


Bild 4.8: Typische PA aus *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten

In Anbetracht der Tatsache, dass schwere Leber- und Nierenschäden mit der Aufnahme PA-haltiger Pflanzen in Verbindung gebracht werden [RÖDER, 1992 und 1995] und die in dieser Arbeit behandelte Spezies *E. semialatum* in der Naturmedizin von Guatemala breite Anwendung findet [CÁCERES, 1996], erschien es von großem gesundheitspolitischem Interesse, die Pflanze auf die Akkumulation von PA hin zu untersuchen. Dazu wurde ein Teil des Methanol-Extraktes nach einem für diese Problemstellung etablierten Verfahren aufgearbeitet und in den beiden dabei erhaltenen Fraktionen I und II mittels DC, GC und GC-MS gezielt nach PA gesucht [RÖDER et al., 1981 und 1984; WITTE et al., 1993].

Nach Dann und Mattocks lassen sich toxische PA leicht durch eine Blaufärbung der entsprechenden Substanzzonen auf der DC-Platte identifizieren und von untoxischen PA abgrenzen, welche eine Rotfärbung ergeben [DANN, 1960; MATTOCKS, 1967a, 1967b und 1968]. Die bei der hier durchgeführten Untersuchung erhaltene Blaufärbung der Substanzen in Fraktion II sprach daher für das Vorliegen solcher toxischer Verbindungen. Darüber hinaus

sollte Fraktion I untoxische Derivate enthalten, da sich bei der Detektion dieser Fraktion eine Rotfärbung ergeben hatte. Trotz intensiver Nachsuche mit Hilfe der GC-MS, bei der eine umfangreiche PA-Datenbank mit den Spektraldaten von mehr als 300 verschiedenen Derivaten zur Verfügung stand, konnten in Fraktion II jedoch keinerlei toxische PA nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis hat große Bedeutung für die volksmedizinische Anwendung der Droge, da die Gefahr gesundheitlicher Schäden durch toxische PA vermutlich ausgeschlossen werden kann. Als Hauptkomponenten der Fraktion II konnten statt dessen die beiden Monoterpene *trans*-Terpin (**MO1**) und *trans*-Sobrerol (**MO2**) identifiziert werden (siehe Bild 4.9, S. 286). Damit muß die Auffassung, wonach blau gefärbte Substanzzonen nach der Detektion mit dem Reagenz nach Dann und Mattocks zweifelsfrei auf toxische PA schließen lassen, revidiert werden. Aus der hier gemachten Beobachtung, dass auch bestimmte terpenoide Verbindungen blaue Färbungen ergeben, folgt, dass zusätzlich zur Detektion bei der DC aussagekräftigere instrumentelle Methoden wie GC-MS, LC-MS oder NMR anzuwenden sind, um wirklich eindeutige Aussagen über die Struktur der für die Färbung verantwortlichen Stoffe machen zu können. Die beiden Monoterpene *trans*-Terpin (**MO1**) und *trans*-Sobrerol (**MO2**) werden hiermit zum ersten Mal für die Gattung *Eupatorium* beschrieben.

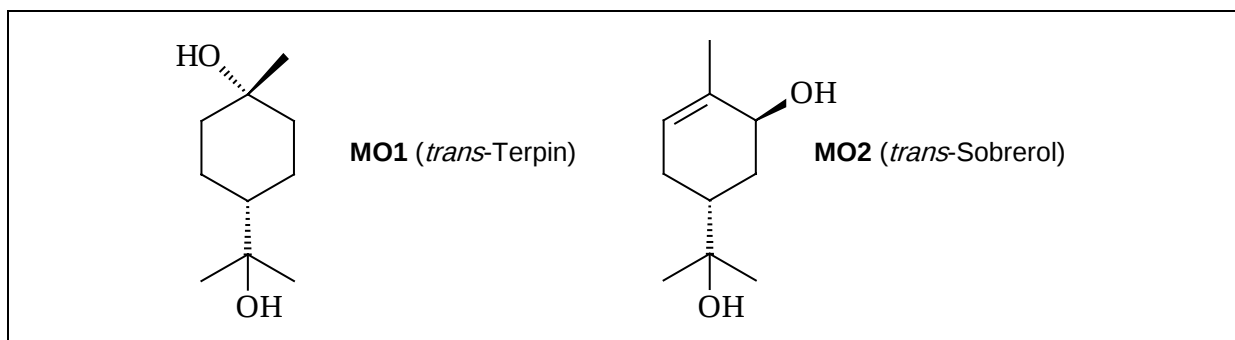


Bild 4.9: Im Methanol-Extrakt von *E. semialatum* nachgewiesene Monoterpene

In Fraktion I fanden sich neben Pyrrolidin-2-essigsäuremethylester (**PA5**) die vier untoxischen PA Tussilagin, Isotussilagin, Neotussilagin und Neoisotussilagin (**PA1 - PA4**, siehe Bild 4.10, S. 287). Nach Paßreiter (1992) handelt es sich bei diesen untypischen PA um Artefakte, die im Verlauf der Aufarbeitung mit Methanol aus den genuin vorliegenden freien Säuren entstehen. PA vom Tussilagin-Typ konnten bisher ausschließlich in Spezies der Asteraceae gefunden werden. Die betreffenden zwölf Arten entstammen den Triben Heliantheae, Inuleae und Senecioneae (siehe Kap. 2.5.2, S. 235 f.). Für die Tribus Eupatorieae liegt hiermit der erste Nachweis solcher Verbindungen vor.

Das gemeinsame Vorkommen der Tussilagin-Isomere und der Pyrrolidinessigsäure in *E. semialatum* untermauert die von Paßreiter (1992) geäußerte These, nach der die ungewöhnlichen PA vom Typ des Tussilagins, die sich durch eine Carbonylfunktion in der Seitenkette an C-1 sowie eine Methyl-Substitution an C-2 deutlich von den übrigen PA unterscheiden, nicht auf dem bisher als universell für PA angesehenen Biosyntheseweg [RÖDER, 1992 und 1995] gebildet werden. Die Alkaloide könnten durch die Reaktion einer Ketoverbindung wie Pyruvat oder Acetoacetyl-CoA mit der aktivierten Methylengruppe der Pyrrolidinessigsäure und anschließendem Ringschluß über das Stickstoffatom entstehen. Dies würde auch das gemeinsame Auftreten der vier Stereoisomere des Tussilagins erklären. Zur

Überprüfung dieser These wären Fütterungsversuche mit markierten Prekursoren die Methode der Wahl.

Um erste Hinweise darauf zu erhalten, in wie weit Tussilagin und seine Isomere auch in anderen Arten der Asteraceae sowie der Solanaceae, deren Tropan-Alkaloide sich wie die PA vom Arginin bzw. Ornithin ableiten, vorkommen, wurde kommerziell erhältliches Drogenmaterial der Spezies *Datura stramonium*, *Eupatorium perfoliatum*, *Hyoscyamus niger*, *Senecio fuchsii*, *Solidago gigantea* und *Solidago virgaurea* in gleicher Weise wie bei *E. semialatum* einem Alkaloid-Extraktionsverfahren unterworfen. In den dabei erhaltenen Extrakten konnten jedoch weder die Tussilagine noch die Pyrrolidin-2-essigsäure detektiert werden. Daraus folgt zum einen, dass Verbindungen vom Tussilagin-Typ nicht- wie oft angenommen wird [RÖDER, 1998] - ubiquitär in Asteraceae vorkommen, und zum anderen, dass die beiden Biosynthese-Wege, die einerseits zu den Tropan-Alkaloiden der Solanaceae und andererseits zu den PA vom Tussilagin-Typ der Asteraceae führen, nicht parallel in einer Familie beschritten werden.

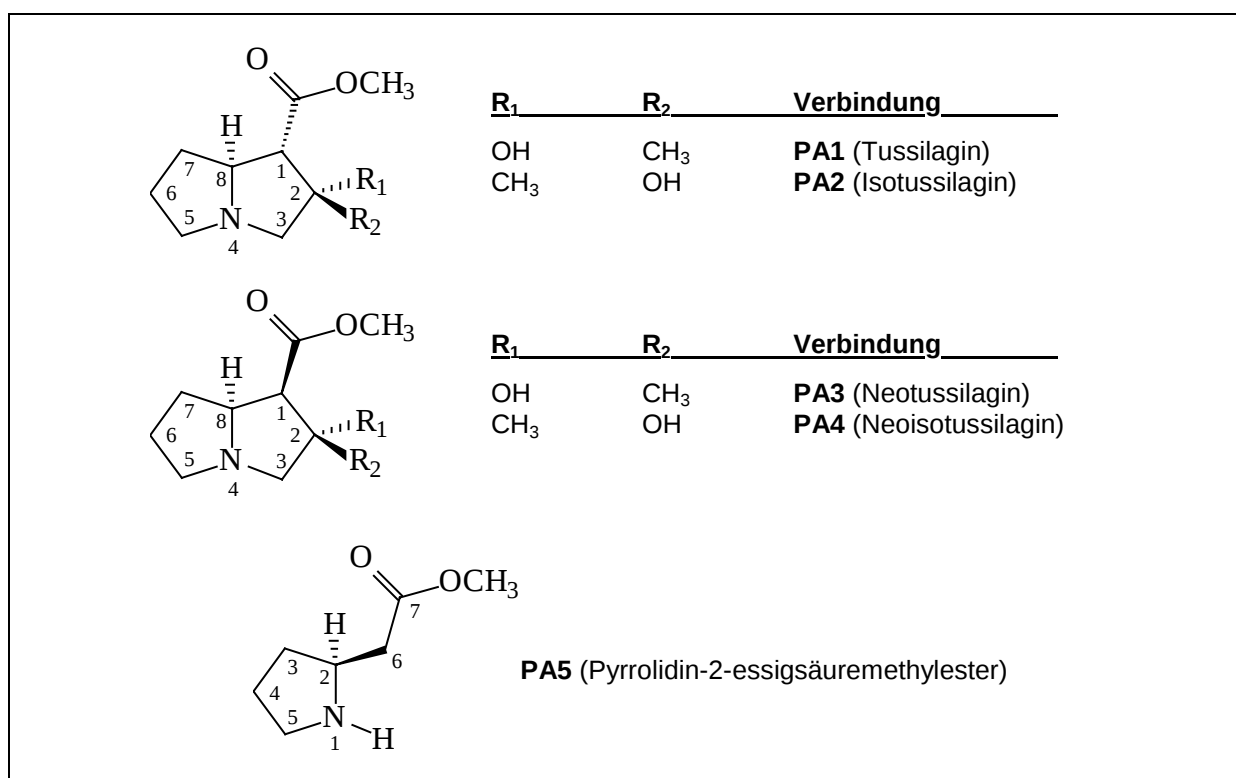


Bild 4.10: Für *E. semialatum* nachgewiesene Pyrrolizidin-Alkaloide

Bei der Bearbeitung des Dichlormethan-Extraktes von *E. semialatum* konnten neben den bereits diskutierten Verbindungen zwei weitere terpenoide Substanzen isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden (siehe Bild 4.11, S. 288). Es handelt sich um den bisher nur in *A. ligustrina* gefundenen Sesquiterpenalkoholester 11-Cinnamoyloxyoplopanon (**SE1**) [TAMAYO-CASTILLO et al., 1988] sowie das ubiquitär vorkommende Triterpen Oleanolsäure (**TR1**). 11-Cinnamoyloxyoplopanon ist das einzige Terpenoid, das sowohl in den Blättern von *E. semialatum* als auch in *A. ligustrina* vorkommt. Die übrigen vier für *A. ligustrina* beschriebenen Sesquiterpene β -Caryophyllen, β -Caryophyllenepoxid, Germacren D und Spathulenol [BOHLMANN et al., 1977b; ROJAS et al., 1988; TAMAYO-CASTILLO et al., 1988] sowie das in derselben Art entdeckte Triterpen Lupeol [ROJAS et al., 1988; TAMAYO-

CASTILLO et al., 1988] (siehe Bild 1.3, S. 4) konnten in *E. semialatum* nicht gefunden werden. Ob und in wie weit diese Befunde für eine Verwandtschaftsbeziehung zwischen *E. semialatum* und *A. ligustrina* sprechen, kann auf Grund der seltenen Funde von 11-Cinnamoyloxyoplopanon einerseits und des ubiquitären Vorkommens der übrigen genannten Terpene andererseits nicht beurteilt werden.

Mit den in dieser Arbeit vorgelegten NMR-Daten für 11-Cinnamoyloxyoplopanon (**SE1**) konnten die in der ursprünglichen Publikation vorhandenen Lücken geschlossen werden [TAMAYO-CASTILLO et al., 1988]. Das Triterpen Oleanolsäure (**TR1**) wird hiermit zum ersten Mal für die Gattung *Eupatorium* beschrieben.

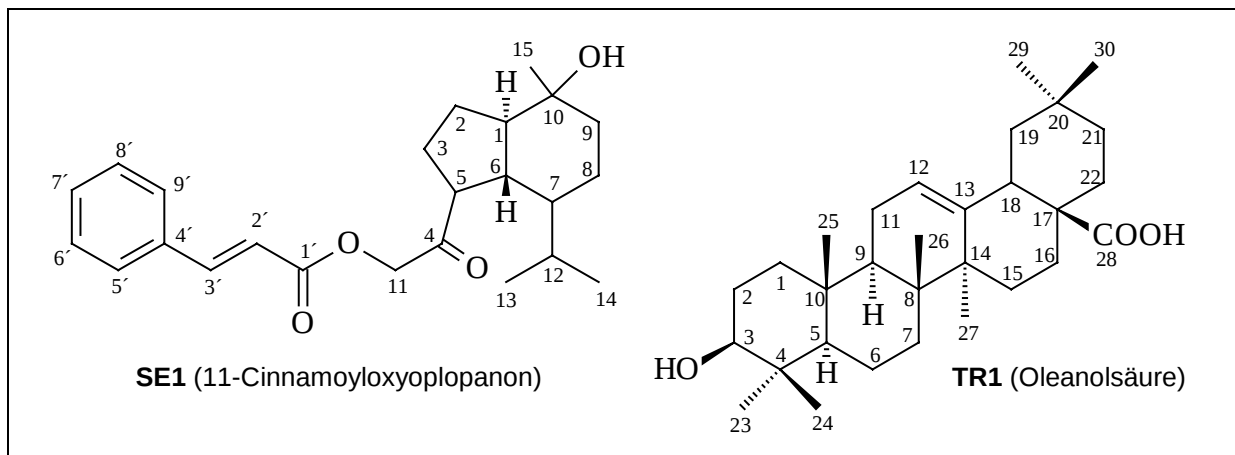


Bild 4.11: Aus *E. semialatum* isolierte Terpene

Bis heute konnten lediglich acht Coumarine aus wenigen Spezies der beiden Gattungen *Ageratina* und *Eupatorium* isoliert werden. Dabei überwiegen strukturell einfach aufgebaute Derivate wie Coumarin, Umbelliferon oder Ayapanin [CALLE A. et al., 1985]. Das im Methanol-Extrakt von *E. semialatum* gefundenen Aesculin (**CU1**) konnte bisher nur für *E. pauciflorum* mittels DC nachgewiesen werden [FIGUEIREDO, 1975].

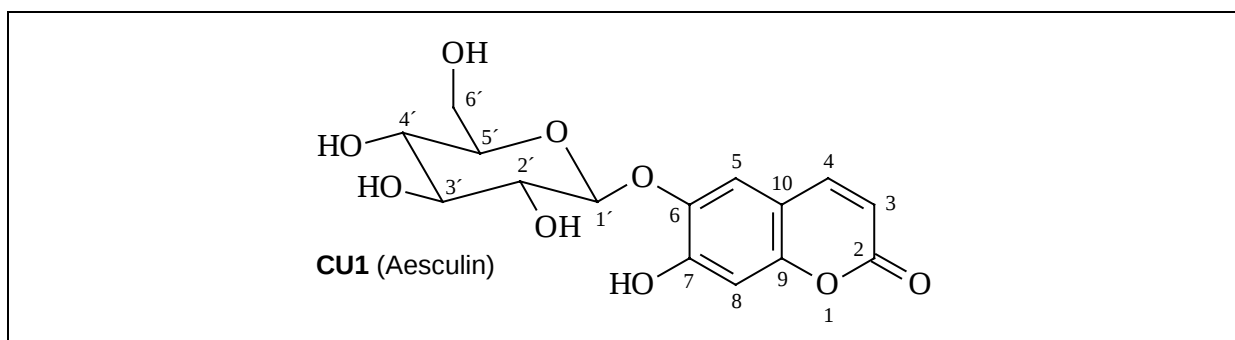


Bild 4.12: Das aus *E. semialatum* isolierte Coumarin glucosid Aesculin (**CU1**)

Mit Drogenzubereitungen der Gattungen *Eupatorium* therapiert man in der abendländischen Volksmedizin traditionell eine Fülle von verschiedenen Erkrankungen [WOERDENBAG, 1993]. Im Homöopathischen Arzneibuch (2000) sind noch die beiden Arten *E. perfoliatum* und *E. purpureum* offizinell. Sie finden Anwendung als unspezifische Immunstimulantien, Grippemittel, Amara, Diaphoretika und zur Behandlung von rheumatischen und grippalen Gliederschmerzen [BOERICKE, 1995]. Die Bedeutung dieser Pharmaka ist jedoch angesichts

des Vorkommens toxischer Pyrrolizidin-Alkaloide und der Tatsache, dass bessere Alternativen zur Verfügung stehen, rückläufig. Anders sieht die Situation in den ärmeren Ländern der Dritten Welt aus. Da in diesen Regionen meist keine der in der westlichen Welt gebräuchlichen Medikamente zur Verfügung stehen, greifen die Menschen dort auch bei schweren Erkrankungen wie Parasitosen und bakteriellen oder viralen Infektionen gerne auf einheimische Heilpflanzen zurück. Dies gilt insbesondere auch für die in diesem Gebiet verbreiteten Spezies der Gattungen *Ageratina* und *Eupatorium*, die dort schon seit Jahrhunderten zu Heilzwecken angewendet werden [SHARMA et al., 1998; WOERDENBAG, 1993].

E semialatum Benth. kennen die Einheimischen der Alta Verapaz in Guatemala unter den Namen „Bacché“, „Baretillo“, „Chicajol“, „Hoja Lisa“, „Q`ezci káy“ oder „Sal de Venado“. Die letzte Bezeichnung bedeutet soviel wie „Salz des Hirsches“, die anderen Begriffe sind Eigennamen. Zubereitungen der bitter schmeckenden Blätter werden in der guatemaltekischen Volksmedizin, insbesondere in der Alta Verapaz, zur oralen Behandlung von Malaria, Diabetes, Magen-Darm-Entzündungen, Koliken (vor allem im Veterinärbereich), Blutvergiftungen, Hepatitiden, Nephritiden, Husten, Schmerzzuständen des Kopfes, des Leibes, des Magens und der Knochen sowie Amöben-Infektionen verwendet [CÁCERES, 1996; DIESELDORFF, 1977; MEDINILLA und DE GARCÍA, 1978; MEJÍA, 1922; MORTON, 1981; NASH und WILLIAMS, 1976; SUTHERLAND, 1986]. Darüber hinaus ist die Anwendung in Form eines Rinden-Dekokts belegt [CÁCERES, 1996; MEJÍA, 1922]. Cáceres gibt in seiner Monographie über die Arzneipflanzen Guatemalas Hinweise zur Einnahme von Bacché-Zubereitungen. Er empfiehlt die orale Behandlung von Malaria und Diabetes durch die Einnahme einer Tasse des Infuses (3–5 g Droge pro Tasse) oder von 1 bis 3 ml der Tinktur (1:10 in Ethanol 35%) nach jeder Mahlzeit. Aufgrund der antimikrobiellen Qualitäten des Aufgusses oder der Tinktur rät er auch zur externen Behandlung von Infektionen der Haut und Schleimhaut. Eine Kombination mit vergleichbar wirkendem Drogenmaterial anderer Pflanzen (*Acalypha guatemalensis*, *Plantago australis*, *Plantago major*, *Byrsonima crassifolia* oder *Smilax lundellii*) sei möglich. Für die Diabetesbehandlung favorisiert er die Mischung mit *Momordica charantia*, *Trigonella foenum-graecum* oder *Tecoma stans* [CÁCERES, 1996].

Bis heute wurden pharmakologische Versuche mit Extrakten oder Reinsubstanzen aus mehr als zwei Dutzend *Ageratina*- und *Eupatorium*-Arten veröffentlicht [PICMAN, 1986; SHARMA et al., 1998; WOERDENBAG, 1986]. Die vielfältigen *in vitro*- und *in vivo*-Tests konzentrierten sich auf die antitumoralen und zytotoxischen Eigenschaften von Sesquiterpenlactonen sowie auf die Toxizität verschiedener Benzofurane und Sesquiterpene. Die antiplasmodiale Wirkung von Extrakten oder isolierten Reinstoffen ist nur rudimentär untersucht, bislang befaßten sich nur zwei Arbeiten mit diesem Themenkomplex [CARVALHO und KRETTLI, 1991; RÜCKER et al., 1996; WOERDENBAG, 1993].

Eine aus den Blättern von *E. semialatum* hergestellte Tinktur erwies sich gegen verschiedene mikrobielle Testkeime als antibiotisch wirksam [CÁCERES, 1996]. Die IC₅₀-Werte lagen zwischen 1 und 10 mg/ml. Ein wässriger Extrakt senkte bei weißen Ratten mit Alloxan-induzierter Hyperglykämie in einer Konzentration von 1 g/kg Körpergewicht signifikant den Blutzuckerspiegel. Die LD₅₀ des wässrigen Extrakts belief sich bei Mäusen auf 6,4g/kg Körpergewicht. Eine Beurteilung dieser wenigen Daten fällt schwer, da die Original-Publikationen in Europa nicht zugänglich sind.

Da für die Wirksamkeit gegen Malaria, eine der Hauptindikationen für Zubereitungen aus *E. semialatum*, noch keine pharmakologischen Daten vorlagen, wurden die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Sesquiterpenlactone **SL1**, **SL2**, **SL5** – **SL9** und **SL11** mit Hilfe des modifizierten pLDH-Assays (siehe Kap. 3.2, S. 266 f.) *in vitro* gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (K1-Stamm) getestet. Nach Auswertung der Daten konnten die getesteten Verbindungen in zwei Gruppen unterschiedlicher Wirksamkeit eingeteilt werden (siehe Tabelle 3.1, S. 269 und Bild 3.13, S. 270). Gruppe A enthält die stärker wirksamen Substanzen **SL7** – **SL9** und **SL11** mit mittleren IC_{50} -Werten zwischen 8,85 (**SL8**) und 16,32 μ M (**SL7**). In Gruppe B wurden die schwächer wirksamen Substanzen **SL1**, **SL2**, **SL5** und **SL6** zusammengefaßt, die mittleren IC_{50} -Werte lagen hier zwischen 26,15 (**SL6**) und 31,73 μ M (**SL1**). Versucht man, Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten, so zeigt sich, dass bei den getesteten Eudesmanoliden die Verbindungen mit einer endozyklischen Doppelbindung (**SL7** – **SL9**) generell stärker wirksam waren, als die mit einer exozyklischen Doppelbindung (**SL1**, **SL2**, **SL5** und **SL6**). Das zur Gruppe A gehörende Guaianolid **SL11** ist hinsichtlich seiner Aktivität mit den Eudesmanoliden mit endozyklischer Doppelbindung (**SL7** bis **SL9**) vergleichbar. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Struktur der Seitenkette, die bei den Reynosin-Derivaten (**SL1**, **SL2**, **SL5** und **SL6**) nur hinsichtlich der Länge und der Stereochemie differiert, keinen Einfluß auf die Aktivität hat.

Im Vergleich zur Standardsubstanz Chloroquin (IC_{50} : $0,43 \pm 0,1 \mu$ M) ist die wirksamste Verbindung von Gruppe A (**SL8**) etwa zwanzig- und die am schwächsten wirkende Verbindung von Gruppe B (**SL1**) etwa fünfundsiebzigfach schwächer wirksam. Verglichen mit dem Germacranolid Neurolenin B (IC_{50} : $2,63 \pm 0,3 \mu$ M), der aktivsten Verbindung aus *Neurolaena lobata* (siehe Bild 4.13, S. 290), waren die SL aus *E. semialatum* etwa um den Faktor 3,4 (**SL8**) bis 12 (**SL1**) schwächer wirksam [WRIGHT und PAßREITER, 1997]. Die SL aus *Neurolaena lobata* waren jedoch wesentlich wirksamer gegenüber dem Chloroquin-sensitiven *P. falciparum*-Stamm A1A9 [FRANÇOIS et al., 1996]. Es ist daher zu erwarten, dass auch die SL aus *E. semialatum* Erreger dieses weniger aggressiven Stammes stärker hemmen. Dies konnte wegen der Auflösung des Arbeitskreises um Guido François jedoch leider nicht mehr überprüft werden. Da in Zentralamerika überwiegend Chloroquin-sensitive Stämme vorkommen, geben die hier erhaltenen moderaten Aktivitäten gegen den widerstandsfähigeren K1-Stamm Anlaß zu der Annahme, dass *E. semialatum* zu Recht als Ersatz für *Neurolaena lobata* in der Malaria-Behandlung eingesetzt wird, wenn auch die Wirkung etwas schwächer sein dürfte.

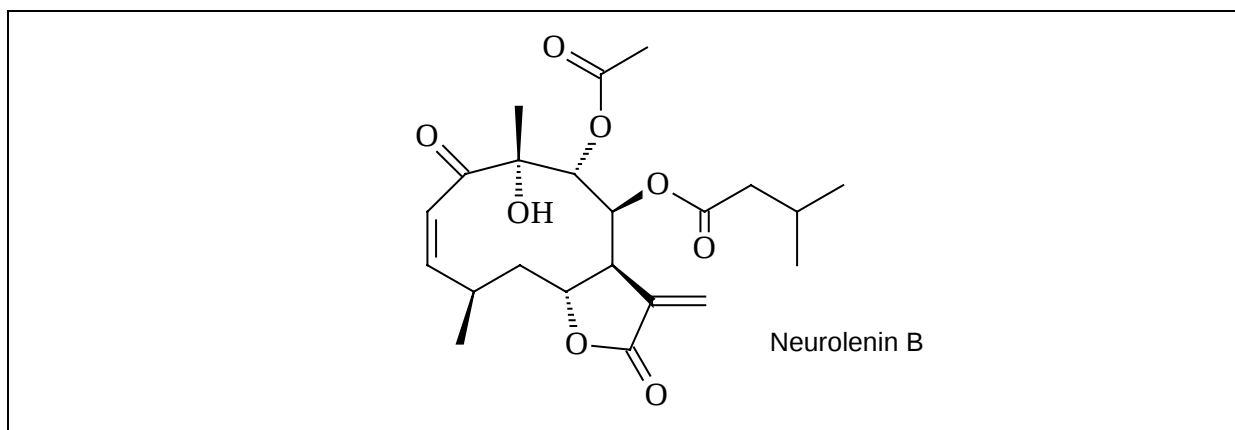


Bild 4.13: Neurolenin B, ein stark antiplasmodial wirksames Germacranolid aus *Neurolaena lobata*

Da nicht alle aus *E. semialatum* isolierten Verbindungen in ausreichender Menge für den Test zur Verfügung standen, wäre eine gezielte Nachisolierung und Testung dieser Substanzen wünschenswert. Da nur acht Verbindungen getestet werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass sich unter den noch nicht in den Test eingesetzten Sekundärstoffen wirksamere Substanzen befinden.

5 Zusammenfassung

1. An Hand der Struktur der aus den Blättern der in Guatemala heimischen Arzneipflanze *Eupatorium semialatum* Benth. isolierten Sekundärstoffe (insgesamt 49) konnte gezeigt werden, dass diese Spezies nicht mit den bislang als synonym betrachteten Arten *A. ligustrina*, *E. erythropappum*, *E. ligustrinum* und *E. micranthum* identisch ist, sondern eine eigene, chemotaxonomisch klar abgegrenzte Art darstellt.
2. Aus dem Dichlormethan-Extrakt der Blätter von *E. semialatum* konnten durch verschiedene chromatographische Techniken wie SC und semipräparative HPLC als charakteristische und dominierende Inhaltsstoffe elf Sesquiterpenlactone isoliert werden (siehe Bild 4.2, S. 277). Deren Struktur wurde mit Hilfe einer Reihe von spektroskopischen Verfahren ermittelt (IR, EI-MS, CI-MS und NMR einschließlich ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^{13}C -HETCOR, HMQC, HMBC und NOESY). Zehn dieser Verbindungen sind vom Eudesmanolid- (**SL1** – **SL10**), eine vom Guaianolid-Typ (**SL11**). Die Eudesmanolide leiten sich von den Grundkörpern 8β -Hydroxyreynosin (**SL1**, **SL2**, **SL4**, **SL5** und **SL6**), 8β -Hydroxybalchanin (**SL3**, **SL7** und **SL8**) und 8β -Hydroxymagnolialid (**SL9** und **SL10**) ab. Es handelt sich durchweg um Ester, wobei die Esterbindung zwischen der 8β -Hydroxygruppe der SL-Komponente und einer der Säuren 2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acrylsäure (**SL1** – **SL3**), 2-(1-Hydroxyethyl)acrylsäure (**SL4**), 4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tiglinsäure (**SL5**, **SL7** und **SL9**) und 5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tiglinsäure (**SL6**, **SL8** und **SL10**) geknüpft wurde. Im Falle des ebenfalls als Ester vorliegenden Guaianolids **SL11** ist die 8β -Hydroxygruppe mit der 4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tiglinsäure verestert. Bis auf Verbindung **SL4** (Trichomatolid D) handelt es sich um bisher noch nicht beschriebene neue Naturstoffe.
3. Ein weiterer Schwerpunkt der phytochemischen Arbeiten bestand in der Isolierung und Strukturaufklärung von insgesamt zwanzig Flavonoiden (siehe Bild 4.6, S. 282). Aus dem Dichlormethan- und dem Methanol-Extrakt konnten neun Aglyka (**FA1** – **FA9**) durch SC, präp. DC und LPLC isoliert bzw. durch vergleichende DC und LC-MS identifiziert werden. Die Aufarbeitung des Methanol-Extraktes mittels SC, präp. DC und LPLC führte zur Isolierung der elf Flavonoid-Glykoside **FG1** – **FG11**. Bei der spektroskopischen Strukturaufklärung der Flavonoide standen die Verfahren UV, DCI-MS, LC-MS und NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, ^1H , ^{13}C -HETCOR, HMQC und HMBC) im Vordergrund. Unter den Aglyka fanden sich die Flavone Hispidulin (**FA1**), Pectolinarigenin (**FA2**), Eupafolin (**FA3**), Desmethoxycentaureidin (**FA4**) und Acacetin (**FA5**), die Flavonole Patuletin (**FA6**), Laciniatin (**FA7**) und Mikanin (**FA8**) sowie das 3-Methoxyflavon Axillarin (**FA9**). Bei den elf Glykosiden handelt es sich um Flavonol-Derivate, die mit einem (**FG1**, **FG3** – **FG11**, Glykosidierung an Position 3) oder zwei Zuckern (**FG2**, Glykosidierung an den Positionen 3 und 4') verknüpft sind. Als Zucker-Komponenten fanden sich β -Galactose (**FG4**, **FG7** und **FG9**), β -Glucose (**FG2**, **FG3**, **FG6** und **FG11**) und α -Rhamnose (**FG1**, **FG2**, **FG5**, **FG8** und **FG10**). Bis auf Acacetin (**FA5**) verfügen alle identifizierten Flavonoide über die für die Genera *Ageratina* und *Eupatorium* charakteristische 6-Methoxy- bzw. 6,7-Dimethoxygruppe. Beim Diglykosid **FG2** handelt

es sich um einen neuen Naturstoff, die Verbindungen Desmethoxycentaureidin (**FA4**), Laciniatin (**FA7**), Mikanin (**FA8**), Axillarin (**FA9**) und Patuletin 3-O- α -rhamnosid (**FG10**) sind bisher noch nicht für die Gattung *Eupatorium* beschrieben worden.

4. Als weitere Inhaltsstoffe des Methanol-Extraktes konnten die Kaffeoyl-Chinasäuren **KC1** – **KC8** gewonnen und spektroskopisch in ihrer Struktur aufgeklärt werden (siehe Bild 4.7, S. 284). Es handelt sich um Stellungsisomere, wobei im Falle der Verbindungen **KC1** – **KC3** (Chlorogensäure, Kryptochlorogensäure und Neochlorogensäure) die Chinasäure als Alkoholkomponente mit einem, bei **KC4** – **KC8** (Isochlorogensäure a bis c) dagegen mit zwei Molekülen Kaffeesäure verestert ist. In Folge der Aufarbeitung mit Methanol lagen die meisten dieser Verbindungen als Methylester vor. In dem für die NMR-Spektroskopie verwendeten Lösungsmittel DMSO- d_6 liegen **KC1** bis **KC8** in der 1C_4 -Konformation vor. Krypto- und Isochlorogensäure c (**KC2** und **KC7** bzw. **KC8**) werden hiermit zum ersten Mal für die Gattung *Eupatorium* beschrieben.
5. Im Methanol-Extrakt konnten durch vergleichende DC, GC und GC-MS vier untoxische Pyrrolizidin-Alkaloide vom Tussilagin-Typ (Tussilagin, Isotussilagin, Neotussilagin und Neoisotussilagin, **PA1** – **PA4**) sowie deren mögliche biogenetische Vorstufe Pyrrolidin-2-essigsäure (**PA5**) nachgewiesen werden (siehe Bild 4.10, S. 287). **PA1** bis **PA5** lagen aufgrund der Aufarbeitung mit Methanol in Form der Methylester vor. Alle fünf Verbindungen sind neu für die gesamte Tribus Eupatorieae. Da keine giftigen PA gefunden werden konnten, bestehen hinsichtlich dieser Substanzen keine toxikologischen Bedenken gegen die Einnahme der Droge. Die Blaufärbung der beiden Monoterpene *trans*-Terpin und *trans*-Sobrerol (**MO1** und **MO2**, siehe Bild 4.9, S. 286) mit dem bei der PA-Analyse eingesetzten Reagenz nach Dann und Mattocks zeigt, dass die nach den beiden Autoren benannte Farbreaktion nicht, wie bisher angenommen, für toxische PA selektiv ist, sondern auch mit terpenoiden Verbindungen blau gefärbte Reaktionsprodukte ergibt.
6. Neben den Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden konnten der Sesquiterpenalkoholester 11-Cinnamoyloxyoplopanon (**SE1**) und das Triterpen Oleanolsäure (**TR1**) (siehe Bild 4.11, S. 288) aus dem Dichlormethan-Extrakt sowie das Coumarin-Derivat Aesculin (**CU1**, siehe Bild 4.12, S. 288) aus dem Methanol-Extrakt isoliert und identifiziert werden. Das 11-Cinnamoyloxyoplopanon wurde bereits als Inhaltsstoff von *A. ligustrina* beschrieben, die Oleanolsäure ist neu für die Gattung *Eupatorium*.
7. Aufgrund der volksmedizinischen Anwendung von *E. semialatum* bei der Behandlung der Malaria wurde die Aktivität einiger der isolierten Sesquiterpenlactone (**SL1**, **SL2**, **SL5** – **SL9** und **SL11**) *in vitro* gegenüber den asexuellen Blutformen von *Plasmodium falciparum* geprüft (siehe Tabelle 3.1, S. 269 und Bild 3.13, S. 270). Im Vergleich mit der aktivsten Verbindung aus der im gleichen Indikationsgebiet in Guatemala eingesetzten Asteraceae *Neurolaena lobata* (2,63 μ M) waren die ermittelten Aktivitäten nur moderat (mittlere IC₅₀-Werte zwischen 8,85 und 31,73 μ M). Dennoch ist es denkbar, dass die genannten Sesquiterpenlactone an einer möglichen Wirkung des aus den Blättern bereiteten Dekokts beteiligt sind.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

Lösungsmittel und Chemikalien

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und nach zweimaliger Destillation verwendet. Ausnahmen waren spezielle hochreine Lösungsmittel für die Verfahren mit UV-Detektion (siehe Kap. 6.3.3, S. 303) und deuterierte Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie (siehe Kap. 6.3.5, S. 305).

Aufbewahrung

Die Extrakte und Reinsubstanzen wurden entweder im Vakuum-Exsiccator über Blaugel oder – nach Stickstoffbegasung – im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Die Proben für die NMR-Spektroskopie wurden 2 Tage im Vakuum über Phosphorpentoxid aufbewahrt. Die Exsiccatoren wurden lichtgeschützt aufgestellt.

6.2 Chromatographische Verfahren

6.2.1 Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Probenvorbereitung bei analytischer Arbeitsweise

Von den zu untersuchenden Proben wurden 1%ige Lösungen (m/V) bereitet. Etwa 20 ml davon wurden jeweils etwa 20 µl mit einer ausgezogenen Glaskapillare auf die Startzone der DC-Folie 1 cm breit aufgetragen. Wenn möglich, wurde die Plattenbeladung unter UV-Licht (254 nm) kontrolliert.

Entwicklung

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte, vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt, über eine Laufstrecke von 15 cm in DC-Kammern ohne Sättigung. Um die Einschleppung von Siliconen zu verhindern, wurden die Glasschliffe der DC-Kammern nicht mit Schliff fett eingerieben.

Stationäre Phasen

Bei fast allen Trennproblemen wurden DC-Alufolien (20 cm x 20 cm) Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm der Fa. Merck verwendet. Selbstbestrichene Glasplatten (20 cm x 20 cm) mit Polyamid DC-11 und Cellulosepulver MN 300 zur besseren Haftung des Gels auf den Glasplatten, beides Fa. Macherey & Nagel, kamen ausschließlich bei allen Untersuchungen mit Referenzsubstanzen von Prof. E. Wollenweber vom Institut für Botanik der Technischen Hochschule Darmstadt zum Einsatz. Das Standardfließmittel bei dieser stationären Phase war das System DC-5.

Mobile Phasen

Die Lösungsmittelgemische wurden vor der Überführung in die DC-Kammer in 500 ml-Rundkolben gemischt und durch Schütteln homogenisiert. Die Verhältnisangaben bei den Fließmittel-Systemen beziehen sich auf Volumenanteile.

System DC-1:	Ethylacetat/Essigsäure/Ameisensäure/Wasser 100:11:11:27
DC-2:	Ethylacetat/Methylethylketon/Ameisensäure/Wasser 5:3:1:1
DC-3:	Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure 5:4:1
DC-4:	DC-1/DC-3 1:1
DC-5:	Toluol/Petrolether (Sb. 100 bis 140°C)/Methylethylketon/Methanol 60:30:10:5
DC-6:	Toluol/Ethylacetat 6:4
DC-7:	Ethylacetat/Toluol 6:4
DC-8:	Chloroform/Eisessig 9:1
DC-9:	Toluol/2-Butanon/Methanol 60:25:15
DC-10:	Dichlormethan/Methanol 18:1
DC-11:	Dichlormethan/Methanol 9:1
DC-12:	Dichlormethan/Aceton 2:1
DC-13:	Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (25%) 85:14:1

Detektion

Die optische Auswertung der entwickelten Chromatogramme erfolgte unter UV-Licht mit Wellenlängen von 254 nm (Fluoreszenzlöschung) bzw. 365 nm (Eigenfluoreszenz) oder im Tageslicht. Zur besseren Beurteilung der Trennergebnisse wurden die Chromatogramme mit einem der folgenden Sprühreagenzien behandelt:

Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz

0,5 ml Anisaldehyd wurden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure unter Eiskühlung in der angegebenen Reihenfolge vorsichtig gemischt. Die DC-Folien wurden dann solange mit dieser Mischung besprüht, bis ihre Oberfläche unter UV_{254 nm}-Licht gleichmäßig dunkelviolett erschien und kein Fluoreszenzindikator mehr zu sehen war. Anschließend wurden die Folien gleichmäßig bei 105°C bis zur intensiven Farbentwicklung erhitzt.

Naturstoffreagenz A nach Neu [NEU, 1957]

Lösung A: 1%ige Lösung von Diphenylboryloxyethylamin in Methanol

Lösung B: 5%ige Lösung von Polyethylenglycol 400 in Ethanol

Die entwickelte DC-Folie wird mit Lösung A und nach dem Trocknen des Reagenzes zur Fixierung mit Lösung B besprüht. Die Auswertung erfolgte nach 30 Minuten im Tageslicht und im UV-Licht bei 365 nm. Das Naturstoffreagenz A wurde routinemäßig bei der Auswertung der Fraktionen und Reinsubstanzen aus dem Methanol-Extrakt eingesetzt.

Reagenz nach Dann und Mattocks [DANN, 1960; MATTOCKS, 1967a, 1967b und 1968]

Lösung A: Wasserstoffperoxid 30%

Lösung B: Acetanhydrid/Petrolether (Kp. 80 – 100°C)/Toluol 1:4:5

Lösung C: 2,00 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 54,00 ml Salzsäure konz., Ethanol (90%) ad 100,00 ml (Ehrlich's Reagenz)

Die entwickelte DC-Folie wird zunächst mit Lösung A besprüht und anschließend 30 Minuten lang bei 120°C im Trockenschrank erhitzt. Anschließend wird die erkaltete Folie mit Lösung B besprüht und nochmals unter den genannten Bedingungen erhitzt. Nach Aufsprühen von Lösung C liefern Pyrrolizidin-Alkaloide mit gesättigtem Ringsystem rotviolette, solche mit ungesättigtem Ringsystem blaue bis dunkelblaue Reaktionsprodukte.

Präparative Dünnschicht-Chromatographie

Die für diesen Zweck verwendeten DC-Folien wurden in reinem Methanol vorentwickelt und anschließend eine Stunde bei 100°C im Trockenschrank getrocknet. Diese Operation diente der Entfernung von Klebstoff- und Weichmacherresten aus dem Herstellungsprozeß. Die zu trennenden Fraktionen wurden in Form konzentrierter Lösungen strichförmig über die gesamte Breite der Startzone aufgetragen. Dabei betrug zur Vermeidung von Tailing- und Leading-Phänomenen die maximale Probenbeladung 6 mg Substanz pro Platte. Nach der Entwicklung der Chromatogramme wurden die interessierenden Substanzbanden unter UV-Licht markiert und danach mit einem geeigneten Spatel ausgekratzt. Lipophile Verbindungen wurden unter Zusatz von Aceton mit Hilfe eines Magnetrührers erschöpfend eluiert, bei hydrophilen Verbindungen wurde Methanol als Eluens verwendet. Die dabei gewonnenen Lösungen wurden zur Entfernung von Kieselgelresten durch Blauband-Papierfilter der Fa. Schleicher & Schuell filtriert und anschließend über einen mit wenigen Gramm Sephadex LH-20 gefüllten Glastrichter mit Fritte gegeben.

Bei Substanzen ohne ausreichende Fluoreszenzlöschung bei 254 nm wurden von den entwickelten DC-Folien schmale Streifen abgeschnitten und mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz (Terpene) bzw. DANN-MATTOCKS-Reagenz (Pyrrolizidin-Alkaloide) besprüht und erwärmt. Auf den Vergleichsstreifen waren nun die gesuchten Substanzbanden gut zu identifizieren. Die Streifen wurden dann bündig an die Ursprungsfolien angelegt und die zu eluierenden Substanzbanden auf Höhe der interessierenden gefärbten Zonen der Vergleichsstreifen markiert. Die Elution und weitere Bearbeitung erfolgte in der gewohnten Weise.

R_F-Werte

Was die SL, die PA und die übrigen Substanzen aus verschiedenen Naturstoffklassen betrifft, sind die Retentionsfaktoren und Färbungen am Ende dieses Kapitels bei den betreffenden Substanzen aufgeführt. Bei den liphophileren Flavonoid-Aglyka kamen neben den für die Glykoside verwendeten Fließmitteln DC-1 bis DC-4 auch die Systeme DC-7, DC-8 und DC-10 zum Einsatz. Einen Überblick über die R_F-Werte der Substanzbanden, ihr Aussehen unter UV-Licht von 356 nm sowie ihre Färbung nach Detektion mit Naturstoffreagenz A bei Tageslicht und unter UV-Licht (365 nm) gibt die folgende Tabelle 6.1, (S. 298). Die hydrophilen Verbindungen des Methanol-Extraktes wurden in den Fließmittelsystemen DC-1, DC-2 und DC-4 chromatographiert. Einen Überblick über ihr Lauf- und Detektionsverhalten ist ebenfalls der Tabelle 6.1 (S. 298) zu entnehmen.

Tabelle 6.1: R_f -Werte und Detektionsverhalten aller aus dem Drogenmaterial von *E. semialatum* isolierten Flavonoide und Kaffeoyl-Chinasäuren. Sämtliche dieser Substanzen bewirkten auf den DC-Folien eine Fluoreszenzminderung bei Bestrahlung mit ultravioletter Licht der Wellenlänge 254 nm.

Verb.	R_f -Werte			Färbung undetektiert	Färbung nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A	
	DC-3	DC-4	DC-8	UV 365 nm	UV 365 nm	Tageslicht
FA1	0,51	0,82	0,18	dunkel	dunkelorange	gelb
FA3	0,45	0,72	0,17	dunkelrot	hellorange leuchtend	orange
FA4	0,49	0,80	0,45	dunkel	dunkelorange	gelb
FA6	0,48	0,76	0,15	dunkelrot	hellorange leuchtend	rot
FA7	0,56	0,82	0,66	orange	gelbgrün	gelb
FA8	0,69	0,89	0,89	orange	gelbgrün	gelb
	DC-1	DC-2	DC-4			
FG1	0,84	0,83	0,40	dunkelrot	dunkelorange	gelb
FG2	0,36	0,27	0,05	dunkelrot	dunkelorange	gelb
FG3	0,67	0,65	0,22	dunkelrot	dunkelorange	gelb
FG4	0,64	0,62	0,19	dunkelrot	dunkelorange	gelb
FG5	0,76	0,73	0,28	dunkelrot	hellorange leuchtend	orange
FG6	0,71	0,68	0,22	dunkelrot	dunkelorange	gelb
FG7	0,66	0,63	0,19	dunkelrot	dunkelorange	gelb
FG8	0,84	0,78	0,38	dunkelrot	dunkelorange	gelb
FG9	0,62	0,51	0,14	dunkelrot	hellorange leuchtend	orange
FG10	0,63	0,60	0,15	dunkelrot	hellorange leuchtend	orange
FG11	0,68	0,54	0,20	dunkelrot	hellorange leuchtend	orange
KC1	0,76	0,71	0,29	hell grüngrau	grüngelb leuchtend	leuchtend gelb
KC2	0,84	0,81	0,34	hell grüngrau	grüngelb leuchtend	gelb
KC3	0,59	0,55	0,12	hell grüngrau	grüngelb leuchtend	gelb
KC4	0,79	0,71	0,21	rötlich graugrün	grüngelb leuchtend	gelb
KC5	0,92	0,89	0,43	gelbgrün	grüngelb leuchtend	gelb
KC6	0,50	0,76	0,29	grüngrau	gelb leuchtend	grünorange
KC7	0,33	0,67	0,22	grüngrau	grüngelb leuchtend	grünorange
KC8	0,80	0,91	0,46	rötlich graugrün	grüngelb leuchtend	gelb

6.2.2 Säulenchromatographie (SC)

Säulen

Es kamen ausschließlich Glassäulen mit Fritte und fein regulierbarem Auslaufhahn zum Einsatz. Zur Optimierung der Trennung über eine höchstmögliche Anzahl von theoretischen Trennböden wurden von den von ihrem Volumen her passenden Säulen jeweils diejenigen ausgewählt, die möglichst lang, dafür aber schmal waren.

Füllung der Säulen

Die Sorbentien wurden mit dem zu verwendenden Lösungsmittel in einem großen Bercherglas homogen aufgeschlemmt, verschlossen und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tage wurde das durch Sedimentation entstandene Zweiphasen-System erneut gut durchmischt und rasch und Luftblasen-frei bei geöffnetem Auslaufhahn in die Säule gefüllt. Nach vollständiger Aufgabe der stationären Phase wurde das Gelbett durch von oben

ausgeübten Luftdruck so weit wie möglich kompaktiert. Die Säule samt Füllung wurde darauf über Nacht stehen gelassen.

Stationäre Phasen

Kieselgel 60

Korngröße 0,040 – 0,063 mm, 230 – 400 mesh ASTM, Fa. Merck

Die Masse des Lösungsmittel-freien Materials betrug immer das Hundertfache der Masse der zu trennenden Fraktion. Nach einmaliger Benutzung wurde das Material verworfen.

Polyklar AT

Fa. Gaf

Das Material wurde vor der Verwendung intensiv mit Methanol gespült, um den Feinanteil zu entfernen. Die Masse des Lösungsmittel-freien Materials betrug immer das Zwanzigfache der Masse der zu trennenden Fraktion. Nach beendeter Trennung wurde auch dieses Material verworfen.

Sephadex LH-20

Fa. Pharmacia

Die Masse des Lösungsmittel-freien Materials betrug wie beim Kieselgel 60 das Hundertfache der Masse der zu trennenden Fraktion. Falls verunreinigt, wurde das Trennmaterial in Methanol aufgeschlämmt und jeweils mit einer 2%igen NaOH- und Na-EDTA-Lösung gespült. Anschließend wurde mit Wasser neutral gewaschen. Nach der Umstellung auf Methanol war die Säulenfüllung wieder betriebsbereit.

Mobile Phasen

System SC-1:	Methanol
SC-2:	Dichlormethan/Methanol 9:1
SC-3:	Dichlormethan/Cyclohexan/Methanol 7:4:1
SC-4:	Dichlormethan/Aceton 2:1

Bei lipohileren Fließmittelgemischen als reines Methanol, wurde im Verlauf der Chromatographie die Elutionskraft der mobile Phase kontinuierlich erhöht, um auch die hydrophileren Verbindungen in einer vertretbaren Zeit eluieren zu können. Die elutrope Reihe endete stets bei Methanol als hydrophilstem Lösungsmittel. Zur Ermittlung des für ein bestimmtes Trennproblem optimalen Fließmittels wurden vor jeder SC umfangreiche DC-Versuche mit der zu trennenden Fraktion unternommen. Hierbei wurden bewährte Fließmittel ausprobiert und bei befriedigenden Ergebnissen durch leichte Veränderungen in der Zusammensetzung weiter optimiert.

Probenaufgabe

Die im jeweiligen Lösungsmittel gelöste Probe wurde vorsichtig als konzentrierte Lösung bei geöffnetem Auslaufhahn gleichmäßig auf die Oberfläche des Gelbettes pipettiert. Nach dem Einsickern wurde vorsichtig mit Fließmittel nachgespült. Danach wurde die stationäre Phase mit dem Eluenten überschichtet.

Durchführung

Die Tropfgeschwindigkeit wurde auf etwa 20 Tropfen pro Minute eingestellt. Die Eluate wurden mit automatischen Fraktionssammlern aufgefangen, der Reagenzglasvorschub betrug

meist 1 Reagenzglas alle 30 Minuten. Bei sehr kleinen Säulen wurde entweder die Tropfgeschwindigkeit halbiert oder der Vorschub verdoppelt. Die Chromatographie verlief in einem klimatisierten Raum ohne Fenster bei erniedrigter Temperatur, um gleichmäßige Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Das Monitoring der SC erfolgte per DC jedes dritten aufgefangenen Reagenzglasinhaltes in einem geeigneten Fließmittel. Zusammengehörig erscheinende Fraktionen wurden vereinigt. Danach wurde unter vermindertem Druck bei 40°C das Lösungsmittel abgezogen und nach Trocknung der Kolben im Exsiccator unter Vakuum das Fraktionsgewicht ermittelt.

6.2.3 Niederdruck-Flüssigchromatographie (LPLC)

Gerät

Zwei HPLC-Pumpen mit Gradientensteuerung über Programmer 50, vorgeschaltete Mischkammer, UV-Detektor K-2000/A4060 und analoger Zweikanalschreiber (Fa. Knauer).

Säulen

Die Säulen wurden speziell vom Glasbläser der Universität aus dickwandigem Borosilikatglas hergestellt und von der Feinmechaniker-Werkstatt der Fakultät mit Messingstempeln mit Teflonköpfen versehen. Einige Säulen waren auch mit Stempeln der Fa. Latek ausgestattet. Auch bei der LPLC richtete sich die Säulendimension nach der Menge der zu trennenden Substanz. Die Fraktionen wurden an der hundertfachen Menge stationärer Phase getrennt.

Stationäre Phasen

Je nach Trennproblem wurde entweder LiChroprep RP-18, 15-25µm (Fa. Merck) oder LiChroprep RP-18, 25-40µm (Fa. Merck) verwendet.

Mobile Phasen

System	LPLC-1:	Wasser/Acetonitril (Standardsystem für lipophile Substanzen aus dem Dichlormethan-Extrakt)
	LPLC-2:	Ameisensäure (1%)/Acetonitril (Standardsystem für hydrophile Substanzen aus dem Methanol-Extrakt)

Probenaufgabe

Die Proben wurden in wenig Fließmittel gelöst und mit Hilfe einer Probenschleife, die mit einem Reodyne-Ventil gekoppelt war, auf das Gelbett gepumpt.

Durchführung

Bei einer Flußrate von 2 ml/min (Fraktionen unter 500 mg) oder 5 ml/min (Fraktionen über 500 mg) wurde eine Gradientenelution über zwei bzw. fünf Stunden durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgte manuell mit Hilfe der vom UV-Detektor/Schreiber ausgeworfenen Signale. Die Detektion der Sesquiterpenlactone erfolgte bei 220 nm, Flavonoide wurden bei 254 nm erfaßt.

6.2.4 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Gerät

Zum Einsatz kam ein Hewlett-Packard 1050 Instrument mit quaternärer Pumpe und Vakuumentgaser. Das Gerät verfügte über einen Diodenarray-Detektor. Die Prozeßsteuerung und Auswertung erfolgte mit einem gekoppelten PC mit Hewlett-Packard ChemStation Software.

Säulen

Bei analytischer Arbeitsweise wurde eine Macherey & Nagel-Säule der Dimensionen 12,5 cm x 5 mm, gefüllt mit Hypersil[®] ODS RP-18 (5µm), eingesetzt. Bei den semipräparativen Trennungen wurde eine Hibar[®] 250-10-Säule, gefüllt mit LiChrosorb[®] RP-8 (7 µm) der Firma Merck verwendet.

Mobile Phasen

- A Wasser (Aqua ad injectabilia, Fa. Delta Pharma)
- B Methanol (HPLC-Qualität, Fa. Merck)
- C Acetonitril (HPLC-Qualität, Fa. Merck)

Trenn-Methoden

- | | | |
|--------|---------|--|
| System | HPLC-1: | Eluenten A und B; Gesamtlaufzeit 70 min; zu Beginn 20 % B, dann lineare Steigerung des B-Anteils in 60 min auf 100%, anschließend 10 min Auswaschphase mit 100% B; vor jedem Lauf 5 min Equilibrierzeit mit 20 % B; Flußrate: 1,5 ml/min; Einstellung der Detektionswellenlänge bei DAD-1 auf 215 nm, bei DAD-2 auf 260 nm |
| System | HPLC-2: | Eluenten A und B; Gesamtlaufzeit 15 min; zu Beginn 75 % B, dann lineare Steigerung des B-Anteils in 10 min auf 80 %, anschließend eine fünfminütige isokratische Phase mit einem B-Anteil von 80 %, schließlich 10 min Auswaschphase mit 100% B; vor jedem Lauf 5 min Equilibrierzeit mit 75 % B; Flußrate: 3 ml/min; Einstellung der Detektionswellenlänge bei DAD-1 auf 219 nm, bei DAD-2 auf 282 nm |
| System | HPLC-3: | Eluenten A und B; Gesamtlaufzeit 60 min; zu Beginn 25 % B, dann lineare Steigerung des B-Anteils in 60 min auf 100%, anschließend 10 min Auswaschphase mit 100% B; vor jedem Lauf 5 min Equilibrierzeit mit 25 % B; Flußrate: 3 ml/min; Einstellung der Detektionswellenlänge bei DAD-1 auf 215 nm |
| System | HPLC-4: | Eluenten A und B; Gesamtlaufzeit 15 min; zu Beginn 40 % B, dann lineare Steigerung des B-Anteils in 20 min auf 55 %, anschließend 15 min Auswaschphase mit 100% B; vor jedem Lauf 5 min Equilibrierzeit mit 40 % B; Flußrate: 3 ml/min; Einstellung der Detektionswellenlänge bei DAD-1 auf 215 nm |

System	HPLC-5:	Eluenten A und C; Gesamtlaufzeit 45 min; zu Beginn 25 % C, dann 45 min isokratisch bei gleichem Mischungsverhältnis, anschließend 15 min Auswaschphase mit 100% C; vor jedem Lauf 5 min Equilibrierzeit mit 25 % B; Flußrate: 3 ml/min; Einstellung der Detektionswellenlänge bei DAD-1 auf 215 nm
--------	---------	--

Proben-Vorbereitung und Durchführung

Abhängig vom Lösungsmittelgemisch der mobilen Phase wurden die Proben 1%ig entweder in Methanol oder Acetonitril gelöst. Von diesen Probenlösungen wurden mit einer graduierten HPLC-Spritze jeweils 5 bis 10 µl injiziert. Die Auswahl der Methode im Hinblick auf das Lösungsmittel-Gradientenprogramm, die Flußrate und die Detektionswellenlängen orientierte sich an bestmöglicher Trennung der Peaks und kürzest möglicher Analysenzeit. Für präparative Zwecke wurden konzentrierte Lösungen der aufzutrennenden Fraktion in Methanol oder Acetonitril bereitet und in Portionen zu 50µl in aufeinanderfolgenden HPLC-Läufen zur Isolierung aufgetrennt. Die Separation der Eluate erfolgte Peak-orientiert unter Hinzunahme der on line aufgenommenen UV-Spektren. Die Eluate wurden am Ende der Auftrennung vereinigt und am Rotationsverdampfer unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Um trotz der hohen Konzentration der analysierten Substanzen eine Separation zu erzielen, wurde eine ausreichend weit vom Absorptionsmaximum entfernte Meßwellenlänge gewählt. Es hatte sich gezeigt, dass bei der semipräparativen Arbeitsweise erst dann reproduzierbare Chromatogramme erzielt werden konnten, wenn vor dem ersten Lauf eine Stunde lang mit der Ausgangsmischung der mobilen Phase equilibriert und zwischen den einzelnen Chromatogrammläufen keine Pause eingelegt wurde.

6.2.5 Gaschromatographie (GC)

Geräte

Gaschromatograph HP 5890 mit Splitinjektion und Flammenionisationsdetektor; Integrator HP 3396 Series II (Fa. Hewlett-Packard)

Säule

Quarzkapillarsäure OPTIMA 1 DF, 25 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm (Fa. Macherey & Nagel)

Mobile Phase

Stickstoff (Reinheitsgrad 5.0); Trägergasstrom (total): 65 ml/min; Säulendurchflußrate: 1,3 ml/min; Split-Verhältnis: 1:50; Injektor- und Detektortemperatur: 300 °C

Probenaufgabe

Von den zu untersuchenden Gemischen oder Reinsubstanzen wurden 0,1%ige Lösungen in Aceton oder Methanol bereitet. Hiervon wurden mit einer graduierten GC-Spritze jeweils 0,8 µl entnommen und in den Injektorblock des Gaschromatographen injiziert.

Retentionszeiten

Alle in dieser Arbeit angegebenen Retentionszeiten sind Gesamtretentionszeiten (Totzeit + Nettoretentionszeit).

Tabelle 6.2: Retentionszeiten der GC-gängigen Substanzen aus dem Dichlormethan-Extrakt von *E. semialatum*

Substanz	Retentionszeit [min]	Substanz	Retentionszeit [min]
SL1	14,31	SL7	13,50
SL2	14,31	SL8	13,50
SL3	13,93	SL9	13,60
SL4	17,61	SL10	13,60
SL5	13,74	SL11	14,32
SL6	13,74	SE1	19,60

Temperaturprogramme

Methode GC-1: Standardmethode; Starttemperatur: 150°C (3 min lang);
Gradient: 150 – 280°C (Heizrate 10°C/min); Endtemperatur:
280°C isotherm (25 min lang)

6.3 Spektroskopische Verfahren

6.3.1 Optische Drehung

Die Messung der spezifischen Drehung erfolgte unter Verwendung einer Quarzküvette der Schichtdicke 1 dm (Mikrozelle, 0,35 ml) an einem Polarimeter 341 LC der Firma Perkin-Elmer bei 20°C und 589 nm. Als Lösungsmittel diente Ethanol.

6.3.2 IR-Spektroskopie

Sämtliche IR-Spektren wurden mit einem Spektrometer der Reihe 881 der Firma Perkin-Elmer aufgenommen. Als Matrix für die zu analysierenden Substanzen wurden Kaliumbromid-Preßlinge verwendet.

6.3.3 UV-Spektroskopie

Geräte

Die UV-Spektren der Flavonoide wurden mit einem Spektralphotometer Typ DB-G (Fa. Beckman) in Methanol mit oder ohne Zugabe von Shiftreagenzien aufgenommen. Die Spektren der übrigen Verbindungen wurden während der HPLC-Läufe online mit einem Photodiodenarray-Detektor (HP 1050, Hewlett Packard) aufgezeichnet. Methoden-abhängig wurde mit Wasser/Methanol- oder Wasser/Acetonitril-Gemischen als Solventien gearbeitet. Sämtliche Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen.

Die Extinktionskoeffizienten der Terpene wurden mit dem Beckman-Spektralphotometer bestimmt, als Lösungsmittel diente Methanol.

Shiftreagenzien

Bei der UV-spektroskopischen Untersuchung von Flavonoiden bedient man sich verschiedener Shiftreagenzien. Zur Herstellung und Verwendung siehe MABRY et al. (1970).

<u>Natriummethanolat</u>	2,5 g frisch geschnittenes metallisches Natrium wurde in kleinen Portionen vorsichtig in 100 ml Methanol gelöst. Von dieser Stammlösung wurden zur Aufnahme des NaOMe-Spektrums zwei bis drei Tropfen in die Küvette pipettiert, in der sich noch die Lösung befand, mit der das UV-Spektrum in Methanol gewonnen worden war. Das Spektrum wurde sofort und nach fünf Minuten aufgenommen, um eventuelle Zersetzungen der Untersuchungssubstanz unter dem Einfluß der Base dokumentieren zu können.
<u>Natriumacetat</u>	Pulverförmiges wasserfreies Natriumacetat wurde in die Küvette mit der methanolischen Untersuchungslösung gegeben. Danach wurde die verschlossene Küvette kräftig geschüttelt, um die Lösung mit dem Salz zu sättigen. Es mußte soviel Reagenz zugegeben werden, dass sich nach dem Schütteln auf dem Grund der Küvette ca. 2 mm Bodensatz befand. Das Spektrum wurde unverzüglich aufgenommen.
<u>Natriumacetat/ Borsäure</u>	Eine ausreichende Menge pulverförmiger wasserfreier Borsäure wurde in die Küvette mit der Natriumacetat-Untersuchungslösung gegeben und das Ganze wieder gewissenhaft homogenisiert, um eine gesättigte Lösung zu erhalten. Danach wurde das Spektrum aufgezeichnet.
<u>Aluminiumchlorid</u>	Fünf Gramm wasserfreies Aluminiumchlorid wurden in 100 ml Methanol gelöst. Das Spektrum wurde unmittelbar nach der Zugabe von sechs Tropfen des Reagenzes zur methanolischen Untersuchungslösung aufgenommen.
<u>Aluminiumchlorid/ Salzsäure</u>	Drei Tropfen einer Mischung von 50 ml konzentrierter Salzsäure mit 50 ml Wasser wurden in die Küvette mit der Aluminiumchlorid-Lösung pipettiert und die Lösung anschließend vermessen.

6.3.4 Massenspektrometrie (MS)

Geräte

Massenspektren ohne vorhergehende GC-Trennung wurden mit einem Massenspektrometer INCOS 50 der Firma Finnigan MAT aufgenommen. Die Proben wurden direkt in die Ionenquelle eingelassen und entweder bei 200°C durch Elektronenstoß (DEI-MS, Ionisierungsenergie: 70 eV) oder bei 280°C mit Hilfe von Ammoniak als Reaktantgas chemisch ionisiert (DCI-MS). Die Massenspektren der Substanzen **FA6**, **FA7** und **FA8** wurden mit einem Kratos MS-50 TC-Spektrometer aufgenommen. Das Gerät wurde mit einer kombinierten EI/CI-Ionen-Quelle bei einer Temperatur von 120°C und einer Ionisierungsenergie von 60eV betrieben.

6.3.5 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Geräte

Als Standardgerät kam ein Kernresonanz-Spektrometer DRX 500 (Fa. Bruker) zum Einsatz. Es war mit einem TBI-Probenkopf (triple broadband inverse gradient head) für ^1H NMR- und Korrelationsspektren und einem QNP-Probenkopf (quadro nuclear probe) für ^1H NMR-, ^{13}C NMR-, DEPT- und NOESY-Messungen ausgestattet. Die Meßfrequenzen betrugen 500 MHz (^1H NMR-, COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren) und 125 MHz (^{13}C NMR-, DEPT- und NOESY-Spektren).

Die Verbindung **SE1** wurde zusätzlich mit einem Kernresonanz-Spektrometer DMX-600 (Fa. Bruker) untersucht. Es war mit einem TBI-Probenkopf ausgerüstet. Die Meßfrequenzen betrugen 600 MHz (^1H NMR-, COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren) und 150 MHz (^{13}C NMR-Spektren).

Sämtliche ^{13}C NMR-Spektren sind Protonen-breitbandentkoppelt.

Lösungsmittel

Als Standardlösungsmittel für lipophile Verbindungen wurde Chloroform- d verwendet. In den Fällen, in denen sich die Substanzen darin nicht ausreichend lösten, wurde auf Aceton- d_6 ausgewichen. Die Flavonoid-Aglyka wurden in Methanol- d_4 oder DMSO- d_6 vermessen, für deren Glykoside sowie die Kaffeoyl-Chinasäuren wurde ausschließlich DMSO- d_6 verwendet. Alle Lösungsmittel waren hochreine Spezialsolvenzien für die NMR-Spektroskopie.

Probenvorbereitung und Durchführung

Die Proben wurden zunächst 24 Stunden in einem Vakuum-Exsiccator über Blaugel und danach weitere 24 Stunden über Phosphor-(V)-oxid aufbewahrt, um Lösungsmittel- und Wasserreste zu entfernen. Danach wurden die Proben in wenig deuteriertem Lösungsmittel gelöst und über Glaswolle in die über Nacht im Trockenschrank bei 50 °C gelagerten NMR-Probenröhrchen überführt. Bei ausreichenden Probenmengen wurde eine geringe Menge Tetramethylsilan (TMS) als interner Standard zugesetzt. Die Auswertung erfolgte mit spezieller Software der Fa. Bruker. Die Werte für die chemische Verschiebung [δ] sind in ppm angegeben. Die Referenzierung erfolgte entweder auf TMS oder das jeweilige Lösungsmittelsignal. Die Einheit der Kopplungskonstanten [J] ist Hertz (Hz).

6.4 Gekoppelte Verfahren

6.4.1 GC-MS

Geräte

Bei der Analyse der Verbindungen aus der Alkaloidaufarbeitung bestand das GC-MS-System aus einem Carlo Erba 5160 GC, verbunden mit einem Quadrupol-Massenspektrometer Finnigan MAT 4515 (Ionisierungsenergie: 40 eV). Die Auswertung und Steuerung der Geräte erfolgte mit dem Incos Data System. Alle übrigen Verbindungen wurden mit einem Gaschromatographen HP 5890 Series II *Plus* mit Splitinjektion und massenselektivem Detektor HP 5972 Series (Ionisierungsenergie: 70 eV) untersucht. Die Steuerung übernahm eine HP Chemstation (Fa. Hewlett-Packard).

Säule

Mit dem HP-System wurde eine Quarzkapillarsäule OPTIMA 1 DF, 25 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 μm (Fa. Macherey & Nagel) verwendet. Das Carlo Erba-Gerät war mit einer Quarzkapillar-Säule der Fa. J&W Scientific ausgestattet (30 m x 0.32 mm, stationäre Phase: Methylsilicon DB-1).

Mobile Phase

Für das HP-System galten folgende Parameter: Helium des Reinheitsgrades 5.0; Säulenvordruck: $1,16 \times 10^5$ Pa; Trägergasstrom (total): 70 ml/min; Säulendurchflußrate: 1,5 ml/min; Split-Verhältnis: 1:50; Injektortemperatur: 280 °C; Steuerung über HP Chemstation mit HP Software G1034C. Beim Carlo Erba-Gerät diente ebenfalls Helium als Trägergas, die Injektortemperatur betrug jedoch nur 250°C und das Splitverhältnis 1:20.

Probenaufgabe, Retentionszeiten und Temperatur-Programme

Für das HP-System siehe Kap. 6.2.5, S. 302! Bei der Kombination aus Carlo Erba-GC und Finnigan MAT-Massenspektrometer wurde ein linearer Gradient von 70 bis 300°C mit einer Aufheizrate von 6°C/min programmiert.

6.4.2 LC-MS

Geräte

LC:	HPLC-Gerät 1050 mit quarternärer Pumpe und UV-VIS Diodenarray-Detektor (Fa. Hewlett-Packard)
MS:	PE Sciex API 3+ Tripel-Quadrupol Massenspektrometer mit Sciex-Software
Interface:	APCI (<u>A</u> tmospheric <u>P</u> ressure <u>C</u> hemical <u>I</u> onisation) Verneblertemperatur 480°C, Spitzenentladung bei 8 kV und 3 μA

Säulen

Für die LC-Trennung kam folgende Fertigsäule zur Anwendung: LiChrospher[®] RP-18, 250 x 4 mm, 5 μm (Fa. Merck).

Mobile Phase

Bei sämtlichen LC-MS/MS-Versuchen wurde ein linearer Gradient von 20% bis 80% Acetonitril in 1%iger wässriger Ameisensäure über 60 Minuten gefahren. Die Flußrate betrug immer 0,8 ml pro Minute.

Probenaufgabe

Bei MS/MS-Versuchen wurde die Untersuchungslösung über eine Probenschleife in das Massenspektrometer injiziert. Bei den LC-MS/MS-Experimenten wurde das Ende der HPLC-Säule direkt mit dem APCI-Interface des Massenspektrometers gekoppelt. Das APCI-Interface wurde ausschließlich im Positivmodus betrieben, d.h. die Moleküle des Analyten wurden positiv ionisiert.

Durchführung

Die Ionisierungsmethode der APCI eignet sich insbesondere für die LC-MS-Kopplung. Es handelt sich um eine Art der chemischen Ionisierung, bei der es zu einem Protonentransfer zwischen ionisiertem Fließmittel und den darin gelösten Probenmolekülen kommt. Die Ionisierung vollzieht sich bei Atmosphärendruck durch simultane Verneblung und Spitzenentladung („corona discharge“). Die durch die Protonenübertragung entstandenen Pseudomolekülonen radikalischen Charakters $[MH]^{+•}$ liefern meist im ersten der drei Massenspektrometer zunächst keine Fragmentionen. Dies geschieht erst durch Kollisions-induzierten Molekülzerfall (CID = „collision-induced dissociation“) im zweiten der drei verbundenen Quadrupole. Die Pseudomolekülonen kollidieren dort mit Molekülen eines inerten Reaktandgases und werden abgebremst. Die dabei freigeordnete kinetische Energie bewirkt die Fragmentierung der Ionen. Die interessierenden Fragmente werden im dritten Quadrupol fokussiert und dort analysiert. Durch Variation der angelegten Öffnungsspannung der Ionenquelle und der Kollisionsenergie im zweiten Massenspektrometer lässt sich der Grad der Fragmentierung steuern. Bei den untersuchten Flavonoid-Glykosiden reicht eine Kollisionsenergie von 30 – 50 V lediglich aus, die Zuckermoleküle abzuspalten. Man erhält dadurch die Massen der Aglyka. Wird die Öffnungsspannung auf 80 V erhöht, so fragmentieren auch die Aglyka und es lassen sich Spektren erzielen, die durch EI-MS erhaltenen Spektren gleichen. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse bei verschiedenen Spannungen spricht man auch von pseudo-MS/MS/MS. Als Target wurde ein Argon-Stickstoff-Gemisch (9:1) mit einer Dichte von etwa $1,9 \times 10^{14}$ Teilchen pro Kubikzentimeter verwendet [STEVENS et al., 1997].

6.5 Isolierung der Inhaltsstoffe aus *Eupatorium semialatum*

6.5.1 Herkunft des Drogenmaterials

Die Blätter von *Eupatorium semialatum* Benth. wurden am 1.2.1995 nahe der Stadt Purulhá in der Baja Verapaz/Guatemala gesammelt und an der Luft getrocknet. Das Pflanzenmaterial wurde von Juan José Castillo von der Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos, Guatemala Ciudad, identifiziert. Ein Belegexemplar lagert unter der Signatur JC2541 im Institut von Castillo, ein weiteres mit derselben Signatur befindet sich im Besitz des Instituts für Pharmazeutische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

6.5.2 Gewinnung der Rohextrakte

Die Gewinnung der Rohextrakte erfolgte nach der Soxhlet-Methode. 725,96 g der fein gemahlenen Blattdroge wurden in vier Portionen innerhalb von 32 Stunden Extraktionszeit erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Es verblieben 81 g eines zähen, grünen Rohextraktes, was einer Extraktionsausbeute von ungefähr 10% entsprach.

Die getrockneten Extraktionshülsen wurden anschließend in gleicher Weise mit Methanol extrahiert. Es resultierten 179,38 g eines gelbbraunen sirupösen Methanol-Extraktes. Die Ausbeute betrug damit etwa 25% bezogen auf die eingesetzte trockene Blattdroge.

6.5.3 Fraktionierung des Dichlormethan-Extraktes

In Anlehnung an Willuhn et al. [PAßREITER, 1990; SKIBINSKI, 1990] wurden 81 g des Dichlormethan-Extraktes zur Abtrennung lipophiler Verunreinigungen mit Methanol erschöpfend ausgezogen. Es resultierten ca. 37 g Methanol-löslicher Anteil des Dichlormethan-Extraktes als Ausgangsbasis für die weitere Auftrennung. Zur Abgrenzung von den Fraktionen des Methanol-Extraktes wurde allen Fraktionsbezeichnungen des Dichlormethan-Extraktes ein „D“ vorangestellt.

Der Methanol-lösliche Anteil wurde in 6 Teile gleicher Masse aufgeteilt. Ein Teil (6,17 g) wurde als Reserve für eventuelle spätere Untersuchungen vom Lösungsmittel befreit und unter Stickstoff in einem verschlossenen Rundkolben bei 8°C gelagert. Die verbliebenen fünf Teile (30,83 g) wurden nacheinander unter gleichen Bedingungen einer SC an Sephadex LH-20 unterzogen. Als mobile Phase diente Methanol (SC-1). Die Eluate der einzelnen Durchgänge wurden im Fließmittelsystem DC-6 chromatographiert und mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz oder Naturstoffreagenz A detektiert. Nach Auswertung der Chromatogramme wurden zusammengehörige Eluate vereinigt und mit den Unterfraktionen der übrigen Säulen verglichen. Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung wurden dabei übergreifend vereinigt. Hieraus resultierten fünf Grobfraktionen des Dichlormethan-Extraktes D-I bis D-V (siehe Tabelle 6.3, S. 309). Diese erste Trennung diente hauptsächlich dazu, die Sesquiterpenlactone und anderen Terpenoide (D-II), welche mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz blaue bis violette Färbungen ergaben, und die Flavonoid-Aglyka (D-IV), die nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz A als gelbe bis orangefarbene Banden erschienen, von den Begleitstoffen (D-I, D-III und D-V) abzutrennen.

Tabelle 6.3: Ergebnis der SC-Trennung von 30,83 g Methanol-löslichem Anteil an Sephadex LH-20 mit Methanol

Fraktion	Ausbeute [g]	Substanzen
D-I	11,55	-
D-II	8,85	SL1 – SL11 SE1 – TR1
D-III	2,98	-
D-IV	0,68	FA1 – FA5, FA9
D-V	3,25	-

6.5.3.1 Auftrennung der Fraktion D-II

Die ca. 9 g schwere Fraktion wurde durch SC an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol 9:1 (SC-2) weiter aufgetrennt. Die aufgefangenen Eluate wurden nach DC-Kontrolle (System DC-12, Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure) zu fünf Unterfraktionen (D-II-1 bis D-II-5) zusammengefaßt (siehe Tabelle 6.4, S. 309).

Tabelle 6.4: Ergebnis der SC-Trennung von Fraktion D-II an Kieselgel 60 (System SC-2)

Fraktion	Ausbeute [g]	Substanzen
D-II-1	0,88	-
D-II-2	1,69	SL4 SE1
D-II-3	0,51	SL1 – SL3 TR1
D-II-4	0,73	SL5 – SL11
D-II-5	4,13	-

Die Fraktion D-II-2 erschien im Hinblick auf das Vorhandensein terpenoider Verbindungen so vielversprechend, dass diese Fraktion (1,69 g) einer erneuten SC an Kieselgel 60 unterzogen wurde. In Vorversuchen hatte sich die mobile Phase SC-3 für die Feintrennung dieser Fraktion als die geeignetste gezeigt. Auch hier wurden fünf Unterfraktionen (D-II-2-1 bis D-II-2-5) gebildet (siehe Tabelle 6.5, S. 309).

Tabelle 6.5: Ergebnis der SC-Trennung von Fraktion D-II-2 an Kieselgel 60 (System SC-3)

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
D-II-2-1	462	-
D-II-2-2	81	SE1
D-II-2-3	535	-
D-II-2-4	14	SL4
D-II-2-5	346	-

Die Fraktion D-II-3 (510 mg) wurde ebenfalls SC weiter aufgetrennt, allerdings an Sephadex LH-20 mit dem System SC-3 als mobiler Phase. Daraus gingen die fünf Fraktionen D-II-3-1 bis D-II-3-5 hervor (siehe Tabelle 6.6, S. 310).

Tabelle 6.6: Ergebnis der SC-Trennung von Fraktion D-II-3 an Sephadex LH-20 (System SC-3)

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
D-II-3-1	21	-
D-II-3-2	21	SE1
D-II-3-3	143	-
D-II-3-4	17	SL1 – SL3
D-II-3-5	257	-

Fraktion D-II-4 (730 mg) wurde zur Entfernung eines Großteils der Begleitstoffe SC an Kieselgel 60 chromatographiert. Als mobile Phase kam das Gemisch SC-4 zur Verwendung. Aus den Eluaten wurden die drei Unterfraktionen D-II-4-1 bis D-II-4-3 gebildet (siehe Tabelle 6.7, S. 310).

Tabelle 6.7: Ergebnis der SC-Trennung von Fraktion D-II-4 an Kieselgel 60 (System SC-4)

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
D-II-4-1	277	-
D-II-4-2	74	SL5 – SL11
D-II-4-3	298	-

6.5.3.2 Auftrennung der Fraktion D-IV

Diese Fraktion (680 mg), in der die Flavonoid-Aglyka angereichert vorlagen, wurde einer weiteren SC-Trennung an Sephadex LH-20 mit Methanol als Fließmittel unterzogen. Nach DC-Kontrolle (System DC-4, Naturstoffreagenz A) wurden aus den Eluaten die fünf Unterfraktionen D-IV-1 bis D-IV-5 gebildet (siehe Tabelle 6.8, S. 310).

Tabelle 6.8: Ergebnis der SC-Trennung von Fraktion D-IV an Sephadex LH-20 (System SC-1)

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
D-IV-1	317	FA2
D-IV-2	67	FA9
D-IV-3	88	FA5
D-IV-4	44	FA1, FA4
D-IV-5	77	FA3

6.5.4 Isolierung und analytische Daten der Sesquiterpenlactone und anderer terpenoider Verbindungen aus dem Dichlormethan-Extrakt

6.5.4.1 Verbindung SL1

**8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin =
1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-4(15),11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

Fraktion D-II-3-4 (siehe Tabelle 6.6, S. 310) enthielt Substanzen mit UV-Absorptionsmaxima über 200 nm und schien nach GC-MS-Untersuchungen mehrere Sesquiterpenlactone zu enthalten. Es wurde daher eine dem Trennproblem angepaßte HPLC-Methode entwickelt, mit der das Gemisch dieser Verbindungen getrennt werden konnte (siehe Bild 6.1, S. 311). Es handelte sich um die Substanzen **SL1** - **SL3**. Die Separierung der beiden sehr ähnlichen Sesquiterpenlactone **SL1** und **SL2** gelang dadurch, dass bei **SL1** nur das zeitlich simultan mit dem ansteigenden Ast des Peaks aus dem Detektor gespülte Eluat aufgefangen wurde. Bei **SL2** wurde ähnlich verfahren, allerdings wurde das mit dem absteigenden Ast des Peaks erscheinende Eluat aufgefangen. Von der farblosen und gummiartigen Substanz **SL1** konnten auf diese Weise 4 mg rein gewonnen werden.

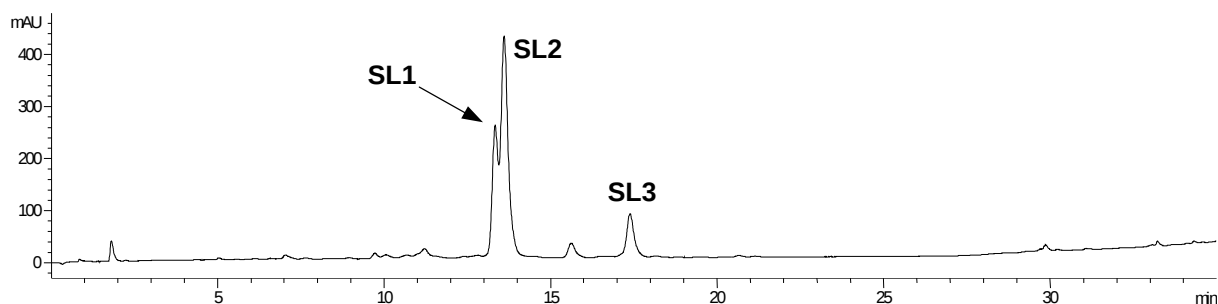


Bild 6.1: HPLC-Chromatogramm von Fraktion D-II-3-4 (215 nm), aus der die Verbindungen **SL1**, **SL2** und **SL3** mit Methode HPLC-4 isoliert werden konnten

Summenformel: $C_{21}H_{28}O_7$

Molekulargewicht: M_r 392

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -0,44^\circ$ (c 6.93, Ethanol)

GC: siehe Tabelle 6.2, S. 303

HPLC: R_t (min): 12,90 (HPLC-4)

IR: $\nu_{\max}^{KBr}$ cm^{-1} : 3522 br (OH), 2944 (CH), 1765 (γ -Lacton), 1719 (konjugierter Ester), 1650 wk (Doppelbindung)

UV: $\lambda_{\max}$ (nm) in Methanol: 210, ϵ 6389

EI-MS: m/z (rel. Int.): 264 [8 β -Hydroxyreynosin] $^{+\bullet}$ (< 1), 246 [264-H $_2$ O] $^{+\bullet}$ (7), 228 [246-H $_2$ O] $^{+\bullet}$ (11), 213 [228-CH $_3$] $^{+}$ (5), 202 [246-CO $_2$] $^{+\bullet}$ (13), 179 (34), 161 (24), 145 (13), 133 (22), 117 [C $_5$ H $_9$ O $_3$] $^{+}$ (19), 106 (52), 91 (64), 79 (51), 69 (58), 55 (44), 41 (100)

DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 410 $[M+NH_4]^+$ (57), 282 $[410-Acyl]^+$ (29), 274 (13), 163 $[Acyl+NH_3]^{+\bullet}$ (71), 146 $[Acyl]^{+\bullet}$ (100)
NMR:	siehe Tabelle 2.1, S. 15
DC:	R_f : 0,46 (DC-11), 0,39 (DC-12) Farbe: Blauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.2 Verbindung SL2

**8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]reynosin =
1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-4(15),11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

Verbindung **SL2** fiel bei der Aufarbeitung von Fraktion D-II-3-4 (siehe Kap. 6.5.4.1, S. 311) mittels semipräparativer HPLC (Methode HPLC-4) in einer Ausbeute von 2 mg als farblose und gummiartige Substanz an.

Summenformel:	$C_{21}H_{28}O_7$
Molekulargewicht:	M_r 392
Optische Drehung:	$[\alpha]_D^{20} = +0,35^\circ$ (c 6.85, Ethanol)
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R_t (min): 13,19 (HPLC-4)
IR:	ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3522 br (OH), 2944 (CH) 1765 (γ -Lacton), 1719 (konjugierter Ester), 1650 wk (Doppelbindung)
UV:	λ_{max} (nm) in Methanol: 210, ϵ 6517
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 264 $[8\beta\text{-Hydroxyreynosin}]^{+\bullet}$ (< 1), 246 $[264-H_2O]^{+\bullet}$ (7), 228 $[246-H_2O]^{+\bullet}$ (11), 213 $[228-CH_3]^+$ (5), 202 $[246-CO_2]^{+\bullet}$ (13), 179 (34), 161 (24), 145 (13), 133 (22), 117 $[C_5H_9O_3]^+$ (19), 106 (52), 91 (64), 79 (51), 69 (58), 55 (44), 41 (100)
DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 410 $[M+NH_4]^+$ (100), 282 $[410-Acyl]^+$ (32), 274 (52), 163 $[Acyl+NH_3]^{+\bullet}$ (29), 146 $[Acyl]^{+\bullet}$ (31)
NMR:	siehe Tabelle 2.2, S. 25
DC:	R_f : 0,46 (DC-11), 0,39 (DC-12) Farbe: Blauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.3 Verbindung SL3

**8 β -[2-(2-Hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]balchanin =
1 β -Hydroxy-8 β -[2-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)acryloyloxy]-3,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

Verbindung **SL3** lag in Fraktion D-II-3-4 vor. Durch Isolierung mittels semipräparativer HPLC (siehe Kap. 6.5.4.1, S. 311) konnten 3 mg der farblosen und gummiartigen Substanz gewonnen werden.

Summenformel:	$C_{21}H_{28}O_7$
Molekulargewicht:	M_r 392

Optische Drehung:	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 38,8^{\circ}$ (c 0.2, Ethanol)
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R_{f} (min): 17,04 (HPLC-4)
IR:	$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3611 br (OH), 2940 (CH), 1778 (γ -Lacton), 1721 (konjugierter Ester), 1650 wk (Doppelbindung)
UV:	λ_{max} (nm) in Methanol: 218, ϵ 7412
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 264 $[8\beta\text{-Hydroxybalchanin}]^{+\bullet}$ (14), 246 $[264\text{-H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (2), 228 $[246\text{-H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (3), 213 $[228\text{-CH}_3]^+$ (6), 202 $[246\text{-CO}_2]^{+\bullet}$ (5), 189 (16), 175 (9), 173 (9), 164 (25), 150 (17), 119 (39), 97 (34), 91 (61), 79 (45), 69 (64), 55 (50), 43 (59), 41 (100)
DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 410 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100)
NMR:	siehe Tabelle 2.3, S. 31
DC:	R_{f} : 0,43 (DC-11) Farbe: Blauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.4 Verbindung SL4

Trichomatolid D =

$8\beta\text{-}[2\text{-(1-Hydroxyethyl)acryloyloxy}]$ reynosin =

$1\beta\text{-Hydroxy-}8\beta\text{-}[2\text{-(1-Hydroxyethyl)acryloyloxy}]\text{-4(15),11(13)-eudesmadien-12,6-olid}$

Aus Fraktion D-II-2-4 (siehe Tabelle 6.5, S. 309) wurde Verbindung **SL4** durch semipräparative HPLC (Methode HPLC-3) in einer Ausbeute von 1 mg gewonnen. Die Substanz war farblos und besaß gummiartige Konsistenz.

Summenformel:	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$
Molekulargewicht:	M_{r} 362
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R_{f} (min): 20,04 (HPLC-3)
UV:	λ_{max} (nm) in Methanol: 211
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 362 $[\text{M}]^{+\bullet}$ (<1), 347 $[\text{M-CH}_3]^+$ (<1), 318 $[\text{M-CH}_3\text{CHO}]^{+\bullet}$ (<1), 300 $[318\text{-H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (<1), 272 $[300\text{-CO}]^{+\bullet}$ (<1), 264 $[8\beta\text{-Hydroxyreynosin}]^{+\bullet}$ (< 1), 246 $[\text{M-Acyl-H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (6), 228 $[246\text{-H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (17), 213 $[228\text{-CH}_3]^+$ (9), 202 $[246\text{-CO}_2]^{+\bullet}$ (18), 183 (11), 173 (10), 161 (30), 145 (15), 131 (16), 105 (27), 91 (55), 81 $[\text{Acyl-H}_2\text{O}]^+$ (79), 67 (33), 55 (100), 43 (100)
DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 380 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100)
^1H NMR:	siehe Tabelle 2.4, S. 35
DC:	R_{f} : 0,06 (DC-6), 0,64 (DC-11), 0,47 (DC-12) Farbe: Blauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.5 Verbindung SL5

**8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin =
1 β -Hydroxy-8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4(15),11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

Aus der Fraktion D-II-4-2 (siehe Tabelle 6.7, S. 310) gelang durch semipräparative HPLC (HPLC-5) die gleichzeitige Gewinnung der Reinsubstanzen **SL5** bis **SL11** (siehe Bild 6.2, S. 314). Die Ausbeute an der farblosen und gummiartigen Verbindung **SL5** betrug 29 mg.

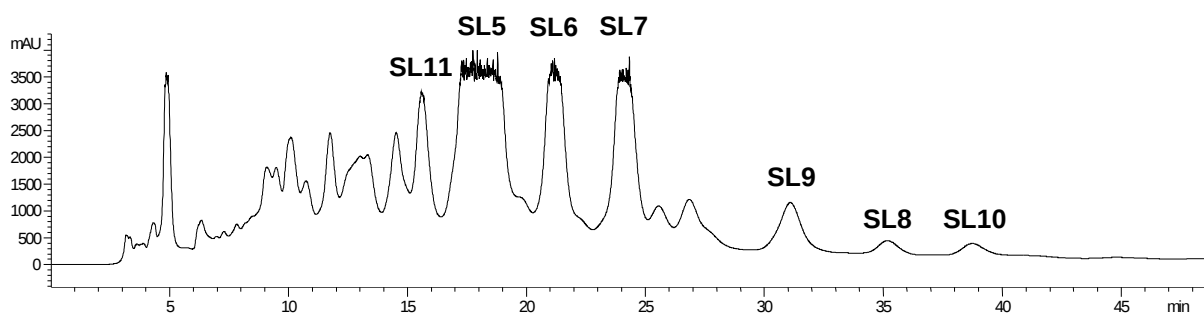


Bild 6.2: HPLC-Chromatogramm von Fraktion D-II-4-2 (215 nm), aus der die Verbindungen **SL5** bis **SL11** mit Methode HPLC-5 isoliert werden konnten

Summenformel: $C_{25}H_{32}O_9$

Molekulargewicht: M_r 476

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +27,2^\circ$ (c 1.92, Ethanol)

GC: siehe Tabelle 6.2, S. 303

HPLC: R_t (min): 16,94 (HPLC-5)

IR: $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3411 br (OH), 2944 (CH), 1765 (γ -Lacton), 1709 (konjugierter Ester), 1650 wk (Doppelbindung)

UV: $\lambda_{\max}$ (nm) in Methanol: 209, ϵ 5678

EI-MS: m/z (rel. Int.): 264 [8 β -Hydroxyreynosin] $^{+\bullet}$ (< 1), 246 [264-H $_2$ O] $^{+\bullet}$ (3), 228 [246-H $_2$ O] $^{+\bullet}$ (4), 213 [228-CH $_3$] $^+$ (3), 202 [246-CO $_2$] $^{+\bullet}$ (6), 179 (18), 161 (12), 157 (10), 133 (13), 117 [C $_5$ H $_9$ O $_3$] $^+$ (12), 106 (28), 91 (43), 79 (36), 77 (36), 69 (48), 55 (37), 43 (50), 41 (100)

DCI-MS: m/z (rel. Int.): 494 [M+NH $_4$] $^+$ (15), 396 [494-(5-Hydroxytigloyl)+H] $^+$ (<1), 378 [396- NH $_4$] $^{+\bullet}$ (5), 282 [8 β -Hydroxyreynosin+NH $_4$] $^+$ (2), 264 [8 β -Hydroxyreynosin] $^{+\bullet}$ (1), 250 (12), 151 [4,5-Dihydroxy-tiglinsäure+H+NH $_4$] $^{+\bullet}$ (35), 134 [5-Hydroxytiglinsäure +NH $_4$] $^+$ (100), 117 [5-Hydroxytigloyl+NH $_4$] $^{+\bullet}$ (<1)

NMR: siehe Tabelle 2.5, S. 38

DC: R_f : 0,53 (DC-11), 0,19 (DC-12)

Farbe: Blauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.6 Verbindung SL6

**8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]reynosin =
1 β -Hydroxy-8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4(15),11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

SL6 wurde neben den Verbindungen **SL5** und **SL7 – SL11** als farblose und gummiartige Substanz aus Fraktion D-II-4-2 isoliert (siehe Kap. 6.5.4.5, S. 314). Die Ausbeute betrug 5 mg.

Summenformel:	C ₂₅ H ₃₂ O ₉
Molekulargewicht:	M _r 476
Optische Drehung:	$[\alpha]_D^{20} = + 15,6^\circ$ (c 0.311, Ethanol)
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R _t (min): 20,71 (HPLC-5)
IR:	$\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹ : 3414 br (OH), 2956 (CH), 1764 (γ -Lacton), 1710 (konjugierter Ester), 1650 wk (Doppelbindung)
UV:	$\lambda_{\max}$ (nm) in Methanol: 209, ϵ 5813
EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 228 [8 β -Hydroxyreynosin-2H ₂ O] ⁺ • (2), 202 [246-CO ₂] ⁺ • (2), 179 (16), 161 (10), 157 (10), 145 (6), 133 (12), 117 [C ₅ H ₉ O ₃] ⁺ (13), 106 (24), 91 (45), 79 (35), 77 (36), 69 (48), 55 (37), 43 (50), 41 (100)
DCI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 494 [M+NH ₄] ⁺ (100)
NMR:	siehe Tabelle 2.6, S. 48
DC:	R _f : 0,53 (DC-11), 0,19 (DC-12) Farbe: Purpurviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.7 Verbindung SL7

**8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin =
1 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-3,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

Die Verbindung **SL7** lag gemeinsam mit **SL5**, **SL6** und **SL8 – SL11** in Fraktion D-II-4-2 vor und konnte mittels semipräparativer HPLC in einer Ausbeute von 4 mg DC-rein dargestellt werden (siehe Kap. 6.5.4.5, S. 314). Die Substanz war farblos und besaß gummiartige Konsistenz.

Summenformel:	C ₂₅ H ₃₂ O ₉
Molekulargewicht:	M _r 476
Optische Drehung:	$[\alpha]_D^{20} = + 0,30^\circ$ (c 8.871, Ethanol)
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R _t (min): 22,60 (HPLC-5)
IR:	$\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹ : 3497 br (OH), 2933 (CH), 1760 (γ -Lacton), 1710 (konjugierter Ester), 1643 wk (Doppelbindung)
UV:	$\lambda_{\max}$ (nm) in Methanol: 209, ϵ 6645

EI-MS:	m/z (rel. Int.): 264 [8 β -Hydroxybalchanin] ⁺ • (5), 217 (4), 207 (4), 189 (8), 173 (5), 164 (12), 150 (9), 133 (9), 119 (23), 105 (21), 97 (23), 91 (42), 77 (34), 69 (51), 55 (43), 43 (50), 41 (100)
DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 494 [M+NH ₄] ⁺ (38), 396 [494-(5-Hydroxytigloyl)+H] ⁺ (3), 378 [396-NH ₄] ⁺ • (5), 282 [8 β -Hydroxybalchanin+NH ₄] ⁺ (6), 264 [8 β -Hydroxybalchanin] ⁺ • (2), 250 (10), 151 [4,5-Dihydroxytiglinsäure+H+NH ₄] ⁺ • (47), 134 [5-Hydroxytiglinsäure +NH ₄] ⁺ (100), 117 [5-Hydroxytigloyl+NH ₄] ⁺ • (<1)
NMR:	siehe Tabelle 2.7, S. 53
DC:	R _f : 0,53 (DC-11), 0,19 (DC-12) Farbe: Blauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.8 Verbindung SL8

**8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]balchanin =
1 β -Hydroxy-8 β -[5-hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-3,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

Die Substanz **SL8** lag neben **SL5** – **SL7** und **SL9** – **SL11** in Fraktion D-II-4-2 vor. Durch semipräparative HPLC konnte 1 mg der farblosen und gummiartigen Verbindung rein erhalten werden (siehe Kap. 6.5.4.5, S. 314).

Summenformel:	C ₂₅ H ₃₂ O ₉
Molekulargewicht:	M _r 476
Optische Drehung:	[α] _D ²⁰ = + 0,10° (c 0.2, Ethanol)
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R _t (min): 28,80 (HPLC-5)
IR:	$\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹ : 3460 br (OH), 2939 (CH), 1763 (γ -Lacton), 1711 (konjugierter Ester), 1647 wk (Doppelbindung)
UV:	$\lambda_{\max}$ (nm) in Methanol: 209, ϵ 6497
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 264 [8 β -Hydroxybalchanin] ⁺ • (6), 246 [264-H ₂ O] ⁺ • (<1), 228 [246-H ₂ O] ⁺ • (<1), 217 (3), 202 (2), 189 (8), 175 (5), 164 (13), 150 (10), 145 (7), 133 (9), 119 (24), 105 (20), 91 (43), 77 (35), 69 (52), 55 (43), 43 (54), 41 (100)
DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 494 [M+NH ₄] ⁺ (3), 396 [494-(5-Hydroxytigloyl)+H] ⁺ (16), 378 [396-NH ₄] ⁺ • (3), 282 [8 β -Hydroxybalchanin+NH ₄] ⁺ (48), 264 [8 β -Hydroxybalchanin] ⁺ • (10), 250 (5), 151 [4,5-Dihydroxytiglinsäure+H+NH ₄] ⁺ • (15), 134 [5-Hydroxytiglinsäure +NH ₄] ⁺ (100)
¹ H NMR:	siehe Tabelle 2.8, S. 58
DC:	R _f : 0,53 (DC-11), 0,19 (DC-12) Farbe: Grauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.9 Verbindung SL9

**8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid =
1 β -Hydroxy-8 β -[4-hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

Die Substanz **SL9** wurde wie **SL5** – **SL8** und **SL10** – **SL11** aus Fraktion D-II-4-2 durch semipräparative HPLC isoliert (siehe Kap. 6.5.4.5, S. 314). Dabei fielen 2 mg farbloses und gummiartiges **SL9** an.

Summenformel:	C ₂₅ H ₃₂ O ₉
Molekulargewicht:	M _r 476
Optische Drehung:	$[\alpha]_D^{20} = -18,0^\circ$ (c 0.69, Ethanol)
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R _t (min): 24,88 (HPLC-5)
IR:	$\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹ : 3502 br (OH), 2927 (CH), 1766 (γ -Lacton), 1718 (konjugierter Ester), 1637 wk (Doppelbindung)
UV:	$\lambda_{\max}$ (nm) in Methanol: 209, ϵ 4815
EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 246 [(8 β -Hydroxymagnolialid)-H ₂ O] ⁺ • (13), 228 [246-H ₂ O] ⁺ • (5), 213 (6), 202 (9), 185 (7), 153 (32), 135 (44), 128 (27), 115 (39), 107 (52), 93 (100), 91 (94), 77 (73), 65 (38), 55 (52), 43 (99), 41 (88)
DCI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 494 [M+NH ₄] ⁺ (100), 410 (4), 396 [494-(5-Hydroxytigloyl)+H] ⁺ (3), 378 [396-NH ₄] ⁺ • (4), 282 [8 β -Hydroxymagnolialid+NH ₄] ⁺ (2), 250 (<1), 151 [4,5-Dihydroxy-tiglinsäure+H+NH ₄] ⁺ • (3), 134 [5-Hydroxytiglinsäure +NH ₄] ⁺ (7)
NMR:	siehe Tabelle 2.9, S. 63
DC:	R _f : 0,53 (DC-11), 0,19 (DC-12) Farbe: Blauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.10 Verbindung SL10

**8 β -[5-Hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]magnolialid =
1 β -Hydroxy-8 β -[5-hydroxy-4-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4,11(13)-
eudesmadien-12,6-olid**

SL10 wurde neben den Verbindungen **SL5** – **SL9** und **SL11** als farblose und gummiartige Substanz aus Fraktion D-II-4-2 isoliert (siehe Kap. 6.5.4.5, S. 314). Die Ausbeute betrug 1 mg.

Summenformel:	C ₂₅ H ₃₂ O ₉
Molekulargewicht:	M _r 476
Optische Drehung:	$[\alpha]_D^{20} = -14,0^\circ$ (c 0.02, Ethanol)
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R _t (min): 30,31 (HPLC-5)

IR:	$\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3485 br (OH), 2932 (CH), 1764 (γ -Lacton), 1715 (konjugierter Ester), 1645 wk (Doppelbindung)
UV:	$\lambda_{\max}$ (nm) in Methanol: 209, ϵ 4466
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 246 $[\text{8}\beta\text{-Hydroxymagnolialid-H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (13), 228 $[\text{246-H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (4), 213 (6), 202 (8), 185 (7), 167 (9), 153 (28), 135 (42), 128 (29), 115 (41), 107 (49), 93 (92), 91 (99), 77 (74), 65 (38), 55 (53), 43 (100), 41 (89)
DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 494 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (41), 410 (1), 396 $[\text{494-(5-Hydroxytigloyl)+H}]^+$ (6), 378 $[\text{396-NH}_4]^{+\bullet}$ (4), 282 $[\text{8}\beta\text{-Hydroxymagnolialid}+\text{NH}_4]^+$ (5), 264 $[\text{8}\beta\text{-Hydroxymagnolialid}]^{+\bullet}$ (3), 248 (2), 151 $[\text{4,5-Dihydroxytiglinsäure}+\text{H}+\text{NH}_4]^{+\bullet}$ (28), 134 $[\text{5-Hydroxytiglinsäure}+\text{NH}_4]^+$ (100)
$^1\text{H NMR}$:	Tabelle 2.10, S. 71
DC:	R_f : 0,53 (DC-11), 0,19 (DC-12) Farbe: Grauviolett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.4.11 Verbindung SL11

3 β -Hydroxy-8 β -[4-Hydroxy-5-(5-hydroxytigloyloxy)tigloyloxy]-4 α -methoxy-10(14),11(13)-guaidiolen-12,6-olid

Die Verbindung **SL11** lag gemeinsam mit **SL5** – **SL10** in Fraktion D-II-4-2 vor und konnte mittels semipräparativer HPLC in einer Ausbeute von 6 mg DC-rein dargestellt werden (siehe Kap. 6.5.4.5, S. 314). Die Substanz war farblos und von gummiartiger Konsistenz.

Summenformel:	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$
Molekulargewicht:	M_r 506
Optische Drehung:	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20,6^\circ$ (c 0.391, Ethanol)
GC:	siehe Tabelle 6.2, S. 303
HPLC:	R_t (min): 15,60 (HPLC-5)
IR:	$\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3476 br (OH), 2941 (CH), 1763 (γ -Lacton), 1714 (konjugierter Ester), 1648 wk (Doppelbindung)
UV:	$\lambda_{\max}$ (nm) in Methanol: 218, ϵ 5729
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 294 $[\text{M}+\text{H-Acyl}]^{+\bullet}$ (1), 262 $[\text{294-MeOH}]^{+\bullet}$ (2), 249 (8), 244 $[\text{262-H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (4), 235 (13), 166 (13), 109 (18), 101 (83), 91 (42), 88 (48), 79 (31), 77 (39), 69 (52), 67 (30), 59 (53), 55 (29), 43 (100), 41 (98)
DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 524 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100), 426 $[\text{524-(5-Hydroxytigloyl)+H}]^+$ (7), 409 $[\text{426-NH}_3]^+$ (16), 366 (54), 312 $[\text{M-Acyl}+\text{H}+\text{NH}_4]^+$ (10), 298 (9), 151 $[\text{4,5-Dihydroxytiglinsäure}+\text{H}+\text{NH}_4]^{+\bullet}$ (28), 134 $[\text{5-Hydroxytiglinsäure}+\text{NH}_4]^+$ (86)
NMR:	siehe Tabelle 2.11, S. 75

DC: R_f : 0,20 (DC-12)
 Farbe: Hellrosa (Anisaldehyd/Schwefelsäure), blaue Fluoreszenz unter UV-Licht der Wellenlänge 365 nm

6.5.4.12 Verbindung SE1 11-Cinnamoyloxyoplopanon

Verbindung **SE1** lag in Fraktion D-II-2-2 vor (siehe Tabelle 6.5, S. 309) und wurde mit Hilfe der semipräparativen HPLC isoliert (Methode HPLC-2). Hierdurch konnten 4 mg der farblosen und gummiartigen Substanz isoliert werden (siehe Bild 6.3, S. 319).

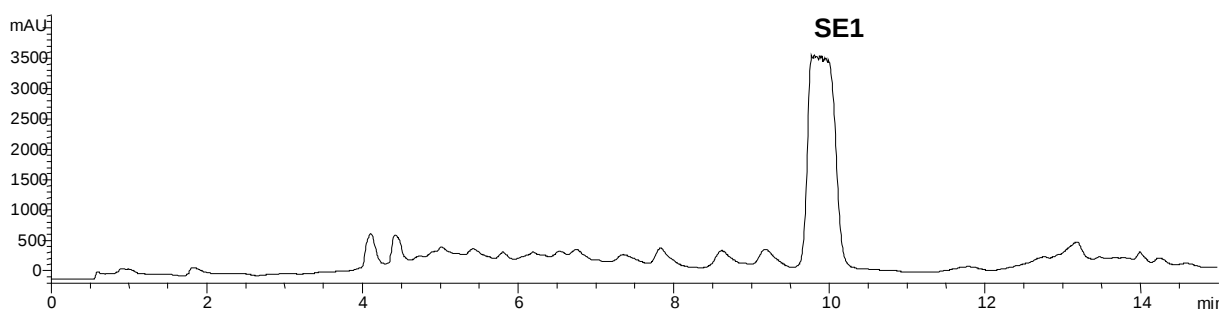


Bild 6.3: Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm von Fraktion D-II-2-2 (282 nm) mit **SE1** als Hauptpeak; Methode HPLC-2; die am Ende der Chromatographie eluierenden Verunreinigungen wurden nicht dargestellt

Summenformel: $C_{24}H_{32}O_4$
 Molekulargewicht: M_r 384
 GC: siehe Tabelle 6.2, S. 303
 UV: λ_{max} (nm) in Methanol: 219, 282
 GC-EI-MS: m/z (rel. Int.): 384 $[M]^{++}$ (< 1), 382 (< 1), 299 (< 1), 236 $[M-Zimt\ säure]^{++}$ (9), 223 (17), 187 (15), 177 (30), 147 (6), 131 $[Cinnamoyl]^+$ (100), 121 (14), 103 $[C_6H_5-CH=CH]^+$ (42), 95 (16), 93 (9), 91 $[C_6H_5-CH_2]^+$ (9), 81 (14), 77 $[C_6H_5]^+$ (27), 71 (15), 69 (11), 67 (11), 55 (11), 43 (40), 41 (12)
 GC-CI-MS: m/z (rel. Int.): 402 $[M+NH_4]^+$ (100), 385 $[M+H]^+$ (18), 370 (4), 272 (8), 256 (30), 238 (21), 221 (6)
 NMR: siehe Tabelle 2.52, S. 241
 DC: R_f : 0,41 (DC-6), 0,86 (DC-11), 0,85 (DC-12)
 Farbe: Purpur (Anisaldehyd/Schwefelsäure), nach mehreren Stunden blaugrün

6.5.4.13 Verbindung TR1 Oleanolsäure = 3 β -Hydroxy-12-oleanen-28-säure

Die Fraktion D-II-3-2 (siehe Tabelle 6.6, S. 310) wurde auf der DC-Folie von einem nicht löschenden Substanzfleck dominiert, der sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz

dunkelviolett anfärben ließ. Zur Isolierung der Substanz wurde eine präp. DC im Fließmittelgemisch DC-6 angefertigt. Mit dieser Methode konnten 10 mg der farblosen und gummiartigen Verbindung **TR1** gewonnen werden.

Summenformel:	$C_{30}H_{48}O_3$
Molekulargewicht:	M_r 456
CAS-Nr.:	[508-02-1]
DEI-MS:	m/z (rel. Int.): 456 $[M]^{++}$ (1), 248 (60), 233 (9), 203 (64), 175 (18), 161 (9), 145 (16), 134 (42), 119 (40), 105 (45), 95 (43), 81 (53), 69 (63), 55 (66), 43 (100)
DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 474 $[M+NH_4]^+$ (100), 456 $[M]^{++}$ (1), 296 (5), 279 (10), 270 (9), 254 (16), 252 (19), 212 (13), 204 (14)
NMR:	siehe Tabelle 2.53, S. 248
DC:	R_f : 0,58 (DC-6), 0,59 (DC-11), 0,78 (DC-12) Farbe: Violett (Anisaldehyd/Schwefelsäure)

6.5.5 Isolierung und analytische Daten der Flavonoid-Aglyka

6.5.5.1 Verbindung FA1

Hispidulin =

4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavon

Fraktion D-IV-4 enthielt als Hauptbestandteile die beiden Verbindungen **FA1** und **FA4** (siehe Tabelle 6.8, S. 310). Um diese zu trennen, wurden die 44 mg der Fraktion mit einer präp. DC im Fließmittelsystem DC-3 aufgetrennt. Dabei resultierten 10 mg reines amorphes **FA1**. Die Substanz war von gelber Farbe.

Summenformel:	$C_{16}H_{12}O_6$
Molekulargewicht:	M_r 300
CAS-Nr.:	[1447-88-7]
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 300 $[M]^{++}$ (30), 285 $[M-CH_3]^+$ (23), 282 $[M-H_2O]^{++}$ (22), 271 $[M-H-CO]^+$ (5), 257 $[M-CO-CH_3]^+$ (37), 242 $[M-2H-2CO]^{++}$ (2), 185 (4), 167 $[A_1-CH_3]^+$ (13), 153 (9), 139 $[A_1-CH_3-CO]^+$ (25), 126 $[A_1-CO-CO]^{++}$ (32), 121 $[B_2]^+$ (22), 119 (23), 118 $[B_1]^{++}$ (18), 83 (26), 69 (100)
CI-MS:	m/z (rel. Int.): 301 $[MH]^+$ (100)
NMR:	siehe Tabelle 2.13, S. 91
DC:	R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.5.2 Verbindung FA2**Pectolinarigenin =****5,7-Dihydroxy-4',6-dimethoxyflavon**

FA2 lag in Fraktion D-IV-1 vor (siehe Tabelle 6.8, S. 310). Die Substanz wurde durch LC-MS (Vergleich der Retentionszeit und des Massenspektrums) und Co-Chromatographie mit der authentischen Reinsubstanz auf Polyamid DC-11-Platten (Fa. Macherey & Nagel) im System DC-5 identifiziert.

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_6$ Molekulargewicht: M_r 314

CAS-Nr.: [520-12-7]

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 315 $[MH]^+$ (100), 231 (14), 217 (26), 203 (30)**6.5.5.3 Verbindung FA3****Eupafolin =****3',4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon**

Die Fraktion D-IV-5 (siehe Tabelle 6.8, S. 310) enthielt hauptsächlich die gelbe Substanz **FA3**. Zur Isolierung wurden 77 mg der Fraktion durch wiederholte präp. DC aufgereinigt (System DC-3 und anschließend System DC-9). Die Ausbeute betrug 7 mg reines amorphes **FA3**. Darüber hinaus konnte die Verbindung auch aus dem Methanol-Extrakt isoliert werden. Durch präp. DC (System DC-1) und anschließende LPLC von Fraktion M-VIII-5 (siehe Tabelle 6.15, S. 326) wurden zusätzlich 5 mg von **FA3** gewonnen. Die Identität der Substanz konnte durch LC-MS-Untersuchungen und Co-Chromatographie mit der authentischen Substanz verifiziert werden (System DC-5 auf Polyamid DC-11-Platten der Fa. Macherey & Nagel).

Summenformel: $C_{16}H_{12}O_7$ Molekulargewicht: M_r 316

CAS-Nr.: [520-11-6]

EI-MS: m/z (rel. Int.): 316 $[M]^{++}$ (12), 301 $[M-CH_3]^+$ (8), 298 $[M-H_2O]^{++}$ (7), 287 $[M-H-CO]^+$ (6), 273 $[M-CO-CH_3]^+$ (11), 167 $[A_1-CH_3]^+$ (6), 153 (7), 139 $[A_1-CH_3-CO]^+$ (12), 137 $[B_2]^+$ (6), 134 $[B_1]^{++}$ (13), 105 (9), 77 (15), 69 (90), 60 (15), 55 (22), 45 (33), 43 (100)CI-MS: m/z (rel. Int.): 317 $[MH]^+$ (100)

NMR: siehe Tabelle 2.15, S. 98

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298**6.5.5.4 Verbindung FA4****Desmethoxycentaureidin =****3',5,7-Trihydroxy-4',6-dimethoxyflavon**

Verbindung **FA4** lag in Fraktion D-IV-4 vor (siehe Tabelle 6.8, S. 310). Die Fraktion wurde mittels präp. DC im Fließmittelsystem DC-3 aufgetrennt. Da die gewonnene Substanz noch leicht verunreinigt war, wurde sie anschließend mit Hilfe einer präp. DC im System DC-7 und

danach im System DC-8 weiter gereinigt. Durch diese Operation konnten 7 mg der gelben amorphen Verbindung **FA4** rein gewonnen werden.

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_7$

Molekulargewicht: M_r 330

CAS-Nr.: [22934-99-2]

EI-MS: m/z (rel. Int.): 330 $[M]^{++}$ (44), 315 $[M-CH_3]^+$ (32), 312 $[M-H_2O]^{++}$ (32), 301 $[M-H-CO]^+$ (4), 287 $[M-CO-CH_3]^+$ (41), 167 $[A_1-CH_3]^+$ (12), 149 $[B_1]^{++}$ (28), 139 $[A_1-CH_3-CO]^+$ (26), 122 (19), 105 (21), 89 (13), 77 (12), 69 (100), 51 (27), 43 (62)

CI-MS: m/z (rel. Int.): 331 (21)

NMR: siehe Tabelle 2.17, S. 103

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.5.5 Verbindung FA5

Acacetin =

5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon

FA5 konnte in Fraktion D-IV-3 (siehe Tabelle 6.8, S. 310) durch LC-MS (Vergleich der Retentionszeit und des Massenspektrums) und Co-Chromatographie mit der authentischen Reinsubstanz auf Polyamid DC-11-Platten (Fa. Macherey & Nagel) im System DC-5 identifiziert werden.

Summenformel: $C_{16}H_{12}O_5$

Molekulargewicht: M_r 284

CAS-Nr.: [480-44-4]

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 285 $[MH]^+$ (100), 227 (17)

6.5.5.6 Verbindung FA6

Patuletin =

3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon

Die Substanz **FA6** entstammt einer Fraktion des Methanol-Extraktes (M-V-2-6, siehe Tabelle 6.13, S. 326). Nach Aufreinigung dieser Fraktion durch präp. DC (System DC-1) und anschließende LPLC fiel die amorphe gelbe Verbindung in einer Ausbeute von 8 mg DC-rein an.

Summenformel: $C_{16}H_{12}O_8$

Molekulargewicht: M_r 332

CAS-Nr.: [519-96-0]

EI-MS: m/z (rel. Int.): 332 $[M]^{++}$ (100), 317 $[M-CH_3]^+$ (11), 314 $[M-H_2O]^{++}$ (35), 301 $[M-H-CO]^+$ (9), 289 $[M-CO-CH_3]^+$ (96), 260 (5), 163 (5), 137 $[B_2]^+$ (19), 109 $[B_2-CO]^+$ (6), 81 (6), 69 (30), 55 (5)

NMR: siehe Tabelle 2.19, S. 112

DC: R_F -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.5.7 Verbindung FA7

Laciniatin =

3,3',5,7-Tetrahydroxy-4',6-dimethoxyflavon

FA7 konnte aus einer Fraktion des Methanol-Extraktes gewonnen werden. Die Fraktion M-XI (siehe Tabelle 6.9, S. 324) wurde nacheinander mittels LPLC und präp. DC (System DC-1) aufgetrennt. Nach Elution der Hauptbande konnten 4 mg der amorphen gelben Verbindung **FA7** DC-rein erhalten werden.

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_8$

Molekulargewicht: M_r 346

CAS-Nr.: [74161-28-7]

EI-MS: m/z (rel. Int.): 346 $[M]^{++}$ (100), 331 $[M-CH_3]^+$ (9), 328 $[M-H_2O]^{++}$ (36), 317 $[M-H-CO]^+$ (9), 303 $[M-CO-CH_3]^+$ (85), 260 (4), 151 $[B_2]^+$ (8), 121 (5), 108 $[B_2-CO-CH_3]^+$ (3), 69 (15), 65 (3)

NMR: siehe Tabelle 2.21, S. 115

DC: R_F -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.5.8 Verbindung FA8

Mikanin =

3,5-Dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavon

FA8 entstammt der Fraktion M-IX des Methanol-Extraktes (siehe Tabelle 6.9, S. 324). Sie wurde zunächst durch SC an Polyklar AT mit Methanol als mobiler Phase aufgetrennt. Nach anschließender präp. DC im System DC-1 und Reinigung der eluierten Hauptbande durch LPLC fiel reines **FA8** als amorphe gelbe Substanz in einer Ausbeute von 3 mg an.

Summenformel: $C_{18}H_{16}O_7$

Molekulargewicht: M_r 344

CAS-Nr.: [4324-53-2]

EI-MS: m/z (rel. Int.): 344 $[M]^{++}$ (84), 329 $[M-CH_3]^+$ (13), 326 $[M-H_2O]^{++}$ (36), 301 $[M-CO-CH_3]^+$ (100), 283 (27), 258 (19), 153 $[A_1-CH_3-CO]^{++}$ (13), 135 $[B_2]^+$ (28), 69 (14), 55 (11)

NMR: siehe Tabelle 2.23, S. 121

DC: R_F -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.5.9 Verbindung FA9

Axillarin =

3',4',5,7-Tetrahydroxy-3,6-dimethoxyflavon

Fraktion D-IV-2 (siehe Tabelle 6.8, S. 310) enthielt neben **FA1**, **FA2** und **FA4** auch **FA9**. Die Substanz wurde durch LC-MS und Chromatographie des Gemisches gegen authentische Referenzsubstanz auf Polyamid DC-11-Platten (Fa. Macherey & Nagel) im System DC-5 identifiziert.

Summenformel: $C_{17}H_{14}O_8$
 Molekulargewicht: M_r 346
 CAS-Nr.: [5188-73-8]
 APCI-MS: m/z (rel. Int.): 347 $[MH]^+$ (100)

6.5.6 Fraktionierung des Methanol-Extraktes

Zur Gewinnung hydrophiler Sekundärstoffe wurden 40 g des im Anschluß an die Dichlormethan-Extraktion gewonnenen Methanol-Extraktes verwendet. Um Verwechslungen mit Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes zu vermeiden, tragen die Bezeichnungen der nicht-alkaloidischen Fraktionen des Methanol-Extraktes das Präfix „M“. Aus den verbliebenen 140 g des Methanol-Extraktes wurden Pyrrolizidin-Alkaloide extrahiert.

Die Fraktionierung des Extraktes erfolgte in vier Portionen à 10 g an Sephadex LH-20. Als Fließmittel diente zunächst reines Methanol (SC-1), dem am Ende der Chromatographie steigende Wasseranteile zugemischt wurden, um auch die stark hydrophilen Substanzen quantitativ eluieren zu können. Die aufgefangenen Eluate wurden nach DC-Kontrolle zu elf Fraktionen vereinigt. Tabelle 6.9, S. 324 gibt eine Übersicht über die Ausbeuten und die aus diesen Fraktionen isolierten Reinsubstanzen.

Diese elf Fraktionen sowie einige Unterfraktionen wurden per LC-MS untersucht, um schon vor der Isolierung der Reinsubstanzen eine Vorstellung von ihrer Zusammensetzung zu bekommen. Es zeigte sich, dass der überwiegende Teil der Verbindungen Flavonoidglykoside und Kaffeoyl-Chinasäuren waren, während nur wenige freie Flavonoid-Aglyka im Methanol-Extrakt vorlagen.

Tabelle 6.9: Ergebnis der SC-Trennung von 40 g Methanol-Extrakt an Sephadex LH-20 mit Methanol

Fraktion	Ausbeute [g]	Substanzen
M-I	11,74	-
M-II	3,90	CU1 FG1 – FG3
M-III	0,67	FG4
M-IV	0,31	FG5 – FG7
M-V	2,51	FA6 FG8 – FG11
M-VI	0,14	-
M-VII	1,74	KC1, KC2, KC4, KC5, KC7
M-VIII	1,07	FA3 KC4, KC6
M-IX	2,11	FA8
M-X	1,59	KC8
M-XI	1,42	FA7

6.5.6.1 Auftrennung der Fraktion M-II

Fraktion M-II (3,9 g) wurde SC an Polyklar AT unter Verwendung von Methanol als Elutionsmittel in fünf Unterfraktionen partitioniert (siehe Tabelle 6.10, S. 325).

Tabelle 6.10: Ergebnis der SC-Trennung von Fraktion M-II an Polyklar AT (System SC-1)

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
M-II-1	1200	-
M-II-2	98	CU1, FG2
M-II-3	98	FG1
M-II-4	87	FG3
M-II-5	715	-

6.5.6.2 Auftrennung der Fraktion M-IV

Auch Fraktion M-IV (310 mg) wurde SC an Polyklar AT mit Methanol gereinigt. Es wurden die drei Unterfraktionen M-IV-1 bis M-IV-3 gebildet (siehe Tabelle 6.11, S. 325).

Tabelle 6.11: Ergebnis der SC-Trennung von Fraktion M-IV an Polyklar AT (System SC-1)

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
M-IV-1	81	-
M-IV-2	41	FG5
M-IV-3	61	FG6, FG7

6.5.6.3 Auftrennung der Fraktion M-V

Die Aufarbeitung dieser Fraktion (2,51 g) gestaltete sich wegen der höheren Zahl an enthaltenen Komponenten wesentlich aufwendiger. Die erste Trennoperation war identisch mit der von Fraktion M-IV (SC mit Methanol an Polyklar AT), führte hier jedoch nur zu den beiden Unterfraktionen M-V-1 und M-V-2 (siehe Tabelle 6.12, S. 325).

Tabelle 6.12: Ergebnis der SC-Trennung von Fraktion M-V an Polyklar AT (System SC-1)

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
M-V-1	928	-
M-V-2	581	FA6 FG8 – FG11

Fraktion M-V-2 wurde nach DC-Kontrolle zur weiteren Aufreinigung der LPLC zugeführt und in die sechs Unterfraktionen M-V-2-1 bis M-V-2-6 aufgetrennt (siehe Tabelle 6.13, S. 326).

Tabelle 6.13: Ergebnis der LPLC-Trennung von Fraktion M-V-2

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
M-V-2-1	80	FG9 – FG11
M-V-2-2	257	-
M-V-2-3	61	FG8
M-V-2-4	68	-
M-V-2-5	12	-
M-V-2-6	60	FA6

6.5.6.4 Auftrennung der Fraktion M-VII

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Fraktionen wurde M-VII (1,74 g) nicht per SC, sondern direkt durch LPLC bearbeitet. Mit Hilfe der UV-Detektion wurden sechs Unterfraktionen gebildet. Von diesen wurden M-VII-2, M-VII-4 und M-VII-5 weiter aufgearbeitet (siehe Tabelle 6.14, S. 326).

Tabelle 6.14: Ergebnis der LPLC-Trennung von Fraktion M-VII

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
M-VII-1	164	-
M-VII-2	812	KC1, KC2
M-VII-3	250	-
M-VII-4	223	KC4, KC7
M-VII-5	117	KC5
M-VII-6	37	-

6.5.6.5 Auftrennung der Fraktion M-VIII

Die LPLC-Trennung von Fraktion M-VIII (1,07 g) lieferte die sechs Unterfraktionen M-VIII-1 bis M-VIII-6 (siehe Tabelle 6.15, S. 326).

Tabelle 6.15: Ergebnis der LPLC-Trennung von Fraktion M-VIII

Fraktion	Ausbeute [mg]	Substanzen
M-VIII-1	215	KC3
M-VIII-2	94	-
M-VIII-3	93	KC6
M-VIII-4	45	-
M-VIII-5	64	FA3
M-VIII-6	26	-

6.5.7 Isolierung und analytische Daten der Flavonoid-Glykoside und Kaffeoyle-Chinasäuren sowie eines Coumarin-Glykosids aus dem Methanol-Extrakt

6.5.7.1 Verbindung FG1

Eupalin =

3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid

Fraktion M-II-3 (siehe Tabelle 6.10, S. 325) wurde durch präp. DC (System DC-1) aufgetrennt. Nach Elution und Reinigung mittels LPLC verblieben 5 mg der gelben amorphen Substanz **FG1**.

Summenformel: $C_{23}H_{24}O_{11}$

Molekulargewicht: M_r 476

CAS-Nr.: [29617-75-2]

UV: siehe Tabelle 2.24, S. 127

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 477 $[MH]^+$ (100), 331 $[MH-146]^+$ (35);
Öffnungsspannung: 55 V

Pseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 331 $[MH-146]^+$ (3), 316 $[331-CH_3]^{++}$ (3), 298 $[316-H_2O]^{++}$ (5), 270 $[298-CO]^{++}$ (100), 242 $[270-CO]^{++}$ (6);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 331 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.25, S. 128

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.2 Verbindung FG2

Eupalitin 3-rhamnosid-4'-glucosid =

3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid-4'-O- β -glucopyranosid

Fraktion M-II-2 (siehe Tabelle 6.10, S. 325) wurde im System DC-1 mittels präp. DC weiter aufgetrennt. Das DC zeigte zwei dominierende Substanzbanden (**CU1** und **FG2**), die eluiert und danach jeweils noch durch LPLC weiter gereinigt wurden. Dabei konnte neben **CU1** die gelbe amorphe Substanz **FG2** in einer Ausbeute von 7 mg DC-rein isoliert werden.

Summenformel: $C_{29}H_{34}O_{16}$

Molekulargewicht: M_r 638

UV: siehe Tabelle 2.26, S. 134

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 639 $[MH]^+$ (43), 493 $[MH-146]^+$ (38), 477 $[MH-162]^+$ (6), 331 $[MH-162-146]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 V

Pseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 331 $[MH-162-146]^+$ (31), 316 $[331-CH_3]^{++}$ (14), 298 $[316-H_2O]^{++}$ (76), 270 $[298-CO]^{++}$ (87), 242 $[270-CO]^{++}$ (100);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 331 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.27, S. 136

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.3 Verbindung FG3

Eupalitin 3-glucosid =

3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- β -glucopyranosid

Nach Auftrennung von Fraktion M-II-4 (siehe Tabelle 6.10, S. 325) durch präp. DC im System DC-1 und anschließender Reinigung mittels LPLC fielen 5 mg der gelben amorphen Verbindung **FG3** an.

Summenformel: $C_{23}H_{24}O_{12}$

Molekulargewicht: M_r 492

CAS-Nr.: [83117-60-6]

UV: siehe Tabelle 2.28, S. 140

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 493 $[MH]^+$ (100), 331 $[MH-162]^+$ (20);
Öffnungsspannung: 55 V

Pseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 331 $[MH-162]^+$ (29), 316 $[331-CH_3]^{++}$ (14), 298 $[316-H_2O]^{++}$ (86), 270 $[298-CO]^{++}$ (79), 242 $[270-CO]^{++}$ (100);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 331 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.29, S. 142

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.4 Verbindung FG4

Eupalitin 3-galactosid

3,4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- β -galactopyranosid

Die Isolierung von **FG4** aus Fraktion M-III (siehe Tabelle 6.9, S. 324) erfolgte durch SC an Polyklar AT mit Methanol als mobiler Phase und anschließende Reinigung mittels LPLC und präp. DC im Fließmittel DC-1. Es resultierten 3 mg der gelben amorphen Verbindung **FG4**.

Summenformel: $C_{23}H_{24}O_{12}$

Molekulargewicht: M_r 492

CAS-Nr.: [98604-37-6]

UV: siehe Tabelle 2.30, S. 146

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 493 $[MH]^+$ (100), 331 $[MH-Galactose]^+$ (66);
Öffnungsspannung: 55 V

Pseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 331 $[MH-Galactose]^+$ (34), 316 $[331-CH_3]^{++}$ (11), 298 $[316-H_2O]^{++}$ (39), 270 $[298-CO]^{++}$ (100), 242 $[270-CO]^{++}$ (89);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 331 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.31, S. 148

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.5 Verbindung FG5**Eupatolin =****3,3',4',5-Tetrahydroxy-6,7-dimethoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid**

Die Fraktion M-IV-2 (siehe Tabelle 6.11, S. 325) wurde durch LPLC weiter aufgetrennt. Dabei fiel reines **FG5** (38 mg) als amorphe Substanz von gelber Farbe an.

Summenformel: $C_{23}H_{24}O_{12}$ Molekulargewicht: M_r 492

CAS-Nr.: [29725-50-6]

UV: siehe Tabelle 2.32, S. 152

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 493 $[MH]^+$ (100), 347 $[MH-Rhamnose]^+$ (27);
Öffnungsspannung: 55 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 347 $[MH-Rhamnose]^+$ (63), 332 $[347-CH_3]^{++}$ (18), 314 $[332-H_2O]^{++}$ (72), 286 $[314-CO]^{++}$ (100), 258 $[286-CO]^{++}$ (91);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 347 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.33, S. 153

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298**6.5.7.6 Verbindung FG6****6-Methoxykaempferol 3-glucosid =****3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- β -glucopyranosid**

FG6 lag neben **FG7** in der Fraktion M-IV-3 vor (siehe Tabelle 6.11, S. 325). Die Auftrennung der Fraktion durch LPLC lieferte leicht verunreinigtes **FG6**, das durch präp. DC im System DC-1 und anschließende LPLC in einer Ausbeute von 4 mg rein dargestellt werden konnte. Die amorphe Substanz war gelb gefärbt.

Summenformel: $C_{22}H_{22}O_{12}$ Molekulargewicht: M_r 478

CAS-Nr.: [63422-27-5]

UV: siehe Tabelle 2.34, S. 159

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 479 $[MH]^+$ (100), 317 $[MH-Glucose]^+$ (60);
Öffnungsspannung: 55 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 317 $[MH-Glucose]^+$ (10), 302 $[317-CH_3]^{++}$ (100), 274 $[302-CO]^{++}$ (3), 229 (2), 121 (2); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 317 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.35, S. 159

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.7 Verbindung FG7**6-Methoxykaempferol 3-galactosid =****3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- β -galactopyranosid**

Nach der Auftrennung von Fraktion M-IV-3 (siehe Tabelle 6.11, S. 325) durch LPLC konnte neben **FG6** die amorphe gelbe Verbindung **FG7** in einer Ausbeute von 4 mg rein erhalten werden.

Summenformel: $C_{22}H_{22}O_{12}$ Molekulargewicht: M_r 478

CAS-Nr.: [72945-43-8]

UV: siehe Tabelle 2.36, S. 162

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 479 $[MH]^+$ (100), 317 $[MH-Galactose]^+$ (50);
Öffnungsspannung: 55 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 317 $[MH-Galactose]^+$ (100), 302 $[317-CH_3]^{++}$ (5);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 V, Tochterionen des
317 amu-Fragments
302 $[317-CH_3]^{++}$ (100); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V,
Tochterion des 317 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.37, S. 164

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298**6.5.7.8 Verbindung FG8****6-Methoxykaempferol 3-rhamnosid =****3,4',5,7-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon-3-O- α -rhamnopyranosid**

FG8 konnte durch präp. DC der Fraktion M-V-2-3 (siehe Tabelle 6.13, S. 326) im System DC-1 und anschließende Reinigung mittels LPLC in einer Ausbeute von 1 mg isoliert werden. Die reine Substanz war amorph und gelb gefärbt.

Summenformel: $C_{22}H_{22}O_{11}$ Molekulargewicht: M_r 462

CAS-Nr.: [104055-83-6]

UV: siehe Tabelle 2.38, S. 168

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 463 $[MH]^+$ (100), 317 $[MH-Rhamnose]^+$ (50);
Öffnungsspannung: 55 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 317 $[MH-Rhamnose]^+$ (7), 302 $[317-CH_3]^{++}$ (100), 274
 $[302-CO]^{++}$ (5); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V,
Tochterionen des 317 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.39, S. 170

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.9 Verbindung FG9**Patuletin 3-galactosid =****3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon-3-O-β-galactopyranosid**

FG9 lag neben **FG10** und **FG11** in Fraktion M-V-2-1 vor (siehe Tabelle 6.13, S. 326). Die Auftrennung durch präp. DC im Laufmittel DC-1 und die anschließende Reinigung mittels LPLC lieferten 14 mg der gelben amorphen Verbindung **FG9**.

Summenformel: $C_{22}H_{22}O_{13}$ Molekulargewicht: M_r 494

CAS-Nr.: [90706-63-1]

UV: siehe Tabelle 2.40, S. 174

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 495 $[MH]^+$ (100), 333 $[MH-Galactose]^+$ (17);
Öffnungsspannung: 55 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 333 $[MH-Galactose]^+$ (14), 318 $[333-CH_3]^{++}$ (100);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 333 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.41, S. 174

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298**6.5.7.10 Verbindung FG10****Patuletin 3-rhamnosid =****3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon-3-O-α-rhamnopyranosid**

FG10 lag neben **FG9** und **FG11** in Fraktion M-V-2-1 vor (siehe Tabelle 6.13, S. 326). Nach Auftrennung der Fraktion durch präp. DC im Laufmittel DC-1 und Endreinigung mittels LPLC konnten 7 mg der gelben amorphen Verbindung **FG10** gewonnen werden.

Summenformel: $C_{22}H_{22}O_{12}$ Molekulargewicht: M_r 478

CAS-Nr.: [60048-92-2]

UV: siehe Tabelle 2.42, S. 179

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 479 $[MH]^+$ (100), 333 $[MH-Rhamnose]^+$ (34);
Öffnungsspannung: 55 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 333 $[MH-Rhamnose]^+$ (10), 318 $[333-CH_3]^{++}$ (100), 290 $[318-CO]^{++}$ (1), 244 (3); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 333 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.43, S. 181

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.11 Verbindung FG11**Patuletin 3-glucosid =****3,3',4',5,7-Pentahydroxy-6-methoxyflavon-3-O-β-glucopyranosid**

FG11 lag neben **FG9** und **FG10** in Fraktion M-V-2-1 vor (siehe Tabelle 6.13, S. 326). Durch Auftrennung der Fraktion mittels präp. DC (System DC-1) und abschließende Reinigung mit Hilfe der LPLC konnten 3 mg der gelben amorphen Verbindung **FG11** erhalten werden.

Summenformel: $C_{22}H_{22}O_{13}$ Molekulargewicht: M_r 494

CAS-Nr.: [19833-27-3]

UV: siehe Tabelle 2.44, S. 185

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 495 $[MH]^+$ (100), 333 $[MH-Glucose]^+$ (27);
Öffnungsspannung: 55 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 333 $[MH-Glucose]^+$ (7), 318 $[333-CH_3]^{++}$ (100);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 333 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.45, S. 187

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298**6.5.7.12 Verbindung KC1****Chlorogensäuremethylester =****3-O-Kaffeoylchinasäuremethylester**

KC1 lag neben **KC2** in Fraktion M-VII-2 vor (siehe Tabelle 6.14, S. 326). 100 mg der Fraktion wurden mittels präp. DC getrennt (System DC-1). Die untere der beiden Hauptbanden wurde eluiert und einer SC-Trennung an der LPLC-Apparatur unterworfen. Die Ausbeute an der gelblichen und amorphen Verbindung **KC1** betrug 21 mg.

Summenformel: $C_{17}H_{20}O_9$ Molekulargewicht: M_r 368

CAS-Nr.: unveresterte Chlorogensäure: [327-97-9]

UV: siehe Tab. 2.46, S. 195

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 369 $[MH]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 VAPCI-CID-MS: m/z (rel. Int.): 369 $[MH]^+$ (14), 351 $[MH-H_2O]^+$ (3), 207 $[MH-Kaffeoyl]^+$ (4), 163 $[Kaffeoyl]^+$ (100), 145 $[Kaffeoyl-H_2O]^+$ (2);
Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 163 $[Kaffeoyl]^+$ (1), 135 $[Kaffeoyl-CO]^+$ (1), 117 $[135-H_2O]^+$ (8), 107 $[135-CO]^+$ (<1), 89 $[107-H_2O]^+$ (100), 77 $[C_6H_5]^+$ (18), 63 $[C_5H_3]^+$ (21), 51 $[C_4H_3]^+$ (<1); Öffnungsspannung: 80 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 163 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.47, S. 197 und Tabelle 2.48, S. 202

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.13 Verbindung KC2
Kryptochlorogensäuremethylester
4-O-Kaffeoylchinasäuremethylester

KC2 lag neben **KC1** in Fraktion M-VII-2 (siehe Tabelle 6.14, S. 326) vor. 100 mg der Fraktion wurden durch präp. DC getrennt (System DC-1). Die obere der beiden Hauptbanden wurde eluiert und durch LPLC gereinigt. Die Ausbeute an der gelblichen und amorphen Verbindung **KC2** betrug 5 mg.

Summenformel: $C_{17}H_{20}O_9$

Molekulargewicht: M_r 368

CAS-Nr.: unveresterte 4-O-Kaffeoylchinasäure: [905-99-7]

UV: siehe Tab. 2.46, S. 195

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 369 $[MH]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 V

APCI-CID-MS: m/z (rel. Int.): 369 $[MH]^+$ (5), 351 $[MH-H_2O]^+$ (<1), 207 $[MH-Kaffeoyl]^+$ (3), 163 $[Kaffeoyl]^+$ (100), 145 $[Kaffeoyl-H_2O]^+$ (2); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 V

Pseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 135 $[Kaffeoyl-CO]^+$ (3), 117 $[135-H_2O]^+$ (4), 89 $[107-H_2O]^+$ (100), 77 $[C_6H_5]^+$ (16), 63 $[C_5H_3]^+$ (17); Öffnungsspannung: 80 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 163 amu-Fragments

1H NMR: siehe Tabelle 2.47, S. 197

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.14 Verbindung KC3
Neochlorogensäuremethylester =
5-O-Kaffeoylchinasäuremethylester

Durch präp. DC (System DC-1) und anschließende LPLC konnten aus Fraktion M-VIII-1 (siehe Tabelle 6.15, S. 326) 3 mg von Verbindung **KC3** isoliert werden. Die Substanz war amorph und schwach gelb gefärbt.

Summenformel: $C_{17}H_{20}O_9$

Molekulargewicht: M_r 368

CAS-Nr.: unveresterte 5-O-Kaffeoylchinasäure: [906-33-2]

UV: siehe Tab. 2.46, S. 195

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 369 $[MH]^+$ (100); 355 (51), 333 (7), 315 (20), 291 (69), 279 (14), 244 (7), 183 (19), 163 $[Kaffeoyl]^+$ (31), 128 (7); Öffnungsspannung: 55 V

APCI-CID-MS: m/z (rel. Int.): 369 $[MH]^+$ (4), 351 $[MH-H_2O]^+$ (4), 163 $[Kaffeoyl]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 V

Pseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 163 [Kaffeoyl]⁺ (25), 117 [135-H₂O]⁺ (25), 89 [107-H₂O]⁺ (100), 77 [C₆H₅]⁺ (24); Öffnungsspannung: 80 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 163 amu-Fragments

¹H NMR: siehe Tabelle 2.47, S. 197

DC: R_F-Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.15 Verbindung KC4

Isochlorogensäure b = 3,4-Dikaffeoylchinasäure

Von den 220 mg der Fraktion M-VII-4 (siehe Tabelle 6.14, S. 326), in der **KC4** neben **KC7** vorlag, wurden 100 mg der präp. DC im System DC-1 zugeführt. Die eluierte Zone bestand aus mehreren Substanzbanden. Dieses Gemisch wurde durch LPLC aufgetrennt. Nach erneuter präp. DC (System DC-1) und anschließender LPLC konnte die gelbliche amorphe Verbindung **KC4** in einer Ausbeute von 7 mg erhalten werden.

Summenformel: C₂₅H₂₄O₁₂

Molekulargewicht: M_r 516

CAS-Nr.: [14534-61-3]

UV: siehe Tab. 2.46, S. 195

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 517 [MH]⁺ (100); Öffnungsspannung: 55 V

APCI-CID-MS: m/z (rel. Int.): 517 [MH]⁺ (9), 499 [MH-H₂O]⁺ (100), 355 [MH₂-Kaffeoyl]⁺ (11), 337 [355-H₂O]⁺ (9), 163 [Kaffeoyl]⁺ (81); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 V

Pseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 135 [Kaffeoyl-CO]⁺ (2), 117 [135-H₂O]⁺ (7), 89 [107-H₂O]⁺ (100), 77 [C₆H₅]⁺ (13), 63 [C₅H₃]⁺ (18); Öffnungsspannung: 80 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 163 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.49, S. 211 und Tabelle 2.50, S. 212

DC: R_F-Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.16 Verbindung KC5

Isochlorogensäure b-methylester = 3,4-Dikaffeoylchinasäuremethylester

Fraktion M-VII-5 (siehe Tabelle 6.14, S. 326) wurde mittels LPLC aufgetrennt, gefolgt von einer präp. DC (System DC-1) und einer erneuten LPLC-Trennung. Dabei wurden 50 mg reine Substanz **KC5** erhalten. Die Verbindung war amorph und von gelblicher Farbe.

Summenformel: C₂₆H₂₆O₁₂

Molekulargewicht: M_r 530

CAS-Nr.: unveresterte Isochlorogensäure b: [14534-61-3]

UV: siehe Tab. 2.46, S. 195

APCI-MS:	m/z (rel. Int.): 531 $[\text{MH}]^+$ (21), 513 $[\text{MH-H}_2\text{O}]^+$ (30), 369 $[\text{MH}_2\text{-Kaffeoyl}]^+$ (8), 351 $[\text{369-H}_2\text{O}]^+$ (5), 163 $[\text{Kaffeoyl}]^+$ (100); Öffnungsspannung: 80 V
APCI-CID-MS:	m/z (rel. Int.): 531 $[\text{MH}]^+$ (4), 513 $[\text{MH-H}_2\text{O}]^+$ (100), 369 $[\text{MH}_2\text{-Kaffeoyl}]^+$ (4), 351 $[\text{369-H}_2\text{O}]^+$ (4), 333 $[\text{351-H}_2\text{O}]^+$ (2), 163 $[\text{Kaffeoyl}]^+$ (13); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 V 163 $[\text{Kaffeoyl}]^+$ (100), 145 $[\text{Kaffeoyl-H}_2\text{O}]^+$ (23), 135 $[\text{Kaffeoyl-CO}]^+$ (7), 117 $[\text{135-H}_2\text{O}]^+$ (3); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V
Pseudo-MS/MS/MS:	m/z (rel. Int.): 135 $[\text{Kaffeoyl-CO}]^+$ (<1), 117 $[\text{135-H}_2\text{O}]^+$ (6), 89 $[\text{107-H}_2\text{O}]^+$ (100), 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (14), 63 $[\text{C}_5\text{H}_3]^+$ (17); Öffnungsspannung: 80 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 163 amu-Fragments
NMR:	siehe Tabelle 2.49, S. 211 und Tabelle 2.50, S. 212
DC:	R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.17 Verbindung KC6

Isochlorogensäure a-methylester = 3,5-Dikaffeoylchinasäuremethylester

Durch präp. DC (System DC-1) und anschließende LPLC konnten aus Fraktion M-VIII-3 (siehe Tabelle 6.15, S. 326) 40 mg der gelblichen amorphen Verbindung **KC6** erhalten werden.

Summenformel:	$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$
Molekulargewicht:	M_r 530
CAS-Nr.:	unveresterte Isochlorogensäure a: [2450-53-5]
UV:	siehe Tab. 2.46, S. 195
APCI-MS:	m/z (rel. Int.): 531 $[\text{MH}]^+$ (31), 513 $[\text{MH-H}_2\text{O}]^+$ (8), 369 $[\text{MH}_2\text{-Kaffeoyl}]^+$ (8), 163 $[\text{Kaffeoyl}]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 V
APCI-CID-MS:	m/z (rel. Int.): 531 $[\text{MH}]^+$ (2), 513 $[\text{MH-H}_2\text{O}]^+$ (100), 369 $[\text{MH}_2\text{-Kaffeoyl}]^+$ (3), 351 $[\text{369-H}_2\text{O}]^+$ (1), 163 $[\text{Kaffeoyl}]^+$ (23); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 V 163 $[\text{Kaffeoyl}]^+$ (100), 145 $[\text{Kaffeoyl-H}_2\text{O}]^+$ (6), 135 $[\text{Kaffeoyl-CO}]^+$ (2); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V
Pseudo-MS/MS/MS:	m/z (rel. Int.): 163 $[\text{Kaffeoyl}]^+$ (1), 117 $[\text{135-H}_2\text{O}]^+$ (7), 89 $[\text{107-H}_2\text{O}]^+$ (100), 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (15), 63 $[\text{C}_5\text{H}_3]^+$ (18); Öffnungsspannung: 80 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 163 amu-Fragments
NMR:	siehe Tabelle 2.49, S. 211 und Tabelle 2.51, S. 221
DC:	R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.18 Verbindung KC7

Isochlorogensäure c =
4,5-Dikaffeoylchinasäure

KC7 lag neben **KC4** in Fraktion M-VII-4 vor (siehe Tabelle 6.14, S. 326). Von den 220 mg der Fraktion wurden 100 mg der präp. DC im System DC-1 zugeführt. Die eluierte Zone bestand aus mehreren Substanzbanden. Dieses Gemisch wurde durch LPLC aufgetrennt. Die gelbliche amorphe Verbindung **KC7** konnte ohne anschließende Reinigungsschritte in einer Ausbeute von 6 mg DC-rein aus dem Gemisch abgetrennt werden.

Summenformel: $C_{25}H_{24}O_{12}$

Molekulargewicht: M_r 516

CAS-Nr.: [57378-72-0]

UV: siehe Tab. 2.46, S. 195

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 517 $[MH]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 V

APCI-CID-MS: m/z (rel. Int.): 517 $[MH]^+$ (7), 499 $[MH-H_2O]^+$ (97), 355 $[MH_2-Kaffeoyl]^+$ (10), 337 $[369-H_2O]^+$ (5), 163 $[Kaffeoyl]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 V
163 $[Kaffeoyl]^+$ (100), 145 $[Kaffeoyl-H_2O]^+$ (13), 135 $[Kaffeoyl-CO]^+$ (6); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V

Pseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 117 $[135-H_2O]^+$ (7), 89 $[107-H_2O]^+$ (100), 77 $[C_6H_5]^+$ (17), 63 $[C_5H_3]^+$ (23); Öffnungsspannung: 80 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 163 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.49, S. 211 und Tabelle 2.51, S. 221

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.19 Verbindung KC8

Isochlorogensäure c-methylester =
4,5-Dikaffeoylchinasäuremethylester

Fraktion M-X (siehe Tabelle 6.9, S. 324) wurde zunächst durch LPLC von einem Großteil der störenden Begleitstoffe befreit. Das verbliebene Eluat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. 100 mg der dabei erhaltenen Substanz wurden für eine Auftrennung mittels präp. DC im System DC-1 verwendet. Die dominierende Substanzzone lieferte nach Elution und LPLC 93 mg der amorphen gelben Substanz **KC8**.

Summenformel: $C_{26}H_{26}O_{12}$

Molekulargewicht: M_r 530

CAS-Nr.: unveresterte Isochlorogensäure c: [57378-72-0]

UV: siehe Tab. 2.46, S. 195

NMR: siehe Tabelle 2.49, S. 211 und Tabelle 2.51, S. 221

DC: R_f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle 6.1, S. 298

6.5.7.20 Verbindung CU1**Aesculin =****6,7-Dihydroxy-2H-1-benzopyran-2-on-6-O- β -glucopyranosid**

Die Fraktion M-II-2 (siehe Tabelle 6.10, S. 325) wurde im System DC-1 mittels präp. DC weiter aufgetrennt. Nach Elution und weiterer Reinigung durch LPLC konnten neben **FG2** 12 mg der farblosen und lackartigen Substanz **CU1** erhalten werden.

Summenformel: $C_{15}H_{16}O_9$ Molekulargewicht: M_r 340

CAS-Nr.: [531-75-9]

UV: siehe Tabelle 2.54, S. 252

APCI-MS: m/z (rel. Int.): 341 $[MH]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 VAPCI-CID-MS: m/z (rel. Int.): 341 $[MH]^+$ (89), 179 $[MH\text{-Glucose}]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 VPseudo-MS/MS/MS: m/z (rel. Int.): 179 $[MH\text{-Glucose}]^+$ (100), 151 $[179\text{-CO}]^+$ (2), 133 $[151\text{-H}_2\text{O}]^+$ (6), 123 $[151\text{-CO}]^+$ (7); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 11 V, Tochterionen des 179 amu-Fragments 123 $[151\text{-CO}]^+$ (77), 105 $[C_6H_5CO]^+$ (8), 77 $[C_6H_5]^+$ (100); Öffnungsspannung: 55 V, Kollisionsenergie: 30 V, Tochterionen des 179 amu-Fragments

NMR: siehe Tabelle 2.55, S. 254

DC: R_f : 0,51 (DC-1), 0,46 (DC-2), 0,09 (DC-4)

Farbe: Hellblauviolett fluoreszierend (undetektiert bei 254 und 356 nm sowie bei 356 nm nach Detektion mit Naturstoffreagenz A)

6.5.8 Aufreinigung der 140 g-Portion des Methanol-Extraktes zum Nachweis der Pyrrolizidin-Alkaloide

140 g Methanol-Extrakt wurden in 2,5%iger Salzsäure suspendiert und durch jeweils dreifaches Ausschütteln mit Diethylether und Chloroform von einem Großteil der lipophilen Begleitstoffe befreit. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 25%iger wässriger Ammoniaklösung alkalisiert (ca. pH 9) und mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. [WITTE et al., 1993]. Dabei fielen 142 mg eines zähen, braunen Alkaloid-Rohextraktes von intensivem Geruch an. Dieser Rohextrakt wurde durch präp. DC im Fließmittelsystem DC-13 weiter aufgetrennt [LIU et al., 1992]. Zwei von ihrer Färbung und Intensität vielversprechende Zonen wurden eluiert und zeigten mit dem Reagenz nach Dann und Mattocks im DC eine Rosa- (Fraktion I, R_f = 0,64) bzw. eine Blaufärbung (Fraktion II, R_f = 0,36) [DANN, 1960; MATTOCKS, 1967a, b und 1968]. Die beiden Gemische wurden danach mittels Festphasenextraktion unter Verwendung von Extrelut[®]20-Fertigsäulen (Fa. Merck) weiter aufgereinigt. Dazu wurden die beiden Proben in jeweils 20 ml 2,5%iger Salzsäure suspendiert und dann jeweils auf eine Fertigsäule aufgetragen. Das Volumen war so bemessen, dass es genau zur vollständigen Benetzung des Säulen-Füllmaterials ausreichte. Nach der Beladung der stationären Phase wurde mit Dichlormethan eluiert, um die

Verunreinigungen auszuwaschen. Die protonierten Alkaloide blieben dabei an das Füllmaterial adsorbiert. Anschließend wurde soviel 25%ige Ammoniaklösung in die Säulen pipettiert, bis die Salzsäure neutralisiert und ein alkalisches Milieu geschaffen wurde. Die Alkaloide wurden dann als freie Basen mit Dichlormethan eluiert, aufgefangen und vom Lösungsmittel befreit. Es verblieben 8 mg von Fraktion I und 1 mg von Fraktion II. In Fraktion I konnten durch GC-MS-Untersuchungen die Verbindungen **PA1**, **PA2**, **PA3**, **PA4** und **PA5**, in Fraktion II die Substanzen **MO1** und **MO2** identifiziert werden.

6.5.9 Analytische Daten der Pyrrolizidin-Alkaloide aus Fraktion I und der in Fraktion II vorliegenden Monoterpene

Verbindung PA1

Tussilagin

Summenformel:	$C_{10}H_{17}NO_3$
Molekulargewicht:	M_r 199
CAS-Nr.:	[80151-77-5]
GC:	R_t (min): 7,78
GC-EI-MS:	m/z (rel. Int.): 199 $[M]^{++}$ (6), 184 $[M-CH_3]^+$ (1), 168 $[M-OCH_3]^+$ (5), 156 (7), 126 (1), 124 (5), 112 (3), 83 (100), 70 (4), 55 (22), 42 (8)
DC:	R_f : 0,64 (DC-13), Farbe: Rosa (Reagenz nach Dann und Mattocks)

Verbindung PA2

Isotussilagin

Summenformel:	$C_{10}H_{17}NO_3$
Molekulargewicht:	M_r 199
CAS-Nr.:	[91108-32-6]
GC:	R_t (min): 7,22
GC-EI-MS:	m/z (rel. Int.): 199 $[M]^{++}$ (8), 168 $[M-OCH_3]^+$ (5), 156 (7), 126 (1), 124 (5), 112 (3), 83 (100), 70 (3), 55 (21), 42 (7)
DC:	R_f : 0,64 (DC-13), Farbe: Rosa (Reagenz nach Dann und Mattocks)

Verbindung PA3

Neotussilagin

Summenformel:	$C_{10}H_{17}NO_3$
Molekulargewicht:	M_r 199
CAS-Nr.:	[147730-90-3]
GC:	R_t (min): 7,68
GC-EI-MS:	m/z (rel. Int.): 199 $[M]^{++}$ (3), 168 $[M-OCH_3]^+$ (3), 156 (6), 126 (1), 124 (4), 112 (2), 83 (100), 70 (3), 55 (25), 43 (13), 42 (8)
DC:	R_f : 0,64 (DC-13), Farbe: Rosa (Reagenz nach Dann und Mattocks)

Verbindung PA4**Neoisotussilagin**Summenformel: $C_{10}H_{17}NO_3$ Molekulargewicht: M_r 199

CAS-Nr.: [147730-89-0]

GC: R_t (min): 8,07GC-EI-MS: m/z (rel. Int.): 199 $[M]^{++}$ (5), 184 (<1), 168 $[M-OCH_3]^+$ (5), 156 (8), 126 (1), 124 (1), 124 (5), 112 (1), 83 (100), 70 (3), 55 (22), 43 (9), 42 (9)DC: R_f : 0,64 (DC-13), Farbe: Rosa (Reagenz nach Dann und Mattocks)**Verbindung PA5****Pyrrolidin-2-essigsäuremethylester**Summenformel: $C_7H_{13}NO_2$ Molekulargewicht: M_r 143

CAS-Nr.: [51856-76-9]

GC: R_t (min): 1,42GC-EI-MS: m/z (rel. Int.): 143 $[M]^{++}$ (3), 128 $[M-CH_3]^+$ (1), 115 $[M-CO]^{++}$ (3), 100 (1), 124 (5), 82 (4), 70 $[M-CH_2COOCH_3]^+$ (100), 56 (13), 43 (9)DC: R_f : 0,64 (DC-13), Farbe: Rosa (Reagenz nach Dann und Mattocks)**Verbindung MO1*****trans*-Terpin**Summenformel: $C_{10}H_{20}O_2$ Molekulargewicht: M_r 172

CAS-Nr.: [565-50-4]

EI-MS: m/z (rel. Int.): 154 $[M-H_2O]^{++}$ (2), 139 (20), 125 (4), 111 (7), 108 (8), 96 (81), 81 (100), 71 (26), 68 (22), 59 (81), 55 (29), 43 $[H_3C-CH-CH_3]^{++}$ (85)DC: R_f : 0,36 (DC-13)
Farbe: Blau (Reagenz nach Dann und Mattocks)**Verbindung MO2*****trans*-Sobrerol**Summenformel: $C_{10}H_{18}O_2$ Molekulargewicht: M_r 170

CAS-Nr.: [32226-54-3]

EI-MS: m/z (rel. Int.): 170 $[M]^{++}$ (<1), 152 $[M-H_2O]^{++}$ (25), 137 (31), 119 (7), 109 (100), 95 (22), 79 (52), 69 (16), 59 (100), 55 (17), 43 $[H_3C-CH-CH_3]^{++}$ (63)

DC: R_f 0,36 (DC-13)
Farbe: Blau (Reagenz nach Dann und Mattocks)

6.6 Pharmakologische Arbeitsmethoden

6.6.1 Allgemeines

Die im Folgenden beschriebenen Verfahren zur *in vitro*-Kultivierung von *P. falciparum* basierten auf den durch Fairlamb verbesserten Techniken von Jensen und Trager [FAIRLAMB et al., 1985; JENSEN und TRAGER, 1977]. Alle mit den Parasitenkulturen durchgeführten Arbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen in einer Cyttox II laminar flow Werkbank der Firma Envair UK durchgeführt. Zur Minimierung der Kontamination der Kulturen durch Fremdkeime wurden ausschließlich sterile Behälter und Pipetten verwendet. Alle Chemikalien und Enzyme wurden von der Firma Sigma bezogen.

6.6.2 Reagenzien und Mischungen

APAD-Reagenz

Für 1,0 ml Reagenz wurden 10,0 mMol APAD, 192,0 mg Lithiumlactat, das Massenäquivalent von 130,0 units Diaphorase und 2,0 mg des nicht-ionischen Tensids Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) in einem passenden Volumen TRIS-Puffer pH 9,2 gelöst.

Färbelösung nach GIEMSA

Zur Herstellung der Lösung wurde zunächst eine Mischung aus 250,0 ml Glycerol und 250,0 ml Methanol hergestellt. 3,80 g des GIEMSA-Farbstoffes wurden nun anteilsweise mit dem Lösungsmittelgemisch in einem Porzellanmörser verrieben. Die fertige Farbstofflösung wurde in einer gut verschlossenen Braunglasflasche bei 4°C aufbewahrt.

Kultur-Medium

10,4 g lyophilisiertes RPMI 1640 (Aminosäuren- und Vitaminmischung) wurden in 800,0 ml destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2,0 g D-Glucose, 2,33 g Natriumhydrogencarbonat und 9,2 g TES-Puffer gegeben und vollständig gelöst. Der klaren Lösung wurden 40,0 mg Gentamicin beigemischt. Danach wurde auf einen Liter Flüssigkeit mit destilliertem Wasser ergänzt und mit 5-molarer Natriumhydroxidlösung ein pH von 7,3 eingestellt. Diese Stammlösung wurde steril filtriert, in 50 ml-Portionen aufgeteilt und bei 20°C aufbewahrt. Das vollständige Kulturmedium wurde durch die Lösung von 2,5 ml aufgetauten Serums in 20,0 ml aufgetauter Stammlösung bereitet. Diese Mischung war bei einer Aufbewahrungstemperatur von 4°C eine Woche verwendbar.

NBT-Lösung

Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (10,0 mg) und Phenazinethosulfat (5,0 mg) wurden jeweils in 10,0 ml bzw. 100,0 ml destilliertem Wasser gelöst. Die gebrauchsfertige NBT-Lösung wurde durch Vereinigung von 5,0 ml der Phenazinethosulfat-Lösung mit der gesamten Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Lösung erhalten.

Pufferlösung zur Erythrozyten-Reinigung

Der Puffer wurde durch Lösen von 8,0 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,14 g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat in 800,0 ml destilliertem Wasser und nachfolgendem Auffüllen auf 1,0 l hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert.

6.6.3 Herkunft der Parasiten-Isolate

Kulturen des K1-Stammes von *P. falciparum* wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. D.C. Warhurst von der London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM) zur Verfügung gestellt. Dr. L. Ranford-Cartwright vom Institute of Cell, Animal and Population Biology der Universität Edinburgh gebührt Dank für die Überlassung von Parasiten des HB3-B₂-Stammes.

6.6.4 Gewinnung des Blut-Serums

Das benötigte Blutserum wurde aus gefrorenem Blutplasma vom Yorkshire Blood Transfusion Centre (YBTC) in Leeds bereitet. Nach dem Auftauen wurde das Plasma in 20 ml-Portionen in 30 ml-Zentrifugenbehälter überführt. Danach wurde in jedes Behältnis je 0,4 ml sterilfiltrierte Calciumchlorid-Lösung gegeben. Die recalcifizierten Serumproben wurden darauf eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Klümpchen, die sich in den Proben gebildet hatten, mit einem sterilisierten Glasstab von den Rändern der Behälter entfernt und durch Rühren dispergiert. Diese Suspension wurde anschließend mit 2500 Umdrehung pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert. Der klare Überstand, also das Serum, wurde gesammelt und bei –20°C eingelagert.

6.6.5 Aufbereitung der Erythrozyten

Frische, nicht infizierte rote Blutkörperchen der Blutgruppe A Rh⁺ wurden vom Yorkshire Blood Transfusion Centre (YBTC) in Leeds bezogen. Die Zellen mussten zunächst zur Entfernung von Resten weißer Blutkörperchen und Konservierungsmitteln, die üblicherweise sofort nach der Abnahme zu den Blutspenden gegeben werden, mit einer Phosphat-Pufferlösung pH 7,4 gewaschen werden.

Dazu wurden 15,0 ml der Erythrozyten-Suspension in ein Zentrifugenglas pipettiert und 10 Minuten mit 2500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die sedimentierten Erythrozyten wurden nach Abnahme des Überstandes in einem gleich großen Volumen Pufferlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach drei weiteren Wiederholungen dieser Prozedur wurden die roten Blutkörperchen schließlich in einem passenden Volumen Kulturmedium gelöst, so dass sich ein Haematokrit von 50% ergab. Diese Suspension wurde bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt.

6.6.6 Kultivierung der Plasmodien

Zur Aufbewahrung der Kulturen wurden 50 ml Kultur-Fläschchen der Fa. Corning verwendet. Die Füllmenge wurde auf maximal 5,0 ml und der Haematokrit der Kulturen auf 5 % begrenzt. Zunächst wurde ein bestimmtes Volumen einer Suspension infizierter Zellen in ein sterilisiertes Reagenzglas pipettiert. Danach wurde das für einen Haematokriten von 5 % erforderliche Volumen einer Suspension Plasmodien-freier Erythrozyten hinzugegeben. Die Mischung wurde vorsichtig durch Schwenken homogenisiert und in ein Kultur-Fläschchen überführt. In diesem Behälter wurde die Kultur mit einer für das Gedeihen der Plasmodien optimierten Gas-Mischung (3 % Sauerstoff, 4 % Kohlendioxid und 93 % Stickstoff) begast. Nach dem raschen Verschließen wurde das Behältnis in einen auf 37°C thermostatisierten Inkubator (Fa. Billups-Rothenberg) gelegt und dort aufbewahrt. Alle 72 Stunden mußte das

Kulturmedium ausgetauscht werden. Hierzu wurden die Kultursuspensionen in Zentrifugengläser überführt und 5 Minuten mit 2500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend entfernt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nach erneuter Dispergierung wurde die Suspension zurück in das Kultur-Fläschchen überführt. Nach Begasung mit der oben beschriebenen Mischung wurde der Behälter verschlossen und wieder zurück in den Inkubator gestellt.

6.6.7 Blutaustrieche und Zählung der Parasiten

200 µl der Kultur wurden in einen Mikro-Zentrifugenbehälter pipettiert und 3 Minuten lang mit 2500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Es wurde soviel Überstand entfernt, dass sich beim Resuspendieren ein Haematokrit von etwa 50 % ergab. 3 µl dieser höher konzentrierten Suspension wurden auf einem mit Methanol desinfizierten Objektträger ausgestrichen. Der Austrich wurde mit Labordruckluft trocken geblasen und mit Methanol 30 Sekunden lang fixiert. Danach wurde der dünne trockene Blutfilm nach GIEMSA gefärbt. Für die Färbung wurde der bestrichene Objektträger 20 Minuten lang in die GIEMSA-Lösung gelegt und anschließend unter fließendem Wasser gewaschen. Nach der Trocknung im Luftstrom wurden die Erythrozyten mit einem Mikroskop (100-fache Vergrößerung) betrachtet, um die Parasitaemie zu bestimmen. Die Parasitaemie ist definiert als der Anteil von Plasmodien-infizierten Erythrozyten an der Gesamtfraktion roter Blutkörperchen einer bestimmten Kultur. Sie wird ermittelt durch die Auszählung von insgesamt 1000 willkürlich ausgewählten Erythrozyten. Mehrfach infizierte Zellen wurden nur einmal bei der Zählung berücksichtigt.

6.6.8 Durchführung des modifizierten pLDH-Assays

Der pLDH-Test geht auf Arbeiten von MAKLER und HINRICHS (1993) zurück. Die zu untersuchenden Substanzen wurden jeweils sechs Mal getestet. Nach Zugabe von DMSO wurde mit Kulturmedium eine Stammlösung hergestellt (50 µg/ml), wodurch die höchste im Test eingesetzte Konzentration festgelegt war. Der DMSO-Anteil betrug maximal 1 %, da Beimischungen bis zu dieser Konzentration von den Plasmodien toleriert werden. Von dieser Stammlösung wurde dann eine Verdünnungsreihe mit zwölf verschiedenen Konzentrationen hergestellt, wobei die Konzentration jeweils halbiert wurde. Jeweils 30 µl dieser Verdünnungen wurden in die Reaktionskammern einer Mikrotiterplatte pipettiert. In jede Kammer wurden zusätzlich 30 µl einer Suspension mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten gegeben. Parasitämie und Haematokrit betrugen jeweils 2 %. Der Inhalt jeder Reaktionskammer wurde anschließend gemischt. Hierdurch sank der Haematokrit auf 1 %. Die letzten drei Reihen der Mikrotiterplatte enthielten Lösungen bzw. Suspensionen zur Positiv- bzw. Negativkontrolle und zum Nullabgleich bei der photometrischen Vermessung. Als Positivkontrolle diente eine Verdünnungsreihe mit Chloroquin als Wirkstoff. Die Negativ-Kontrolle wurde mit infiziertem Blut ohne Wirkstoff durchgeführt. Dem Nullabgleich dienten nicht infizierte rote Blutkörperchen in Kulturmedium (Haematokrit 1 %).

Die Mikrotiterplatte wurde anschließend in eine Mikroinkubatorkammer (Fa. Billups-Rothenberg) gelegt, in der sich zur Verringerung von Verdunstungseffekten eine Schale mit Aqua ad injectabilia mit Baumwolldocht befand. Die Inkubationskammer wurde mit dem in

Kap. 6.6.6, S. 342 beschriebenen Gasgemisch 5 Minuten lang begast, verschlossen und bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf von 48 Stunden wurde die Mikrotiterplatte der Inkubatorkammer entnommen und jeder Reaktionszelle jeweils 50 µl frisch hergestelltes APAD-Reagenz und ein gleiches Volumen NBT-Lösung zugesetzt. Die Zellinhalte wurden vorsichtig gemischt und die Mikrotiterplatte für 30 Minuten in einem lichtgeschützten verschlossenen Laborschrank aufbewahrt. Anschließend wurden die Absorptionen der Reaktionskammern mit einem Mikrotiterplattenleser der Fa. MRX Dynatech Laboratories gemessen.

6.6.9 Berechnung der IC_{50}

Jede der zu prüfenden Substanzen (SL1, SL2, SL5 – SL9 und SL11) wurde in zwölf Konzentrationen mit sechs Wiederholungen getestet. Von jedem Absorptionswert wurde zunächst der Blindwert abgezogen und aus diesem korrigierten Wert die prozentuale Hemmung des Plasmodien-Wachstums berechnet. Die prozentualen Hemmungen wurden dann grafisch gegen die zugehörigen Konzentrationen an eingesetzter Substanz aufgetragen, wobei sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurven resultierten. Die im linearen Bereich zwischen 20% und 80% Plasmodien-Hemmung liegenden Meßwerte wurden einer linearen Regression unterzogen. Aus der daraus abgeleiteten Gleichung wurde die IC_{50} errechnet. Man erhielt demnach für jede getestete Substanz sechs IC_{50} -Werte, aus denen mit Hilfe der Statistik-Software SPSS (Version 10.0) neben dem Mittelwert auch Standardabweichung, Standardfehler und die Grenzen des 95%-Konfidenzintervalles für den Mittelwert bestimmt wurden (siehe Tabelle 3.1, S. 269 und Bild 3.13, S. 270).

6.6.10 Statistischer Vergleich der Mittelwerte

Vor der Varianzanalyse mit dem Programm SPSS wurde zunächst mit der Prozedur nach KOLMOGOROV und SMIRNOV geprüft, ob bei den einzelnen Substanzen die IC_{50} -Werte normalverteilt waren. Nach der Bestätigung der Normalverteilung wurde mit dem Verfahren nach LEVENE auf Homogenität der Varianzen der IC_{50} -Werte der Testsubstanzen geprüft. Der sich ergebende F -Wert der LEVENE-Statistik betrug bei (7,40) Freiheitsgraden auf dem 0,05-Signifikanzniveau 1,792 und war damit nicht signifikant. Somit konnte von der Homogenität der Varianzen ausgegangen werden. Der nach Erfüllung dieser Voraussetzungen mögliche Mittelwertvergleich durch Varianzanalyse wurde nach dem Verfahren der einfaktoriellen ANOVA durchgeführt. Der berechnete F -Wert von 8,839 ist auch bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,001 und (7,40) Freiheitsgraden signifikant. Dies bedeutet, dass sich im Hinblick auf die mittleren IC_{50} -Werte der Testsubstanzen mindestens ein Wert signifikant von den anderen unterscheidet. Zur Beantwortung der Frage, welche Substanz(en) für diesen Effekt verantwortlich sind, wurden die Resultate aus der einfaktoriellen ANOVA noch einem Post-hoc-Test nach DUNCAN unterzogen. Mit Hilfe dieses Testalgorithmus konnten zwei homogene Untergruppen gebildet werden, deren Mittelwerte sich auf dem $p = 0,05$ -Niveau signifikant voneinander unterscheiden (siehe Bild 3.13, S. 270) [BÜHL und ZÖFEL, 2000; ZÖFEL, 2001].

7 Literatur

- AASEN, A.J.; CULVENOR, C.C.J.; SMITH, L.W.: »The Saturated Pyrrolizidinediols. I. Spectral Studies and the Conversion of an Ester of Dihydroxyheliotridane Into the (+)-Enantiomer of Hastanecine«. *Journal of Organic Chemistry*, 34 (12), 4137-4143, 1969.
- AGRAWAL, P.K. (Ed.): »Carbon-13 NMR of Flavonoids«. In: *Studies in Organic Chemistry*. Bd. 39. Amsterdam, Niederlande : Elsevier, 1989.
- AHMED, A.A.; NORRIS, J.A.; MABRY, T.J.: »Flavonoids of *Brickellia vernicosa*«. *Phytochemistry*, 25 (6), 1501-1502, 1986.
- AL-KHUBAIZI, M.S.; MABRY, T.J.; BACON, J.: »6-Methoxykaempferol-3-O-glucoside from *Flaveria brownii*«. *Phytochemistry*, 17, 163, 1978.
- AMADOR, R.; PATARROYO, M.E.: »Malaria Vaccines«. *Journal of Clinical Immunology*, 16 (4), 183-189, 1996.
- AQIL, M.: »Flavonoidic Glycosides from *Eupatorium Africanum*«. *Ultra Scientist of Physical Sciences*, 7 (1), 1-6, 1995.
- ARITOMI, M.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T.: »Flavonol Glycosides in Leaves of *Spinacia oleracea*«. *Phytochemistry*, 25 (1), 231-234, 1986.
- AUDIER, H.: »Étude des Composés Flavoniques par Spectrométrie de Masse«. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 9, 2892-2899, 1966.
- BACON, J.D.; MABRY, T.J.; MEARS, J.A.: »UV Spectral Procedures for Distinguishing Free and Substituted 7-Hydroxyl Groups in Flavones and Flavonols«. *Revista Latinoamericana de Química*, 7, 83-86, 1976.
- BARNES, C.S.: »The Properties and Structures of the 1,8-Terpins and Some Related Compounds«. *Australian Journal of Chemistry*, 11, 134-146, 1958.
- BARTHA, R.; GRIFFITHS, K.; ALTWEIN, J.E.: »Auswirkungen der Ernährung auf das Mamma- und Prostatakarzinom«. *Pharmazeutische Zeitung*, 142 (34), 2855-2863, 1997.
- BENTHAM, G.: »*Plantas Hartwegiana Imprimis Mexicanas*«. London, 76, 1840.
- BERENDSOHN, W.G.; DE GONZÁLEZ, A.E.A.: »Dicotyledonae, Sympetalae (pro parte) Labiatae, Bignoniaceae, Acanthaceae, Pedaliaceae, Martyniaceae, Gesneriaceae, Compositae«. In: BERENDSOHN, W.G. (Ed.): *Cuscatlania : Listado Básico de la Flora Salvadorensis*. Bd. 1 (3). San Salvador : Jardín Botánico La Laguna, 290-1 – 290-13, 1989.
- BERNARD, F.-X.; SABLÉ, S.; CAMERON, B.; PROVOST, J.; DESNOTTES, J.-F.; CROUZET, J.; BLANCHE, F.: »Glycosylated Flavones as Selective Inhibitors of Topoisomerase IV«. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41 (5), 992-998, 1997.
- BHARDWAJ, D.K.; BISHT, M.S.; JAIN, S.C.; SHARMA, G.C.: »Synthesis of Patuletin«. *Indian Journal of Chemistry*, 16B, 338-339, 1978.
- BOERICKE, W.: »*Homöopathische Mittel und ihre Wirkungen*«. Leer : Verlag Grundlagen und Praxis, 1995.

- BOGITSH, B.J.; CHENG, T.C.: »*Human Parasitology*«. 2. Aufl. San Diego, Kalifornien, USA : Academic Press, 127-152, 1998.
- BOHLMANN, F.; BANERJEE, S.; WOLFRUM, C.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H.: »Sesquiterpene Lactones, Geranylnerol and Tremetone Derivatives from *Ageratina* Species«. *Phytochemistry*, 24 (6), 1319-1321, 1985a.
- BOHLMANN, F.; GRENZ, M.: »Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 82 : Über neue Inhaltsstoffe aus Vertretern der *Eupatorium*-Gruppe«. *Chemische Berichte*, 110, 1321-1329, 1977.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; AHMED, M.; SCHUSTER, A.: »Sesquiterpene Lactones and Other Constituents from *Schistostephium* Species«. *Phytochemistry*, 22 (7), 1623-1636, 1983.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; LONITZ, M.: »Natürlich vorkommende Terpen-Derivate 76 : Über Inhaltsstoffe der *Eupatorium*-Gruppe«. *Chemische Berichte*, 110, 301-314, 1977a.
- BOHLMANN, F.; LONITZ, M.: »Neue Sandaracopimaradien-Derivate, Sesquiterpene und Sesquiterpenlactone aus *Zexmenia*-Arten«. *Chemische Berichte*, 111, 843-852, 1978.
- BOHLMANN, F.; MAHANTA, P.K.; SUWITA, A.; SUWITA, A.; NATU, A.A.; ZDERO, C.; DORNER, W.; EHLERS, D.; GRENZ, M.: »Neue Sesquiterpenlactone und andere Inhaltsstoffe aus Vertretern der *Eupatorium*-Gruppe«. *Phytochemistry*, 16, 1973-1981, 1977b.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.: »Über Flavone aus *Centaurea*-Arten«. *Tetrahedron Letters*, 33, 3239-3242, 1967.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H.: »Further Germacranolides from *Eupatorium serotinum*«. *Planta Medica*, 76-77, 1985b.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; TURNER, B.L.: »Germacranolides from *Eupatoriastrium nelsonii*«. *Phytochemistry*, 24 (6), 1263-1266, 1985c.
- BOHLMANN, F.; ZEISBERG, R.; KLEIN, E.: »¹³C-NMR-Spektren von Monoterpenen«. *Organic Magnetic Resonance*, 7, 426-432, 1975.
- BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J.; ROBINSON, H.; KING, R.M.: »Seven Germacranolides and Four Eudesmanolides from *Tithonia rotundifolia*«. *Phytochemistry*, 20, 267-270, 1981.
- BORK, P.M.; SCHMITZ, M.L.; KUHN, M.; ESCHER, C.; HEINRICH, M.: »Sesquiterpene Lactones as Potent Inhibitors of Transcription Factor κ B (NF- κ B)«. *FEBS-Letters*, 402, 85-90, 1997.
- BOSE, P.K.; CHAKRABARTI, P.; CHAKRAVARTI, S.; DUTTA, S.P.; BARUA, A.K.: »Chemical Examination of the Leaves of *Eupatorium odoratum*«. *Transactions of the Bose Research Institute*, 37 (1-2), 25-30, 1974.
- BOWIE, J.H.; CAMERON, D.W.: »Electron Impact Studies : II. Mass Spectra of Quercetagenin Derivatives«. *Australian Journal of Chemistry*, 19, 1627-1635, 1966.
- BOYCE, N.: »Blocking Malaria«. *New Scientist*, 2246, 15, 2000.
- BROWN, G.V.: »Progress in the Development of Malaria Vaccines: Context and Constraints«. *Parassitologia*, 41 (1-3), 429-432, 1999.

- BROWN, S.A.: »Coumarins«. In: CONN, E.E. (Ed.): *The Biochemistry of Plants : A Comprehensive Treatise*. Vol. 7 : Secondary Plant Products. New York, USA : Academic Press, 269-300, 1981.
- BROWN, S.A.: »Biochemistry of Plant Coumarins«. In: CONN, E.E. (Ed.): *Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 20 : The Shikimic Acid Pathway. New York, USA : Plenum Press, 287-316, 1986.
- BUDEŠÍNSKÝ, M.; ŠAMAN, D.: »Carbon-13 NMR Spectra of Sesquiterpene Lactones«. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 30, 231-483, 1995.
- BUDEŠÍNSKÝ, M.; ŠAMAN, D.: »Identification of Acyl Groups Occurring in Sesquiterpene Lactones: Proton and Carbon-13 NMR Study«. *Collection Czechoslovak Chemistry Communications*, 52, 453-475, 1987.
- BÜHL, A.; ZÖFEL, P.: »SPSS Version 10 : Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows«. 7. Aufl. München : Addison Wesley, 2000.
- CÁCERES, A.: »Plantas de Uso Medicinal en Guatemala«. In: GIRÓN, L.M. und CÁCERES, A. (Eds.): *Colección Monografías*. Bd. 1. Guatemala : Editorial Universitaria, 89-90, 1996.
- CALLE A., J.; MARIN, D.A.; FUENTES, J.E.: »Phytochemical Studies on *Eupatorium acuminatum*«. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 16 (2), 14-15, 1985.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L.: »Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships«. *Free Radical Biology & Medicine*, 22 (5), 749-760, 1997.
- CARVALHO, L.H.; BRANDÃO, M.G.L.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J.L.C.; KRETTLI, A.U.: »Antimalarial Activity of Crude Extracts from Brazilian Plants Studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-Infected Mice and *in vitro* Against *Plasmodium falciparum* in Culture«. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24, 1113-1123, 1991.
- CARVALHO, L.H.; KRETTLI, A.U.: »Antimalarial Chemotherapy with Natural Products and Chemically Defined Molecules«. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 (Suppl. II), 181-184, 1991.
- CASSAL, J.-M.; FÜRST, A.; MEIER, W.: »Synthese der enantiomeren 2-Pyrrolidinessigsäuren«. *Helvetica Chimica Acta*, 59 (5), 1917-1924, 1976.
- CAULA, S.A.; VILLAR, S.I.; MARTINO, V.S.; COUSSIO, J.D.; FERRARO, G.E.: »Polyphenols Isolated from *Eupatorium buniifolium*«. *Revista Latinoamericana de Química*, 22 (1), 1-3, 1991.
- CHIRIKDJIAN, J.J.; BLEIER, W.: »Zusammenhänge zwischen UV-Spektrum und Substitutionsmuster von Flavonen, Flavonolen und deren 3-Methyläthern«. *Scientia Pharmaceutica*, 39 (2), 65-79, 1971.
- CLEWELL, A.F.: »Las Compuestas de Honduras«. *Ceiba*, 19 (2), 119-244, 1975.
- CORSE, J.; LUNDIN, R.E.; SONDHEIMER, E.; WAISS, A.C.: »Conformation Analyses of D-(-)-Quinic Acid and Some of Its Derivatives by Nuclear Magnetic Resonance«. *Phytochemistry*, 5, 767-776, 1966.

- CUSSANS, N.J.; HUCKERBY, T.N.: »Carbon-13 NMR Spectroscopy of Heterocyclic Compounds – IV : A 20 MHz Study of Chemical Shifts and Carbon-Proton Coupling Constants in a Series of Hydroxy, Methoxy and Glucosyl Coumarins«. *Tetrahedron*, 31, 2719-2726, 1975.
- D'AGOSTINO, M.; DE FEO, V.; PIZZA, C.; DE SIMONE, F.: »Isolation of 3,5,7,2',3',4'-Hexahydroxyflavone-3-O- β -D-glucopyranoside from *Eupatorium sternbergianum*«. *Fitoterapia*, 65 (5), 472-473, 1994.
- DANN, A.T.: »Detection of N-Oxides of the Pyrrolizidine Alkaloids«. *Nature*, 186, 1051, 1960.
- DAUBERSIES, P.; THOMAS, A.W.; MILLET, P.; BRAHIMI, K.; LANGERMANS, J.A.M.; OLLOMO, B.; MOHAMED, L.B.; SLIERENDREGT, B.; ELING, W.; VAN BELKUM, A.; DUBREUIL, G.; MEIS, J.F.G.M.; GUÉRIN-MARCHAND, C.; CAYPHAS, S.; COHEN, J.; GRAS-MASSE, H.; DRUILHE, P.: »Protection Against *Plasmodium falciparum* Malaria in Chimpanzees by Immunization with the Conserved Pre-Erythrocytic Liver-Stage Antigen 3«. *Nature Medicine*, 6 (11), 1258-1263, 2000.
- DE PASCUAL TERESA, J.; CABALLERO, E.; ANAYA, J.; CABALLERO, C.; GONZALEZ, M.S.: »Eudesmanolides from *Chamaemelum fuscatum*«. *Phytochemistry*, 25 (6), 1365-1369, 1986.
- DE PÉREZ, C.E.; DE PINILLA, G.S.: »Metoxiflavonas de *Ageratina glyptophlebia* (Compositae)«. *Revista Colombiana de Química*, 19 (1), 101-105, 1990.
- DE PÉREZ, C.E.; MOLINA, E.V.: »Flavonoides Glicosídicos de *Ageratina arbutifolia*«. *Revista Colombiana de Química*, 24 (1), 39-45, 1995.
- DE VILLARRAGA, A.A.; DE PÉREZ, C.E.: »6-Metoxiflavonas de Flores de *Ageratina angustifolia* R.M. King & H. Robinson (Compositae)«. *Revista Colombiana de Química*, 23 (1), 45-51, 1994.
- DIESELDORFF, E.P.: »Las Plantas Medicinales del Departamento de Alta Verapaz«. Guatemala : Tip. Nacional, 21-27, 1977.
- DING, Z.-H.; GUO, Y.-B.; DING, J.-K.: »Chemical Constituents from the Flowers of *Eupatorium adenophorum*«. *Acta Botanica Yunnanica*, 21 (4), 505-511, 1999.
- DOHERTY, G.O.P.; HAYNES, N.B.; WHALLEY, W.B.: 5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavone, a Minor Pigment from *Digitalis lanata*, L.«. *Journal of the Chemical Society*, 5577-5578, 1963.
- DOMÍNGUEZ, X.A.: »Eupatorieae – Chemical Review«. In: HEYWOOD, V.H.; HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. (Eds.): *The Biology and Chemistry of the Compositae Volume 1*. London : Academic Press, 487-502, 1977.
- DOMÍNGUEZ, X.A.; SANCHEZ, H.; RÍO, E.D.; VAZQUEZ, G.; ABDEL AAL, M.: »Desoxypetiolaside and Other Constituents from *Fleischmannia pycnocephala* and *Ageratina virburnoides*«. *Revista Latinoamericana de Química*, 19 (1), 43-44, 1988.
- DOSKOTCH, R.W.; KEELY, S.L.; HUFFORD, C.D.; EL-FERALY, F.S.: »New Sesquiterpene Lactones from *Liriodendron tulipifera*«. *Phytochemistry*, 14, 769-773, 1975.
- DRANIK, L.I.: »A Spectroscopic Investigation of the Phenolcarboxylic Acids of *Cynara scolymus*«. *Chemistry of Natural Compounds*, 2, 246-248, 1966.

- DUBOIS, M.-A.; WIERER, M.; WAGNER, H.: »Palustroside, a Coumarin Glucoside Ester from *Ledum palustre*«. *Phytochemistry*, 29 (10), 3369-3371, 1990.
- DUPONT, G.: »Composition and Commercial Applications of Spirits of Turpentine. : The Composition of Bordeaux Turpentine (from *Pinus maritimus*)«. *Chemical Abstracts*, 16, 4339-4341, 1922.
- DUTHIE, S.J.; JOHNSON, W.; DOBSON, V.L.: »The Effect of Dietary Flavonoids on DNA Damage (Strand Breaks and Oxidised Pyrimidines) and Growth in Human Cells«. *Mutation Research*, 390, 141-151, 1997.
- EBERT, M.: »Inhaltsstoffe von *Arnica viscosa* und *Arnica nevadensis*«. Promotionsschrift, Universität Düsseldorf, 1985.
- EBERT, M.; MERFORT, I.; WILLUHN, G.: »Flavonoid Distribution in *Arnica* Subgenera *montana* and *austromontana*«. *Phytochemistry*, 27 (12), 3849-3851, 1988.
- ELEMA, E.T.; SCHRIPEMA, J.; MALINGRÉ, T.M.: »Flavones and Flavonol Glycosides from *Eupatorium cannabinum* L.«. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 11, 161-164, 1989.
- FAIRLAMB, A.H.; WARHURST, D.C.; PETERS, W.: »An Improved Technique for the Cultivation of *Plasmodium falciparum* in vitro Without Daily Medium Change«. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 79 (4), 379-384, 1985.
- FANG, N.; MABRY, T.J.: »Flavonoid Aglycones from *Ageratina tomentella*«. *Journal of Natural Products*, 49 (4), 738-739, 1986.
- FANG, N.; MABRY, T.J.: »Sesquiterpenes from *Ageratina tomentella*«. *Phytochemistry*, 27 (1), 283-285, 1988.
- FANG, N.; YU, S.; MABRY, T.J.: »Flavonoids from *Ageratina calophylla*«. *Phytochemistry*, 25 (11), 2684-2686, 1986.
- FANG, N.; YU, S.; MABRY, T.J.; ABBOD, K.A.; SIMONSEN, S.H.: »Terpenoids from *Ageratina saltillensis*«. *Phytochemistry*, 27 (10), 3187-3196, 1988.
- FELDMEIER, H.: »Malaria«. In: SCHADEWALDT, H. (Hrsg.): *Die Rückkehr der Seuchen : Ist die Medizin machtlos?*. Köln : vgs Verlagsgesellschaft, 157-186, 1994.
- FELDMEIER, H.: »Malaria : Wie trickreiche Parasiten das Immunsystem usurpieren«. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 136 (27), 2282-2286, 1996.
- FERNÁNDEZ, I.; PEDRO, J.R.; POLO, E.: »Sesquiterpene Lactones from *Centaurea alba* and *C. conifera*«. *Phytochemistry*, 38 (3), 655-657, 1995.
- FERRARO, G.E.; COUSSIO, J.D.: »Flavonoids from *Eupatorium subhastatum*«. *Phytochemistry*, 12, 1825, 1973.
- FERRARO, G.; MARTINO, V.; BORRAJO, G.; COUSSIO, J.D.: »5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6-methoxyflavanone from *Eupatorium subhastatum*«. *Phytochemistry*, 26 (11), 3092-3093, 1987.
- FERRARO, G.; MARTINO, V.; COUSSIO, J.: »Flavonoides Aislados de *Eupatorium hookerianum*«. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 71, 327-329, 1983.

- FERRARO, G.E.; MARTINO, V.S.; COUSSIO, J.D.: »4',4''[?]-Dimethylcuppressuflavanone from *Eupatorium subhastatum*«. *Journal of Natural Products*, 51 (3), 586-587, 1988.
- FERRERES, F.; TOMÁS, F.; GUIRADO, A.; TOMÁS, F.A.: »Agliconas de Flavonoides en la *Centaurea aspera* (Compositae)«. *Afinidad*, 37, 337-338, 1980.
- FIGUEIREDO, R.D.C.L.: »Notas Preliminares Sobre a Germinação e Ocorrência de Derivados Cumarínicos em Aquênios de *Eupatorium pauciflorum* H.B.K. (Compositae)«. *Hoehnea*, 5, 47-57, 1975.
- FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C.: »Pyrrolizidine Alkaloids: A Word of Caution«. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 49 (5/6), 331-338, 1997.
- FISCHER, N.H.; OLIVIER, E.J.; FISCHER, H.D.: »The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones«. In: HERZ, W.; GRISEBACH, H.; KIRBY, G.W. (Eds.): *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vol. 38. Wien : Springer, 47-391, 1979.
- FRANÇOIS, G.; PASSREITER, C.M.; WOERDENBAG, H.J.; VAN LOOVEREN, M.: »Antiplasmodial Activities and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts and Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata*«. *Planta Medica*, 62, 126-129, 1996.
- GONZÁLEZ, A.G.; ARTEAGA, J.M.; FRAGA, B.M.; HERNÁNDEZ, M.G.; FAYOS, J.: »The Structure of Jhanilactone«. *Experientia*, 34 (5), 554, 1978.
- GONZÁLEZ, A.G.; BARRERA, J.B.; DÍAZ, J.B.; RODRÍGUEZ PÉREZ, E.M.; YANÉS, A.C.; RAUTER, P.; POZO, J.: »Diterpenes and Other Constituents of *Eupatorium salvia*«. *Phytochemistry*, 29 (1), 321-323, 1990.
- GONZÁLEZ, A.G.; BARRERA, J.B.; HERNÁNDEZ, A.Y.; ROSAS, F.E.; DOMÍNGUEZ, X.A.: »Structure of two Eudesmanolides, Morifolin A and B«. *Heterocycles*, 23 (7), 1601-1602, 1985a.
- GONZÁLEZ, A.G.; BARRERA, J.B.; HERNÁNDEZ, A.C.Y.; ROSAS, F.E.; DOMÍNGUEZ, X.A.: »Eudesmane Sesquiterpenes from *Eupatorium quadrangulare*«. *Phytochemistry*, 24 (8), 1847-1848, 1985b.
- GONZÁLES, A.G.; BARRERA, J.B.; YANÉS, A.C.; DÍAZ, J.G.; RODRÍGUEZ PÉREZ, E.M. : »Chromenes and Benzofuranes from *Ageratina glechonophylla*«. *Phytochemistry*, 28 (9), 2520-2522, 1989.
- GOUDARD, M.; FAVRE-BONVIN, J.; LEBRETON, P.; CHOPIN, J.: »Differentiation des Dihydroxy-5,7 Méthoxy-6 ou 8 Flavones, Flavonols et Méthyl-3 Flavonols par Spectrometrie de Masse«. *Phytochemistry*, 17, 145-146, 1978.
- GROSS, G.G.: »Phenolic Acids«. In: CONN, E.E. (Ed.): *The Biochemistry of Plants : A Comprehensive Treatise*. Vol. 7: Secondary Plant Products. New York : Academic Press, 301-316, 1981.
- GUERRERO, C.; CAMPOS, G.; TABOADA, J.: »Estudio Químico de *Eupatorium brevipes* y Algunas Actividades Biológicas de la Brevipenina«. *Revista Latinoamericana de Química*, 19(3), 147-149, 1988.

- GUERRERO, C.; SILVA, M.; MALDONADO, E.; MARTÍNEZ, M.: »Acido Eupaglabrico un Nuevo Compuesto Aislado de *Eupath[?]orium glabratum* H.B.K.«. *Revista Latinoamericana de Química*, 9, 71-75, 1978.
- HÄNSEL, R.; STICHER, O.; STEINEGGER, E.: »*Pharmakognosie – Phytopharmazie*«. 6. Auflage. Heidelberg : Springer, 1999.
- HAI, M.A.; SAHA, K.; AHMAD, M.U.: »Chemical Constituents of *Eupatorium odoratum* Linn. (Compositae)«. *Journal of the Bangladesh Chemical Society*, 8 (2), 139-142, 1995.
- HALL, C.A.; CUPPETT, S.L.: »Structure-Activities of Natural Antioxidants«. In: ARUOMA, O.I.; CUPPETT, S.L. (Eds.): *Antioxidant Methodology : In vivo and in vitro Concepts*. Champaign, Illinois, USA : AOCS Press, 141-172, 1997.
- HAN, S.; FENG, Y.: »Constituents in Volatile Oil of Peilan and Three Plants of the Same Genus«. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 18 (1), 39-41, 1993.
- HARBORNE, J.B. (Ed.): »*The Flavonoids : Advances in Research since 1986*«. London : Chapman and Hall, 1994.
- HARBORNE, J.B. (Ed.): »*The Flavonoids : Advances in Research since 1980*«. London : Chapman and Hall, 1988.
- HARBORNE, J.B.; HEYWOOD, V.H.; KING, L.: »Evolution of Yellow Flavonols in Flowers of Anthemideae«. *Biochemical Systematics and Ecology*, 4, 1-4, 1976.
- HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. (Eds.): »*The Flavonoids : Advances in Research*«. London : Chapman and Hall, 1982.
- HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. (Eds.): »*The Flavonoids*«. London : Chapman and Hall, 1975.
- HASLAM, E.; TURNER, M.J.: »The Shikimate Pathway. Part II. : Conformational Analysis of (-)-Quinic Acid and Its Derivatives by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy«. *Journal of the Chemical Society C*, 1496-1500, 1971.
- HASSAN, M.M.A.; MOSSA, J.S.; TARAGAN, A.H.U.K.: »Terpin Hydrate«. *Analytical Profiles of Drug Substances*, 14, 273-323, 1985.
- HASSON, A.M.; DOBHAL, M.P.; NEGI, G.S.; JOSHI, B.C.: »A Review of the Chemical Constituents in the Genus *Eupatorium*«. *Himalayan Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 12, 1-9a, 1995.
- HASSON, A.M.; DOBHAL, M.P.; NEGI, G.S.; JOSHI, B.C.: »A Review of the Chemical Constituents in the Genus *Eupatorium* Pt. II«. *Himalayan Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 13, 7-13, 1996.
- HASSON, A.M.; DOBHAL, M.P.; NEGI, G.S.; JOSHI, B.C.: »A Review of the Chemical Constituents in the Genus *Eupatorium* (Remaining Part)«. *Himalayan Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 14, 24-39, 1997.
- HEILMANN, J.; MERFORT, I.: »Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden : I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen«. *Pharmazie in unserer Zeit*, 27 (2), 58-65, 1998a.

- HEILMANN, J.; MERFORT, I.: »Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden : II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden«. *Pharmazie in unserer Zeit*, 27 (4), 173-183, 1998.
- HENDRIKS, H.; MALINGRÉ, T. M.; ELEMA, E.T.: »Pyrrolizidine Alkaloids, Flavonoids and Volatile Compounds in the Genus *Eupatorium*«. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 5, 281-286, 1983.
- HERZ, W.: »Sesquiterpene Lactones in the Compositae«. In: HEYWOOD, V.H.; HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. (Eds.): *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Vol. 1. London : Academic Press, 337-357, 1977.
- HERZ, W.: »Recent Development in the Chemistry of Terpenoids from Compositae: The Genus *Eupatorium*«. *Symposium Papers – IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products 11th*, 4 (2), 180-185, 1978.
- HERZ, W.; DE GROOTE, R.; MURARI, R.; KUMAR, N.; BLOUNT, J.F.: »Sesquiterpene Lactones of *Eupatorium serotinum*«. *Journal of Organic Chemistry*, 44 (15), 2784-2788, 1979.
- HERZ, W.; FARKAS, L.; SUDARSANAM, V.; WAGNER, H.; HÖRHAMMER, L.; RÜGER, R.: »Isolierung und Struktur von Axillarin, einem neuen Flavon aus *Iva axillaris* Pursh. ssp. *robustior*«. *Chemische Berichte*, 99, 3539-3543, 1966.
- HERZ, W.; GOVINDAN, S.V.; KUMAR, N.: »Sesquiterpene Lactones and Other Constituents of *Eupatorium lancifolium* and *E. semiserratum*«. *Phytochemistry*, 20 (6), 1343-1347, 1981.
- HERZ, W.; KULANTHAIVEL, P.: »Flavones from *Eupatorium leucolepis*«. *Phytochemistry*, 21 (9), 2363-2366, 1982.
- HERZ, W.; KULANTHAIVEL, P.: »Eudesmanolides and ent-Pimaranes from *Liatris laevigata*«. *Phytochemistry*, 22 (3), 715-720, 1983.
- HERZ, W.; KUMAR, N.; BLOUNT, J.F.: »A Thiol-Containing Ester Side Chain in an Sesquiterpene Lactone from *Eupatorium mikanioides* : Absolute Configuration of Deacetylepaserrin and Its Congeners«. *Journal of Organic Chemistry*, 45 (3), 489-493, 1980.
- HERZ, W.; SUMI, Y.: »Constituents of *Ambrosia hispida* Pursh.«. *Journal of Organic Chemistry*, 29, 3438-3439, 1964.
- HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B.: »*Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*«. 5. Aufl. Stuttgart : Thieme, 1995.
- HEYWOOD, V.H.; HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. (Eds.): »*The Biology and Chemistry of the Compositae*«. Vol. 1. London : Academic Press, 1977.
- HIGUERA, B.L.; DE PÉREZ, C.E.: »Isolation of 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxy-3-O-glucosylflavone from *Ageratina glyptophlebia* and Characterisation of Its Aglycone«. *Revista Colombiana de Química*, 18 (1-2), 55-60, 1989.
- HO, T.-I.; CHENG, M.-C.; PENG, S.-M.; CHEN, F.-C.; TSAU, C.C.: »Structure of Terpin«. *Acta Crystallographica*, C42, 1787-1789, 1986.
- HOENEISEN, M.; SILVA, M.; BOHLMANN, F.: »Sesquiterpene Lactones of *Podanthus mitiqui*«. *Phytochemistry*, 19, 2765-2766, 1980.

- HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.: »Evaluation of the Potential Health Promoting Properties of Flavonoids«. *Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen (Universiteit Gent)*, 62 (4a), 1279-1287, 1997.
- HOLUB, M.; BUDEŠÍNSKÝ, M.; SMÍTALOVÁ, Z.; ŠAMAN, D., RYCHLEWSKA, U.: » Structure of Isosilerolide, Relative and Absolute Configuration of Silerolide and Lasolide - Sesquiterpenic Lactones of New Stereoisomeric Type of Eudesmanolides«. *Collection Czechoslovak Chemistry Communications*, 51, 903-929, 1986.
- HOLUB, M.; SAMEK, Z.; BUDEŠÍNSKÝ, M.; ŠAMAN, D.; BLOSZYK, E.; DROZDZ, B.: »8 α -Hydroxybalchanin – A New Sesquiterpenic Lactone from *Leucanthemella serotina* (L.) Tzvel.«. *Collection Czechoslovak Chemistry Communications*, 47, 2927-2931, 1982.
- HORIE, T.; TSUKAYAMA, M.; KAWAMURA, Y.; YAMAMOTO, S.: »3,5-Dihydroxy-7,8-dimethoxyflavones and Revised Structures for Some Natural Flavones«. *Phytochemistry*, 27 (5), 1491-1495, 1988.
- HUBERT, T.D.; OKUNADE, A.L.; WIEMER, D.F.: »Quadrangolide, a Heliangolide from *Eupatorium quadrangulare*«. *Phytochemistry*, 26 (6), 1751-1753, 1987.
- HUNGRIA, M.; STACEY, G.: »Molecular Signals Exchanged Between Host Plants and Rhizobia : Basic Aspects and Potential Application in Agriculture«. *Soil Biology & Biochemistry*, 29 (5/6), 819-830, 1997.
- ITO, K.; SAKAKIBARA, Y.; HARUNA, M.: »New Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium chinense* var. *simplicifolium* (Makino) Kitam.«. *Chemistry Letters*, 12, 1473-1476, 1979a.
- ITO, K.; SAKAKIBARA, Y.; HARUNA, M.: »New Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium sachalinense* (Fr. Schmidt) Makino«. *Chemistry Letters*, 12, 1503-1506, 1979b.
- ITO, K.; SAKAKIBARA, Y.; HARUNA, M.: »Seven Guaianolides from *Eupatorium Chinense*«. *Phytochemistry*, 21 (3), 715-720, 1982.
- IVIE, G.W.; WITZEL, D.A.: »Sesquiterpene Lactones: Structure, Biological Action, and Toxicological Significance«. In: KEELER, R.F.; TU, A.T. (Eds.): *Handbook of Natural Toxins*. Vol. 1 : Plant and Fungal Toxins. New York, USA : Marcel Dekker, Inc., 544-584, 1983.
- JAKUPOVIC, J.; SUN, H.; BOHLMANN, F.; KING, R.M.: »Further Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium altissimum*«. *Planta Medica*, 53 (1), 97-98, 1987.
- JENSEN, J.B.; TRAGER, W.: »*Plasmodium falciparum* in Culture: Use of Outdated Erythrocytes and Description of the Candle Jar Method«. *Journal of Parasitology*, 63 (5), 883-886, 1977.
- JERGA, C.: »Analyse der Flavonoide und weiterer Inhaltsstoffe der Blüten von *Heterotheca inuloides* Cass. („Mexikanische Arnikablüten“)«. Promotionsschrift, Universität Düsseldorf, 1989.
- JOMAA, H.; WIESNER, J.; SANDERBRAND, S.; ALTINCICEK, B.; WEIDEMEYER, C.; HINTZ, M.; TÜRBAČHOVA, I.; EBERL, M.; ZEIDLER, J.; LICHTENTHALER, H.K.; SOLDATI, D.; BECK, E.: »Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs«. *Science*, 285, 1573-1576, 1999.

- JUNGMAIR, P.: »Malariaphylaxe mit Tafenoquin : Drei Tage Einnahme – sieben Wochen Schutz«. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 140 (30), 3463-3465, 2000.
- JURD, L.: »Aluminium Complexes of Phenolic Flavones : Spectral and Structural Correlations«. *Phytochemistry*, 8, 445-462, 1969.
- KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.: »Flavonoids as Antioxidants«. In: SHAHIDI, F. (Ed.): *Natural Antioxidants*. Champaign, Illinois, USA : AOCS Press, 174-203, 1997.
- KAPLAN, N.O.; CIOTTI, M.M.; STOLZENBACH, F.E.: »Reaction of Pyridine Nucleotide Analogues with Dehydrogenases«. *Journal of Biological Chemistry*, 221, 833-844, 1956.
- KAYSER, F.H.: »*Medizinische Mikrobiologie*«. 9. Aufl. Stuttgart : Thieme, 530-548, 1998.
- KELLEY, C.J.; HARRUFF, R.C.; CARMACK, M.: »The Polyphenolic Acids of *Lithospermum ruderale*. II. : Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Lithospermic and Rosmarinic Acids«. *Journal of Organic Chemistry*, 41 (3), 449-455, 1976.
- KHAJURIA, R.K.; SURI, K.A.; SURI, O.P.; ATAL, C.K.: »3,5,4'-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavone 3-glucoside from *Sesuvium portulacastrum*«. *Phytochemistry*, 21 (5), 1179-1180, 1982.
- KHALID, S.A.; WATERMAN, P.G.: »Alkaloid, Lignan and Flavonoid Constituents of *Haplophyllum tuberculatum* from Sudan«. *Planta Medica*, 43, 148-152, 1981.
- KHAN, M.A.S.; MOONEY, E.F.; STEPHEN, W.I.: »A Structural Study of the Methyleneiminodiacetic Acid Derivatives of Some 7-Hydroxycoumarins«. *Analytica Chimica Acta*, 43, 153-156, 1968.
- KIANG, A.K.; SIM, K.Y.; GOH, J.: »Constituents of *Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Robinson (Compositae). : Isolation of Mikanin, Epifriedelinol, and Fumaric Acid; the Structure of Mikanin«. *Journal of the Chemical Society*, 6371-6374, 1965.
- KIANG, A.K.; SIM, K.Y.; YOONG, S.W.: »Constituents of *Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Robinson (Compositae) – II.«. *Phytochemistry*, 7, 1035-1037, 1968.
- KINGSTON, D.G.I.: »Mass Spectrometry of Organic Compounds-VI : Electron-Impact Spectra of Flavonoid Compounds«. *Tetrahedron*, 27, 2691-2700, 1971.
- KIREDJIAN, M.; SMITH, D.M.: »A Chemosystematic Investigation on *Ipomopsis*«. *Biochemical Systematics and Ecology*, 13 (2), 141-143, 1985.
- KING, R. M.; ROBINSON, H.: »Studies in the Eupatorieae (Compositae). : XIX. New Combinations in *Ageratina*«. *Phytologia*, 19 (4), 208-229, 1970a.
- KING, R. M.; ROBINSON, H.: »*Eupatorium*, a Composite Genus of Arcto-Tertiary Distribution«. *Taxon*, 19, 769-774, 1970b.
- KING, R. M.; ROBINSON, H.: »Compositae in Flora of Guatemala: A Review«. *Taxon*, 26 (4), 435-442, 1977.
- KING, R.M.; ROBINSON, H.: »The Genera of the Eupatorieae (Asteraceae)«. In: *Monographs in Systematic Botany from The Missouri Botanical Garden*. Vol. 22, Lawrence, Kansas (USA) : Allen Press, 1987.

- KOTOV, A.G.; DARMOGRAI, R.E.; ROSIK, G.G.; KOMISSARENKO, N.F.; LADNAYA, L.Y.: »Sesquiterpene Lactones of *Eupatorium cannabinum*«. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 1990 (3), 411-412, 1990.
- KRISHNASWAMY, N.R.; SESHADRI, T.R.; TAHIR, P.J.: »Nepitrin, a New Flavone Glucoside from *Nepeta hindostana* & Revision of the Structure of Pedaliin«. *Indian Journal of Chemistry*, 6, 676-677, 1968.
- KUPCHAN, S.M.; KELSEY, J.E.; MARUYAMA, M.; CASSADY, J.M.; HEMINGWAY, J.C.; KNOX, J.R.: »Tumor Inhibitors. XLI. Structural Elucidation of Tumor-Inhibitory Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium rotundifolium*«. *The Journal of Organic Chemistry*, 34 (12), 3876-3883, 1969a.
- KUPCHAN, S.M.; SIGEL, C.W.; HEMINGWAY, R.J.; KNOX, J.R.; UDAYAMURTHY, M.S.: »Tumor Inhibitors-XXXIII. : Cytotoxic Flavones from *Eupatorium* Species«. *Tetrahedron*, 25, 1603-1615, 1969b.
- KUPCHAN, S.M.; MARUYAMA, M.; HEMINGWAY, R.J.; HEMINGWAY, J.C.; SHIBUYA, S.; FUJITA, T.: »Structural Elucidation of Novel Tumor-Inhibitory Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium cuneifolium*«. *Journal of Organic Chemistry*, 38 (12), 2189-2196, 1973.
- KWIATKOWSKI, D.; MARSH, K.: »Development of a Malaria Vaccine«. *The Lancet*, 350, 1696-1701, 1997.
- LACAILLE-DUBOIS, M.-A.; WAGNER, H.: »Importance Pharmacologique des Dérivés Polyphénoliques«. *Acta Botanica Gallica*, 143 (6), 555-562, 1996.
- LELL, B.; FAUCHER, J.-F.; ANOUMOU MISSINOU, M.; BORRMANN, S.; DANGELMAIER, O.; HORTON, J.; KREMSNER, P.G.: »Malaria Chemoprophylaxis with Tafenoquine: A Randomised Study«. *The Lancet*, 355, 2041-2045, 2000.
- LI, Y.; DING, Z.; DING, J.: »Chemical Constituents from *Eupatorium adenophorum*«. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, 19 (2), 196-200, 1997.
- LI, R., FANG, N.; MABRY, T.J.: »Flavonoids from *Brickellia scoparia*«. *Journal of Natural Products*, 49 (4), 732-733, 1986.
- LICHTENTHALER, H.K.; ZEIDLER, J.; SCHWENDER, J.; MÜLLER, C.: »The Non-Mevalonate Isoprenoid Biosynthesis of Plants as a Test System for New Herbicides and Drugs Against Pathogenic Bacteria and the Malaria Parasite«. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55c, 305-313, 2000.
- LINDAHL, M.; TAGESSON, C.: »Flavonoids as Phospholipase A₂ Inhibitors : Importance of Their Structure for Selective Inhibition of Group II Phospholipase A₂«. *Inflammation*, 21 (3), 347-356, 1997.
- LIU, K.; ROEDER, E.; CHEN, H.L.; XIU, X.J.: »Pyrrolizidine Alkaloids from *Eupatorium fortunei*«. *Phytochemistry*, 31 (7), 2573-2574, 1992.
- LIU, K.C.-S.; YANG, S.-H.; ROBERTS, M.F.; PHILLIPSON, J.D.: »Flavonol Glycosides with Acetyl Substitution from *Kalanchoe gracilis*«. *Phytochemistry*, 28 (10), 2813-2818, 1989.
- LYB, G.; GLASL, S.; JURENITSCH, J.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.: »A Sesquiterpene and Sesquiterpene Lactones from the *Achillea millefolium* Group Possess Antiinflammatory

Properties but Do not Inhibit the Transcription Factor NF- κ B«. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 10 (1), 13-15, 2000.

LYß, G.; SCHMIDT, T.J.; MERFORT, I.; PAHL, H.L.: »Helenalin, an Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone from *Arnica*, Selectively Inhibits Transcription Factor NF- κ B«. *Biological Chemistry*, 378, 951-961, 1997.

MABRY, T.J.; BOHLMANN, F.: »Summary of the Chemistry of the Compositae«. In: HEYWOOD, V.H.; HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. (Eds.): *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Vol. 2. London : Academic Press, 1097-1104, 1977.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. (Hrsg.): »The Systematic Identification of Flavonoids«. New York : Springer, 1970.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P.: »¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features«. *Phytochemistry*, 37 (6), 1517-1575, 1994.

MAILLARD, M.; ADEWUNMI, C.O.; HOSTETTMANN, K.: »A Triterpene Glycoside from the Fruits of *Tetrapleura tetraptera*«. *Phytochemistry*, 31 (4), 1321-1323, 1992.

MAKLER, M.T.; HINRICHS, D.J.: »Measurement of the Lactat Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum* as an Assessment of Parasitaemia«. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48 (2), 205-210, 1993.

MAKLER, M.T.; RIES, J.M.; WILLIAMS, J.A.; BANCROFT, J.E.; PIPER, R.C.; GIBBINS, B.L.; HINRICHS, D.J.: »Parasite Lactat Dehydrogenase as an Assay for *Plasmodium falciparum* Drug Sensitivity«. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48 (6), 739-741, 1993.

MARKHAM, K.R. »*Techniques of Flavonoid Identification*«. London : Academic Press, 1982.

MATTOCKS, A.R.: »Spectrophotometric Determination of Unsaturated Pyrrolizidine Alkaloids«. *Analytical Chemistry*, 39 (4), 443-447, 1967a.

MATTOCKS, A.R.: »Spectrophotometric Determination of Pyrrolizidine Alkaloids – Some Improvements«. *Analytical Chemistry*, 40 (11), 1749-1750, 1968.

MATTOCKS, A.R.: »Detection of Pyrrolizidine Alkaloids on Thin-Layer Chromatograms«. *Journal of Chromatography*, 27, 505-508, 1967b.

MEARS, J.A.; MABRY, T.J.: »A Procedure for the UV Detection of Hydroxyl and Methoxyl Groups at C6 in Flavones and 3-O-Substituted Flavonols«. *Phytochemistry*, 11, 411-412, 1972.

MEDINA, J.H.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; CALVO, D.; PALADINI, A.C.: »Overview-Flavonoids: A New Family of Benzodiazepine Receptor Ligands«. *Neurochemical Research*, 22 (4), 419-425, 1997.

MEDINILLA, J.C.; DE GARCÍA, G.A.: »Aspectos de la Medicina Popular en el Área Rural de Guatemala«. *Guatemala Indígena*, 13 (3-4), 13 (Appendix), 1978.

MEIER, U.: »Untersuchungen zur Toxizität von *Iphiona aucheri* Boiss.«. Promotionsschrift, Universität Bonn, 1993.

- MEJÍA, J.V.: »*Geografía Descriptiva de la República de Guatemala*«. Guatemala : Tipografía Sánchez & De Guise, 127-139, 1922.
- MELEK, F.R.; GAGE, D.A.; MABRY, T.J.: »Isolation of Provincialin from *Ageratina cronquistii*«. *Journal of Natural Products*, 48 (2), 331-332, 1985.
- MENDEZ, A.M.; ROSQUETE, C.: »Flavonoids from *Ageratina stevioides* (Steyermark) R.M. King & Robinson«. *Revista Latinoamericana de Química*, 19 (2), 47-49, 1988.
- MERFORT, I.: »Untersuchungen zur Flavonoidführung der Gattung *Arnica* unter besonderer Berücksichtigung der arzneilich verwendeten Arnikablüten DAB 9«. Habilitationsschrift, Universität Düsseldorf, 1990.
- MERFORT, I.; MARCINEK, C.; EGGERT, A.: »Flavonoid Distribution in *Arnica* subgenus *chamissonis*«. *Phytochemistry*, 25 (12), 2901-2903, 1986.
- MERFORT, I.; WENDISCH, D.: »Flavonoidglycoside aus *Arnica montana* und *Arnica chamissonis*«. *Planta Medica*, 53 (5), 434-437, 1987.
- MERRILL, G.B.; STEVENS, K.L.: »Sesquiterpene Lactones from *Centaurea solstitialis*«. *Phytochemistry*, 24 (9), 2013-2018, 1985.
- MERZ, K.W.; WU, Y.H.: »Über die Glykoside der Blüten von *Linaria vulgaris* L.: Die Konstitution des Linarins und des Pektolarins«. *Archiv der Pharmazie*, 274, 126-148, 1936.
- MESHNICK, S.R.; TAYLOR, T.E.; KAMCHONWONGPAISAN, S.: »Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides : From Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy«. *Microbiological Reviews*, 60 (2), 301-315, 1996.
- METZ, G.: »Polyphenole : Einfache Strukturen mit hohem Potential«. *Pharmazeutische Zeitung*, 145 (16), 1273-1278, 2000.
- METZ, G.: »Flavonoide Teil II : Trotz Resorptionsschwächen gut wirksam«. *Pharmazeutische Zeitung*, 145 (27), 2206-2208, 2000.
- MØLGAARD, P.; RAVN, H.: »Evolutionary Aspects of Caffeoyl Ester Distribution in Dicotyledons«. *Phytochemistry*, 27 (8), 2411-2421, 1988.
- MOLINA R., A.: »Enumeración de las Plantas de Honduras«. *Ceiba*, 19 (1), 1-118, 1975.
- MOLINEUX, R.J.: »Isolation, Characterization and Analysis of Polyhydroxy Alkaloids«. *Phytochemical Analysis*, 4, 193-204, 1993.
- MORALES MÉNDEZ, A.; ROSQUETTE, C.: »Flavonoides de la *Ageratina Stevioides* (Steyermark) R.M. King & H. Robinson«. *Revista Latinoamericana de Química*, 19 (2), 47-49, 1988.
- MORENO, B.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTOLO, G.B.: »Flavones and Kauranoid Diterpenes from *Eupatorium tinifolium* H.B.K.«. *Il Farmaco – Edizione Scientifica*, 35 (6), 457-464, 1980.
- MORISHITA, H.; IWAHASHI, H.; OSAKA, N.; KIDO, R.: »Chromatographic Separation and Identification of Naturally Occurring Chlorogenic Acids by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry«. *Journal of Chromatography*, 315, 253-260, 1984.

- MORTON, J.F.: »Atlas of Medicinal Plants of Middle America : Bahamas to Yucatan«. Springfield, Illinois : Charles C. Thomas, 933-934, 1981.
- MÜLLER-BOHN, T.: »Neuer Ansatz zur Malariatherapie«. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 140 (11), 1188-1190, 2000.
- MUES, R.; TIMMERMAN, B.N.; OHNO, N.; MABRY, T.J.: »6-Methoxyflavonoids from *Brickellia californica*«. *Phytochemistry*, 18, 1379-1383, 1979.
- MURRAY, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A.: »The Natural Coumarins : Occurrence, Chemistry and Biochemistry«. Chichester : John Wiley & Sons Ltd., 1982.
- MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; COUSSIO, J.: »5,7,5'-Trihydroxy-3,6,2',4'-tetramethoxyflavone from *Eupatorium buniifolium*«. *Phytochemistry*, 36 (4), 1085-1086, 1994.
- NASH, D.; WILLIAMS, L.O. (Eds.): »Compositae«. In: *Fieldiana Botany : Flora of Guatemala*. Bd. 24 (12). Chicago, Illinois : Field Museum of Natural History, 96-97, 1976.
- NEU, R.: »Chelate von Diarylborsäuren mit aliphatischen Oxyalkylaminen als Reagenzien für den Nachweis von Oxyphenyl-Benzopyronen«. *Naturwissenschaften*, 44, 181, 1957.
- NIELSEN, J.G.; NØRGAARD, P.; HJEDS, H.: »Flavonoids of *Lotus* L. : II. Synthesis of the Flavonols Corniculatusin and Patuletin«. *Acta Chemica Scandinavica*, 24 (2), 724-726, 1970.
- NORRIS, J.A.; MABRY, T.J.: 6-Methoxyflavonoids of *Brickellia monocephala*«. *Journal of Natural Products*, 48 (4), 668, 1985.
- OBER, A.G., QUIJANO, L., FISCHER, N.H.: »Eudesmanolides, Trichomatolides B-E, and a Heliangolide from *Calea trichomata*«. *Phytochemistry*, 23 (7), 1439-1443, 1984.
- OELRICHS, P.B.; CALANASAN, C.A.; MACLEOD, J.K.; SEAWRIGHT, A.A.; NG, J.C.: »Isolation of a Compound from *Eupatorium adenophorum* (Spreng.) [*Ageratina adenophora* (Spreng.)] Causing Hepatotoxicity in Mice«. *Natural Toxins*, 3 (5), 350-354, 1995.
- OKUNADE, A.L.; WIEMER, D.F.: »Ant-Repellent Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium quadrangulare*«. *Phytochemistry*, 24 (6), 1199-1201, 1985.
- OSWIECIMSKA, M.; SENDRA, J.: »*Eupatorium cannabinum* L. : Part I. Search for Biologically Active Fraction«. *Dissertationes Pharmaceuticae et Pharmacologicae*, 24 (5), 475-483, 1972.
- PAGANI, F.; ROMUSSI, G.: »Constituents of *Eupatorium cannabinum* L., var. *Syriacum* (Jacq.)«. *Farmaco Edizione Pratica*, 22 (12), 771-785, 1967.
- PAßREITER, C.M.: »Untersuchungen zur Inhaltsstoffführung der Blüten von *Arnica sachalinensis* (Regl.) A. Gray und *Arnica amplexicaulis* Nutt. sowie Identifizierung eines Epoxythymolderivates als Kontaktallergen von *Arnica sachalinensis*«. Promotionsschrift, Universität Düsseldorf, 1990.
- PAßREITER, C.M.: »Pyrrolizidine Alkaloids from *Neurolaena lobata*«. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, 839-843, 1998.
- PAßREITER, C. M.: »Co-Occurrence of 2-Pyrrolidineacetic Acid with the Pyrrolizidines Tussilaginic Acid and Isotussilaginic Acid and Their 1-Epimers in *Arnica* Species and *Tussilago farfara*«. *Phytochemistry*, 31 (12), 4135-4137, 1992.

- PABREITER, C.M.; WILLUHN, G.; RÖDER, E.: »Tussilagine and Isotussilagine: Two Pyrrolizidine Alkaloids in the Genus *Arnica*«. *Planta Medica*, 58, 556-557, 1992.
- PÉREZ C., A.L.; DEL C. COLIN V., M.; GUERRERO R., C.; DE LA LUZ CRUZ R., M., ROMO DE VIVAR R., A.: »Sesquiterpene Lactones from *Tithonia rotundifolia*«. *Phytochemistry*, 23 (4), 823-827, 1984.
- PICMAN, A.K.: »Biological Activities of Sesquiterpene Lactones«. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14 (3), 255-281, 1986.
- PROKSCH, P.; RODRIGUEZ, E.: »Chromenes and Benzofurans of the Asteraceae, their Chemistry and Biological Significance«. *Phytochemistry*, 22 (11), 2335-2348, 1983.
- PROKSCH, P.; SIEBERTZ, R.: »*Eupatorium cannabinum* L. (Hemp Agrimony): In Vitro Culture and the Production of Benzofurans«. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.): *Biotechnology in Agriculture and Forestry 21 : Medicinal and Aromatic Plants IV*. Berlin : Springer, 148-161, 1993.
- PROKSCH, P.; WITTE, L.; WRAY, V.: »Chromene Glycosides from *Ageratina altissima*«. *Phytochemistry*, 27 (11), 3690-3691, 1988.
- PROKSCH, P.; WRAY, V.; ISMAN, M.B.; RAHAUS, I.: »Ontogenetic Variation of Biologically Active Natural Products in *Ageratina adenophora*«. *Phytochemistry*, 29 (2), 453-457, 1990.
- QUIJANO, L.; MALANCO, F.; RÍOS, T.: »The Structures of Eupalin and Eupatolin, Two New Flavonol Rhamnosides Isolated from *Eupatorium ligustrinum* D.C.«. *Tetrahedron*, 26, 2851-2859, 1970.
- RIDLEY, R.G.: »Planting the Seeds of New Antimalarial Drugs«. *Science*, 285, 1502-1503, 1999.
- RILEY, E.: »Malaria Vaccines: Current Status and Future Prospects«. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49 (Suppl. 2), 21-27, 1997.
- RIZK, A.-F.M.: »The Pyrrolizidine Alkaloids: Plant Sources and Properties«. In: RIZK, A.-F.M. (Ed.): *Naturally Occuring Pyrrolizidine Alkaloids*. Boca Raton, Florida (USA) : CRC Press, 1-90, 1991.
- ROBINSON, H.; KING, R.M.: »Comments on the Generic Concepts in the Eupatorieae«. *Taxon*, 34 (1), 11-16, 1985.
- ROBINSON, R.; SCHWARZENBACH, G.: »Transitions from a Flavylum Salt to a Flavone, Illustrated by a New Synthesis of Scutellarein Tetramethyl Ether«. *Journal of the Chemical Society*, 822-830, 1930.
- ROBINSON, R.; VENKATARAMAN, K.: »A Synthesis of Acacetin and Certain Other Derivatives of Flavone«. *Journal of the Chemical Society*, 128, 2344-2348, 1926.
- RODRÍGUEZ, J.; TELLO, H.; QUIJANO, L.; CALDERÓN, J.; GÓMEZ, F.; ROMO, J.; RÍOS, T.: »Flavonoides de Plantas Mexicanas Aislamiento y Estructura de la Santina y de la Glucoferida«. *Revista Latinoamericana de Química*, 5 (1), 41-53, 1974.
- RÖDER, E.: »Pyrrolizidinalkaloidhaltige Arzneipflanzen«. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 132 (45), 2427-2435, 1992.

RÖDER, E.: »Medicinal Plants in Europe Containing Pyrrolizidine Alkaloids«. *Pharmazie*, 50, 83-98, 1995.

RÖDER, E.: Persönliche Mitteilung während des GA-Kongresses in Wien, 1998.

RÖDER, E.; ECKERT, A.; BOURAUDEL, T.: »Pyrrolizidine Alkaloids from *Petasites spurius*«. *Pharmazie*, 48 (12), 953-954, 1993.

RÖDER, E.; NEUBERGER, V.: »Pyrrolizidin-Alkaloide in *Symphytum*-Arten«. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 128 (39), 1991-1994, 1988.

RÖDER, E.; WIEDENFELD, H.; HILLE, T.; BRITZ-KIRSTGEN, R.: »Pyrrolizidine in *Echinacea angustifolia* DC. und *Echinacea purpurea* M.«. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 124 (45), 2316-2318, 1984a.

RÖDER, E.; WIEDENFELD, H.; JOST, E.-J.: »Synthese der Pyrrolizidine ($\pm$)-Tussilagin und ($\pm$)-Isotussilagin«. *Archiv der Pharmazie*, 317, 403-407, 1984b.

RÖDER, E.; WIEDENFELD, H.; JOST, E.-J.: »Tussilagin – ein neues Pyrrolizidin-Alkaloid aus *Tussilago farfara*«. *Planta Medica*, 43 (1), 99-102, 1981.

RÖSLER, K.-H.A.; WONG, D.P.C.; MABRY, T.J.: »Problems with Ultraviolet Spectroscopy of Flavonoids Using Sodium Acetate in Methanol«. *Journal of Natural Products*, 48 (5), 837-840, 1985.

RÖSLER, K.-H.A.; GOODWIN, R.S.; MABRY, T.J.; VARMA, S.D.; NORRIS, J.: »Flavonoids with Anti-Cataract Activity from *Brickellia arguta*«. *Journal of Natural Products*, 47 (2), 316-319, 1984.

ROMO, J.; RÍOS, T.; QUIJANO, L.: »Ligustrin, a Guaianolid Isolated from *E. ligustrinum* DC«. *Tetrahedron*, 24, 6087-6091, 1968.

ROJAS, A.; CASTRO, V.; CICCIO, J. F.; TAMAYO, G.: »Estudio Fitoquímico de *Ageratina ligustrina* (D.C.) King et Rob. (Compositae)«. *Ingeniería y Ciencia Química*, 12 (1-2), 10-11, 1988.

RÜCKER, D.: »Plasmodien-Untermieter ist die Schwachstelle«. *Pharmazeutische Zeitung*, 144 (36), 2845-2847, 1999.

RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G.G.: »Instrumentelle Pharmazeutische Analytik«. 2. Aufl. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1992.

RÜCKER, G.; SCHENKEL, E.P.; MANNS, D.; MAYER, R.; HEIDEN, K.; HEINZMANN, B.M.: »Sesquiterpene Peroxides from *Senecio selloi* and *Eupatorium rufescens*«. *Planta Medica*, 62, 565-566, 1996.

SACHS, L.: »Angewandte Statistik : Anwendung statistischer Methoden«. 9. Aufl. Berlin : Springer, 1999.

SAGAREISHVILI, T.G.: »Composition of the Nonpolar Part of *Eupatorium micranthum*«. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1980 (6), 833, 1980.

SAGAREISHVILI, T.G.: »Flavonoids of *Eupatorium micranthum*«. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 5, 710, 1985.

- SAGAREISHVILI, T.G.; ALANIYA, M.D.; TSITSISHVILI, V.G.; KEMERTELIDZE, E.P.: »Micranthoside – A New Glycoside from *Eupatorium micranthum*«. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 3, 298-303, 1981.
- SAKAKIBARA, M.; MABRY, T.J.: »A Procedure for Distinguishing 5-Hydroxyl-6-Methoxyl from 5,6-Dihydroxyl Systems in Flavones and 3-O-Substituted Flavonols«. *Revista Latinoamericana de Química*, 8, 99-100, 1977.
- SALEH, N.A.M.; EL-NEGOUMY, S.I.; ABD-ALLA, M.F.; ABOU-ZAID, M.M.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J.: »Flavonoid Glycosides of *Artemisia monosperma* and *A. herba-alba*«. *Phytochemistry*, 24 (1), 201-203, 1985.
- SALEH, N.A.M.; BOHM, B.A.; ORNDUFF, R.: »Flavonoids of *Lasthenia conjugens* and *Lasthenia fremontii*«. *Phytochemistry*, 10, 611-614, 1971.
- SCHMELLER, T.; EL-SHAZLY, A.; WINK, M.: Allelochemical Activities of Pyrrolizidine Alkaloids: Interactions With Neuroreceptors and Acetylcholine Related Enzymes«. *Journal of Chemical Ecology*, 23 (2), 399-416, 1997.
- SCHMIDT, H.: »Über *cis*- und *trans*-Sobrerol (optisch-aktives Pinolhydrat)«. *Chemische Berichte*, 86 (11), 1437-1444, 1953.
- SCHMIDT, T.J.: »Sesquiterpenlactone, Diterpene, Flavonoidaglyka und weitere Inhaltsstoffe der Blütenkörbchen von *Arnica angustifolia* Vahl und ihren Unterarten«. Promotionsschrift, Universität Düsseldorf, 1994.
- SCHMIDT, T.J.: »Toxic Activities of Sesquiterpene Lactones: Structural and Biochemical Aspects«. *Current Organic Chemistry*, 3 (6), 577-608, 1999.
- SCHMIDT, T.J.; MERFORT, I.; MATTHIESEN, U.: »Resolution of Complex Mixtures of Flavonoid Aglycones by Analysis of Gas Chromatographic - Mass Spectrometric Data«. *Journal of Chromatography*, 634, 350-355, 1993.
- SCHMIDT, T.J.; MERFORT, I.; WILLUHN, G.: »Gas Chromatography - Mass Spectrometry of Flavonoid Aglycones II. : Structure-Retention Relationships and a Possibility of Differentiation Between Isomeric 6- and 8-Methoxyflavones«. *Journal of Chromatography A*, 669, 236-240, 1997.
- SCHÜNGEL, J.; PASSREITER, C.M.: »2-Pyrrolidineacetic Acid and Pyrrolizidine Alkaloids from *Melampodium divaricatum*«. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 705-706, 2000.
- SEAMAN, F.C.: »Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in the Asteraceae«. *The Botanical Review*, 48 (2), 121-551, 1982.
- SEAMAN, F.; BOHLMAN, F.; ZDERO, C. ; MABRY, T.J.: »Diterpenes of Flowering Plants : *Compositae* (Asteraceae)«. New York : Springer, 1990.
- SEKIOKA, T.; SHIBANO, M.; KUSANO, G.: »Three Trihydroxypiperidines, Glycosidase Inhibitors, from *Eupatorium fortunei* TURZ«. *Natural Medicines*, 49 (3), 332-335, 1995.
- SENER, B.; ERGUN, F.: »Pyrrolizidine Alkaloids from *Tussilago farfara* L.«. *Journal of the Faculty of Pharmacy Gazi University*, 10 (2), 137-141, 1993.

- SENER, B., ERGUN, F.: »Pyrolizidine Alkaloids from *Petasites hybridus* (L.) Gaertner«. *Journal of the Faculty of Pharmacy Gazi University*, 13 (2), 171-173, 1996.
- SHAFIZADEH, F.; MELNIKOFF, A.B.: »Coumarins of *Artemisia tridentata* ssp. *vaseyana*«. *Phytochemistry*, 9, 1311-1316, 1970.
- SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K.; KURADE, N.P.; SHARMA, P.D.: »A Review of the Toxicosis and Biological Properties of the Genus *Eupatorium*«. *Natural Toxins*, 6, 1-14, 1998.
- SHERMAN, I.W.: »Heterogeneity of Lactate Dehydrogenase in Avian Malaria Demonstrated by the Use of Coenzyme Analogues«. *Proceedings of the First International Congress of Parasitology*, A2, 73, 1966.
- SIM, K.Y.: »The Syntheses of Mikanin, Combretol, and 3,5,7-Trihydroxy-2'-methoxyflavone, and the Purification of Flavones by Sublimation«. *Journal of the Chemical Society (C)*, 976-979, 1967.
- SKIBINSKI, A.: »Untersuchungen zur Sesquiterpenlacton- und Flavonoidaglykaführung der Blüten von *Arnica longifolia* Eat.«. Promotionsschrift, Universität Düsseldorf, 1990.
- SMITH, D.M.; GLENNIE, C.W.; HARBORNE, J.B.: »Identification of Eupalitin, Eupatolitin and Patuletin Glycosides in *Ipomopsis aggregata*«. *Phytochemistry*, 10, 3115-3120, 1971.
- STEVENS, J.F.: Persönliche Mitteilung während eines Arbeitstreffens in Groningen, 2000.
- STEVENS, J.F.; ELEMA, E.T.; WOLLENWEBER, E.: »Exudate Flavonoids of *Eupatorium cannabinum*«. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23 (4), 451-452, 1995.
- STEVENS, J.F.; IVANCIC, M.; HSU, V.L.; DEINZER, M.L.: »Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*«. *Phytochemistry* 44 (8), 1575-1585, 1997.
- SUGA, T.; HIRATA, T.; AOKI, T.: »An X-Ray Crystallographic Study on *cis-trans* Configurational Assignment to „*cis*-“ and „*trans*-1,8-Terpins“ and a Proposal of New Designation for Discriminating between the Configurational Isomers«. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 55 (3), 914-917, 1982.
- SUTHERLAND, C.H.N.: »Plantas Comunes de Honduras : Tomo II«. In: *Colección Docencia*. Bd. 40. Tegucigalpa, Honduras : Editorial Universitaria, 1986.
- TAKAHASHI, T.; ICHIMURA, T.; MURAE, T.: »Antitumor Agents of *Eupatorium sachalinense* : Hiyodorilactone D, E and F«. *Koen Yoshishu – Koryo, Terupen oyobi Seiyu Kagaku ni kansuru Toronkai*, 23, 273-275, 1979.
- TALAPATRA, S.K.; PAL, M.K.; MALLIK, A.K.; TALAPATRA, B.: »Chemical Constituents of *Eupatorium erythropappum* : Eupathronoside – A New Flavanone Glucoside and (-)-1S,2R,4S,5R-2,5-Dihydroxy-*p*-menthane – A New Monoterpene Diol«. *Journal of the Indian Chemical Society*, 62 (12), 999-1002, 1985.
- TAMAYO-CASTILLO, G.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; ROJAS, A.; CASTRO, V.; KING, R.M.: »Germacranolides and Other Constituents from *Ageratina* Species«. *Phytochemistry*, 27 (9), 2893-2897, 1988.
- TAYLOR, A.O.; WONG, E.: »Quercetageitin 3,6-dimethyl Ether«. *Tetrahedron Letters*, 41, 3675-3678, 1965.

THOMAS, M.B.; MABRY, T.J.: »Flavonoid Constituents of *Hymenoxys scaposa* DC. (Compositae)«. *Phytochemistry*, 7, 787-790, 1968.

TIMMERMAN, B.N.; HOFFMANN, J.J.; JOLAD, S.D.; SCHRAM, K.H.; KLENCK, R.E.; BATES, R.B.: »Constituents of *Chrysanthamnus paniculatus* 3 : 3,4,5-Tricaffeoylquinic Acid (a New Shikimate Prearomatic) and 3,4-, 3,5- and 4,5-Dicaffeoylquinic Acids«. *Journal of Natural Products*, 46 (3), 365-368, 1983.

TIMMERMAN, B.N.; MUES, R.; MABRY, T.J.; POWELL, A.M.: »6-Methoxyflavonoids from *Brickellia laciniata* (Compositae)«. *Phytochemistry*, 18, 1855-1858, 1979.

TORRENEGRA, R.D.; PEDROZO, J.A.; ESCARRIA, S.: »Flavonoides de *Eupatorium gracile*«. *Revista Latinoamericana de Química*, 15 (3), 129-130, 1984.

TURNER, B.L.: »The Comps of Mexico : A Systematic Account of the Family Asteraceae : Volume 1: Eupatorieae«. In: WARNOCK, M.J. (Hrsg.): *Phytologia Memoirs*. Vol. 11. Huntsville, Texas, USA : University of Texas, 1997.

ULUBELEN, A.; MABRY, T.J.; AYNECHI, Y.: »Flavonoids of *Anvillea garcini*«. *Journal of Natural Products*, 42 (6), 624-626, 1979.

ULUBELEN, A.; TIMMERMAN, B.N.; MABRY, T.J.: »Flavonoids from *Brickellia chlorolepis* and *B. dentata*«. *Phytochemistry*, 19, 905-908, 1980.

VALECHA, N.; TRIPATHI, K.D.: »Artemisinin: Current Status in Malaria«. *Indian Journal of Pharmacology*, 29 (2), 71-75, 1997.

VAN AGTMAEL, M.; EGGELTE, T.A.; VAN BOXTEL, C.J.: »Artemisinin Drugs in the Treatment of Malaria : From Medicinal Herb to Registered Medication«. *TiPS*, 20 (5), 199-205, 1999.

VOIRIN, B.: »UV Spectral Differentiation of 5-Hydroxy- and 5-Hydroxy-3-Methoxyflavones with Mono-(4'), Di-(3',4') or Tri-(3',4',5')-Substituted B Rings«. *Phytochemistry*, 22 (10), 2107-2145, 1983.

VROMAN, J.A.; ALVIM-GASTON, M.; AVERY, M.A.: »Current Progress in the Chemistry, Medicinal Chemistry and Drug Design of Artemisinin Based Antimalarials«. *Current Pharmaceutical Design*, 5, 101-138, 1999.

WAGNER, H.; HÖRHAMMER, L.; HÖER, R.; FARKAS, L.: »Notiz über die Synthese des Mikanins, eines Flavonols aus *Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Robinson«. *Chemische Berichte*, 100, 1768-1769, 1967.

WAISS, A.C.; LUNDIN, R.E.; CORSE, J.: »The N.M.R. Spectra of Chlorogenic Acids«. *Chemistry and Industry*, 1984-1985, 1964.

WERNERY, U.; BOURAUDEL, T.; RÖDER, E.; MEIER, U.; WIEDENFELD, H.: »Toxic Diterpene Glycosides from *Iphiona aucheri*«. *Fitoterapia*, 68, 278-280, 1997.

WIEDENFELD, H.; LEBADA, R.; KOPP, B.: »Pyrrolizidinalkaloide im Huflattich«. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 135 (12), 1037-1046, 1995.

WIEDENFELD, H.; RÖDER, E.; KIRFEL, A.; WILL, G.: »Die absolute Konfiguration des Pyrrolizidin-Alkaloids Tussilagin«. *Archiv der Pharmazie*, 316, 367-371, 1983.

- WILLIAMS, C.A.: »The Systematic Implications of the Complexity of Leaf Flavonoids in the Bromeliaceae«. *Phytochemistry*, 17, 729-734, 1978.
- WILLIAMS, L.O.: »Tropical American Plants, XVII«. *Fieldiana Botany*, 36 (10), 77-110, 1975.
- WISEMAN, H.; O'REILLY, J.: »Influence of the Dietary Flavonoid Quercetin on the Cardioprotective Antioxidant Action of Oestrogen and Phytoestrogens«. *Biochemical Society Transactions*, 25 (1), 108S, 1997.
- WITTE, L.; RUBIOLO, P.; BICCHI, C.; HARTMANN, T.: »Comparative Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids from Natural Sources by Gas Chromatography - Mass Spectrometry«. *Phytochemistry*, 32 (1), 1993.
- WOERDENBAG, H.J. : »*Eupatorium cannabinum* L. A Review Emphasizing the Sesquiterpene Lactones and Their Biological Activity«. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 8, 245-251, 1986.
- WOERDENBAG, H.J.: »*Eupatorium* Species«. In: DE SMET, P.A.G.M.; KELLER, K.; HÄNSEL, R.; CHANDLER, F. (Eds.): *Adverse Effects of Herbal Drugs*. Vol. 2. Berlin : Springer, 171-194, 1993.
- WOLLENWEBER, E.: »Dünnschicht-Chromatographie von Flavonoiden auf Polyamid-Platten«. *Supplement Chromatographie* 1982. Darmstadt : GIT-Verlag, 50-54, 1982.
- WOLLENWEBER, E.; DÖRR, M.; BEYER, M.; SCHILLING, E.: »External Flavonoids of 12 Species of North American Eupatorieae (Asteraceae)«. *Zeitschrift für Naturforschung*, 51c, 893-896, 1996.
- WRIGHT, C.W.; PAßREITER, C.M.: Noch nicht publizierte Ergebnisse, 1997.
- WRIGHT, C.W.; PHILLIPSON, J.D.: »Natural Products and the Development of Selective Antiprotozoal Drugs«. *Phytotherapy Research*, 4, 127-139, 1990.
- YOSHIOKA, H.; MABRY, T.J.; TIMMERMAN, B.N.: »*Sesquiterpene Lactones : Chemistry, NMR and Plant Distribution*«. Tokyo : University of Tokyo Press, 1973.
- YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W.; SHIMIZU, M.: »Antioxidative Activity of Flavones and Flavonols *In Vitro*«. *Phytotherapy Research*, 11, 446-449, 1997.
- YU, S.; FANG, N.; MABRY, T.J.: »Flavonoids from *Ageratina saltillensis*«. *Journal of Natural Products*, 49 (6), 1178-1179, 1986a.
- YU, S.; FANG, N.; MABRY, T.J.: »Flavonoids from *Ageratina havanensis*«. *Revista Latinoamericana de Química*, 18 (1), 20-22, 1987.
- YU, S.G.; GAGE, D.A.; FANG, N.; MABRY, T.J.: »Flavonols and Flavonol Glycosides from *Eupatorium areolare* var. *leiocarpum*«. *Journal of Natural Products*, 49 (1), 181-182, 1986b.
- ZDERO, C.; BOHLMANN, F.: »Eupatoriopicrin 19-O-Linolenate and Other Constituents from *Eupatorium cannabinum*«. *Planta Medica*, 1987, 169-172, 1987.
- ZDERO, C.; LEHMANN, L.; BOHLMANN, F.: »Chemotaxonomy of *Athanasia* and Related Genera«. *Phytochemistry*, 30 (4), 1161-1163, 1991.

ZÖFEL, P.: »*Statistik verstehen*«. München : Addison Wesley, 2001.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und damit zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Rudolf Bauer für seine Hilfe bei den Online-Recherchen sowie für seinen Einsatz für die Veröffentlichung meines Artikels über heimische Orchideen.
- Frau Sabine Borstel für ihre unermüdliche Unterstützung, wenn die berüchtigte MPLC ´mal wieder ihren eigenen Willen hatte, sowie für die vielen netten Gesten (selbstgestickte Ernie und Bert-Bilder, portugiesische Stickmagazine etc.), die den harten Laboralltag für mich erträglicher gemacht haben.
- Herrn Heiko Buff für die lustige gemeinsame Studienzeit und die Hilfe beim Einrotieren des DMSO´s.
- Herrn Oliver Busch für seine wertvollen Internet-Recherchen sowie die unschlagbaren Einblicke in sein pralles Privatleben.
- Herrn Dr. Rainer Ebel für seine Hilfe mit der NMR-Software und die vielen fürstlichen und lehrreichen gemeinsamen botanischen Exkursionen.
- Meinen Famulanten und studentischen Hilfskräften Daniel Gutjahr, Andrea Marzoll, Katrin Paschen, Stefan Rathgeber, Arne Schwelm, Alen Svrznjak und Julia Wessel für ihre tatkräftige Unterstützung.
- Frau Natalia Filipowicz für Ihre Hilfe bei den Malaria-Tests.
- Frau Heike Fürtges für die gewissenhafte Aufnahme vieler UV-Spektren, die Anfertigung der Alkaloid-Extrakte sowie die freundliche Unterstützung bei vielen anderen Laborarbeiten.
- Frau Meike Hildebrand für die nette gemeinsame Zeit im Labor sowie für die Tekkno-Party in der Bio-III-Vorbereitung.
- Frau Katrin Kohnert für die Anfertigung des Acetonextraktes und der HPLC-Analysen.
- Herrn Klaus Lohmann für seinen Beistand in Computerfragen, seine Hilfe beim Umzug sowie vor allem für sein Lächeln.
- Herrn Dr. Uwe Matthiesen für die Aufnahme zahlreicher Spektren (insbesondere Direkteinlaß) sowie seine vorzügliche Schokoladencreme.
- Frau Kerstin "Saarland" Paulus für die Durchführung mehrerer 5-LOX-Tests sowie die vielen erbaulichen Gespräche.
- Herrn Dr. W. Peters und seinen Mitarbeitern vom NMR-Service des Instituts für Anorganische Chemie und Strukturchemie I der Universität Düsseldorf für die Aufnahme fast aller in dieser Arbeit vorgestellten NMR-Spektren.
- Frau Dr. „Äffy“ Reininger für die Durchführung mehrerer COX-1- und COX-2-Tests, die vielen gemeinsamen Stunden beim Lauftreff sowie für den Grapefruitsaft.
- Frau Dr. Marion Resch für die vielen tollen Geburtstagsgeschenke, die gemeinsame Bewältigung ungezählter witziger und weniger witziger Vorfälle am Institut sowie dafür, dass sie eigentlich nie „Oh jeh“ gesagt hat.
- Frau Waltraud Schlag für die vielen kleinen Geschenke und ihre offene und kollegiale Art.
- Herrn Dr. Thomas Schmidt für seine großzügigen Lösungsmittel-Spenden sowie für den Austausch vieler Possen und Schwänke.
- Herrn Dr. Jan F. Stevens vom Institute of Bioorganic Chemistry der Vrije Universiteit Amsterdam für die viele Zeit, die er in die Aufnahme der LC-MS-Spektren meiner Flavonoide investiert hat sowie seine kompetente und schnelle Hilfe bei allen Problemen rund um Flavonoide und MS.
- Herrn „Baron“ Christian Stiller für die Anfertigung ungezählter DC´s, die Hilfe beim Umzug und bei der Heimwerkerarbeit sowie seine unvergleichliche Art, Witze zu erzählen.
- Herrn Sebastian Stöber für seine Freundschaft und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen, seinen beispielhaften Einsatz für die Lehre sowie für die gewissenhafte Betreuung der Internetseiten des Instituts.

Danke auch für seine Ohren, seine bewundernswerte Leidenschaft und für die dauernde Quelle der Inspiration im Hinblick auf Spitznamen.

- Herrn Dr. Jochen Stöhr für seine vielen Hilfestellungen bei den alltäglichen Problemen im Labor sowie die gemeinsame Zeit beim Sport und in den Düsseldorfer Kneipen. Danke auch für die Freundschaft und die vielen geselligen Stunden bei Exkursionen und Kongressen. Meine Bewunderung für seine Standhaftigkeit und sein gegenüber Mitarbeitern und Vorgesetzten gleichermaßen selbstbewußtes und geradliniges Auftreten.
- Herrn Alan W. Taylor vom Environmental Health Sciences Center der Oregon State University in Corvallis für die Aufnahme der LC-MS-Spektren.
- Herrn Dr. Ludger Witte vom Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig für seine Hilfe bei der GC-MS-Analyse der Pyrrolizidin-Alkaloide.
- Prof. Dr. Eckhard Wollenweber vom Institut für Botanik der TU Darmstadt für die vorzügliche Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft, die Bereitstellung von Reinsubstanzen sowie die Ermöglichung der gemeinsamen Publikationen.
- Herrn Dr. Victor Wray von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig für die Aufnahme der 600 MHz-Spektren von Substanz SE1.
- Herrn Dr. Colin W. Wright vom Institute of Pharmaceutical Technology der University of Bradford für die Ermöglichung der Malaria-Tests in seinem Labor, seine persönliche und liebevolle Betreuung während meiner Zeit in Bradford sowie für die tollen Briefmarken, die ich mit ihm getauscht habe.
- Allen anderen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie für die Unterstützung und das gute Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich schon früh für die Naturwissenschaften begeisterten und mir durch ihre großzügige Unterstützung den Weg für meine Ausbildung und mein Studium geebnet und mir die Promotion ermöglicht haben. Wie gerne würde ich heute meinem Vater und meinen Großeltern die fertige Arbeit überreichen, leider ist es ihnen nicht vergönnt, diesen krönenden Abschluß ihrer Förderung zu erleben. Dank gebührt auch meiner Frau Sabine, die viele zusätzliche Arbeiten auf sich genommen hat, um mir den Rücken für die Fertigstellung dieser Arbeit frei zu halten.

Lebenslauf

Zur Person

Günter Lang

Geburt: 27. Juli 1970 in Bonn

Familienstand: seit dem 22.3.2000 verheiratet mit Sabine Lang, geb. Stobbe

Eltern: Wilfried und Helene Lang, geb. Becker

Schulbesuch

1977 – 1981 Horion-Schule, Pulheim-Sinnersdorf

1981 – 1990 Norbert-Gymnasium Knechtsteden

9.6.1990 Abitur

Bundeswehr

1.7.1990 – 30.6.1991 Fernmeldebataillon 940 in Daun

Berufsausbildung

1991 - 1995 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

21.9.1993 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

20.9.1995 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

1.10.1995 – 31.3.1996 Pharmaziepraktikant bei der Fa. Rhône-Poulenc-Rorer, Köln

1.4.1996 – 30.9.1996 Pharmaziepraktikant in der Helenen-Apotheke, Pulheim

15.11.1996 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

25.11.1996 Approbation als Apotheker

1.1.1997 – 30.6.2000 Wissenschaftliche Hilfskraft bzw. wissenschaftlicher
Angestellter am Institut für Pharmazeutische Biologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Arbeitsgruppe Dr.
Claus Martin Paßreiter

seit dem 1.7.2000 Apotheker in der Helenen-Apotheke, Pulheim

30.7.2000 Anerkennung als Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik