

**Inhaltsstoffe aus Pflanzen
der indonesischen Volksmedizin (Jamu):
Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der
antioxidativen Eigenschaften**

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

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

Vorgelegt von

Bärbel Steffan

aus Völklingen

Düsseldorf 2005

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

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch

Korreferentin: Prof. Dr. Regine Kahl

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juni 2005

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch

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

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Proksch möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die interessante Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung und die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsbedingungen.

Bei Frau Prof. Dr. Regine Kahl möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferates und für die sehr gute Kooperation bedanken.

Bei Frau Gudrun Michels, Frau Petra Niering, Frau Sandra Ohler und Herrn Dr. Wim Wätjen aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Regine Kahl bedanke ich mich sehr herzlich für die sehr gute Kooperation und für die Durchführung der Zellkulturexperimente, insbesondere des Neutralrotassays, der Apoptosenachweise, des DCF-Assays und des Comet-Assays sowie für die Inkubation der Zellen mit den zu testenden Substanzen für die Aufnahmestudien.

Bei Frau Ine Dewi Indriani aus dem Arbeitskreis von Herrn Juniorprofessor Dr. Rainer Ebel bedanke ich mich sehr herzlich für die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten, insbesondere für die Isolierung und Aufreinigung der Pilz-DNA aus *Alstonia scholaris*, für die Durchführung der PCR und der DGGE und für die Identifizierung des Endophyten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Der Einfluss traditioneller Heilmethoden auf die moderne Medizin	1
1.2. Jamu – traditionelle Heilkunde Indonesiens	7
1.2.1. Bedeutung von Jamu für die Wirtschaft und das Gesundheitssystem in Indonesien	8
1.2.2. Probleme und Gefahren bei der Anwendung von Jamu	9
1.2.3. Jamu-Pflanzen als vielversprechende Quelle für neue Arzneistoffe	11
1.2.4. BMBF-Verbundprojekt 0312615 „ <i>Pharmakologische Eigenschaften und Kultivierungstechniken von Medizinpflanzen der indonesischen Volksmedizin (JAMU)</i> “	12
1.3. Antioxidantien und Krankheitsprävention	13
1.3.1. Die Rolle von oxidativem Stress bei der Entstehung von Krankheiten	15
1.3.2. Schutzmechanismen des menschlichen Körpers gegen oxidativen Stress (Antioxidatives Netzwerk)	17
1.3.3. Pflanzliche Polyphenole zum Schutz des menschlichen Körpers vor oxidativem Stress	19
1.4. Ziel der Arbeit	20

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial	23
2.1.1. Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes untersuchte Pflanzen	23
2.1.2. Anzucht von <i>Guazuma ulmifolia</i> im Gewächshaus	24
2.1.3. Transfair von <i>Guazuma ulmifolia</i> ins Freiland	25
2.2. Untersuchung des Pflanzenmaterials	26
2.2.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes	26
2.2.1.1. Extraktion	26
2.2.1.2. Chemische Untersuchung und biologische Testung	26
2.2.1.3. Fraktionierung der aktiven Extrakte	26

2.2.2. Mikroskopische Untersuchung von <i>Guazuma ulmifolia</i> (Indonesien) und <i>Guazuma ulmifolia</i> (Gewächshaus)	27
2.2.3. Antioxidatives Screening	27
2.2.3.1. Taxonomie der untersuchten Pflanzen	28
2.2.3.2. DPPH-Assay	28
2.3. Isolierung der antioxidativ aktiven Inhaltsstoffe	30
2.3.1. Extraktion	30
2.3.2. Flüssig-Flüssig-Verteilung	30
2.3.3. Dünnschichtchromatographie (DC)	32
2.3.4. Vakuumflüssigchromatographie (VLC)	34
2.3.5. Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC)	37
2.3.6. Säulenchromatographie (SC)	38
2.3.7. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	39
2.3.7.1. HPLC-DAD	39
2.3.7.2. HPLC-MS ⁿ	42
2.3.7.3. Semi-präparative HPLC	43
2.4. Identifizierung der isolierten Inhaltsstoffe	44
2.4.1. Massenspektrometrie	45
2.4.1.1. ESI (<i>Electro-Spray-Ionisation</i>) -Massenspektrometrie	45
2.4.1.2. EI (<i>Electron-Impact</i>) -Massenspektrometrie	45
2.4.2. NMR-Spektroskopie	46
2.4.2.1. DEPT (<i>distortionless enhancement by polarization transfers</i>)	46
2.4.2.2. COSY (<i>correlation spectroscopy</i>)	47
2.4.2.3. nOe- (<i>nuclear-Overhauser-effect</i> -) Experimente	47
2.4.3. Optische Drehung	48
2.4.4. Derivatisierung von Zuckern	48
2.4.4.1. Hydrolyse der Glykoside	49
2.4.4.2. Isolierung der Zucker / Abtrennung vom Aglykon	49
2.4.4.3. Butanolyse	49
2.4.4.4. Trimethylsilylierung	49
2.4.5. Gaschromatographie (GC)	50
2.5. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften von den isolierten Inhaltsstoffen <i>in vitro</i> mittels DPPH-Assay	51

2.6. Charakterisierung der zellulären Eigenschaften von den isolierten Inhaltsstoffen (H4IIE- und C6-Zellen)	52
2.6.1. Zellkultur und Medium	52
2.6.2. Bestimmung der Zytotoxizität	53
2.6.2.1. Neutralrotassay	53
2.6.2.2. Apoptosenachweis: Nachweis von DNA-Leiter-Bildung	54
2.6.3. Bestimmung der protektiven Effekte	55
2.6.3.1. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies: DCF-Assay	55
2.6.3.2. Nachweis von DNA-Strangbrüchen: Einzelzellgelelektrophorese („Comet-Assay“)	56
2.6.3.3. Nachweis von Apoptosehemmung: Caspase-Assay	57
2.6.3.4. Proteinbestimmung	58
2.6.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA	59
2.6.3.6. Aufnahmestudien	59
2.7. Für den quantitativen DPPH-Assay, die Zellkulturexperimente und die Aufnahmestudien verwendete Geräte, Materialien und Lösungen	61
2.7.1. Geräte	61
2.7.2. Materialien	61
2.7.3. Lösungen	63
2.8. Quantifizierung der aktivsten Inhaltsstoffe in der jeweiligen Droge sowie in Ethylacetat- und Methanolextrakt	65
2.8.1. Quantifizierung mittels externem Standard	65
2.8.2. Quantifizierung mittels internem Standard	67
2.8.2.1. Bestimmung des substanzspezifischen Korrekturfaktors	67
2.8.2.2. Bestimmung der Acteosid- und Isoacteosidmengen in den Blättern von <i>Guazuma ulmifolia</i>	68
2.9. Biologische Testung von Sch53823 aus <i>Alstonia scholaris</i>	69
2.9.1. Testung auf Wachstumshemmung an verschiedenen Krebszelllinien	69
2.9.2. Testung auf Hemmwirkung gegenüber <i>Cladosporium cucumerinum</i>	69
2.10. Isolierung und Identifizierung von Endophyten-DNA aus der Rinde von <i>Alstonia scholaris</i>	71
2.10.1. Isolierung der Pilz-DNA	71
2.10.2. Amplifizierung der Pilz-DNA: Polymerasekettenreaktion (PCR)	72
2.10.3. Auftrennung der DNA: Agarose-Gelelektrophorese	73

2.10.4. Reinigung des PCR-Produktes	73
2.10.5. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)	74
2.10.6. Sequenzierung	75
2.11. Lösungsmittel	75
2.12. Geräte	76
3. Ergebnisse	
3.1. Ergebnisse im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes	78
3.2. Ergebnisse des antioxidativen Screenings	80
3.3. Isolierte Inhaltsstoffe	81
3.3.1. Inhaltsstoffe aus <i>Guazuma ulmifolia</i> , Sterculiaceae	81
3.3.1.1. Droge aus Indonesien	81
3.3.1.2. Vergleichende Untersuchung des Inhaltsstoffspektrums der Gewächshauspflanze (<i>Guazuma ulmifolia</i>)	88
3.3.2. Inhaltsstoffe aus <i>Alyxia reinwardtii</i> , Apocynaceae	118
3.3.3. 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol aus <i>Sauropus androgynus</i> , Euphorbiaceae	138
3.3.4. Inhaltsstoffe aus <i>Alstonia scholaris</i> , Apocynaceae	142
3.4. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften von den isolierten Inhaltsstoffen <i>in vitro</i> mittels DPPH-Assay	153
3.5. Charakterisierung der zellulären Eigenschaften der isolierten Inhaltsstoffe (H4IIE- und C6-Zellen)	156
3.5.1. Bestimmung der Zytotoxizität	156
3.5.1.1. Neutralrotassay	156
3.5.1.2. Apoptosenachweis: Nachweis von DNA-Leiter-Bildung	161
3.5.2. Bestimmung der protektiven Effekte	161
3.5.2.1. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies: DCF-Assay	161
3.5.2.2. Nachweis von DNA-Strangbrüchen: Comet-Assay	164
3.5.2.3. Nachweis von Apoptosehemmung: Caspase-Assay	166
3.5.3. Ergebnisse der Aufnahmestudien	167
4. Diskussion	176
4.1. Inhaltsstoffe aus den antioxidativ aktiven Pflanzen	177

4.1.1. Inhaltsstoffe aus <i>Guazuma ulmifolia</i>	177
4.1.1.1. Inhaltsstoffe aus den Blättern von <i>Guazuma ulmifolia</i> – Vergleichende Untersuchung von indonesischer Droge und Gewächshauspflanze	179
4.1.1.2. Inhaltsstoffe aus der Rinde von <i>Guazuma ulmifolia</i>	180
4.1.2. Inhaltsstoffe aus der Rinde von <i>Alyxia reinwardtii</i>	182
4.1.3. 3-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosylkämpferol aus den Blättern von <i>Sauropus androgynus</i>	184
4.1.4. Inhaltsstoffe aus der Rinde von <i>Alstonia scholaris</i>	185
4.2. Antioxidative Aktivität der isolierten Inhaltsstoffe im DPPH-Assay	189
4.3. Aktivität ausgewählter Inhaltsstoffe im Zellkultursystem	191
4.4. Aufnahmestudien	196
4.5. Schlussfolgerung und Ausblick	203
5. Zusammenfassung	205
6. Literaturverzeichnis	213
7. Anhang	
7.1. HPLC-Chromatogramme der Extrakte und Fraktionen	226
7.2. NMR-Spektren der isolierten Inhaltsstoffe	232
7.3. EI-Spektren von Pinoresinol, 9α-Hydroxypinoresinol und Sch53823	247
7.4. GC-Chromatogramme der Trimethylsilylierungsprodukte von 3-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosylkämpferol und von den Zuckerstandards	248
7.5. DNA-Sequenz der aus <i>Alstonia scholaris</i> isolierten Pilz-DNA	249
7.5.1. DNA-Sequenz des als <i>Botryosphaeria rhodina</i> identifizierten Pilzes	249
7.5.2. DNA-Sequenz des unbekanntes Pilzes	249
8. Abkürzungen	251

1. Einleitung

1.1. Der Einfluss traditioneller Heilmethoden auf die moderne Medizin

In nahezu allen Kulturkreisen bildete sich im Laufe der Zeit empirisch eine traditionelle Medizin, auch Volksmedizin genannt, aus. So verfügt beispielsweise fast jeder Stamm der Urbevölkerung in Afrika und der Indianer in Südamerika über seine eigene traditionelle Heilkunde. In Japan werden sogar zwei verschiedene Ethnomedizinen nebeneinander praktiziert, zum einen die ursprünglich aus China stammende Kampo-Medizin, zum anderen die traditionelle japanische Heilkunde ‚Wayaku‘ (Heinrich 2001). Neben der deutschen und europäischen Volksmedizin, die sich diverser Heilpflanzen bedienen, gewinnen traditionelle Heilmethoden aus anderen Teilen der Welt in Deutschland immer mehr an Bedeutung. Ein sehr bekanntes Beispiel stellt dabei die Traditionelle Chinesische Medizin (TCM) dar. Sie hat eine jahrtausendelange Tradition, und seit dem 16. Jahrhundert existiert in China eine schriftliche Drogenkunde, die das Thema systematisch behandelt und wissenschaftliche Methoden nutzt. Hier sind über 1800 Drogen und über 11000 Rezepturen beschrieben (Heinrich 2001). Die TCM bedient sich ausserdem alternativer Behandlungsmethoden wie Akupunktur und Akupressur. In China wird die traditionelle Medizin Hand in Hand mit der Schulmedizin praktiziert und ist fester Bestandteil der Mediziner Ausbildung. Auch in Deutschland integrieren mittlerweile viele Schulmediziner erfolgreich diese traditionellen Behandlungsmethoden in ihre Therapie. Beispielsweise ist die Akupunktur, die traditionell gegen funktionelle Störungen und Schmerzerkrankungen eingesetzt wird, heute auf das Nervensystem beziehbar und in ihrer Wirkung zum Teil naturwissenschaftlich erklärbar (Hunnius 1993). Auch chinesische Arzneidrogen werden immer populärer und werden mittlerweile von einigen deutschen Apotheken angeboten.

Auch die indische Medizin, die als Ayurveda bezeichnet wird, spielt im europäischen Kulturkreis mittlerweile eine Rolle in der Behandlung von Krankheiten und

Befindlichkeitsstörungen. Hierbei handelt es sich um ein traditionelles indisches Diagnose- und Behandlungssystem, mit dem hunderte Millionen Inder medizinisch versorgt werden. Unbelebtes und belebtes sowie der Mensch bestehen aus den Elementen Erde, Wasser, Feuer, Luft und Raum. Die ayurvedische Medizin erklärt Krankheit mit einem Ungleichgewicht zwischen diesen Elementen, und durch die Behandlung soll dieses Gleichgewicht wieder hergestellt werden. Zu den Behandlungsmethoden gehören u.a. Abführen, Aderlass, Einläufe, Erbrechen und Schwitzen. Ayurvedische Arzneimittel sind meist pflanzlichen oder mineralischen Ursprungs. Das indische ayurvedische Arzneibuch von 1978 ist in englischer Sprache verfasst und umfasst 450 Einzeldrogen, Mischpräparate und Herstellungsvorschriften (Ammon 1987).

Auch in Europa vertrauen mittlerweile immer mehr Ärzte und Patienten auf alternative Heilmethoden wie TCM oder Ayurveda.

Der Einfluss der traditionellen Medizin auf die moderne Medizin bzw. Schulmedizin ist je nach Kulturkreis unterschiedlich stark. Während beispielsweise die Traditionelle Chinesische Medizin in China in die moderne Medizin integriert und mittlerweile auch in westlichen Ländern mit Erfolg eingesetzt wird, fehlt den meisten traditionellen Heilkunden anderer Länder und Regionen nach wie vor die Akzeptanz durch die westliche bzw. Schulmedizin.

Die naturwissenschaftliche Beschäftigung mit traditioneller Medizin hat in vielen Fällen auch schon erfolgreich zu der Entwicklung neuer Arzneistoffe geführt. Ein Beispiel hierfür ist die Kamille (*Matricaria recutita*), eine in europäischen Ländern sehr bekannte Arzneidroge, deren Blüten seit Jahrtausenden zur Zubereitung von pflanzlichen Magen-Darm-Mitteln bzw. Mitteln bei örtlichen Entzündungen verwendet werden.

Die Strukturen der pharmakologisch wirksamen Hauptinhaltsstoffe (-)- α -Bisabolol und Matricin sind heute bekannt (**Abb. 1**), und deren Wirksamkeit ist nachgewiesen. Auf diese Wirkstoffe standardisierte Kamillenextrakte sind als Phytopharmaka mit antiphlogistischer Wirkung wie Kamillosan[®] Konzentrat und Kamillenbad Robugen[®] erhältlich.

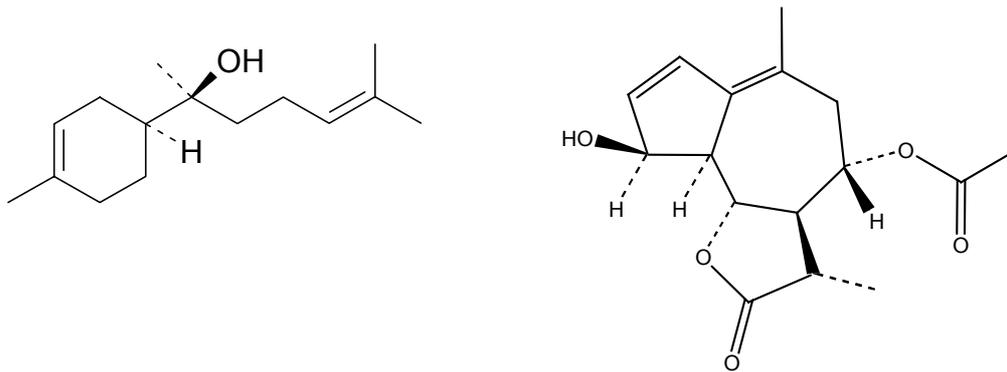


Abb. 1: Strukturen von (-)- α -Bisabolol und Matricin aus *Matricaria recutita*

Ein ebenfalls sehr prominentes Beispiel für einen pflanzlichen Arzneistoff ist das zentral wirkende Analgetikum Morphin, das schon 1904 von dem Paderborner Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner entdeckt wurde. Die Struktur des Morphins (**Abb. 2**) wurde 1925 durch Robert Robinson aufgeklärt, und die Totalsynthese dieses Alkaloids gelang erstmals 1952 (Hunnus 1993). Morphin ist das Hauptalkaloid des Opiums, dem Milchsaft von *Papaver somniferum*. Opium war bereits im Altertum als „Mohnträne“ bekannt, so beispielsweise im Mittelmeergebiet etwa ab dem dritten bis vierten Jahrhundert vor Christus. Im Mittelalter wurde es zur Herstellung des Theriaks verwendet, eines damals sehr wichtigen und berühmten Arzneimittels, das 50 bis 100 verschiedene Bestandteile enthielt. Die Verwendung von Opium als Genussmittel ist bereits seit dem 16. Jahrhundert im Orient stark verbreitet (Hunnus 1993). Die traditionelle Anwendung des Opiums bei Husten sowie zur allgemeinen Schmerzlinderung und zur Ruhigstellung des Darms ist heute wegen der grossen Suchtgefahr obsolet.

Morphin wird auch heute noch in Form seiner Salze als zentral wirkendes Analgetikum bei starken Schmerzzuständen eingesetzt, die durch andere Analgetika nicht zu beeinflussen sind.

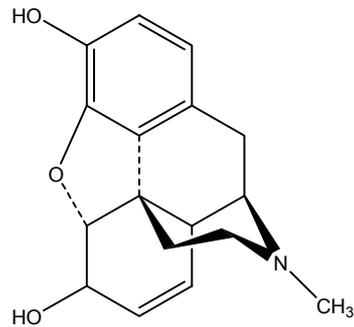


Abb. 2: Struktur des Morphins aus *Papaver somniferum*

Auch in anderen Arzneistoffklassen, wie z.B. in der Klasse der Antimalariamittel, findet man Wirkstoffe, die in ursprünglich volksmedizinisch verwendeten Pflanzen vorkommen, und heute als Reinsubstanzen in der Malariabehandlung Anwendung finden. Ein bekanntes Beispiel ist hier das Chinin (**Abb. 3**) aus der Chinarinde. Chinin ist das älteste Antimalariamittel und stammt aus der Rinde des roten Chinarindenbaums (*Cinchona pubescens*, *C. succirubra*, Rubiaceae). Spanische Eroberer in Peru entdeckten die fiebersenkende Wirkung der Chinarinde und brachten die Droge 1630 zum ersten Mal nach Europa. Im Jahre 1820 wurde das Chinin in Frankreich erstmals isoliert, seine Totalsynthese erfolgte 1944 in den USA. Heute wird Chinin in Form seiner Salze gegen Erregerstämme eingesetzt, die gegenüber Chloroquin und anderen synthetischen Antimalariamitteln resistent sind (Hunnius 1993).

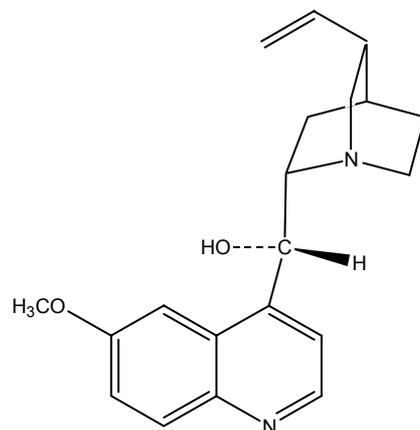


Abb. 3: Struktur des (-)-Chinins aus *Cinchona succirubra*

Auch *Artemisia annua*, der Beifuß, hat eine jahrtausendelange Tradition als volksmedizinisch verwendetes Heilmittel. Es handelt es sich um eine Asteracee, die in China als „Quinghaosu“ bekannt ist und in der Traditionellen Chinesischen Medizin gegen Malaria eingesetzt wird.

1972 wurde der aktive Inhaltsstoff erstmals isoliert und als das Sesquiterpenendoperoxid Artemisinin (**Abb. 4**) identifiziert. Es diente als Leitstruktur zur Entwicklung verschiedener halbsynthetischer Verbindungen, von denen eine, Artemether, heute als potentes Antimalariamittel eingesetzt wird. Auch der Wirkmechanismus des Artemisinins, der auf der Peroxidstruktur basiert, konnte mittlerweile aufgeklärt werden (Newman et al. 2000).



Abb. 4: Struktur des Artemisinins aus *Artemisia annua* und des davon abgeleiteten Artemethers

Auch traditionelle afrikanische Heilpflanzen gewinnen auf dem deutschen Arzneimittelmarkt an Bedeutung. Zum Beispiel werden Extrakte aus der Wurzel der südwestafrikanischen Teufelskralle, *Harpagophytum procumbens* (Pedaliaceae), gegen Arthrose eingesetzt, unter anderem in Form von Jucurba[®]Kapseln. In pharmakologischen Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen wie beispielsweise am Rattenpfotenödem und in *In-vitro*-Modellen konnten für Gesamtextrakte von *Harpagophytum procumbens* mittlerweile analgetische und antiphlogistische Effekte nachgewiesen werden, die unter anderem auf der Hemmung der Thromboxanbiosynthese (Cyclooxygenaseweg), der Cysteinyl-Leukotrien-Biosynthese (5-Lipoxygenaseweg) und der Synthese des Tumornekrosefaktors α beruhen. Welche Inhaltsstoffe in dem Extrakt für die pharmakologischen Wirkungen verantwortlich sind, ist noch unklar. Harpagosid scheint jedoch neben anderen bisher unbekannt Substanzen an der Wirkung beteiligt zu sein (Hänsel 2004).

Ein weiteres Beispiel für ein traditionell in Afrika angewendetes Arzneimittel, ist der Extrakt der südafrikanischen Pelargonienwurzel, der in Deutschland in Form von Umckaloabo[®]Tropfen gegen Infektionen der Atemwege und des Hals-Hasen-Ohren-Bereichs auf dem Markt ist. Für Umckaloabo[®]Tropfen konnte bis jetzt jedoch noch keine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden.

Eine traditionell in Indonesien eingesetzte Droge, die im Europäischen Arzneibuch monografiert ist, ist *Curcumae xanthorrhizae rhizoma*, das Rhizom der javanischen Gelbwurz. In ihrer indonesischen Heimat wird die Droge traditionell gegen dyspeptische Beschwerden eingesetzt, aber auch in Europa wird sie nicht nur als Bestandteil der berühmten Curry-Gewürzmischung verwendet. Vielmehr ist Curcuma-Extrakt in einigen Chologoga wie den „Cholagogum F Nattermann[®] Kapseln“ (Kombinationspräparat mit Schöllkraut) und in verschiedenen Leber- und Galletees (z.B. „H&S“, Kneipp) enthalten.

Heute weiss man, dass die Wirksamkeit von *Curcumae xanthorrhizae rhizoma* auf dem Inhaltsstoff Curcumin beruht, dessen Struktur in Abbildung 5 dargestellt ist.

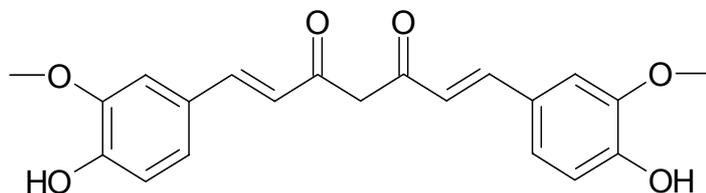


Abb. 5: Struktur von Curcumin aus *Curcuma xanthorrhiza*

Die vorgenannten Beispiele stehen stellvertretend für viele weitere Drogen aus verschiedenen Kulturkreisen, die durch naturwissenschaftliche Erforschung ihrer Wirkstoffe von einer empirisch-ethnomedizinischen auf eine wissenschaftlich fundierte Basis gehoben wurden.

1.2. Jamu - traditionelle Heilkunde Indonesiens

Im südostasiatischen Raum verfügt Indonesien über eine besonders lange und lebendige Tradition bei der volksmedizinischen Anwendung von Pflanzen. Diese traditionelle Medizin Indonesiens wird Jamu genannt und spielt wirtschaftlich eine bedeutende Rolle im Gesundheitswesen des Landes (Proksch 1997).

Jamu ist die ursprünglich javanische Bezeichnung für traditionelle Heilmittel, die meist aus Pflanzenteilen wie Blättern, Rinde, Wurzeln oder Blüten (**Abb. 6**) in Form von Tees zubereitet werden. Darüberhinaus können zusätzlich auch nichtpflanzliche Bestandteile wie gepulverte Eierschalen von frischgeschlüpften Küken zu traditionellen Jamu-Präparaten beigemischt werden (Sidik 1994). Mittlerweile werden auch die traditionellen Heilmittel indonesischer Volksgruppen ausserhalb Javas als Jamu bezeichnet. Sie werden im Bedarfsfall von einem kundigen Mitglied der Familie oder von einem traditionellen Heiler zusammengestellt und verabreicht (Proksch 1997).



Abb. 6: Jamu-Mischung, die man in Indonesien auf Märkten kaufen kann
(Foto: A. Supriyono, Würzburg)

Früher wurde Jamu innerhalb der Grossfamilie bzw. von traditionellen Heilern aus selbst angezogenen oder auf Märkten gekauften Zutaten (**Abb. 7**), bei denen es sich meist um diverse Heilpflanzen handelt, hergestellt. Dabei spielen traditionell auch

mystische Aspekte und die Signaturenlehre eine grosse Rolle, und die Zubereitung der verschiedenen Jamu ist auch ein spiritueller Prozess, ohne den nach traditioneller Vorstellung die jeweilige Zubereitung keine Wirkung hat. So wird zum Beispiel einer Zubereitung für Schwangere Holzkohle, die aus Nestern von Mäusen gewonnen wurde, zugesetzt, damit die Geburt so rasch verläuft wie bei Mäusen (Sidik 1994). Heute verlieren diese mystischen Aspekte jedoch immer mehr an Bedeutung.



Abb. 7: Verkauf von getrockneten Heilpflanzen in Indonesien
(Foto: F. Bohnenstengel, Würzburg)

1.2.1. Bedeutung von Jamu für die Wirtschaft und das Gesundheitssystem in Indonesien

Heute sind vorgefertigte Extrakte, die in grossen Jamu-Fabriken in Form von Pulvern, Tabletten oder ähnlichem hergestellt werden, die wichtigste Quelle, über die Jamu in Indonesien bezogen wird. Dabei ist der zuvor diskutierte mystisch-magische Effekt, der bei der Herstellung innerhalb der Familie ursprünglich eine grosse Rolle spielte, verlorengegangen.

Man schätzt, dass pro Tag fünf Millionen Tabletten, Pulver oder ähnliche Präparate von den Jamu-Fabriken hergestellt und im In- und Ausland verkauft werden (Afdhal und Welsch 1991). Darunter sind auch viele kosmetische Produkte sowie Zubereitungen, die die Attraktivität von Frauen erhöhen oder die Potenz bei Männern steigern sollen. Mittlerweile gibt es mehrere hundert kleine bis grosse industrielle Jamu-Hersteller, die mit ihren Produkten ca. 30% des Arzneimittelmarktes in Indonesien ausmachen (Proksch 1997). Auf dem indonesischen Arzneimittelmarkt wurde bereits 1984 ein Volumen von 600 bis 700 Millionen US-Dollar umgesetzt. Die Jamu-Industrie leistet also einen beachtlichen Beitrag zum Bruttosozialprodukt Indonesiens. Dieser Beitrag ist umso höher einzuschätzen, als nahezu alle modernen, sprich westlichen Arzneimittel bis heute mit einem beträchtlichen Devisenaufwand importiert werden müssen (Proksch 1997).

Für grosse Teile der indonesischen Bevölkerung sind deshalb westliche Arzneimittel unerschwinglich, während die verschiedenen Jamu-Präparate umgerechnet meist weniger als einen Euro kosten und sich deshalb viele Indonesier diese Produkte leisten können. Es überrascht also nicht, dass 70 bis 80 % der mehr als 200 Millionen Indonesier auf Jamu vertrauen und regelmässig Jamu-Produkte zu sich nehmen, um Krankheiten vorzubeugen oder diese zu heilen (Soedigyo 1990, Afdhal und Welsch 1991).

1.2.2. Probleme und Gefahren bei der Anwendung von Jamu

Im Gegensatz zu anderen asiatischen Ländern wie Indien oder China, in denen eine traditionelle Heilkunde oft Seite an Seite mit westlich orientierter Medizin gelehrt und praktiziert wird (Neumann and Lauro 1982), spielt Jamu in Indonesien ausschliesslich in der Selbstmedikation eine Rolle. Ausserdem wurden in Indonesien die Rezepte zur Herstellung traditioneller Heilmittel nur mündlich von Generation zu Generation überliefert und lassen sich nicht datieren und zurückverfolgen, während in Indien oder China bereits frühzeitig sehr detaillierte Arzneimittelkodizes verfasst wurden (Hamid and Sitepu 1990). Da es bis heute im Gegensatz zur Traditionellen Chinesischen Medizin kaum Untersuchungen zu Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der verschiedenen Jamu-Präparate gegeben hat, wird diese traditionelle Heilkunde von der Schulmedizin Indonesiens nicht akzeptiert. Um dies zu ändern, ist ein wissenschaftlicher Nachweis zur Qualität der Produkte nötig.

Ausserdem birgt die Anwendung von Jamu-Präparaten gesundheitliche Risiken für die Verbraucher, solange die Inhaltsstoffe und deren Wirkungen nicht erforscht sind. Dies zeigt beispielsweise eine Reihe von Vergiftungsfällen, die sich seit 1995 in Taiwan ereigneten. Dabei wurden im Rahmen einer Schlankheitskur über 20 Tage die rohen Blätter der Jamu-Pflanze *Sauropus androgynus* (Euphorbiaceae) vor allem von Frauen in Mengen von 150 g bis zu 200 g pro Tag verzehrt. Drei bis vier Wochen nach dem Ende der Kur traten in einigen Fällen Herzrhythmusstörungen (Torsade de pointes) und irreversible Lungenschädigungen in Form einer Bronchiolitis obliterans auf, die bei manchen Patienten Lungentransplantationen erforderlich machten oder sogar zum Tod führten (Lin et al. 1996, Wang und Lee 1997, Chang et al. 2000). Bis jetzt gibt es noch keine Veröffentlichungen über Substanzen, die für diese Wirkungen verantwortlich sein könnten. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass es unbedingt notwendig ist, das Inhaltsstoffspektrum dieser und weiterer Pflanzen im Hinblick auf ihre Pharmakologie und Toxikologie aufzuklären, um die Gefahren, die von der Einnahme solcher Zubereitung ausgehen besser einschätzen zu können.

Eine weitere Gefahr ist die häufig hohe Belastung von Heilpflanzen mit Schwermetallen wie Arsen oder Cadmium. Dazu kommt, dass sich gerade in tropischen Ländern aufgrund des feucht-warmen Klimas auf frischen oder getrockneten Pflanzenteilen; die für die Jamu-Herstellung verwendet werden, leicht Pilze ansiedeln, unter anderem aus der Gattung *Aspergillus*, die lebertoxische Aflatoxine produzieren. So konnten in Untersuchungen von Heilpflanzen, die auf Märkten verkauft wurden, Aflatoxine in zum Teil hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (Proksch 1997).

Von einer Verwendung von Pflanzen und Pflanzenteilen aus einem unkontrollierten Anbau zur Herstellung von Jamu können also konkrete gesundheitliche Risiken für den Verbraucher ausgehen.

Die vorgenannten Probleme mit Jamu-Anwendungen verdeutlichen, dass ein grosser Bedarf daran besteht, durch wissenschaftliche Forschung Erkenntnisse zu gewinnen, die die Gewährleistung der Arzneimittelsicherheit und eine Standardisierung der Jamu-Produkte ermöglichen.

1.2.3. Jamu-Pflanzen als vielversprechende Quelle für neue Arzneistoffe

Als die Sunda- und die Sahul-Schären in der Eiszeit noch über dem Meer lagen, konnten sich sowohl die Pflanzen Asiens als auch die Australiens auf den indonesischen Inseln ausbreiten. Deshalb treffen in der indonesischen Vegetation zwei Florenkreise aufeinander: der asiatische Florenkreis im westlichen Teil Indonesiens, der die Inseln der Sunda-Schären Sumatra, Java, Kalimantan und Bali umfasst, und der australische Florenkreis, der sich über Westirien und Indoaustralien (Sulawesi, Molukken und Nusatenggara) erstreckt (Zeller 1985). Aus diesem Grund verfügt Indonesien über eine enorme Biodiversität mit über 40.000 verschiedenen Pflanzenarten. Von diesen 40.000 Arten werden mindestens 1.000 von diversen ethnischen Gruppen als Heilpflanzen eingesetzt (Soedigyo 1990). Hierbei verfügt jede der mehr als 300 verschiedenen ethnischen Gruppen Indonesiens über ihr eigenes Repertoire an traditionellen Heilmitteln. Unter den verwendeten Pflanzen befinden sich Arten, für die eine pharmakologische Aktivität nachgewiesen wurde und deren Monographien in das Deutsche bzw. Europäische Arzneibuch aufgenommen wurden, wie beispielsweise die oben erwähnte Javanische Gelbwurz (*Curcumae xanthorrhizae rhizoma*, Ph.Eur. 2002) sowie Ingwerwurzelstock (*Zingiberis rhizoma*, Ph. Eur 2002) und Orthosiphonblätter (*Orthosiphonis folium*, Ph. Eur. 2002).

Im Vergleich zur Vegetation Indonesiens ist die Biodiversität der europäischen Flora sehr begrenzt. So umfasst beispielsweise die Flora Deutschlands lediglich etwa 2.000 verschiedene Pflanzenarten, die zum grössten Teil auch schon phytochemisch untersucht worden sind.

Durch phytochemische Untersuchungen an Medizinalpflanzen der traditionellen Volksmedizin Indonesiens eröffnet sich ein Zugang zu der unvergleichlich reichen indonesischen Flora und zu volksmedizinischem Wissen, das noch kaum systematisch untersucht wurde. Hierdurch bieten sich vielversprechende Möglichkeiten auf der Suche nach neuen phytopharmazeutischen Produkten und auch nach neuen Leitsubstanzen zur Wirkstoffentwicklung.

1.2.4 BMBF-Verbundprojekt 0312615 „Pharmakologische Eigenschaften und Kultivierungstechniken von Medizinpflanzen der indonesischen Volksmedizin (JAMU)“

Wie eingangs erläutert, wird der indonesischen Volksmedizin im Hinblick auf neue Arzneistoffe ein grosses Potential zugeschrieben. Daher wurde ein BMBF-Verbundprojekt 0312615 „Pharmakologische Eigenschaften und Kultivierungstechniken von Medizinpflanzen der indonesischen Volksmedizin (JAMU)“ eingerichtet, in dessen Rahmen diese Arbeit entstand. Ziel dieses Projektes war es, wichtige und bislang nicht oder nur wenig erforschte indonesische Arzneipflanzen phytochemisch und pharmakologisch zu untersuchen. Die Projektpartner waren:

- Dr. C. Erdelmeier, Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel, Karlsruhe
- Mr. Gunawan Pranoto, PT Indofarma, Jakarta, Indonesien
- Dr. Ir. Latifah K. Darusman MS, Biopharmaca Research Center, Bogor Agricultural University (IPB), Bogor, Indonesien

Bei diesem Projekt sollten die indonesischen Partner ihre ethnomedizinischen Erfahrungen einbringen, indem sie vielversprechende Pflanzen aussuchten und bereitstellten. Anschliessend sollten am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf von jeder dieser Pflanzen Extrakte unterschiedlicher Polarität hergestellt und zur pharmakologischen Testung an die Firma Schwabe weitergegeben werden. Dort sollten die Extrakte insbesondere auf antidiabetische Wirkung (α -Glycosidase und PTP-1B-Assay) getestet und im Lymphozyten-Transformationstest und im IOS-Ileum untersucht werden. In Abhängigkeit von den Testergebnissen sollten dann am Institut für Pharmazeutische Biologie (HHU) die aktiven Extrakte chromatographisch fraktioniert, die aktiven Naturstoffe identifiziert und dann erneut bei Schwabe biologisch getestet werden (**Abb. 8**).

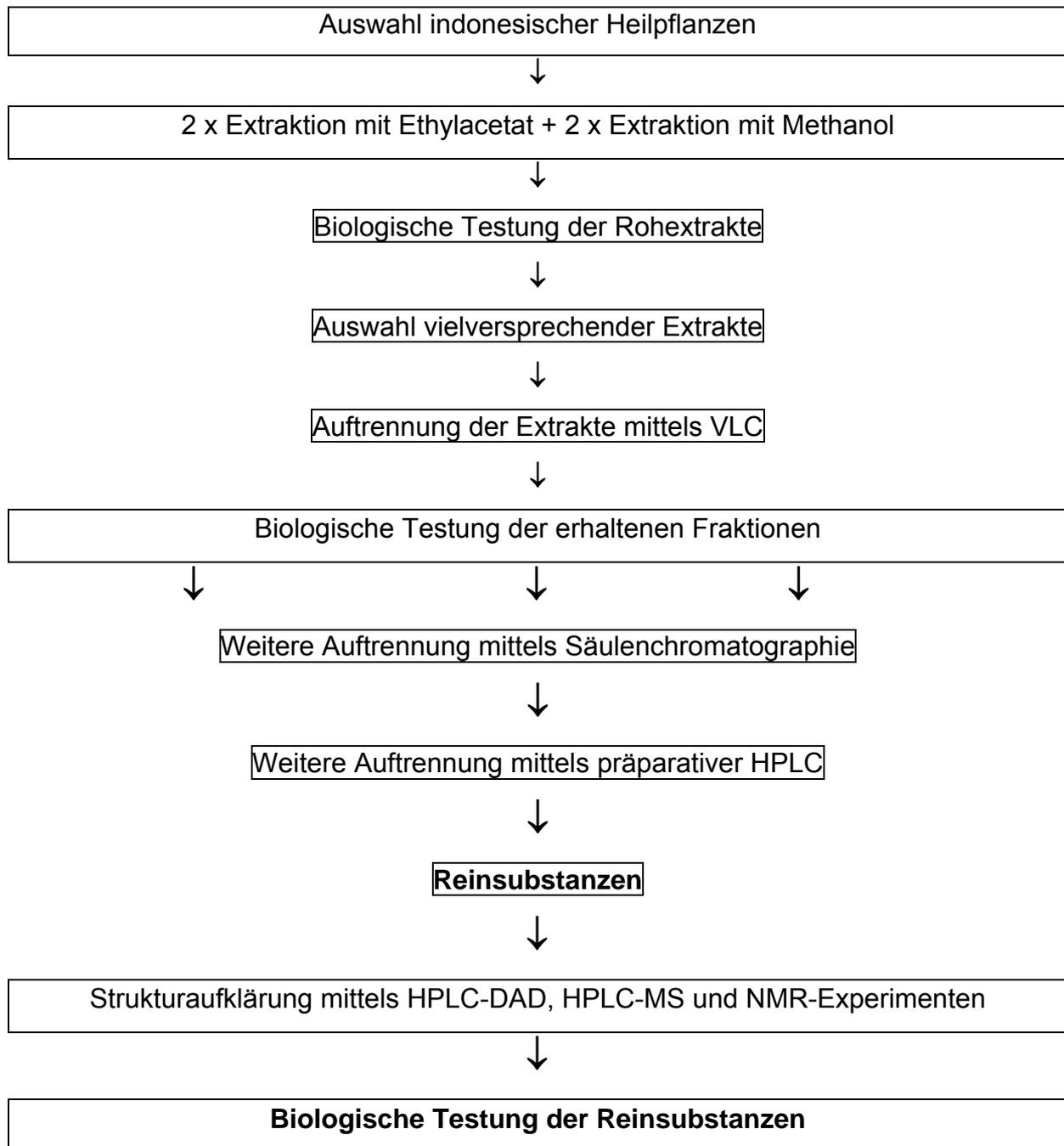


Abb. 8: Vorgehensweise bei der phytochemischen Untersuchung von Jamu-Pflanzen im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes

1.3. Antioxidantien und Krankheitsprävention

In Indonesien werden die diversen Jamu-Produkte nicht nur zur Behandlung von Krankheiten und Befindlichkeitsstörungen, sondern auch zur Krankheitsprävention eingesetzt. Daher werden Jamu-Produkte teilweise regelmässig konsumiert, um das

allgemeine Wohlbefinden zu steigern und die Entstehung von Krankheiten zu verhindern. Dabei werden entweder industriell hergestellte Präparate wie Kapseln, Tabletten und Tropfen oder selbständig aus Pflanzenmaterial nach traditionellen Rezepten hergestellte Getränke oder andere Zubereitungen verwendet. Industrielle Präparate, Pflanzenmaterial und nicht-industrielle Zubereitungen werden in Indonesien teilweise auch auf der Strasse verkauft. („jamu gendong“ = „Jamu von Tür zu Tür“, Proksch 1997). Manche Jamu-Pflanzen sind aber auch Bestandteil der täglichen Ernährung wie das Gemüse „Daun Katuk“, die jungen Blätter von *Sauropus androgynus*.

Die regelmässige Anwendung von Jamu-Pflanzen in Indonesien kann man mit der in westlichen Ländern in den letzten Jahren immer populärer gewordenen Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln, die Vitamine, Spurenelemente und andere Vitalstoffe enthalten, vergleichen. Die Hersteller von Nahrungsergänzungsmitteln werben damit, dass auch ihre Produkte das Wohlbefinden steigern und die Entstehung diverser Krankheiten verhindern können. Die krankheitspräventiven Wirkungen, die solchen Mitteln zugeschrieben werden, werden nicht zuletzt auch auf antioxidativ wirkende Substanzen mit Radikalfängereigenschaften zurückgeführt.

Es ist bekannt, dass u.a. bestimmte Umwelteinflüsse, wie z.B. UV-Strahlung und Smog, zu oxidativem Stress führen können. Unter oxidativem Stress versteht man ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung von Oxidantien und den jeweiligen Verteidigungssystemen eines Organismus. Oxidativer Stress wird mit verschiedenen Krankheiten, wie z.B. Atherosklerose, Diabetes mellitus, Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen, wie die Alzheimer'sche Krankheit und Morbus Parkinson, in Zusammenhang gebracht, da Oxidantien Schäden an Membranen, Erbgut und anderen zellulären Strukturen verursachen können. Deshalb gehen heute die Empfehlungen in Richtung „gesunder Ernährung“ mit viel Obst und Gemüse (Functional Food) oder Ergänzung der Ernährung mit antioxidativ wirkenden Vitaminen. Desweiteren ist bekannt, dass oxidativer Stress auch am Alterungsprozess massgeblich beteiligt ist, was oft mit dem Slogan „Aging is oxidation“ wiedergegeben wird. So treten die oben genannten Erkrankungen, die mit oxidativem Stress in Zusammenhang stehen, oft auch erst in fortgeschrittenem Alter auf. Die Hersteller von Nahrungsergänzungsmitteln werben aus diesem Grund häufig damit, dass ihre Produkte den Alterungsprozess verlangsamen und das äussere Erscheinungsbild verbessern können. Auch in Indonesien werden die verschiedenen

Jamu-Produkte wie schon erwähnt zur Krankheitsprävention, zur Steigerung des Wohlbefindens und zur Steigerung der Attraktivität, insbesondere die Attraktivität von Frauen für Männer, verwendet. Diese Effekte sind vermutlich auf in den jeweiligen Pflanzen enthaltene Stoffe, die unmittelbar oder mittelbar antioxidativ wirken, zurückzuführen. Das Interesse in dieser Arbeit galt insbesondere den unmittelbar antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen aus den traditionellen indonesischen Heilpflanzen.

Insoweit ging die Zielsetzung dieser Arbeit über die biologische Testung bei der Firma Schwabe und somit auch über den Ansatz des zuvor vorgestellten BMBF-Verbundprojekts hinaus.

1.3.1. Die Rolle von oxidativem Stress bei der Entstehung von Krankheiten

Durch Umwelteinflüsse, wie z.B. ionisierende Strahlung, UV-Licht und Zigarettenrauch, aber auch durch Leistungssport und Ischämie sowie durch Phagozyten als Teil der kontrollierten Entzündungsreaktion können freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Daneben entstehen solche Radikale und Sauerstoffspezies auch durch biochemische Redoxreaktionen unter Einbeziehung von Sauerstoff, die im Rahmen des normalen Metabolismus auftreten. Freie Radikale sind chemische Spezies, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen, während ROS ein Oberbegriff für freie Radikale (O_2^{*-} , OH^*) und andere nicht-radikalische Sauerstoffderivate (H_2O_2 , 1O_2 , $HOCl$) ist. Aus diesen reaktiven nicht-radikalischen Spezies können Radikale entstehen, die Biomoleküle durch Oxidation schädigen.

Freie Radikale und ROS besitzen eine hohe chemische Reaktivität, die ihnen Reaktionen mit allen möglichen Molekülen im Organismus erlaubt. Findet eine solche Reaktion mit Biomolekülen statt, kommt es zu einer sogenannten Radikalkettenreaktion (**Abb. 9**), die zu strukturellen und funktionellen Veränderungen an den jeweiligen Biomolekülen führt. Die Gefahr bei diesen Reaktionen ist, dass die entstehenden Oxidationsprodukte selbst wieder Radikale sind. Anfangs entsteht durch Wärme, Licht oder andere freie Radikale aus einem Biomolekül ein freies Radikal und reagiert dann mit einem anderen Molekül, z.B. mit Sauerstoff zu einem

weiteren Radikal, das dann erneut mit Biomolekülen reagieren und diese zerstören kann. Gleichzeitig werden immer wieder neue Radikale generiert, die dann ihrerseits Biomoleküle angreifen können, wodurch sich die Radikalkettenreaktion weiter fortpflanzt.

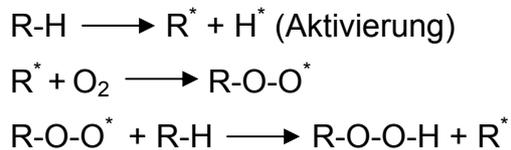


Abb. 9: Durch freie Radikale hervorgerufene Kettenreaktion

Die schädigende Wirkung von freien Radikalen ist jedoch nicht ausschliesslich unerwünscht, sondern wird von unserem Körper u.a. für immunologische Killermechanismen auch gezielt genutzt. So können Phagozyten, Makrophagen und andere Zellen freie Radikale durch den sogenannten „Respiratory Burst“ produzieren, um Bakterien zu zerstören und um Mediator- und Überträgersubstanzen zu bilden und zu modifizieren.

Wie eingangs bereits erwähnt greifen instabile freie Radikale aber auch eigene Zellbestandteile an und verursachen Schäden an Lipiden, Proteinen und DNA. Die hierdurch initiierte Reaktionskette kann sogar eine Erkrankung zur Folge haben. So tragen Schäden an der DNA beispielsweise zur Entstehung von Krebserkrankungen bei, und die Zerstörung von cholinergen bzw. dopaminergen Neuronen im zentralen Nervensystem kann Morbus Alzheimer bzw. Morbus Parkinson zur Folge haben. Die oxidative Veränderung von Low-Density-Lipoproteinen verstärkt auf verschiedenen Wegen deren proatherogenen Eigenschaften und kann so zu Atherosklerose führen. So wirkt oxidiertes LDL unter anderem chemotaktisch auf zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten und wird verstärkt von Makrophagen aufgenommen. Die Aufnahme von LDL durch Makrophagen führt zu einer Anreicherung von Cholesterolestern und zur Bildung von Schaumzellen aus den Makrophagen. Monozyten, T-Lymphozyten und Schaumzellen heften sich dann an beschädigte Stellen im Gefässendothel an, und es kommt zur Bildung von Plaque und zur Arterienverkalkung.

1.3.2. Schutzmechanismen des menschlichen Körpers gegen oxidativen Stress (Antioxidatives Netzwerk)

Der menschliche Körper kann sich auf verschiedene Weise gegen oxidativen Stress schützen. So komplexieren die Plasmaproteine Transferrin, Ceruloplasmin und Albumin Metallionen wie Cu^{2+} und Fe^{2+} und verhindern so die Reaktion dieser Metalle mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ und mit Wasserstoffperoxid und damit die Entstehung von hochreaktiven Sauerstoffspezies wie dem Hydroxylradikal. Sie stellen das erste antioxidative Verteidigungssystem im Körper dar.

Des Weiteren verfügt der Körper über antioxidative Enzyme im Blutplasma und in den Erythrozyten, die sogenannten präventiven Antioxidantien. Dazu zählen die Superoxiddismutase (SOD), die die Reaktion von $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Superoxidradikal) zu H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) katalysiert sowie die Glutathionperoxidase und die Catalase, die die Reaktion von H_2O_2 zu H_2O katalysieren und damit die Spezies (Superoxidradikal, Wasserstoffperoxid) eliminieren, die an der Initiation von Radikalkettenreaktionen beteiligt sind. Somit können diese präventiven Antioxidantien einen Kettenabbruch der Radikalkettenreaktion bewirken.

Schliesslich dienen diverse Antioxidantien, die zum Teil nicht vom Körper selbst synthetisiert werden können und deshalb mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, als Schutz vor oxidativem Stress. Solche Antioxidantien sind Substanzen, die im Vergleich zu der oxidierbaren Substanz bereits in kleiner Konzentration die oxidative Zersetzung (Autooxidation) dieses Substrats signifikant verzögern oder hemmen. Diese Antioxidantien werden offensichtlich durch ihr niedriges Redoxpotential und in ihrer Funktion als Wasserstoffdonatoren leichter oxidiert als die zu schützenden Substanzen. Dazu zählen kleinere körpereigene Moleküle wie Harnsäure (im Plasmawasser), Bilirubin und Glutathion (Erythrozyten, Plasma), die als sogenannte Radikalfänger-Antioxidantien fungieren und durch das Abfangen von freien Radikalen zu einem Abbruch von Radikalkettenreaktionen führen. Zu diesen Radikalfänger-Antioxidantien zählen auch Flavonoide und andere pflanzliche Polyphenole sowie das wasserlösliche Vitamin C (Ascorbinsäure, **Abb. 10**) und die fettlöslichen Vitamine E (α -Tocopherol, **Abb. 11**) und A (Retinol) sowie dessen Vorstufen, die Carotinoide, und das Coenzym Q (Ubichinon), die alle mit der Nahrung aufgenommen werden. Nachdem die Antioxidantien Radikale

aufgenommen haben bzw. oxidiert wurden, können sie von anderen Antioxidantien regeneriert werden. So kann beispielsweise Ascorbinsäure das Vitamin-E-Radikal reduzieren und wird dabei selbst über das Semidehydroascorbylradikal zu Dehydroascorbinsäure oxidiert. Diese wiederum wird von Glutathion wieder zu Ascorbat reduziert, während aus dem Glutathion Glutathiondisulfid entsteht, usw.. Da Antioxidantien im Verlauf der Reaktion verbraucht werden, haben Menschen, die verstärkt Einflüssen ausgesetzt sind, die oxidativen Stress begünstigen, wie zum Beispiel Zigarettenrauch oder UV-Strahlung, oder die an bestimmten Erkrankungen wie Atherosklerose oder Diabetes mellitus leiden, einen erhöhten Bedarf an Antioxidantien.

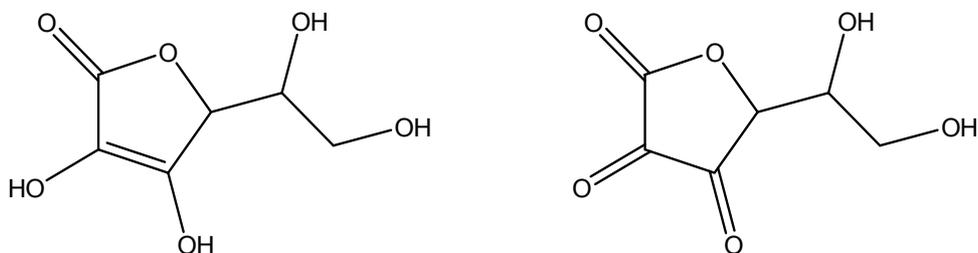


Abb. 10: Struktur der Ascorbinsäure (Vitamin C) und seiner oxidierten Form, der Dehydroascorbinsäure (DHA)

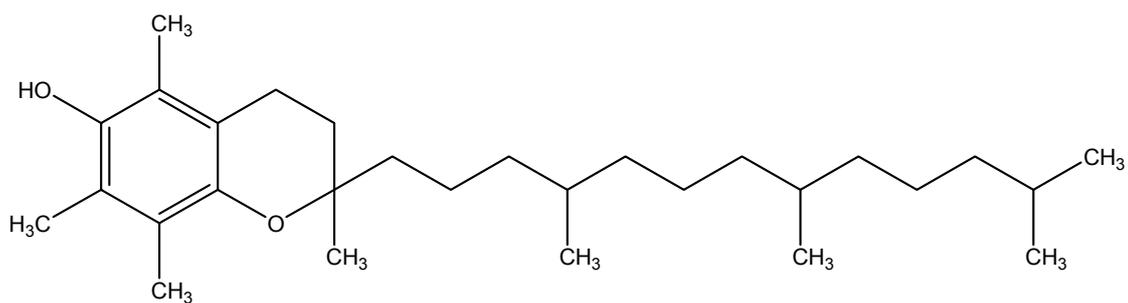


Abb. 11: Struktur des α -Tocopherols (Vitamin E)

1.3.3. Pflanzliche Polyphenole zum Schutz des menschlichen Körpers vor oxidativem Stress

Besonderes Interesse galt in dieser Arbeit den pflanzlichen Polyphenolen, deren Rolle als wasserlösliche, potente Antioxidantien in der Krankheitsprävention in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat. Der Begriff „Polyphenole“ ist ein Oberbegriff für mehr als 5000 natürliche aromatische Verbindungen, die mit vielen Hydroxygruppen substituiert sind. Sie kommen in fast allen Pflanzen vor und werden in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich in aromatische Säuren, die Aroma vermitteln (Gerbstoffe), und in Flavonoide, die für die Farbe der Kronblätter vieler Blütenpflanzen und von beispielsweise Kirschen, Rotkohl und Rotwein etc. verantwortlich sind. Unter den Polyphenolen finden sich Stoffe, die vor Infektionen und Entzündungen schützen sowie Krebs und Herzinfarkt vorbeugen können. Ein bekanntes Beispiel für ein biologisch aktives Polyphenol ist das Resveratrol (**Abb. 12**), das neben Procyanidinen und Catechin und Epicatechin im Rotwein vorkommt (Nigdikar 1998). Diese Inhaltsstoffe stellen die Basis für das sogenannte „French Paradoxon“ (Renaud und Ruf 1994) dar, welches besagt, dass in Frankreich aufgrund des starken Rotweinkonsums weniger Fälle von Herzkrankgefässerkrankungen auftreten als in anderen Ländern. Dieses Phänomen soll teilweise auf die genannten Polyphenole zurückzuführen sein. Hierzu wurden zahlreiche Studien durchgeführt (Ferroluzzi und Serafini 1995, Derijke et al. 1996). Dabei konnten zwar tatsächlich antioxidative Effekte bei der Aufnahme von Rotwein in den menschlichen Körper gezeigt werden, aber die Ergebnisse waren zum Teil auch widersprüchlich. Auch grünem Tee und Schokolade werden aufgrund ihres Polyphenolgehaltes antioxidative bzw. gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Dabei stellen in grünem Tee Catechine wie Epigallocatechingallat (**Abb. 13**) die phenolische Hauptkomponente dar (Harbowy und Balentine 1997), der die entsprechende Wirkung zugeschrieben wird. In Schokolade sollen ebenfalls Catechine wie Epicatechin für die antioxidative Wirkung verantwortlich sein (Wang et al. 2000).

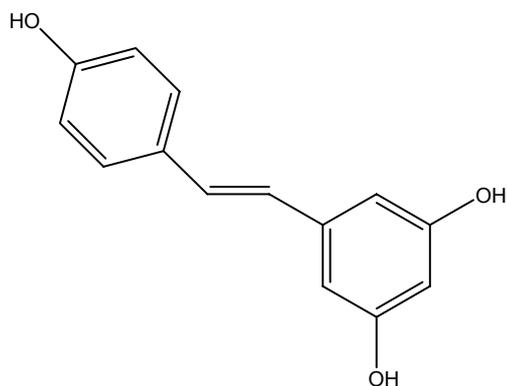


Abb. 12: Struktur des Resveratrols aus Rotwein

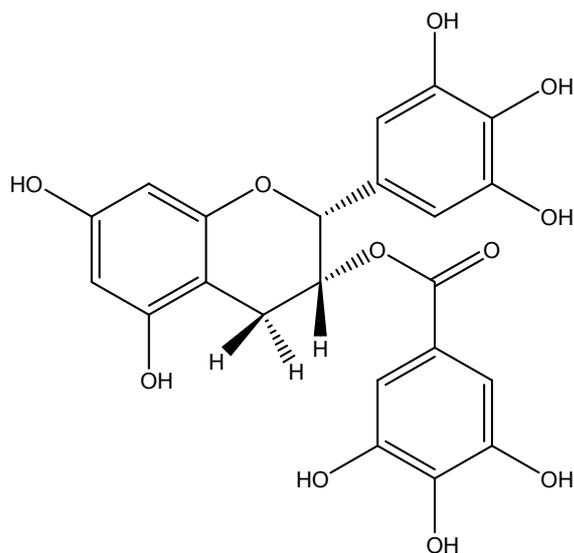


Abb. 13: Struktur des Epigallocatechingallats (EGCG) aus grünem Tee

1.4. Ziel der Arbeit

Da Jamu-Präparate in Indonesien nicht nur zur Heilung, sondern auch zur Prävention von Krankheiten, zur Steigerung des Wohlbefindens und zur Verlangsamung des Alterungsprozesses eingesetzt werden, und wie oben gezeigt Antioxidantien bei solchen Prozessen eine wichtige Rolle spielen, war es das Ziel dieser Arbeit, im Rahmen des unter 1.2.4. vorgestellten BMBF-Verbundprojektes 0312615 „Pharmakologische Eigenschaften und Kultivierungstechniken von Medizinpflanzen

der indonesischen Volksmedizin (JAMU)“, Extrakte von indonesischen Heilpflanzen mit antioxidativer Aktivität zu finden und die für die Aktivität verantwortlichen Inhaltsstoffe zu isolieren, zu identifizieren und deren antioxidative Aktivität zu charakterisieren.

Dazu sollten die aktiven Extrakte mit chromatographischen Methoden aufgetrennt und die Fraktionen ihrerseits auf antioxidative Aktivität hin getestet werden. Aus diesen Fraktionen sollten anschliessend die aktiven Inhaltsstoffe isoliert und deren Struktur mittels HPLC-DAD, HPLC-MS sowie NMR-Experimenten aufgeklärt werden. Darüberhinaus sollte die Aktivität der Reinsubstanzen in einem *in vitro*-Assay quantifiziert und mittels verschiedener Experimente in einem Zellkultursystem charakterisiert werden (**Abb. 14**).

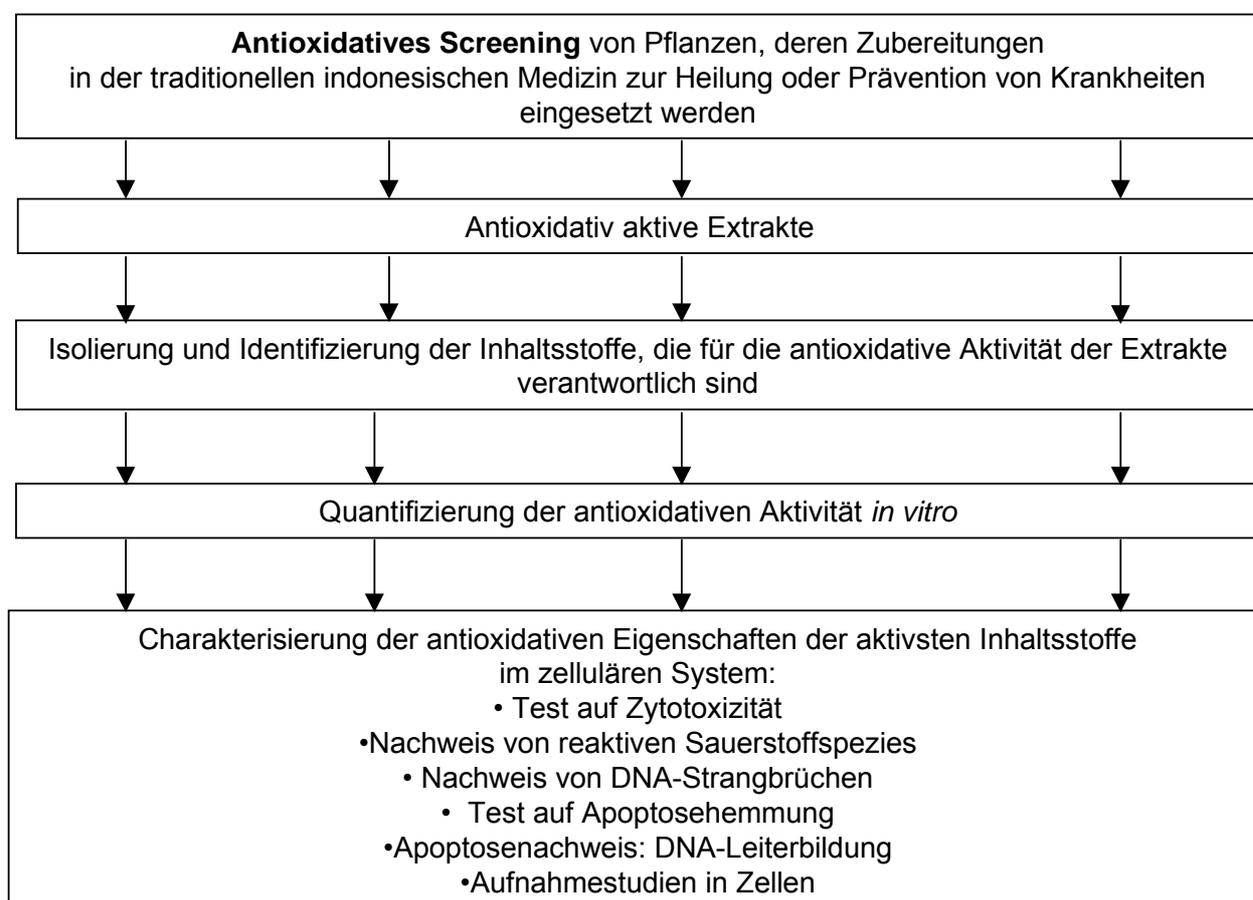


Abb. 14: Jamu-Pflanzen als Quelle für antioxidativ wirksame Naturstoffe

Die Extraktion der indonesischen Heilpflanzen, die Fraktionierung der Extrakte und die Testung der Extrakte und Fraktionen auf antioxidative Aktivität mittels DC-Platten-DPPH-Assay erfolgte am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf. Ausserdem wurden hier die aktiven Inhaltsstoffe

isoliert, identifiziert und deren Aktivität mit einem photometrischen DPPH-Assay quantifiziert.

Die Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften der aktivsten isolierten Inhaltsstoffe in der Zellkultur erfolgte dann am Institut für Toxikologie der HHU Düsseldorf. Die Aufnahmestudien zur Untersuchung der Aufnahme der antioxidativen Verbindungen in Zellen wurden in Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Pharmazeutische Biologie und dem Institut für Toxikologie der HHU Düsseldorf durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

2.1.1. Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes untersuchte Pflanzen

Insgesamt wurden im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes 0312615 "Pharmakologische Eigenschaften und Kultivierungstechniken von Medizinpflanzen der indonesischen Volksmedizin (JAMU)" 39 Pflanzen bearbeitet (**Tab. M1**). Dazu wurden 21 indonesische Heilpflanzen von der Firma PT Indopharma in Jakarta (Indonesien) ausgewählt und zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um die Pflanzen 1 bis 21 in Tabelle M1. 18 weitere Pflanzen (22 bis 39), die ebenfalls in der traditionellen indonesischen Medizin eingesetzt werden, stellte die Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel in Karlsruhe zur Verfügung. Alle Pflanzenteile wurden in getrocknetem Zustand geliefert.

Tab. M1: Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes extrahierte Pflanzen

Pflanze	Familie	verwendete Pflanzenteile
1 <i>Murraya paniculata</i>	Rutaceae	Blätter
2 <i>Centella asiatica</i>	Apiaceae	Kraut
3 <i>Cyperus rotundus</i>	Cyperaceae	Rhizom
4 <i>Curcuma xanthorrhiza</i>	Zingiberaceae	Rhizom
5 <i>Curcuma domestica</i> ,	Zingiberaceae	Rhizom
6 <i>Curcuma manga</i>	Zingiberaceae	Rhizom
7 <i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	Früchte
8 <i>Piper retrofractum</i>	Piperaceae	Früchte
9 <i>Alstonia scholaris</i>	Apocynaceae	Rinde
10 <i>Orthosiphon aristatus</i>	Lamiaceae	Kraut
11 <i>Zingiber purpureum</i>	Zingiberaceae	Rhizom
12 <i>Plectranthus amboinicus</i>	Lamiaceae	Kraut
13 <i>Andrographis paniculata</i>	Acanthaceae	Kraut
14 <i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	Blätter
15 <i>Eurycoma longifolia</i>	Simarubaceae	Rinde
16 <i>Physalis minima</i>	Solanaceae	Kraut

17 <i>Sonchus arvensis</i>	Asteraceae	Blätter
18 <i>Alyxia reinwardtii</i>	Apocynaceae	Rinde
19 <i>Guazuma ulmifolia</i> ,	Sterculiaceae	Blätter
20 <i>Sauropus androgynus</i> ,	Euphorbiaceae	Blätter
21 <i>Graptophyllum pictum</i> ,	Acanthaceae	Blätter
22 <i>Artemisia vulgaris</i>	Asteraceae	Kraut
23 <i>Artemisia vulgaris</i>	Asteraceae	Wurzel
24 <i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	ganze Pflanze
25 <i>Cinnamomum verum</i>	Lauraceae	Rinde
26 <i>Achillea millefolium</i>	Asteraceae	Kraut
27 <i>Foeniculum vulgare</i>	Apiaceae	Früchte
28 <i>Cinnamomum aromaticum</i> ,	Lauraceae	Rinde
29 <i>Piper methysticum</i>	Piperaceae	Rhizom
30 <i>Valeriana officinalis</i>	Valerianaceae	Wurzel
31 <i>Polygala senega</i>	Polygalaceae	Wurzel
32 <i>Cucurbita pepo</i>	Cucurbitaceae	Samen
33 <i>Anethum graveolens</i>	Apiaceae	Früchte
34 <i>Capsicum sp</i>	Solanaceae	Früchte
35 <i>Allium cepa</i>	Liliaceae	Zwiebelknollen
36 <i>Cinchona succirubra</i>	Rubiaceae	Rinde
37 <i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	Früchte
38 <i>Zea mays</i>	Poaceae	Kraut
39 <i>Usnea dasypoga</i>	Usneaceae	getrockneter Thallus

2.1.2. Anzucht von *Guazuma ulmifolia* im Gewächshaus

Um zu überprüfen, ob die untersuchten Pflanzen hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe unter Gewächshausbedingungen qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse liefern können wie für das Pflanzenmaterial aus Indonesien ermittelt, wurde stellvertretend *Guazuma ulmifolia* im Gewächshaus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angezogen, und nach ungefähr 14 Monaten wurden Blätter und Rinde extrahiert und ebenfalls auf antioxidative Inhaltsstoffe untersucht.

Die Samen von *Guazuma ulmifolia* wurden online bei der Firma Sunshine-Seeds (Harkortstrasse 16, 59229 Ahlen, <http://www.sunshine-seeds.de>) bestellt, und die Pflanze wurde im Gewächshaus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Herrn Rogmann und seinen Mitarbeitern kultiviert. Fünf Samen wurden am 25.11.2002 zunächst eine Minute in 75 °C heissem Wasser und dann 24 Stunden in kaltem Wasser vorgequollen und danach in Sand als Substrat in Tontöpfen ausgesät. Zwei Pflanzen keimten und konnten am 12.12.2002 in Floraton-Sand 1:1 umgetopft

werden. Am 12.02.2003 wurden sie dann in Topferde umgetopft und am 25.03. bzw. am 02.05.2003 (ebenfalls in Topferde) jeweils in grössere Plastiktöpfe transferriert. Die Tagestemperaturen betragen anfangs 26 °C und ab dem 03.01.2003 24 °C, die Nachttemperaturen 21 °C, und die Luftfeuchte lag anfangs über und ab dem 01.03.2003 dann um 70%. Das Licht wurde von einer Hochdruck-Natriumdampflampe (SON-T 400 W, 60000 Lux, schattiert) gespendet, und die Tageslänge betrug 16 Stunden. Am 20.02.2004 wurden zunächst einige Blätter und am 10.05 2004 jeweils die ganze Pflanze geerntet. Dazu wurde der Stamm ungefähr 20 cm über der Erde abgesägt, die Blätter und die Rinde vom Stamm getrennt und jeweils an der Luft getrocknet. Der verbliebene Stamm wurde weiter im Gewächshaus belassen, um ein erneutes Austreiben der Blätter zu ermöglichen.

2.1.3. Transfair von *Guazuma ulmifolia* ins Freiland

Nach der Ernte trieb eine der beiden Pflanzen erneut aus und wurde am 22.06.2004 ins Freiland transferiert, um den Einfluss von UV-Strahlung auf die Inhaltsstoffproduktion der Pflanze zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Pflanze vier Wochen lang an der Südseite eines Gewächshauses im botanischen Garten der HHU Düsseldorf direkter Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Nach ca. zwei Wochen (am 08.07.2004) erfolgte die erste Ernte einiger Blätter, weitere zwei Wochen später (am 21.07.2004) die zweite Ernte. Diese Blätter wurden jeweils sofort gefriergetrocknet und mittels HPLC und LC-MS auf ihre Inhaltsstoffe untersucht.

2.2. Untersuchung des Pflanzenmaterials

2.2.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes

2.2.1.1. Extraktion

Die folgende Extraktionsmethode wurde von der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel vorgeschlagen. Jeweils 50 g der in 2.1.1. aufgeführten getrockneten Pflanzenteile wurden in einer Drogenmühle zerkleinert und sukzessive zweimal eine Stunde lang mit der siebenfachen Menge (in diesem Fall 350 ml) Ethylacetat und zweimal eine Stunde lang mit der siebenfachen Menge Methanol unter Rühren extrahiert. Nach dem einstündigen Rühren wurden die Extrakte jeweils über einen Büchnertrichter unter Vakuum abfiltriert, und der Rückstand wurde weiter extrahiert. Die beiden Ethylacetat- und Methanolextrakte wurden jeweils vereinigt, im Rotationverdampfer eingeeengt und im Exsikkator unter Vakuum getrocknet.

2.2.1.2. Chemische Untersuchung und biologische Testung

Alle Rohextrakte wurden in der HPLC und in der LC-MS analysiert und bei der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel in verschiedenen biologischen Testsystemen untersucht.

2.2.1.3. Fraktionierung der aktiven Extrakte

Sechs Extrakte, die in verschiedenen Biotests bei der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel aktiv waren, wurden mittels Vakuum-Flüssig-Chromatographie fraktioniert. Mit einem *n*-Hexan-Ethylacetat-Gradienten (100% Hexan → 100% Ethylacetat in 2%-Schritten und Spülen mit Ethylacetat-Methanol 50:50 und dann mit 100% Methanol) wurden jeweils zwölf Fraktionen aus den Extrakten erhalten, die zur weiteren Testung an die Firma Schwabe geschickt wurden, um herauszufinden, in welchen Fraktionen sich die aktiven Inhaltsstoffe befinden. Die aktiven Fraktionen wurden dann mittels HPLC und LC-MS mit den inaktiven verglichen, und die Aktivität

wurde bestimmten Peaks zugeordnet. Durch Vergleich der jeweiligen UV-Spektren und Molekülmassen mit bekannten Verbindungen konnten die Inhaltsstoffe dann identifiziert werden.

2.2.2. Mikroskopische Untersuchung von *Guazuma ulmifolia* (Indonesien) und *Guazuma ulmifolia* (Gewächshaus)

Zum mikroskopischen Vergleich der Pflanze aus Indonesien mit der aus dem Gewächshaus wurde aus einem frischen Blatt von *Guazuma ulmifolia* (Gewächshaus) mit Hilfe einer Rasierklinge ein Blattquerschnitt angefertigt. Dieser sowie der eines getrockneten Blatts der Droge aus Indonesien wurden auf je einem Objektträger mit Chloralhydrat über einem Bunsenbrenner kurz aufgekocht, um Chlorophyll zu entfernen und das Präparat aufzuhellen.

Danach wurden beide Präparate bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet.

2.2.3. Antioxidatives Screening

Die Ethylacetat- und Methanolextrakte der Pflanzen *Sonchus arvensis* L., Asteraceae ('Daun Tempuyung'), *Graptophyllum pictum* Griff., Acanthaceae ('Daun Ungu'), *Alyxia reinwardtii* Bl., Apocynaceae ('Pulosari'), *Alstonia scholaris* L., Apocynaceae ('Pule'), *Sauropus androgynus* Merr., Euphorbiaceae ('Daun Katuk') und *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae ('Daun Jati Belanda') wurden mittels DC-Platten-DPPH-Assay qualitativ auf antioxidative Aktivität geprüft.

2.2.3.1. Taxonomie der untersuchten Pflanzen

Abteilung: Spermatophyta
Angiospermae

Unterabteilung: Magnoliophytina

Klasse: Rosopsida

Unterklasse: Asteridae

Ordnungsgruppe: Kronröhrenblütige

Ordnung: Gentianales

Familie: Apocynaceae

- *Alyxia reinwardtii* Bl.

- *Alstonia scholaris* L.

Ordnung: Scrophulariales

Familie: Acanthaceae

- *Graptophyllum pictum* Griff.

Ordnungsgruppe: Dolden- und Korbblütler

Ordnung: Asterales

Familie: Asteraceae (Unterfamilie:
Asteroideae)

- *Sonchus arvensis* L.

Unterklasse: Rosidae

Ordnungsgruppe: Malvenartige

Ordnung: Malvales

Familie: Sterculiaceae

- *Guazuma ulmifolia* Lam.

Ordnungsgruppe: Veilchenartige

Ordnung: Euphorbiales

Familie: Euphorbiaceae

- *Sauropus androgynus* Merr.

Abb. M1: Einordnung der bearbeiteten Pflanzenspezies in das taxonomische System nach Frohne und Jensen 1998

2.2.3.2. DPPH-Assay

Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) ist ein violettfarbenes stabiles freies Radikal. In Anwesenheit von antioxidativ aktiven Verbindungen bzw. Radikalfängern wird es zu dem gelben Diphenylpicrylhydrazin reduziert (**Abb. M2**). Führt man den Assay auf einer DC-Platte durch, wird die Platte nach dem Entwickeln getrocknet und dann mit einer 1%-igen Lösung von DPPH in Methanol besprüht. Antioxidativ aktive Banden

erscheinen gelb auf violetterm Hintergrund (Kirby et al. 1997). In diesem Fall wurden die Extrakte der oben genannten Pflanzen vor dem Besprühen mit dem DPPH-Reagenz auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und mit Dichlormethan:Methanol 9:1 entwickelt (siehe auch unter 2.3.3.).

Materialien für den DPPH-Assay:

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (ca. 90%)

Sigma

Propylgallat (97%)

Aldrich

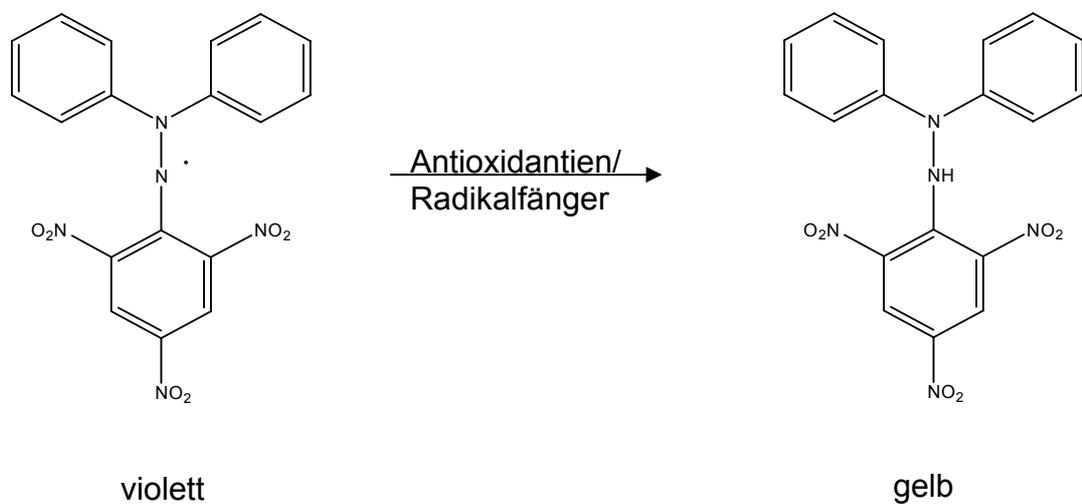


Abb M2: Reduktion von violetterm Diphenylpicrylhydrazyl zu gelbem Diphenylpicrylhydrazin in Gegenwart von Antioxidantien/Radikalfängern

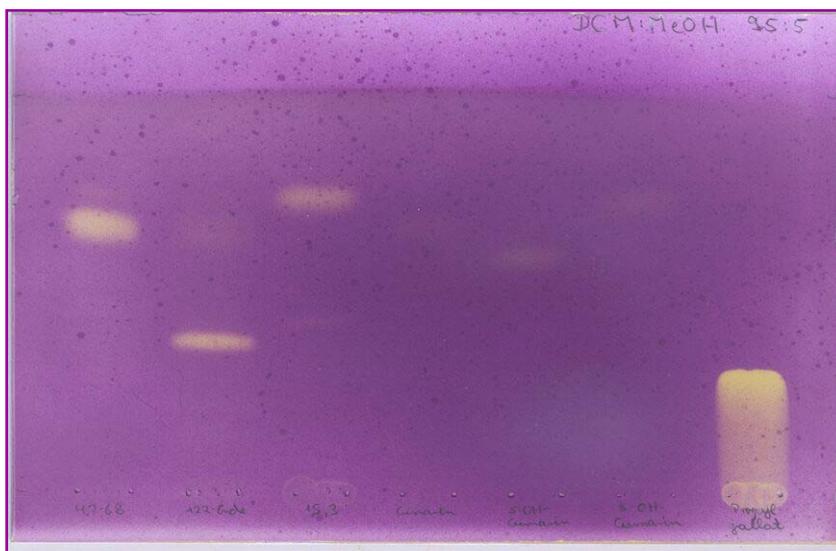


Abb. M3: DC-Platte mit antioxidativ aktiven Banden nach Besprühen mit einer 1% igen DPPH-Lösung in Methanol

2.3. Isolierung der antioxidativ aktiven Inhaltsstoffe

2.3.1. Extraktion

Die Pflanzen, deren Extrakte im DPPH-Assay antioxidative Eigenschaften zeigten, wurden in einem grösseren Ansatz extrahiert (300g bis 1000g Droge). Dabei wurde das jeweilige Pflanzenmaterial in einer grossen Drogenmühle zerkleinert und dann wie unter 2.2.1.1. beschrieben extrahiert. Eine Ausnahme bildete hierbei die Droge von *Guazuma ulmifolia* aus Indonesien. In Vorversuchen war aufgefallen, dass bei dieser Droge die Ausbeute grösser war, wenn mit der Soxhlet-Apparatur extrahiert wurde. Deshalb wurde diese Methode dann auch für den grossen Ansatz gewählt, und es wurden 762 g zerkleinerte Droge auf vier 1000 ml-Soxhlet-Apparaturen mit 2000 ml-Rundkolben verteilt und sukzessive mit Dichlormethan und Methanol jeweils bis zur Erschöpfung (insgesamt 72 h) extrahiert. Die Dichlormethan- und Methanolextrakte wurden jeweils vereinigt und am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingeengt.

Die am 20.02.2004 geernteten Blätter der im Gewächshaus angezogenen *Guazuma ulmifolia* wurden nach der Ernte sofort fünf Tage lang gefriergetrocknet und dann ebenfalls wie in 2.2.1.1. beschrieben extrahiert.

2.3.2. Flüssig-Flüssig-Verteilung

Die Vortrennung des Rohextrakts wurde durch Flüssig-Flüssig-Verteilung vorgenommen. Diese wurde im Scheidetrichter durchgeführt, wobei sich die eingesetzten Volumina nach der Rohextraktmenge richteten.

In der Regel erfolgte eine dreimalige Ausschüttelung von Hand für jeweils 15 min. Die Phasentrennung wurde im Scheidetrichter erreicht.

Die Methanolextrakte von *Guazuma ulmifolia* (Blattdroge aus Indonesien und Rinde der Gewächshauspflanze) und *Alstonia scholaris* wurden jeweils in einem Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 9:1 gelöst und dann gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt, um stark lipophile Strukturen wie Fettsäuren abzutrennen. Die Wasser-Methanol-Phase wurde im Rotationsverdampfer eingeengt, in Ethylacetat gelöst und erneut gegen Wasser ausgeschüttelt, um stark hydrophile Stoffe wie

Zucker zu entfernen. Die Ethylacetatphase wurde dann mittels Vakuum-Liquid-Chromatographie, Säulenchromatographie und präparativer Hochleistungsflüssigchromatographie weiter aufgetrennt bzw. aufgereinigt.

Der Methanolextrakt von *Alyxia reinwardtii* wurde in Wasser gelöst und gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wurde eingeeengt, in Methanol gelöst und gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt. Der Methanolphase wurde Wasser hinzugesetzt, der entstehende Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand mittels Säulenchromatographie weiter aufgetrennt.

Bei den Methanolextrakten von *Sauropus androgynus* und *Guazuma ulmifolia* (Blätter der Gewächshauspflanze) wurde auf eine Flüssig-Flüssig-Verteilung verzichtet und sofort mit Vakuumliquidchromatographie bzw. Säulenchromatographie fortgefahren.

Jede Fraktion wurde per DC und per HPLC hinsichtlich Komplexität und chemischer Diversität untersucht. Um die antioxidativ aktiven Fraktionen auf dem Wege der Isolierung der aktiven Reinsubstanzen zu ermitteln, wurde im Laufe der Auftrennung der Extrakte jede Fraktion auf DC-Platte wie in 2.2.3.2. beschrieben mittels DPPH-Assay auf antioxidative Aktivität hin überprüft, und es wurden die Fraktionen weiter bearbeitet, die diese Aktivität zeigten (bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung).

Eine besondere Form der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie stellt die Fast-Centrifugal-Partition-Chromatography (FCPC) dar, die im Rahmen dieser Arbeit zur weiteren Auftrennung einer VLC-Fraktion benutzt wurde und in 2.3.5. beschrieben ist.

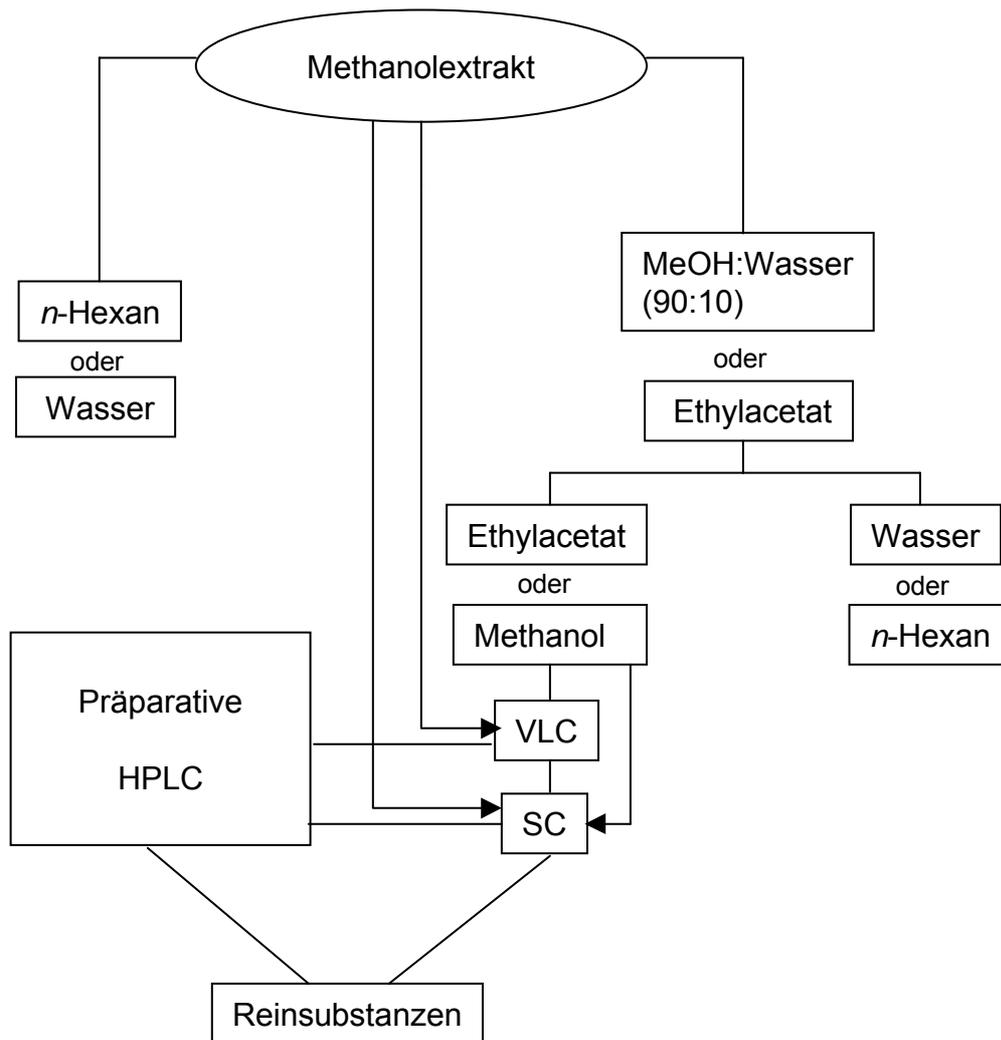


Abb. M4: Die Isolierung von Reinsubstanzen aus den Extrakten. Die einzelnen Fraktionen wurden im DPPH-Assay auf antioxidative Eigenschaften getestet sowie HPLC-chromatographisch (Dioden-Array-Detektor) analysiert.

2.3.3. Dünnschichtchromatographie (DC)

Mit Hilfe der analytischen Dünnschichtchromatographie wurde die qualitative Zusammensetzung der Rohextrakte sowie der ausgeschüttelten Phasen und der säulenchromatographisch getrennten Fraktionen ermittelt. Ferner diente die DC im Vorversuch der Vakuumliquidchromatographie und der Säulenchromatographie zur Optimierung des geeigneten Fließmittelgemisches für die jeweilige stationäre Phase. Verwendet wurden hierfür DC-Fertigplatten Kieselgel 60, F₂₅₄, und HPTLC-Fertigplatten RP-18.

Für die Auswertung der säulenchromatographischen Trennung wurden Kieselgelplatten verwendet. Das Fließmittelgemisch bestand in diesem Falle in der Regel aus Dichlormethan:Methanol (z.B. 90:10) oder aus Hexan:Ethylacetat (z.B. 30:70).

Bei der Dünnschichtchromatographie an der Umkehrphase RP-18 (RP=reversed phase) wurde stets ein Methanol-Wasser-Gemisch (z.B.: 70:30) verwendet.

Je nach Trennproblem wurde das Verhältnis der verschiedenen Fließmittel variiert. Alle DC-Platten wurden bei Kammersättigung über eine Laufstrecke von ca. 10 cm entwickelt. Die Auswertung der Platten erfolgte zunächst visuell durch Detektion im UV-Licht bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung) sowie bei 366 nm (Eigenfluoreszenz). Anschließend wurden die Platten nach dem Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz oder Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz und Erhitzen auf 110 °C für 3 min betrachtet.

Materialien für die Dünnschichtchromatographie:

DC-Fertigplatte (Alufolie) , Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 0.2mm Schichtdicke	Merck
HPTLC-Fertigplatte (Glas), RP-18 F ₂₅₄ S. 0.25mm Schichtdicke	Merck

Zur Herstellung des Anisaldehyd-Sprühreagenz wurden diese Chemikalien in folgender Reihenfolge miteinander versetzt:

- 0.5 ml 4-Methoxybenzaldehyd, Merck
- 85 ml Methanol (destilliert)
- 10 ml Essigsäure (100%), Merck
- 5 ml Schwefelsäure (conc.), Merck

Zur Herstellung des Vanillin-Sprühreagenz wurden diese Chemikalien in folgender Reihenfolge miteinander versetzt:

- 0.5 g 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd, Caelo
- 85 ml Methanol (destilliert)
- 10 ml Essigsäure (100%), Merck
- 5 ml Schwefelsäure (conc.), Merck

2.3.4. Vakuumflüssigchromatographie (VLC)

Die VLC ist eine sehr effektive und zeitsparende Methode zur Vortrennung, bei der mit einem Mal bis zu 30 g Trockenextrakt aufgetragen werden können (Coll and Bowden, 1986).

Bei der VLC wurde die stark konzentrierte Probe mit der stationären Phase (Kieselgel 60, Korngröße 15 - 40 µm, Merck) verrieben. Diese Verreibung wurde auf den Säulenkopf aufgebracht. Als Säule diente ein mit Kieselgel beschicktes, oben offenes Glasrohr, das unten mit einer Fritte abschließt. Unterhalb der Fritte befand sich der Abfluß und seitlich neben dem Abfluß ein Vakuumsaugstutzen.

Zur Durchführung der VLC wurde vakuumbeschleunigt mit einem Lösungsmittelgradienten steigender Polarität eluiert. Hierfür wurden verschiedene Lösungsmittel in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander kombiniert.

Für die Trennung des Methanolextraktes von *Sauropus androgynus* wurde zunächst mit den folgenden drei Lösungsmittelgemischen eluiert: 100% *n*-Hexan, *n*-Hexan:Dichlormethan 50:50, *n*-Hexan:Dichlormethan 10:90. Dann folgte eine elutrope Reihe mit Dichlormethan:Methanol in folgenden Verhältnissen: 100% bis 90% in 1%-Schritten und 90% bis 50% in 5%-Schritten. Schliesslich wurde noch zweimal mit 100% Methanol gespült. Das Volumen des Elutionsmittels betrug jeweils 250 ml.

Für die Trennung der Ethylacetatphase des Methanolextraktes von *Alstonia scholaris* wurde die folgende elutrope Reihe verwendet: Dichlormethan:Methanol 100% bis 95% in 0.5%-Schritten, von 95% bis 90% in 1%-Schritten, von 90% bis 80% in 5%-Schritten und von 80% bis 50% in 10%-Schritten. Auch hier wurde die VLC mit 100% Methanol beendet. Das Volumen des Elutionsmittels betrug bei der Auftrennung dieser Phase jeweils 200 ml.

Die Trennung der Ethylacetatphase des Methanolextraktes von den Blättern von *Guazuma ulmifolia* (Droge aus Indonesien) erfolgte mit folgenden Fließmittelgemischen:

Tab. M2: Eluotrope Reihe für die VLC der Ethylacetatphase vom Methanolextrakt der Blätter von *Guazuma ulmifolia* (Droge aus Indonesien)

Fraktion	<i>n</i> -Hexan	Ethylacetat	Dichlormethan	Methanol	Wasser
1	100	0	0	0	0
2	80	20	0	0	0
3	60	40	0	0	0
4	50	50	0	0	0
5	45	55	0	0	0
6	40	60	0	0	0
7	35	65	0	0	0
8	30	70	0	0	0
9	25	75	0	0	0
10	20	80	0	0	0
11	10	90	0	0	0
12	0	100	0	0	0
13	0	0	70	30	0
14	0	0	50	50	0
15	0	0	40	60	0
16	0	0	30	70	0
17	0	0	20	80	0
18	0	0	10	90	0
19	0	0	0	100	0
20	0	0	0	90	10
21	0	0	0	50	50
22	0	0	0	0	100

Die Trennung der Ethylacetatphase des Methanolextraktes von der Rinde von *Guazuma ulmifolia* (Gewächshaus) erfolgte mit folgenden Fließmittelgemischen:

Tab. M3: Eluotrope Reihe für die VLC der Ethylacetatphase vom Methanolextrakt der Rinde von *Guazuma ulmifolia*

<i>n</i> -Hexan	Ethylacetat	Methanol
100	0	0
99	1	0
98	2	0
95	5	0
90	10	0
80	20	0
75	25	0
70	30	0
65	35	0
60	40	0
55	45	0
50	50	0
0	100	0
0	99	1
0	98	2
0	97	3
0	95	5
0	80	20
0	70	30
0	60	40
0	50	50
0	100	0

2.3.5. Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC)

Bei der Fast Centrifugal Partition Chromatography handelt es sich um ein säulenmaterialfreies Trennverfahren, bei dem die Inhaltsstoffe der Probe in über 1000 in Serie verbundenen Kammern aufgetrennt und nach deren Durchlaufen fraktioniert werden. Dabei findet der Trennprozess in zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen statt, wobei sich die Inhaltsstoffe der Probe gemäss ihrer Polarität in diesen beiden flüssigen Phasen verteilen. Die beiden Phasen befinden sich in einem Rotor, der das Herzstück der FCPC darstellt. Er besteht aus Polytetrafluorethylen- (PTFE-, Teflon-) beschichteten Metallscheiben, die übereinanderliegend verschraubt sind. Jede Metallscheibe hat am Rand 60 eingelasserte kleine Kavitäten, sogenannte Loculi. Diese Loculi sind miteinander verbunden, und jede Metallscheibe hat einen Ein- und Ausgang für flüssige Phasen. Die Loculi des Rotors werden mit der flüssigen stationären Phase gefüllt und bei laufendem Rotor die mobile flüssige Phase mittels einer HPLC-Pumpe durch die stationäre Phase gepumpt (Produktinformation der Firma AlphaCrom, www.alphacrom.de). Durch die Rotation des Rotors, der sich mit einer Geschwindigkeit von 900 bis 1200 rpm dreht, wird die stationäre Phase zurückgehalten, und 50 bis 80% des Rotorvolumens der flüssigen stationären Phase verbleiben im System (Zentrifugalkraft).

Die Moleküle der zu trennenden Probe erreichen dabei unterschiedliche Geschwindigkeiten in der mobilen Phase, da die Bewegung der Moleküle von der Polarität abhängig ist. So trennen sich die Probensubstanzen auf dem Weg durch die Loculi nach ihrer Polarität auf und können fraktioniert werden.

Im Fall von *Alstonia scholaris* wurde mit einem Gemisch aus *n*-Hexan und Ethylacetat im Verhältnis 100:10 als mobile Phase gearbeitet, während ein Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 42:30 die stationäre Phase darstellte. Die Flussrate betrug 20 ml/min Die Fraktionierung erfolgte von Hand, und es wurden jeweils 20 ml der mobilen Phase in einem Reagenzglas aufgefangen. Das Gerät wurde von der Firma AlphaCrom OHG (Karlstrasse 38, D-89129 Langenau) zur Verfügung gestellt.

2.3.6. Säulenchromatographie (SC)

Die Säulenchromatographie schließt sich an die Vortrennungsschritte Flüssig-Flüssig-Verteilung und VLC an. Hierbei nimmt die universelle Trennung in der Gelpermeationschromatographie mit Sephadex eine Übergangsstellung zur gezielten Aufreinigung ein. Verwendet wurde hierbei Sephadex LH-20, bei dem neben der Größenausschlußchromatographie auch Adsorptionseffekte an der Trennung beteiligt sind. Als Fließmittel diente reines Methanol.

Für die gezielte Aufreinigung nach vorangestellter Fließmittelloptimierung mittels DC wurde in der Adsorptionschromatographie Kieselgel 60 verwendet.

Die Feintrennung wurde, wenn nötig, auf vorgefertigten Lobarsäulen der Firma Merck durchgeführt (LiChroprep RP-18). Für die Feintrennung des Methanolextraktes aus der Rinde von *Guazuma ulmifolia* wurde folgende eluotrope Reihe verwendet:

Tab M4: Eluotrope Reihe für die Lobarsäule. Es wurden jeweils 40 ml des jeweiligen Gemisches aufgefangen.

Methanol in %	Wasser in %
25	75
30	70
32	68
34	66
36	64
38	62
40	60
42	58
50	50
100	0

Für die Trennung des Methanolextraktes von *Alyxia reinwardtii* wurde das Fließmittelgemisch *n*-Hexan:Ethylacetat 30:70 verwendet.

Die aufzutrennenden Substanzgemische wurden als konzentrierte Lösungen jeweils in dem verwendeten Fließmittel auf den Säulenkopf aufgetragen. Die Flussrate

wurde je nach Trennproblem variiert. In der Regel wurde die Tropfgeschwindigkeit zwischen 3 und 8 Sekunden pro Tropfen gehalten, um eine optimale Gleichgewichtseinstellung gemäß dem Nernst'schen Verteilungsprinzip zu erhalten, ohne jedoch Diffusion im Falle einer zu geringen Flussrate zu ermöglichen. Die zeitliche Fraktionierung erfolgte mit Hilfe eines Fraktionensammlers. Nach der dünnschichtchromatographischen Auswertung der Trennung auf Kieselgelplatten wurden die Fraktionen anschließend entsprechend vereinigt.

Materialien für die Säulenchromatographie:

Kieselgel 60, 40 - 63 µm Korngröße	Merck
Sephadex LH-20, 25 - 100 µm Korngröße	Sigma
Lobarsäule LiChroprep, RP-18, 40 - 63 µm Korngröße, Größe A (240 - 10)	Merck

2.3.7. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC = high performance liquid chromatography) ist eine Methode zur Substanztrennung im analytischen und präparativen Maßstab mit sehr hoher Auflösung. Die hohe Trennleistung erklärt sich durch die sehr kleine Korngröße der stationären Phase. Das Elutionsmittel wird mit Hilfe von Pumpen unter Druck durch die Säule gepresst (Marston and Hostettmann, 1991).

Mit Hilfe der HPLC wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen analytisch gearbeitet, zum anderen wurde im präparativen Maßstab mit dieser Methode die Endreinigung einiger Reinsubstanzen durchgeführt, um für die Strukturaufklärung sowie für die Bestimmung der antioxidativen Aktivität einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erreichen.

2.3.7.1. HPLC-DAD

Um eine optimale Auftrennung der z.T. sehr komplexen Substanzgemische zu erzielen, war eine Gradientenelution erforderlich. Mit einem binären Gradienten konnte in relativ kurzer Zeit in der Regel eine zufriedenstellende Trennung der untersuchten Substanzgemische erreicht werden. Für die analytische Trennung

wurde im Sinne der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeiten aus dem Institut ein Standardgradient gefahren (**Tab. M5**). Eine Ausnahme stellte hier der Methanolextrakt der Rinde von *Guazuma ulmifolia* dar, der sich nicht mit dem Standardgradienten trennen liess. Deshalb musste hier ein spezieller hydrophiler Gradient entwickelt werden, bei dem mit 100% Wasser begonnen und innerhalb von 40 min kontinuierlich auf 70% Methanol erhöht wurde. Danach wurde 5 min mit 100% Methanol gespült und die Säule dann 15 min mit 100% Wasser äquilibriert. Die Retentionszeiten der Verbindungen, die mit diesem Gradienten analysiert wurden, sind jeweils mit ^(#) gekennzeichnet.

Die stationäre Phase bestand aus RP-18-Material. Die Elutionsmittel waren 0.15%ige Phosphorsäure, pH 2.0, (A) und 100%iges Methanol (B).

Tab. M5: Standardgradient für die analytische HPLC-Analyse von Extrakten und Fraktionen (Eluent A = 0.15%ige Phosphorsäure, pH 2.0 / Eluent B = 100 % HPLC-Methanol)

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	90	10
5	90	10
35	0	100
45	0	100
50	90	10
60	90	10

analytische HPLC-Anlage:

Pumpe: P 580, Dionex

Probengeber: ASI-100, Dionex (Injektionsvolumen = 20 µl)

Detektor: UVD 340S, Dionex (Photodioden-Array-Detektor)

Steuerung: Chromeleon 6.30

Säulenofen: STH 585

Säule: Eurospher 100-C18, [5 µm; 125 mm x 4 mm], Knauer

HPLC-Fließmittel:

HPLC-Methanol (Mikrosolv)	Merck
HPLC-Methanol (Chromanorm)	Prolabo/VWR
Phosphorsäurelösung 0.15%, pH=2.0, hergestellt aus:	
■ ortho-Phosphorsäure 85% p.a.	Merck
■ NANOpur-Wasser	Barnstead

Zum einen diente die HPLC der Analyse von Extrakten und Fraktionen. Bei der analytischen Trennung wurde ein Proben-Volumen von 20 µl injiziert (Konzentration ca. 1 mg/ml). Die Flußrate durch die in einem Säulenofen mit 20 °C konstant temperierte Säule betrug 1 ml/min. Detektiert wurde mit einem UV-Detektor des Photodioden-Array-Typs bei 235 nm, 280 nm, 254 nm und 380 nm. Dieser Detektor zeichnet online das UV-Spektrum jeder bei einer der angegebenen Wellenlängen detektierten Substanz auf. Mit Hilfe dieser Spektren konnte durch Vergleich mit der software-integrierten Spektrenbibliothek, die über 400 gespeicherte Reinsubstanzen enthält, bzw. mit Literaturdaten eine erste Charakterisierung der ermittelten Komponenten, z.B. eines Rohextrakts, vorgenommen werden. In der Spektrenbibliothek befinden sich derzeit (20.04.2005) 134 Verbindungen aus Pflanzen und 289 Verbindungen aus Schwämmen und schwammassoziierten Pilzen, die in der Arbeitsgruppe Proksch bisher aus den jeweiligen Organismengruppen isoliert wurden. Auf diese Weise wurden vom Rohextrakt an alle Trennschritte mit den daraus hervorgegangenen Fraktionen analysiert. Somit dient die Aufzeichnung der UV-Spektren (neben dem antioxidativen Screening) der Selektion der für weitere Untersuchungen in Frage kommenden Extrakte bzw. Fraktionen.

Der Standardgradient wurde je nach Anforderungen und Komplexität der Proben modifiziert.

Ausserdem diente die HPLC zusätzlich der Kontrolle der Reinheit der vermeintlichen Reinsubstanzen. Vor allem die Kopplung mit dem Photodioden-Array-Detektor ermöglichte die Ermittlung der Peakreinheit durch UV-Spektrenvergleich von Peakschultern und Peakmaximum. Da aber nicht alle Substanzen bei den eingestellten Wellenlängen detektiert werden können, wurde in Zweifelsfällen mittels Kieselgel-DC oder mit Hilfe der LC-MS die Reinheit ergänzend überprüft.

Letztendlich wurde die HPLC zur Analyse der Zellextrakte bei den in 2.6.3.6. näher beschriebenen Aufnahmestudien eingesetzt und diente hier der Detektion der Polyphenole, deren Aufnahme untersucht wurde.

HPLC mit chiraler Säule

Die chirale Analyse von Pinoresinol, 9 α -Hydroxypinoresinol und dem Palmarumycinderivat Sch53823 wurde von Cosima von Heimendahl im Arbeitskreis ‚Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen‘ von Herrn Prof. Dr. Alfermann (Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, HHU Düsseldorf) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 20 μ l einer 1 mM Lösung der jeweiligen Substanz in Methanol in eine HPLC-Anlage der Firma Thermoquest mit chiraler Säule eingespritzt. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min. Auch hier erfolgte eine Gradientenelution mit einem binären Stufengradienten. Dabei wurden Ethanol und *n*-Hexan als Elutionsgemisch verwendet. Die Startmischung bestand aus gleichen Teilen Ethanol und *n*-Hexan und wurde innerhalb von 45 min kontinuierlich auf 60% Ethanol erhöht.

Bei der Analyse von Pinoresinol diente reines (+)-Pinoresinol als Standard.

HPLC-Anlage:

Säule: Chiracel OD-H, [5 μ m; 250 mm x 4.6 mm], Diacel Chemical Industries, LTD

Pumpe: Spectra System P2000, Thermoquest

Probengeber: Spectra System AS1000, Thermoquest

Detektor: Spectra System UV6000LP, Thermoquest

Fließmittel:

Ethanol für die HPLC

Merck

n-Hexan für die HPLC

Merck

2.3.7.2. HPLC-MSⁿ

Die HPLC-MS ermöglicht durch die Kopplung eines chromatographischen Verfahrens mit dem Massenspektrometer als Detektor die Identifikation von Molekülen anhand ihrer Ionen auch aus Substanzgemischen. Als Ionisierungsmethode wurde standardmäßig das ESI-Verfahren gewählt (siehe auch

2.4.1.1.). Die ESI-Massenspektren wurden an einer HPLC-MS-Anlage mit Ionenfalle aufgenommen, in der theoretisch unendlich viele MS/MS-Experimente möglich sind.

HPLC-MS:

analyt. HPLC: Agilent HP1100 (Photodioden-Array-Detektor)

MS: Finnigan LCQ^{Deca}, Thermoquest

Ionenquelle: APCI und ESI, Thermoquest

Vakuumpumpe: Edwards 30, BOC

Säule: Eurospher 100-C18, [5µm; 227 mm x 2 mm], Knauer

Fließmittel für HPLC-MS:

Acetonitril, für HPLC Merck

HPLC-Methanol (Mikrosolv) Merck

0.1%ige Ameisensäure-Lösung hergestellt aus

■ Ameisensäure, p.a. Merck

■ NANOpur-Wasser Barnstead

Die zu vermessenden Proben waren in 100% Methanol gelöst. Als Fließmittel dienten Acetonitril und eine 0.1%ige Ameisensäure-Lösung. Vermessen wurden sowohl die positiven als auch die negativen Ionen. Standardmäßig wurde vom signalintensivsten Ion ein MS/MS-Tochterspektrum aufgezeichnet.

Auf diese Art wurden Rohextrakte auf nicht per UV detektierbare Komponenten hin untersucht sowie nach Molekülonen bereits bekannter Verbindungen durchsucht. Durch die Ausgabe der Signale eines bestimmten Massenbereich-Kanals konnte gezielt nach Ionen in Extrakten und Fraktionen gesucht werden.

Desweiteren wurden die Zellextrakte aus den Aufnahmestudien (2.6.3.6.) auch in der HPLC-MS untersucht. Anhand ihrer Molekulargewichte konnten Metaboliten der eingesetzten Polyphenole identifiziert werden.

2.3.7.3. Semi-präparative HPLC

Die präparative HPLC wurde gezielt für die Endreinigung der Reinsubstanzen eingesetzt (in der Regel unterhalb einer Fraktionsstärke von 25 mg). Gemäß der

größeren Säule erhöhen sich sowohl Injektionsvolumen (bis 1 ml bei einer Konzentration von 2 - 3 mg/ml) als auch Flußrate (5 ml/min). Die Detektion erfolgte auch hier mittels UV-Detektor, allerdings ohne Aufzeichnung der Online-UV-Spektren der detektierten Substanzen. Die Fraktionssammlung erfolgte manuell unter Berücksichtigung des aktuell geschriebenen Spektrums.

Semipräparative HPLC-Anlage:

Pumpe: L-7100, Merck/Hitachi

Detektor: UV-Detektor, L-7400, Merck/Hitachi

Schreiber: Chromato-Integrator D-2000, Merck/Hitachi
bzw. Flatbed-Recorder, Kipp & Zonen

Säule: Eurospher 100-C18, [10 µm; 300 mm x 8 mm], Knauer

Vorsäule: Eurospher 100-C18, [10 µm; 30 mm x 8 mm], Knauer

In der Regel wurde auch hier ein binärer Stufengradient gefahren. Elutionsmittel waren je nach Trennproblem NANOpur-Wasser (A) und Methanol (B). Die Proben wurden in der jeweiligen Startmischung gelöst.

2.4. Identifizierung der isolierten Inhaltsstoffe

Die Identifizierung bzw. Strukturaufklärung der isolierten Substanzen lief in der Regel nach folgendem Schema ab. Zunächst wurden die mittels HPLC ermittelten Daten (Retentionszeit bei gegebenem Gradienten, UV-Spektren) mit der Spektrenbibliothek verglichen sowie ein LC-MS-Lauf durchgeführt und ein ¹H-NMR-Spektrum der Substanz aufgenommen. Mit den vorliegenden Informationen (UV, Masse, Substrukturen) wurden Datenbankrecherchen (Dictionary of Natural Products, jeweils aktuelle Version) durchgeführt. Konnte eine Verbindung weder über die Spektrenbibliothek noch über die Datenbankrecherche und den Vergleich mit Literaturdaten eindeutig identifiziert werden, wurden sukzessive weitere NMR-Experimente durchgeführt. In den meisten Fällen wurde dabei folgende Reihenfolge eingehalten: H,H-COSY, HMBC, HMQC. In den meisten Fällen konnten mit diesen Methoden bekannte Verbindungen identifiziert werden bzw. die Strukturen neuer Naturstoffe aufgeklärt werden. Falls erforderlich wurden zusätzlich nOe-Daten

gemessen. Zur Bestimmung der Identität von Zuckern wurde eine Derivatisierungsreaktion durchgeführt (siehe auch 2.4.4.).

2.4.1. Massenspektrometrie

Mit einem Massenspektrometer kann man mit sehr geringen Substanzmengen (bei Direkteinlass 0.001 - 0.1 mg) die relative Molekülmasse einer Verbindung bestimmen. Zudem können anhand des Fragmentierungsmusters der Verbindung erste Aussagen über ihre Struktur gemacht werden (Hesse et al. 1991).

2.4.1.1. ESI (*Electro-Spray-Ionisation*) -Massenspektrometrie

Bei dieser Ionisierungsmethode wird die Probenlösung bei Atmosphärendruck über eine Potentialdifferenz von mehreren Kilovolt durch eine Kapillare in den stufenweise evakuierten Einlaß des Massenspektrometers gesprüht. Dabei werden die einzelnen Tropfen elektrostatisch aufgeladen und das Lösungsmittel verdampft. Die elektrische Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche verstärkt sich bis zu einem kritischen Punkt, an dem sich die Tropfen aufgrund der elektrostatischen Abstoßung wiederholt teilen. Man erhält sehr kleine mit Ladungen gesättigte Ionenmoleküle, die in die Gasphase geschleudert und dann im Analysatorteil detektiert werden können (McLafferty und Turecek 1993).

Die ESI-Massenspektren wurden an der in 2.3.7.2. beschriebenen HPLC-MS-Anlage aufgenommen.

2.4.1.2. EI (*Electron-Impact*) -Massenspektrometrie

Für die Elektronenstoßionisation wird die ungelöste Probe durch Erhitzen auf 200 - 360 °C verdampft. Die verdampfte Probe wird dann durch einen Direkteinlass ins Hochvakuum überführt, wo die zunächst neutralen Moleküle mit einem Elektronenstrahl von 70 eV ionisiert und dann in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Ein angelegtes Magnetfeld lenkt die beschleunigten Ionen auf eine Kreisbahn, deren Radius vom Quotienten Masse/Ladung der Teilchen und von der angelegten Feldstärke abhängig ist. Durch ein kontinuierliches Verändern der

Feldstärke gelangen die Ionen nach ihrer Masse getrennt durch einen Kollektorspalt und werden dann im Analysatorteil detektiert (Hesse et al. 1991).

Bei der Elektronenstoßionisation tritt eine stärkere Fragmentierung der Ionen auf als bei der Electro-Spray-Ionisation. Damit läßt diese Methode mehr Rückschlüsse auf die Molekülstruktur zu.

Die Aufnahme der EI-MS-Spektren wurden von Mitarbeitern des Instituts für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem Massenspektrometer des Typs Varian MAT 311A durchgeführt.

2.4.2. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden zum einen am Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem DRX-500-Spektrometer der Firma Bruker, zum anderen von Herrn Dr. V. Wray (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Abteilung Molekulare Strukturforschung, Braunschweig) mit Spektrometern der Firma Bruker (AM-300, ARX-400 bzw. DMX-600) sowie von Herrn Prof. Deng (A&T Center, Beijing Normal University, Peking, China) mit einem DRX-500-Spektrometer der Firma Bruker aufgezeichnet. Als deuterierte Lösungsmittel dienten u.a. Chloroform (CDCl_3), Dimethylsulfoxid (DMSO-d_6) und Methanol- d_6 . Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit Win-NMR, der entsprechenden Software der Firma Bruker. Die chemischen Verschiebungen wurden in ppm relativ zum internen Standard Tetramethylsilan (TMS), die Kopplungskonstanten in Hertz (Hz) angegeben. Durch Vergleich der chemischen Verschiebungen, der Integration der Signale und der Kopplungskonstanten mit Literaturdaten konnten die Strukturen der isolierten Verbindungen aufgeklärt werden. Neben eindimensionalen ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden H,H-COSY- bzw. H,C-Korrelationsspektren (HMQC, HMBC) gemessen sowie nOe-Differenz, NOESY- und ROESY-Experimente durchgeführt.

2.4.2.1. DEPT (*distortionless enhancement by polarization transfers*)

Die natürliche Häufigkeit und Empfindlichkeit von ^{13}C -Isotopen ist relativ gering. Mit der DEPT-Methode wird die größere Populationsdichte eines empfindlichen Kerns wie ^1H auf eine im Molekül vorhandene, seltene Kernsorte wie ^{13}C übertragen. Durch

diesen Polarisationstransfer werden die Übergänge des unempfindlichen Kerns und folglich auch das Signal verstärkt.

Die DEPT-Technik ermöglicht es, die Multiplizität von Kohlenstoffatomen (Singulett = C, Dublett = CH, Triplett = CH₂ und Quartett = CH₃) festzustellen (Hesse et al. 1991).

2.4.2.2. COSY (*correlation spectroscopy*)

Das zweidimensionale (2D-) NMR-Spektrum kann aus zwei gleichen (H,H-COSY) bzw. zwei verschiedenen (H,C-COSY) Frequenzachsen bestehen. Die Signalintensitäten entsprechen der dritten Dimension.

Die 2D-Protonenkorrelation liefert Information über die H,H-Kopplungen eines Moleküls. Im H,H-COSY-Diagramm wird auf beiden Achsen das ¹H-NMR-Spektrum einer Substanz aufgetragen. Die auf einer Diagonalen liegenden Signale stehen für jeweils gleiche Signale der beiden Spektren. Außerhalb der Diagonalen liegen die Kreuzsignale, die jeweils zwei verschiedenen Kernen entsprechen. Zwei Kerne koppeln miteinander, wenn ihre Diagonal- und Kreuzsignale ein Quadrat bilden (Rücker et al. 1992).

Werden ¹H- und ¹³C-Spektren miteinander korreliert, handelt es sich um 2D-H,C-COSY-Spektren. Kennt man z.B. die Zuordnung der ¹H-Resonanzen, dann liefert die Shift-Korrelation die ¹³C-Zuordnung und umgekehrt (Hesse et al. 1991). Bei HMQC-Spektren (*hetero multinuclear quantum coherence*) können Kopplungen zwischen Kohlenstoffatomen und Protonen über eine Bindung hin sichtbar gemacht werden (CH-direkt-Kopplung). Dagegen werden bei HMBC (*hetero multinuclear bond coherence*) Kopplungen zwischen Kohlenstoffatomen und Protonen detektierbar, die über zwei oder drei Bindungen reichen (*long-range*-Kopplungen).

2.4.2.3. nOe- (*nuclear-Overhauser-effect*-) Experimente

Der "nuclear Overhauser effect" verstärkt bzw. vermindert die Intensität von Signalen in Abhängigkeit von Dipol-Dipol-Interaktionen benachbarter Kerne. Die Einstrahlung auf der Frequenz eines bestimmten Protons beeinflusst die Signalintensitäten der benachbarten Protonen. Bei der nOe-Differenz-Spektroskopie (nOeDS) werden Spektren ohne und mit Einstrahlung aufgezeichnet und voneinander subtrahiert. Die jeweiligen nOe-Effekte werden durch positive bzw. negative Peaks dargestellt.

Als zweidimensionale Anwendungen des homonuclearen nOe-Effekts wurden NOESY- und ROESY-Experimente durchgeführt.

2.4.3. Optische Drehung

Chirale Moleküle können die Ebene des linear polarisierten Lichts drehen. Die optische Aktivität der Reinsubstanzen wurde mit einem Polarimeter 341 LC der Firma Perkin Elmer bei der Natrium-D-Linie von 589 nm bestimmt. Die auf 20 °C temperierte (Ultra Thermostat NB5, Colora) Küvette hatte eine Schichtdicke von 10 cm.

Verwendete Lösungsmittel:

Methanol (99.9%) für die Spektroskopie	Aldrich
Chloroform für die Spektroskopie	Sigma
Uvasol Dimethylsulfoxid für die Spektroskopie	Merck
Uvasol Aceton für die Spektroskopie	Merck

2.4.4 Derivatisierung von Zuckern

Da bei dem Kämpferoldihexosid aus *Sauropus androgynus* aus den durchgeführten NMR-Experimenten nur die Verknüpfung der Zucker hervorging, aber nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob es sich um D-Glucose, L-Glucose, D-Galactose oder L-Galactose handelt, wurde die folgende modifizierte Derivatisierungsmethode nach Gerwig et al. (1977) angewendet, um die Identität der Zucker zu bestimmen. Bei dieser Methode bilden sich nach Butanolyse und Trimethylsilylierung aus den verschiedenen Zuckern Epimeren- und Konformerengemische, die in den GC-Chromatogrammen ein für jeden Zucker charakteristisches Muster an Peaks ergeben.

Die Schritte 2.4.4.3 und 2.4.4.4. wurden jeweils auch mit den folgenden Standardsubstanzen durchgeführt:

-D-Glucose	Sigma
-L-Glucose,	Sigma
-D-Galactose	Sigma
-L-Galactose	Sigma

Durch Vergleich der Chromatogramme der untersuchten Probe mit denen der derivatisierten Standardsubstanzen konnte die Identität der Zucker bestimmt werden.

2.4.4.1. Hydrolyse der Glykoside

4.2 mg des getrockneten Kämpferoldihexosids wurden mit 1.0 ml 3N HCl versetzt und ohne Deckel 5 Stunden lang bei 80 °C im Trockenschrank hydrolysiert. Danach wurde die Probe unter Stickstoff getrocknet.

2.4.4.2. Isolierung der Zucker / Abtrennung vom Aglykon

Das Hydrolyseprodukt aus 2.4.4.1. wurde in 1 ml Dichlormethan gelöst und zweimal mit je 1 ml destilliertem Wasser fünf min lang ausgeschüttelt. Die vereinigten Wasserphasen wurden dann bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet.

2.4.4.3. Butanolyse

Der Rückstand aus 2.4.4.2. wurde in 0.5 ml (-)-2-Butanol (Merck) aufgenommen, mit einem Tropfen Trifluoressigsäure (TFA, Merck) versetzt und in eine Ampulle überführt, die dann zugeschmolzen und zur vollständigen Butanolyse über Nacht bei 130 °C im Trockenschrank belassen wurde. Nach dem Abkühlen unter fließendem Wasser wurde die Ampulle geöffnet und der Inhalt in einem Eppendorf-Gefäß unter Stickstoff und danach durch Gefriertrocknung vollständig getrocknet.

2.4.4.4. Trimethylsilylierung

Zunächst wurden die folgenden Reagenzien miteinander gemischt und geschüttelt:

100 µl Hexamethyldisilazan	Merck
100 µl Chlortrimethylsilan	Merck
500 µl Pyridin	Merck

Der Rückstand aus 2.4.4.3. wurde mit 100 µl dieser Mischung versetzt, 30 min bei Raumtemperatur belassen und dann erneut unter Stickstoff getrocknet. Danach

wurde der Rückstand in 0.5 ml Dichlormethan gelöst und mit 0.5 ml destilliertem Wasser ausgeschüttelt, um die verbliebenen Reagenzien zu entfernen. 1 μ l der Dichlormethanphase, in der sich nun die trimethylsilylierten Zucker befanden, wurden gaschromatographisch analysiert und das Chromatogramm mit den Chromatogrammen der Referenzzucker verglichen, um eine Zuordnung zu einem dieser Zucker zu treffen.

2.4.5 Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie diente in dieser Arbeit der Bestimmung der Identität von Hexosen nach Derivatisierung wie in 2.4.4. beschrieben.

Gaschromatograph:

6850 Series GC System

Agilent

Autoinjektor: 7683 Series Injector mit Spliteinlass

Agilent

Splitverhältnis: 50:1

Temperatur: 200 °C

Injektionsvolumen: 1 μ l

Splitfluss: 50 ml/min

Trärgas: Stickstoff

Säule: HP-5 (crosslinked 5% PH ME Siloxane)

Hewlett Packard

Länge: 30 m

Durchmesser: 250 μ m

Filmdicke: 0.25 μ m

Druck: 15,25 psi

Fluss: 1.0 ml/min

mittlere Strömungsgeschwindigkeit: 30 cm/s

Temperaturprogramm:

Tab. M6: Temperaturprogramm für die Gaschromatographie bei der Analytik von Zuckern

Zeit (min)	Temperatur (°C)
0	135
65	200
70	200

Detektor: Flammenionisationsdetektor

Temperatur: 220 °C

H₂-Fluss: 30 ml/min

Luftfluss: 400 ml/min

Zusatzgasfluss: 25 ml/min

Steuerung: Windows NT 4.0 Agilent Cerity QA-QC

2.5. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften von den isolierten Inhaltsstoffen *in vitro* mittels DPPH-Assay

Zur Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der isolierten Reinsubstanzen wurde photometrisch bei 517 nm die abnehmende Absorption einer DPPH-Lösung (4.5 mg/100 ml) gemessen. Nach zwei min wurde die Differenz zwischen der Absorption des Blindwertes (490 µl reine DPPH-Lösung mit 10 µl DMSO: keine Änderung der Absorption) und der einer Positivkontrolle (Propylgallat, 76 µM) gemessen. Diese Differenz wurde als 100% antioxidative Aktivität (bezogen auf Propylgallat) definiert. Die Differenz der Absorption von der jeweiligen Probe (76 µM) zu der des Blindwertes konnte dann als X% Aktivität berechnet werden (modifizierte Methode nach Li et al. 1999). Alle Substanzen wurden jeweils dreimal vermessen.

$$aA (\%) = \frac{A_B - A_P}{A_B - A_{Pos.}} \times 100$$

aA = antioxidative Aktivität (bezogen auf Propylgallat)

A_B = Absorption des Blindwertes

A_P = Absorption der Probe

A_{Pos} = Absorption der Positivkontrolle

2.6. Charakterisierung der zellulären Eigenschaften von den isolierten Inhaltsstoffen (H4IIE- und C6-Zellen)

Die folgenden Experimente wurden von Gudrun Michels, Petra Niering, Sandra Ohler und Dr. Wim Wätjen am Institut für Toxikologie (Leitung: Prof. Dr. med. Regine Kahl) der HHU Düsseldorf durchgeführt.

2.6.1. Zellkultur und Medium

I.) Zelllinien:

Für die im folgenden beschriebenen Bioassays wurden H4IIE-Rattenhepatomzellen und C6-Rattengliomzellen verwendet. Die H4IIE-Zellen dienen als Modellsystem für primäre Hepatozyten der Ratte und sind relativ differenziert. Sie wurden aus Reuber-H35-Hepatom isoliert und in T75 Zellkulturflaschen (75 cm²) passagiert (ca. 3 x 10⁷ Zellen pro Flasche).

Die C6-Zellen wurden aus einer Glia-Vorläuferzelle nach Induktion mit N-Nitrosomethylharnstoff gewonnen (Benda et al. 1968). Hier wurden die Zellen (ca. 2 x 10⁷) in Petrischalen passagiert (Durchmesser 10 cm). Beide Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank mit einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre gehalten und zweimal wöchentlich passagiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von dem Zellkulturgefäß abgelöst und anschliessend in frischem Medium aufgenommen (H4IIE) bzw. von den Kulturschalen mit frischem Medium ab gespült (C6).

Für die Biotests wurden H4IIE-Zellen der 23. bis 40. Passage und C6-Zellen der 27. bis 45. Passage verwendet. Dabei wurde vor der Durchführung der jeweiligen Experimente lichtmikroskopisch die Morphologie der Zellen überprüft.

II.) Medium:

Als Wachstumsmedium wurde "Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose" verwendet, das 4.5 g/l Glucose und 2 mM L-Glutamin enthält. Für die H4IIE-Zellen waren in dem Medium 10% und für die C6 Zellen 5% fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) enthalten. Um bakterielle Infektionen der Zellkultur zu vermeiden, wurden dem Zellkulturmedium Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) zugesetzt.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden bei allen im folgenden beschriebenen Versuchen zuvor jeweils in Dimethylsulfoxid gelöst. Dabei betrug die Konzentration an DMSO im Medium jeweils maximal 1%.

2.6.2. Bestimmung der Zytotoxizität

2.6.2.1. Neutralrotassay

Dieser Test beruht darauf, dass der kationische Farbstoff Neutralrot ($\lambda_{\max}=560$ nm) nur von lebenden Zellen aufgenommen und in den Lysosomen angereichert wird. Nach Fixierung und Lyse der Zellen kann die Absorption gemessen werden, die ein Mass für die Anzahl der lebensfähigen Zellen ist.

Für den Neutralrotassay wurden die Zellen auf 96-Well-Platten (10000 Zellen/Well) ausgesät und nach 24 Stunden Anwachszeit mit der zu untersuchenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert.

Danach wurde das Medium entfernt und pro Well 200 µl Neutralrot-Gebrauchslösung (hergestellt mit dem jeweiligen Zellmedium) hinzugegeben. Nach dreistündiger Inkubation (37 °C) mit dem Farbstoff wurde die Lösung abgenommen und die Zellen mit Fixierlösung (200 µl/Well) fixiert. Die Fixierlösung wurde nach wenigen Sekunden entfernt, die Zellen durch Zugabe von Neutralrot-Extraktionslösung (200 µl/Well) lysiert und der intrazellulär gespeicherte Farbstoff freigesetzt. Um eine homogene

Lösung zu erhalten, wurde das Lysat bei 4 °C über Nacht stehengelassen, bevor die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen wurde.

2.6.2.2. Apoptosenachweis: Nachweis von DNA-Leiter-Bildung

Das Vorhandensein einer sogenannten DNA-Leiter dient als Nachweis für einen apoptotischen Zelltod. Im späten Stadium der Apoptose wird eine Endonuklease aktiviert, die die DNA spezifisch in der Linkerregion schneidet, was zu einem charakteristischen Bandenmuster im Agarosegel führt. Eine apoptotische DNA-Leiter besteht aus oligonukleosomalen DNA-Fragmenten, deren Grösse jeweils ein Vielfaches von 180 Basenpaaren beträgt.

Für diesen Versuch wurden ca. 1.5 Mio. H4IIE-Zellen auf Petrischalen (10 cm Durchmesser) ausgesät und nach 48 Stunden Anwachszeit mit Acteosid bzw. Isoacteosid inkubiert. Danach wurden adhärente und schwimmende Zellen im Medium vereint und bei 1700 rpm zwei min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS-Puffer bei 12000 rpm fünf min gewaschen und anschliessend wenn nötig bei -20 °C eingefroren.

Die DNA wurde wie folgt aus den Zellen isoliert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl Lysepuffer und 5 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt, und nach vorsichtigem Suspendieren wurde 40 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die Proteine wurden mit 125 µl 5 M NaCl gefällt, dann wurden die Proben leicht geschüttelt und mindestens 60 min bei 4 °C stehen gelassen.

Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 4 °C und 12000 rpm wurde der Überstand mit 250 µl Chloroform und 500 µl gepuffertem Phenol (pH 7.5 – 8) versetzt und für 2 min geschüttelt, um weitere Proteine abzutrennen. Danach wurde erneut zentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C), 650 µl Chloroform zum Überstand gegeben und wiederum 2 min geschüttelt. Dann wurde erneut zentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C).

Zum Überstand wurden 1000 µl Isopropanol (-20 °C) gegeben, gut geschüttelt, und die DNA wurde über Nacht bei -20 °C ausgefällt.

Nach weiterem Zentrifugieren für 15 min bei 12000 rpm und 4 °C wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl TE Puffer (pH 8.0) suspendiert.

Um eine Kontamination mit DNasen zu vermeiden, wurden ausschliesslich autoklavierte Lösungen und Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet.

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 1.5% Agarosegel in TAE-Puffer verwendet. Die Agarose-Lösung wurde aufgekocht und handwarm in einen Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Gel wurde in einer Gelkammer mit TAE-Puffer überschichtet.

Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Blaumarker versetzt, 5 min bei 65 °C inkubiert, im Eisbad gekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Pro Geltasche wurden 4 µg aufgetragen. Die Konzentration der DNA war zuvor wie in 2.6.3.5. beschrieben ermittelt worden.

Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 5 V/cm. Danach wurde das Gel 30 min in Ethidiumbromid-Lösung (0.5 µg/ml) gefärbt, und anschliessend wurden mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage die aufgetrennten Fragmente sichtbar gemacht. Im Fall eines apoptotischen Zelltodes trat ein charakteristisches Bandenmuster auf (DNA-Leiter).

2.6.3. Bestimmung der protektiven Effekte

2.6.3.1. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies: DCF-Assay

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen wurde fluorimetrisch nachgewiesen. Dabei diente 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF) als Sonde (Oyama et al. 1994, Zhu et al. 1994). H₂DCF ist nicht membranpermeabel und wurde deshalb in modifizierter Form als 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) eingesetzt. Diese Verbindung kann über die Zellmembran diffundieren und wird in der Zelle enzymatisch von Esterasen zu 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein gespalten. H₂DCF ist hydrophil, kann daher nicht über die Zellmembran zurückdiffundieren, und wird somit in den Zellen angereichert. H₂DCF selbst fluoresziert nicht, wird aber durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Dieses Oxidationsprodukt besitzt gegenüber dem H₂DCF ein konjugiertes π - Elektronensystem und kann im Fluoreszenzspektrophotometer gemessen werden. Durch Vorinkubation mit antioxidativ wirksamen Testsubstanzen kann deren Fähigkeit, die reaktiven Sauerstoffspezies abzufangen, und damit ihre protektive Eigenschaft bei oxidativem Stress quantitativ gemessen werden.

Für diesen Test wurden 50000 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Für H4IIE-Zellen und C6-Zellen wurde nach 24 Stunden Anwachszeit das Medium gewechselt. Da das Phenolrot des DMEM-Mediums die Messung stört, verwendet man nun farbloses DMEM.

Danach wurden die Zellen mit den Substanzen 30 min vorinkubiert, um deren protektive Effekte zu untersuchen. Am Ende der Vorinkubationszeit wurden 100 µl H₂DCF-DA-Gebrauchslösung (DMEM farblos, 100 µM H₂DCF-DA) hinzugegeben (Endkonzentration 50 µM) und bei 485 nm (Anregung) bzw. 525 nm (Emission) die Fluoreszenz gemessen (Grundfluoreszenz). Nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ als oxidativem Stressor wurde mit dem VICTOR Multiwell-Lesegerät über einen Zeitraum von drei Stunden kontinuierlich (15 min) der Fluoreszenzanstieg gemessen, der ein Mass für die intrazellulären ROS darstellt. Der Nullwert wurde zur Auswertung von den gemessenen Werten subtrahiert. Die gemessene DCF-Fluoreszenz der Zellen, die anstelle von H₂O₂ nur mit DMSO inkubiert wurden, diente als Lösungsmittelkontrolle.

2.6.3.2. Nachweis von DNA-Strangbrüchen: Einzelzellgelelektrophorese ("Comet-Assay")

Zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen wurde der Einzel-Zell-Gelelektrophorese-(COMET-) Assay benutzt. Unter alkalischen Bedingungen verlieren DNA-Stränge, die Brüche enthalten, ihre Superhelixstruktur und entwinden sich. Bei einer Elektrophorese wandern die Bruchstücke im Agarosegel, was im Fluoreszenzmikroskop einen kometenartigen Schweif verursacht. Die durchschnittliche Länge der "Kometen" ist ein Mass für die Anzahl an DNA-Strangbrüchen in den Zellen. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die nicht mit protektiven Substanzen vorinkubiert, sondern nur mit H₂O₂ versetzt wurden. Die durchschnittliche Länge von Zellkernen, die keinem oxidativem Stressor ausgesetzt waren, diente als Negativkontrolle.

Zur Durchführung des COMET-Assays wurden auf Sixwells 0.5 Mio. H4IIE Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden Anwachszeit wurden diese Zellen zwei Stunden mit 500 µM H₂O₂ mit bzw. ohne einstündiger Vorinkubation mit den zu testenden Substanzen inkubiert, um deren protektiven Effekte bei oxidativem Stress zu testen. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen.

Es wurden 100 µl Trypsin-EDTA pro Well hinzugegeben, um die adhärennten Zellen abzulösen, die Suspension wurde in 900 µl DMEM Medium aufgenommen, und zu je 20 µl Zellsuspension wurden 200 µl LMP (*low melting point*)-Agarose 0.5% (pH 7.4) gegeben und auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger aufgetragen.

Die Objektträger wurden 4-5 min im Kühlschrank gekühlt. Dann wurde das Deckglas abgezogen, und die Präparate wurden über Nacht im Kühlschrank in Lysepuffer aufbewahrt (alkalische Lyse).

Danach wurden die Objektträger mit der Gelschicht nach oben unter Eiskühlung in eine Elektrophoresekammer gelegt, und die Objektträger wurden 2-3 mm mit 4 °C kaltem Puffer bedeckt. Nach 25 min, in denen eine alkalische Denaturierung der DNA und die Expression verschiedener Klassen alkalilabiler Stellen erfolgte, wurde die Elektrophorese (25 V, 300 mA, 25 min) durchgeführt.

Danach wurden die Objektträger zunächst kurz in Wasser getaucht und dann zweimal fünf min mit Neutralisationspuffer überschichtet. Nach erneutem Spülen mit Wasser wurden die Objektträger in Ethanol (80%) gestellt, und nach mindestens zweistündigem Trocknen bei Raumtemperatur wurden 30 µl Ethidiumbromidlösung (20 µg/ml) auf die Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt, und die Kometenlänge wurde am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiolab, 400fache Vergrößerung, Anregungswellenlänge: 515 bis 560 nm, Barrierefilter 590 nm) gemessen. Als "image length" wurde mit Hilfe der Okularskalierung die Gesamtlänge von Kern und gewanderter DNA in µm gemessen. Es wurden pro Ansatz mindestens 50 Zellen ausgemessen. Die Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt.

2.6.3.3. Nachweis von Apoptosehemmung: Caspase-Assay

Caspasen sind proteolytische Enzyme, die im Laufe der Apoptose spezifisch aktiviert werden. Um die protektiven Effekte der zu untersuchenden Substanzen gegenüber H₂O₂-induzierter Apoptose zu untersuchen, wurde die Aktivität verschiedener Caspasen bestimmt.

Für diesen Test wurden 1.5 Mio. H4IIE-Zellen auf Petrischalen (Durchmesser 10 cm) ausgesät. Die Zellen wurden nach 48 Stunden Anwachszeit nach einstündiger Vorinkubation mit Acteosid bzw. Isoacteosid für 15 Stunden mit H₂O₂ inkubiert. Danach wurden adhärennte und schwimmende Zellen im Medium aufgenommen, drei min bei 2000 rpm zentrifugiert, das Zellpellet mit PBS-Puffer gewaschen (zwei min

bei 5000 rpm), in 70 µl Lyse-Gebrauchslösung aufgenommen und mit einem Metallrührer bei 4 °C und 500 rpm 15 min suspendiert. Die suspendierte Probe wurde unverzüglich bei – 80 °C über Nacht eingefroren.

Der durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 15300 rpm) erhaltene Überstand wurde für den Assay sowie für die spätere Proteinbestimmung verwendet.

Dann wurde in einer 96-Well-Platte jeweils 10 µl Probenlösung mit 80 µl Assay-Gebrauchslösung und 10 µl Caspasesubstrat (2 mM) versetzt. Für die Bestimmung des Blindwertes wurde die Probenlösung weggelassen und dafür 90 statt 80 µl Assay-Gebrauchslösung zugegeben.

Die Caspasesubstrate sind mit p-Nitrophenylacetat gekoppelte Tetrapeptide die jeweils die spezifische Schnittsequenz einer bestimmten Caspase darstellen. Durch die Reaktion der Caspase mit ihrem Substrat wird Nitrophenol abgespalten, das photometrisch bei 405 nm über drei Stunden im ELISA-Reader vermessen wurde (=Mass für die Aktivität der Caspase).

2.6.3.4. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch mit Rinderserumalbumin als Standard (modifiziert nach Bradford 1976).

Dazu wurden 20 µl Probe mit 1 ml Bradford-Farbreagenz (1:5 mit entmineralisiertem H₂O verdünnt, filtriert) in Plastikküvetten gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm gegen 20 µl des jeweiligen Puffers und 1 ml Bradford-Farbreagenz als Blindwert photometrisch vermessen.

Der Proteingehalt der Probe wurde anhand einer BSA-Eichkurve im Bereich von 25 – 300 µg/ml bestimmt.

Die Proteinbestimmung diente beim Caspase-Assay zur Proteinnormierung.

2.6.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Lösung wurde photometrisch in Quarzküvetten (Schichtdicke 10 mm) bei 260 nm vermessen. Die Konzentration wurde auf der Grundlage folgender Werte ermittelt::

$$1 \text{ OD} = 50 \text{ µg/ml DNA}$$

Das Verhältnis der Absorptionswerte bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ wurde als Mass für die Reinheit der DNA benutzt, und wenn dieses Verhältnis grösser war als 1.5 wurde die DNA als rein angesehen.

2.6.3.6. Aufnahmestudien

Um festzustellen, ob die untersuchten Substanzen von H4IIE- bzw. C6-Zellen aufgenommen werden, wurden an beiden Zelllinien mit den entsprechenden Substanzen Aufnahmestudien etabliert und durchgeführt. Dabei erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen sowie die Lyse der Zellen am Institut für Toxikologie (HHU Düsseldorf), während die Extraktion der lysierten Zellen sowie die Analyse der Zellextrakte und die Quantifizierung der aufgenommenen Reinsubstanzen am Institut für Pharmazeutische Biologie (HHU Düsseldorf) durchgeführt wurden.

Zunächst wurden 1.5 Mio. Zellen in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) ausgesät. Diese wurden nach 48 Stunden Anwachszeit mit den zu untersuchenden Reinsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen (100 bis 1000 μM) über unterschiedliche Zeiträume (0.5 bis 24 Stunden) inkubiert. Danach wurden adhärenente und schwimmende Zellen im Medium suspendiert und zentrifugiert (5000 rpm, 2 min), und das Pellet wurde dreimal mit je 1 ml PBS Puffer gewaschen, um extrazellulär anhaftende Substanzen abzuwaschen.

Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet mit 300 μl HPLC-Methanol versetzt, gevortext und 4 x 10 Sek. mit einer Ultraschallspitze (100 W) unter Eiskühlung die Zellen aufgeschlossen. Bis zur Extraktion wurden die Zelllysate bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Kurz vor der Extraktion wurde das Zelllysate aufgetaut, nochmals für eine Minute ins Ultraschallbad getaucht und dann über fünf Stunden auf einem Schüttler bei 200 rpm extrahiert. Danach wurde sofort bei 13000 rpm fünf min zentrifugiert, und der Überstand wurde in der HPLC analysiert. Die aufgenommenen Substanzen wurden über ihre UV-Spektren identifiziert, und es diente jeweils die Peakfläche bei 254 nm als Grundlage für die Berechnung der aufgenommenen Menge in $\text{nmol}/10^6$ Zellen.

Zur Quantifizierung wurde die Methode des externen Standards gewählt. Dazu wurde mit der jeweiligen isolierten Reinsubstanz (Pinoresinol) bzw. gekauften Standards aus den Peakflächen bei den Konzentrationen 5, 50 und 100 μM eine

Kalibriergerade erstellt, aus der dann die intrazellulären Konzentrationen der untersuchten Substanzen berechnet werden konnten.

Jede Aufnahmestudie wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Um herauszufinden, auf welchem Weg das Quercetin in die Zellen gelangt, wurde der Einfluss der Transportinhibitoren Phloridzin (Glucosetransport-Inhibitor), ZnCl_2 , CdCl_2 , Verapamil, Nifedipin (Ca^{2+} -Kanal-Blocker) und Vanadat (ATPase-Hemmstoff) auf die Quercetinaufnahme in H4IIE-Zellen untersucht. Dazu wurde die Aufnahmestudie wie oben beschrieben durchgeführt, nur mit dem Unterschied, dass der jeweilige Transportinhibitor dem Medium in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ zugesetzt wurde.

Zusätzlich wurden einige Zellextrakte in der HPLC-MS analysiert. Anhand ihrer UV-Spektren und Molekulargewichte konnten Metaboliten der untersuchten Substanzen identifiziert werden.

Zur Bestimmung der Konzentration der untersuchten Substanzen im überstehenden Medium wurden ausserdem jeweils $100 \mu\text{l}$ des Mediums aus der Zellkultur mit $400 \mu\text{l}$ MeOH versetzt, um die im Serum vorhandenen Proteine auszufällen, und nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm wurde der Überstand in der HPLC untersucht und die Substanz, wie oben beschrieben, quantifiziert.

Zur Quantifizierung wurde der gleiche Versuch mit reinem Medium, das nicht mit der Zellkultur in Berührung gekommen war, durchgeführt. Dazu wurden 7.6 mg Quercetin in $100 \mu\text{l}$ DMSO als Lösungsvermittler gelöst. 5 ml des Mediums wurden mit $10 \mu\text{l}$ dieser Lösung versetzt, so dass sich für das Quercetin eine Konzentration von $500 \mu\text{mol/l}$ ergab. $100 \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden mit $400 \mu\text{l}$ MeOH versetzt, und anschliessend wurde weiter verfahren wie bei den Medien aus der Zellkultur. Ausserdem wurde dieser Versuch noch mit reinem Medium durchgeführt, das zuvor autoklaviert worden war, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren und so eine unspezifische Reaktion der Flavonoide mit Proteinen bzw. einen enzymatischen Abbau der Flavonoide z.B. durch Peroxidasen auszuschliessen.

2.7. Für den quantitativen DPPH-Assay, die Zellkulturexperimente und die Aufnahmestudien verwendete Geräte, Materialien und Lösungen

2.7.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Lambda 10 UV/VIS-Spektrophotometer	Perkin Elmer
Lambda 25 UV/VIS Spectrometer	Perkin Elmer
Steuerung: UV WinLab	
Begasungsbrutschrank IG150	Jouan
Zellzählkammer	Fuchs-Rosenthal
Autoklav	Fedegari
Multiwell-Lesegerät Wallac Victor ² mit	Perkin Elmer
Wallac 1420 software version 2.00 release 9	Perkin Elmer
Fluoreszenzmikroskop Axiolab	Zeiss
Steuerung: Image-Pro plus, Version 4.5.1.22	Media cybernetics
Kamera Cool SNAP Pro	Intas
Zentrifuge Minifuge 2, Typ: 423	Heraeus Christ
Zentrifuge Universal 30 F	Hettich
Zentrifuge MR1812	Jouan
Rührer MR 2002	Heidolph
Geldokumentationsanlage GelDoc 2000	Bio Rad
Steuerung: Quantity One 4.1.0	BioRad
Ultraschallspitze Labsonic 1510	Braun
Sterilbank LC 2	Jouan
Sterilbank BSB 4	Bartholomei

2.7.2 Materialien

Material	Hersteller
Küvetten (Quarz): UV/VIS Spectroscopy Cells, 10.00 mm	Perkin Elmer
Plastikküvetten [10 x 4 x 45mm]	Sarstedt
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (ca. 90%)	Sigma

Propylgallat	Aldrich
Methanol (99.9%) für die Spektroskopie	Aldrich
Petrischalen	Nunc
5 x Trypsin-EDTA	Gibco/ICN Biomedicals
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose: (4500 mg/l Glucose, L-Glutamin, ohne Pyruvat)	Gibco
DMEM (ohne Phenolrot)	PAA
Fötale Kälberserum (FCS Gold)	PAA
Penicillin-Streptomycin (10000 u/ml Penicillin-G-Natrium, 10000 µg/ml Streptomycinsulfat)	Gibco
96-Well-Platten (für die Zellkultur)	Nunc
Dimethylsufoxid	Sigma
Neutralrot	Sigma
MTT	Sigma
H ₂ DCF-DA	Sigma
H ₂ O ₂ 30%	Sigma/Fluka
Sixwells (für die Zellkultur)	Nunc
LMP-Agarose	Gibco
Ethanol	Riedel de Haen
Ethidiumbromidlösung	Roth
Capase-2-substrat (Ac-VDVAD-PNA)	ICN Biomedicals
Caspase-10-substrat (Ac-IETD-PNA)	ICN Biomedicals
Caspase-3-substrat (Ac-DEVD-PNA)	ICN Biomedicals
Caspase-9-substrat (Ac-LEHD-PNA)	ICN Biomedicals
Proteinstandard	Sigma
Bradford-Reagenz	BioRad
NaCl	Merck
Chloroform	Merck
gepuffertes Phenol	Roth
Isopropanol	Merck
Agarose NEEO für DNA, RNA	Roth
Tris-Base (Tris)	Sigma
DNA-Blaumarker 6 x Loading dye solution	Fermentas
Quercetin	Sigma

Rutin	Sigma
Luteolin	Sigma
Kaempferol	Calbiochem
Fisetin	Sigma
Myricetin	Calbiochem
Morin	Merck
(+)-Catechin	Sigma
Taxifolin	Sigma

2.7.3 Lösungen

<u>Lösung</u>	<u>Herstellung</u>
Neutralrot-Gebrauchslösung:	20 ml Medium, 250 µl Neutralrotstammlösung (0.4 % (m/V)), vor Gebrauch frisch hergestellt
Fixierlösung:	1% Formaldehyd, 1% Calciumchlorid
NR-Extraktionslösung:	50% Ethanol, 1% Eisessig
H ₂ DCF-DA-Gebrauchslösung:	H ₂ DCF-DA-Stammlösung (100 mM Stammlösung H ₂ DCF-DA in DMSO), 1:1000 in DMEM ohne Phenolrot
Comet-Lyse-Stammlösung	2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 50 ml N-Laurylsarkosin-Natriumsalz-Lösung 10%, pH 10
Lyse-Gebrauchslösung	1 ml Triton-X 100, 10 ml DMSO, 89 ml Lyse-Stammlösung (vor Gebrauch mindestens 1 Stunde bei 4 °C aufbewahren)
Elektrophoresepuffer	300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13, Leitfähigkeit 60-65 mS, Lagerung bei 4 °C
Neutralisationspuffer	0.4 M Tris in Wasser, pH 7.5
Färbelösung	Ethidiumbromidstammlsg. (0.5 mg/ml in Wasser) 1:25 mit Wasser verdünnen (Endkonz.: 20 µg/ml)
LMP-Agarose	0.5% LMP Agarose in Wasser, vor Gebrauch Agarose bei 95 °C schmelzen und bei 37 °C lagern
Lysepuffer Caspase:	50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 100 µM EDTA, pH 7.4 (autoklavieren, Lagerung bei 4 °C)
Assaypuffer Caspase:	55 mM Hepes, 110 mM NaCl, 110 µM EDTA, pH 7.4 (autoklavieren, Lagerung bei 4 °C)

Lyse-Gebrauchslösung:	5 mg CHAPS , 5 µl DTT Lösung (1 M) in 4.990 ml Lysepuffer
Assay-Gebrauchslösung:	5.334 ml Assaypuffer, 6 mg CHAPS, 60 µl 1 M DTT Lösung, 600 µl Glycerol (frisch hergestellt)
Lyse-Puffer	Ethidiumbromidstocklösung 10 mg Ethidiumbromid/ml dH ₂ O (Lagerung in Braunglas bei 4 °C, pro 100 ml Agarosegel 100 µl verwenden)
50 x TAE-Puffer	242 g TRIS-Base, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 1M EDTA, pH 8.0, mit NaOH oder Essigsäure, mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen (autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (autoklavieren, Lagerung bei 4 °C)
RNase A	10 mg RNase A in 1 ml Wasser 10 min bei 100 °C denaturiert (Lagerung bei -20 °C)
5 M NaCl Lösung	5 M NaCl
EDTA-Lösung	0.5 M EDTA, pH 8.0 (autoklavieren)
Tris-HCl	0.1 M Tris-Base, pH 8.0 (autoklavieren)
5 x loading-buffer	15 mM EDTA, 2% SDS, 50% Glycerin, 0.25% Bromphenolblau in Wasser
10 x PBS	1.37 M NaCl, 27 M KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM KH ₂ PO ₄ in Wasser, pH 7.4 (autoklavieren)
(=Stammlösung)	

2.8. Quantifizierung der aktivsten Inhaltsstoffe in der jeweiligen Droge sowie in Ethylacetat- und Methanolextrakt

Die isolierten Inhaltsstoffe, die sowohl *in vitro* als auch in der Zellkultur die stärkste Aktivität zeigten, wurden jeweils sowohl in der Droge, aus der sie isoliert worden waren, als auch in dem jeweiligen Ethylacetat- und Methanolextrakt quantitativ bestimmt.

2.8.1 Quantifizierung mittels externem Standard

Die Quantifizierung der folgenden Reinsubstanzen erfolgte jeweils nach der Methode des externen Standards. Dazu wurde zunächst für jede Substanz aus verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Reinsubstanz oder eines in seinem chromophoren System der zu bestimmenden Substanz ähnlichen Standards eine Kalibriergerade erstellt.

Die Drogen wurden gefriergetrocknet, abgewogen und in kleinem Massstab wie in 2.2.1.1. beschrieben extrahiert. Dann wurden die Extrakte in einer Vakuumzentrifuge und anschliessend im Exsikkator getrocknet, in einer jeweils geeigneten Verdünnung in die HPLC eingespritzt und jeweils die Peakfläche der zu bestimmenden Substanz ermittelt. Die Detektion erfolgte üblicherweise bei 340 nm. Für Pinoresinol wurde allerdings eine Wellenlänge von 235 nm und für Catechin und Epicatechin jeweils eine Wellenlänge von 280 nm zur Detektion ausgewählt, da bei diesen Substanzen die Absorptionsmaxima in dem jeweiligen Wellenlängenbereich liegen.

Die Extrakte wurden in drei Parallelen hergestellt und auf diese Weise analysiert.

An der Kalibriergerade konnte dann die Konzentration des jeweiligen Inhaltsstoffes abgelesen werden und daraus die in dem jeweiligen Extrakt enthaltene Substanzmenge errechnet werden. Die Summe aus den im Ethylacetat- und Methanolextrakt enthaltenen Inhaltsstoffmengen ergab die Gesamtmenge der Substanz in der jeweiligen Droge.

Es wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Rechnungen sowie die statistische Auswertung erfolgte mit Excel 97 (ANOVA).

Tab. M7: Quantifizierung von aktiven Inhaltsstoffen mittels externem Standard:
Konzentrationen der für die jeweiligen Kalibriergeraden verwendeten
Standardsubstanzen

Inhaltsstoff	Pflanze (Droge)	Standard	Konzentrationen für die Kalibriergerade ($\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)
<u>Luteolin</u>	<i>Guazuma ulmifolia</i> (Blattdroge aus Indonesien)	Apigenin	0.01, 0.02, 0.03, 0.1, 0.2, 0.3 1.0, 2.0, 3.0
<u>3-O-β-D-Glucopyranosyl- (1\rightarrow6)-β-D- glucopyranosylkaempferol</u>	<i>Sauropus androgynus</i> (Blattdroge)	Kämpferol	0.1, 0.25, 0.5, 1.0
<u>Pinoresinol</u>	<i>Alyxia reinwardtii</i> (Rindendroge)	Pinoresinol (isolierte Substanz)	0.1, 0.25, 0.5, 1.0
<u>(-)-Catechin</u>	<i>Guazuma ulmifolia</i> (Rindendroge der Gewächshauspflanze)	(+/-)-Catechin	0.19, 0.37, 0.46, 0.93, 1.39, 1.85, 2.78, 3.70, 4.17, 5.56
<u>(-)-Epicatechin</u>	<i>Guazuma ulmifolia</i> (Rindendroge der Gewächshauspflanze)	(+/-)-Catechin	0.19, 0.37, 0.46, 0.93, 1.39, 1.85, 2.78, 3.70, 4.17, 5.56

Für die Kalibriergeraden verwendete Standardsubstanzen:

Apigenin

Fluka

Kämpferol

Roth

(+/-)-Catechin

Sigma

2.8.2 Quantifizierung mittels internem Standard

Für die Quantifizierung der Acteoside wurde die Methode des internen Standards gewählt, da die isolierten Substanzen nicht rein genug waren, um damit eine Kalibriergerade zu erstellen, und diese beiden Stoffe kaum käuflich erworben werden können. Die Methode des internen Standards bietet ausserdem den Vorteil, Fehler, die während der Aufarbeitung der Probe auftreten, zu kompensieren, da sich Standard und zu bestimmende Substanz in einem Ansatz befinden und somit eventuelle Verluste beide Stoffe betreffen.

Die Quantifizierung von Acteosid und Isoacteosid aus den Blättern von *Guazuma ulmifolia* (Gewächshauspflanze) erfolgte mit Rosmarinsäure (ICN Biomedicals) als internem Standard, da diese über die gleichen chromophoren Systeme verfügt wie die Acteoside und somit in der HPLC-DAD einen ähnlichen Response-Faktor hat. Ausserdem tritt der Peak der Rosmarinsäure in der HPLC bei dem angewendeten Standardgradienten deutlich getrennt von denen der Acteoside auf.

2.8.2.1. Bestimmung des substanzspezifischen Korrekturfaktors

Da aufgrund struktureller Unterschiede zwischen Rosmarinsäure und den Acteosiden sich auch die Responsefaktoren im Diodenarray-Detektor unterscheiden, musste hier ein substanzspezifischer Korrekturfaktor errechnet und später in der Gehaltsbestimmung berücksichtigt werden, um diesen Unterschied zu kompensieren.

Die im folgenden verwendeten Konzentrationen hatten sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen.

Zunächst wurden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

Rosmarinsäure: 4 mg/10 ml

Acteosid: 0.3 mg/ml

Zur Korrekturfaktorbestimmung wurden drei verschiedene Verdünnungen verwendet, das heisst es wurden jeweils 100 μ l, 200 μ l und 300 μ l der Acteosidstammlösung mit 100 μ l der Rosmarinsäurestammlösung vermischt, mit HPLC-Methanol auf 1 ml aufgefüllt und in der HPLC vermessen. Es wurden jeweils von allen drei Substanzen

die Peakflächen bei 340 nm ermittelt, und dann wurde der Korrekturfaktor unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte wie folgt berechnet:

$$\text{skf} = \frac{m_R \times \text{PF}_A}{m_A \times \text{PF}_R}$$

skf = substanzspezifischer Korrekturfaktor

m_R = im Ansatz enthaltene Masse der Rosmarinsäure (0.04 mg)

m_A = im Ansatz enthaltene Masse an Acteosid

PF_A = Peakfläche des Acteosidpeaks bei 340 nm

PF_R = Peakfläche der Rosmarinsäure bei 340 nm

Aus den drei Ansätzen wurde jeweils der Mittelwert berechnet, und es ergab sich ein substanzspezifischer Korrekturfaktor von 0.212.

2.8.2.2. Bestimmung der Acteosid- und Isoacteosidmengen in den Blättern von *Guazuma ulmifolia*

Zur Bestimmung des Acteosid bzw. Isoacteosidgehaltes in den Blättern von *Guazuma ulmifolia* wurden die Blätter gefriergetrocknet, gewogen und extrahiert wie in 2.2.1.1. beschrieben. Nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge und im Exsikkator wurde der Methanol-Extrakt gewogen, mit 0.43 mg Rosmarinsäure versetzt, geeignet verdünnt und in der HPLC analysiert. Die Peakflächen des Standards und der beiden Acteoside wurden bei 340 nm ermittelt, und die Menge im Methanol-Extrakt wie folgt berechnet:

$$m_A = \frac{m_R \times \text{PF}_A}{\text{PF}_R \times \text{skf}}$$

m_A = im jeweiligen Extrakt enthaltene Menge an Acteosid bzw. Isoacteosid (mg)

m_R = zugegebene Menge an Rosmarinsäure (0.43 mg)

PF_A = Peakfläche des Acteosids bzw. Isoacteosids (mAU x min)

PF_R = Peakfläche der Rosmarinsäure (mAU x min)

skf = substanzspezifischer Korrekturfaktor (0.212)

Diese Bestimmung wurde dreimal wiederholt, und es wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Rechnungen sowie die statistische Auswertung erfolgte mit Excel 97 (ANOVA).

2.9. Biologische Testung von Sch53823 aus *Alstonia scholaris*

2.9.1. Testung auf Wachstumshemmung an verschiedenen Krebszelllinien

Die Testung auf Antitumorwirkung von Sch53823 erfolgte mit Hilfe des MTT-Assays im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W.E.G. Müller am Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie (Johannes Gutenberg Universität Mainz). Dieser Test beruht darauf, dass die Dehydrogenasen in den Mitochondrien lebender Zellen das lösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zu einem blauen, unlöslichen Formazan reduzieren, dessen Absorption bei 560 nm vermessen werden kann. Die Absorption ist proportional zu der metabolischen Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen und somit zur Lebensfähigkeit der Zellen.

Es wurden L-Zellen, Hela-Zellen und PC12-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Sch53823 inkubiert und die jeweiligen ED₅₀-Werte im MTT-Assay ermittelt.

2.9.2. Testung auf Hemmwirkung gegenüber *Cladosporium cucumerinum*

Für diesen Biotest wurde zunächst eine Standkultur von *Cladosporium cucumerinum* in Universalfüssigmedium für Hefen ^(*1) angelegt. Dazu wurde das Medium mit einem Stück Pilzmycel, das zuvor auf einer Petrischale mit Kartoffel-Dextrose-Agar ^(*2) (15% Agar) kultiviert worden war, beimpft und dann vier Wochen bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, und das Pilzmycel wurde mit 500 ml Kartoffel-Dextrose-Medium (1% Agar) mit dem Ultraturrax

homogenisiert. Die Mischung wurde über einen Büchnertrichter filtriert und 1.5 ml des Filtrats mit 4 ml Kartoffel-Dextrose-Medium (1% Agar) versetzt. Mit dieser Mischung wurden dann Kartoffel-Dextrose-Agar-Platten beimpft und sofort Filterpapierplättchen mit 50 bzw. 100 µg Sch53823 auf den Agar aufgelegt. Als Positivkontrolle dienten 10 bzw. 20 µg Nystatin (ebenfalls auf Filterpapierplättchen aufgetragen).

Die Substanzen waren vor dem Auftragen auf die Filterpapierplättchen in einer definierten Menge eines geeigneten Lösungsmittels gelöst worden, und nach dem Auftragen wurde jeweils so lange gewartet, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war.

Nach einer Woche Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Durchmesser der Hemmhöfe gemessen.

***¹ Universalflüssigmedium für Hefen**

Folgende Bestandteile wurden gemischt und autoklaviert:

Hefeextrakt	3 g
Malzextrakt	3 g
Pepton	5 g
Glucose	10 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

***² Kartoffel-Dextrose-Agar:**

200 g geschälte und in Scheiben geschnittene Kartoffeln wurden eine Stunde lang in 1 l Wasser gekocht und dann über einen Büchnertrichter filtriert. Das Filtrat wurde mit 20 g Glucose und 15 g bzw. 1 g Agar versetzt und autoklaviert.

2.10. Isolierung und Identifizierung von Endophyten-DNA aus der Rinde von *Alstonia scholaris*

Die Isolierung und Identifizierung der Endophyten-DNA aus der Rinde von *Alstonia scholaris* erfolgte durch Ine Dewi Indriani aus dem Arbeitskreis von Juniorprofessor Dr. Rainer Ebel (Institut für Pharmazeutische Biologie, HHU Düsseldorf).

2.10.1. Isolierung der Pilz-DNA

Zur Isolierung der DNA aus dem Pflanzenmaterial wurde das DNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen verwendet.

Zunächst wurden ca. 20 mg des gefriergetrockneten Pflanzenmaterials in einem Eppendorf-Cap mit einer Wolframcarbidskugel und einer Mixer Mill (Fa. Retsch) fein pulverisiert. Danach wurden sofort 400 μ l AP1-Puffer zur Lyse der Zellen und 4 μ l RNase A-Stammlösung (100 mg/ml) zur Verdauung der in der Probe enthaltenen RNA hinzugefügt und kräftig gevortext. Dann wurde das Gemisch 10 min lang bei 65 °C inkubiert und währenddessen dreimal durch Umdrehen des Eppendorf-Caps durchgemischt. Zum Ausfällen von Detergenzien, Proteinen und Polysacchariden wurde das Lysat mit 130 μ l AP2-Puffer versetzt, gemischt und fünf min auf Eis inkubiert. Durch zweiminütiges Zentrifugieren des Lysates auf höchster Stufe durch eine QIAshredder Spin Säule wurde die DNA grob zerlegt und Zellbruchstücke und Niederschläge von Salzen entfernt. Der nach Verwerfen des Pellets erhaltene Überstand wurde mit dem Ethanol-enthaltenden AP3/E-Puffer versetzt und mit der Pipette gemischt, um die Bindung der DNA an die DNeasy-Membran zu ermöglichen. Diese Mischung wurde dann durch eine DNeasy-Mini-Spin-Säule eine Minute lang bei 8000 rpm zentrifugiert, und das Filtrat, in dem sich Verunreinigungen wie Proteine und Polysaccharide befinden, wurde verworfen, während die DNA an die Membran gebunden war. Dann wurden 500 μ l ebenfalls Ethanol-enthaltender AW-Puffer hinzugegeben und erneut eine Minute lang bei 8000 rpm durch die DNeasy-Säule zentrifugiert (zweiter Waschschrift). Die gefilterte Fraktion wurde erneut verworfen und nochmals 500 μ l AW-Puffer hinzugegeben und 2 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Filtermembran zu trocknen bzw. vollständig von

verbleibendem Ethanol zu befreien, da dieser die folgenden Reaktionen hätte stören können. Die DNeasy-Säule wurde nun in ein Eppendorf-Gefäß überführt, und 50 µl 65 °C heisser AE-Puffer wurde direkt auf die DNeasy-Membran gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, um die nun gelöste DNA zu eluieren. Dieser Eluierungsschritt wurde dann noch einmal wiederholt und die DNA der beiden Schritte vereinigt.

2.10.2. Amplifizierung der Pilz-DNA: Polymerasekettenreaktion (PCR)

5 µl der isolierten und gereinigten DNA wurden mit 25 µl Taq-Polymerase-Mix (DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*, Desoxyribonukleinsäuretriphosphate (dNTPs), verschiedene Puffer), 5 µl Primerlösung (10 pmol/µl) und 15 µl Wasser versetzt. Als Primer dienen ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) und ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), die spezifisch an Pilz-DNA binden.

Dann wurde folgendes Temperaturprogramm/folgender Zyklus durchlaufen:

Tab. M8: Temperaturprogramm bei der PCR.

Die Schritte 2 a, b, und c wurden 35 mal wiederholt.

Schritte	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Vorgang
1	95	15	Initialdenaturierung
2a	95	1	Trennung der DNA-Stränge (Melting, Denaturation)
2b	56	1	Anlagerung der Primer (Annealing)
2c	72	1	Verlängerung (Extension)
3	72	10	Final Extension

Materialien für die PCR:

Hot Star Taq Mastermix	Qiagen
Primer	Invitrogen
iCycler	BioRad

2.10.3. Auftrennung der DNA: Agarose-Gelelektrophorese

Das hierfür verwendete Agarosegel bestand aus 2% Agarose in TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer und enthielt 5 μ l einer 1%igen Stammlösung Ethidiumbromid/100 ml Gel zum Anfärben der DNA. Die Elektrophorese wurde 60 min bei 75V durchgeführt. Zusätzlich wurde ein 100 bp Grössenstandard (Fa. NEB) geladen.

Materialien für die Gelelektrophorese:

Agarose	Serva
TBE-Puffer	Merck
Ethidiumbromid	Serva

2.10.4. Reinigung des PCR-Produktes

Zur Reinigung des PCR-Produktes wurde das Perfectprep Gel Cleanup Kit der Firma Eppendorf verwendet.

Zunächst wurde die DNA mit 500 bp (Pilz-DNA) aus dem TBE-Agarosegel ausgeschnitten, wobei möglichst wenig Gel mit ausgeschnitten wurde. Dann wurde dieses Gelstück in ein Eppendorf-Cap überführt, gewogen, das dreifache Volumen des Gelstückes an Bindungspuffer hinzugegeben und 10 min bei 50 °C inkubiert, wobei alle zwei bis drei min gevortext wurde. Nachdem sich das Gel vollständig aufgelöst hatte, wurde das gleiche Volumen wie das des Gels an Isopropanol zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Dann wurde die Probe eine Minute lang bei 8000 rpm über eine Spin-Säule mit Auffanggefäss zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Spin-Säule mit 750 μ l DILUTED-Wasch-Puffer versetzt und erneut eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde ebenfalls verworfen und ein drittes Mal eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, um den restlichen DILUTED-Wasch-Puffer zu entfernen. Die Spin-Säule wurde in ein frisches Auffanggefäss überführt, mit 30 μ l Eluierungs-Puffer versetzt und wieder

eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Spin-Säule wurde verworfen, und in dem Auffanggefäß befand sich nun die aufgereinigte DNA-Lösung, die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurde.

Diese DNA wurde mittels einer zweiten PCR amplifiziert, die wie in 2.10.2. beschrieben durchgeführt wurde, mit dem einzigen Unterschied, dass an Stelle der Primer ITS1 und ITS4 ITS1-gc (CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCG CCCCCGCCGTCCGTAGGTGAACCTGCGG) und ITS4 verwendet wurden, um das Produkt mit einem gc-Clamp zu versehen.

2.10.5. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Die Produkte aus 2.10.4., die aus der zweiten PCR resultierten, wurden mittels Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese nach ihren Schmelzpunkten aufgetrennt, um die DNA verschiedener Pilze zu isolieren. Dazu wurde ein Polyacrylamidgel (6%) mit Harnstoff und Formamid als denaturierende Reagenzien verwendet. Am Startpunkt der Elektrophorese betrug die Konzentration an Denaturierungsreagenz 40% (16.8 g Harnstoff und 16 ml Formamid pro 100 ml Gel), am Ende 70% (29.4 g Harnstoff und 28 ml Formamid pro 100 ml Gel). Für die Elektrophorese wurden pro Geltasche 20 μl des PCR-Produktes aus 2.10.4. geladen. Der Schmelzpunkt der DNA bzw. die Konzentration an denaturierenden Reagenzien, bei der sich die DNA-Stränge trennen, hängt von der Art und Anzahl der Basen ab, denn Guanin und Cytosin gehen drei Wasserstoffbrückenbindungen ein, Adenin und Thymin nur zwei. Deshalb schmelzen DNA-Stränge mit hohem Anteil an Guanin- und Cytosin-Basen bei höheren Konzentrationen an denaturierenden Reagenzien und wandern dementsprechend im Gel weiter. Kommt es zur Trennung der beiden Stränge, liegt der daran gebundene gc-Clamp immer noch als Doppelstrang vor, so dass das Molekül eine Y-förmige Gestalt annimmt. Dadurch kommt es zum Stillstand der DNA im Elektrophoresegel.

Das jeweilige Gelstück, das die mittels DGGE aufgetrennte DNA enthielt, wurde wie in 2.10.4. beschrieben nochmals ausgeschnitten und aufgereinigt, nur mit dem Unterschied, dass das Gelstück vor dem Lösen in Bindungspuffer mit Hilfe der Mixer Mill und des Wolframcarbidkügelchens zermahlen werden musste, da es sich hier um ein Polyacrylamid-Gel handelt, das sich in diesem Puffer nicht auflöst. Dann wurde weiter verfahren wie in 2.10.4. beschrieben.

Die aufgereinigte DNA wurde mittels einer dritten PCR erneut amplifiziert, diesmal wurde aber wieder wie in 2.10.2. beschrieben das Primerpaar ITS1 und ITS4 verwendet, um den gc-Clamp wieder zu entfernen. Das aus dieser PCR resultierende Produkt wurde erneut mittels Agarose-Gelelektrophorese wie in 2.10.3. beschrieben aufgetrennt, wie in 2.10.4. beschrieben nochmals aufgereinigt und dann zur Sequenzierung weggeschickt.

Materialien für die DGGE:

Polyacrylamidgel	Serva
Harnstoff	Serva
Formamid	Serva
DCode Universal Mutation Detection System	Bio Rad

2.10.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von den Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Hannah-Vogt-Strasse 1, D-37085 Göttingen) durchgeführt. Durch Vergleich der Sequenz mit GenBank wurde ein Endophyt identifiziert.

2.11. Lösungsmittel

Die im folgenden aufgeführten Lösungsmittel wurden sowohl zur Extraktion des Pflanzenmaterials als auch für die Flüssig-Flüssig-Verteilung, für die Vakuumliquidchromatographie und für die Säulenchromatographie verwendet.

Aceton, Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat, Hexan, Methanol wurden von den Chemischen Instituten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in technischer Qualität bezogen und jeweils vor Gebrauch destilliert.

2.12. Geräte

Hier finden sich die Geräte und Instrumente, die keiner der einzelnen Methoden zugeordnet werden können. Geräte und Instrumente, die hier nicht explizit erwähnt werden, finden sich in den Paragraphen der jeweiligen Methoden, bei denen sie eingesetzt werden.

Gerät	Hersteller
Drogenmühle (gross)	Retsch
Rührwerk RZR 2041	Heidolph
Analysenwaage MC-1	Sartorius
Mikrowaage MC-1	Sartorius
pH-Meter inoLab, pH-Elektrode Sen Tix 21	WTW
Exsikkator	Glaswerk Wertheim
Fraktionensammler	
■ 2070 Ultrorac II	LKB Bromma
■ Retriever II	ISCO
Gefriertrockner Lyovac GT2	Steris
Vakuumpumpe Trivag D10E)	Leybold
Vakuumzentrifuge SPD 111V	Savant
Kühlfalle RVT 400	Savant
Vakuumpumpe VLP 80	Savant
Heizplatte und Magnetrührer, Combimag Ret	IKA
Labormixer, Commercial Laboratory Blender	Waring
Drogenmühle	IKA
Magnetrührer MR1000	Heidolph
Mikroskop	Leica
Trockenschrank ET6130	Heraeus
Ultraschallbad Sonorex RK 510H	Bandelin
UV-Lampen (254 nm und 366 nm)	Camag
Vakuum-Rotationsverdampfer RV 05-ST	Vacuubrand
Temperierbad TS 2	IKA

Membranvakuumpumpe	Vacuubrand
Laborzentrifuge Pico	Heraeus
Stickstoffgenerator UHPN 3001	Nitrox
Wasserstoffgenerator UHP-20H	Nitrox
Luftgenerator ZA 20	WGA
Schüttler	Edmund Bühler
Autoklav-Varioklav	H+P
Ultraturrax T18 Basic	IKA
Cleanbench, HeraSafe	Heraeus

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes

Ergebnisse der von der Firma Schwabe durchgeführten Biotests und der Fraktionierung der aktiven Extrakte mittels Vakuum-Flüssig-Chromatographie (VLC)

Sechs Extrakte, die in verschiedenen Biotests bei der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel aktiv waren, wurden mittels Vakuum-Flüssig-Chromatographie fraktioniert. Im einzelnen handelt es sich dabei um den Ethylacetat- und Methanolextrakt von *Cyperus rotundus* und den Ethylacetatextrakt von *Centella asiatica*, die im Antidiabetes-Screen (α -Glucosidase und PTP-1B-Assay) aufgefallen waren. Im Lymphozyten-Transformationstest waren Ethylacetat- und Methanolextrakt von *Curcuma domestica*, im IOS-Ileum-Assay der Ethylacetatextrakt von *Curcuma xanthorrhiza* aktiv. Mit einem Hexan-Ethylacetat-Gradienten (100% Hexan \rightarrow 100% Ethylacetat in 2%-Schritten und spülen mit Ethylacetat-Methanol 50:50 und anschliessend mit 100% Methanol) wurden jeweils zwölf Fraktionen aus den Extrakten erhalten, die zur weiteren Testung an die Firma Schwabe geschickt wurden, um herauszufinden, in welchen Fraktionen sich die aktiven Inhaltsstoffe befanden.

Bei der Testung der VLC-Fraktionen von *Curcuma domestica* waren die Fraktionen 1 (100% Hexan), 4 (94% Hexan, 6% Ethylacetat) und 7 bis 12 (80, 70, 50 und 0% Hexan, 50% Methanol / 50% Ethylacetat, 100% Methanol) des Ethylacetatextraktes und die Fraktionen 1 (100% Hexan) und 2 (98% Hexan, 2% Ethylacetat) des Methanolextraktes im Lymphozytentransformationstest aktiv. Durch Vergleich der HPLC-Chromatogramme der aktiven und inaktiven Fraktionen konnte die Aktivität einem Gemisch aus Curcumin (Molekulargewicht: 368) und Bisdsmethoxycurcumin (Molekulargewicht: 308) zugeschrieben werden, da der Peak dieser beiden Verbindungen nur in den aktiven Fraktionen zu finden war. Diese wurden mit Hilfe

ihrer UV- und Massenspektren identifiziert (**Abb. E1**). Da diese beiden Verbindungen im HPLC-Chromatogramm nahezu die gleiche Retentionszeit aufweisen, war es nicht möglich, diese zu trennen und festzustellen, welche der beiden Verbindungen für die Aktivität verantwortlich war oder ob beide zur Aktivität beitragen.

Im Methanolextrakt konnte keine Korrelation zwischen aktiven Fraktionen und den Peaks im HPLC-Chromatogramm gefunden werden.

Die VLC-Fractionen der Extrakte von *Cyperus rotundus*, *Centella asiatica* und *Curcuma xanthorrhiza* waren in den jeweiligen Testsystemen nicht mehr aktiv. Vermutlich waren in diesen Extrakten verschiedene Verbindungen für die Aktivität verantwortlich (synergistischer bzw. additiver Effekt), die alle in geringen Mengen vorlagen und für sich alleine keine Aktivität mehr zeigen.

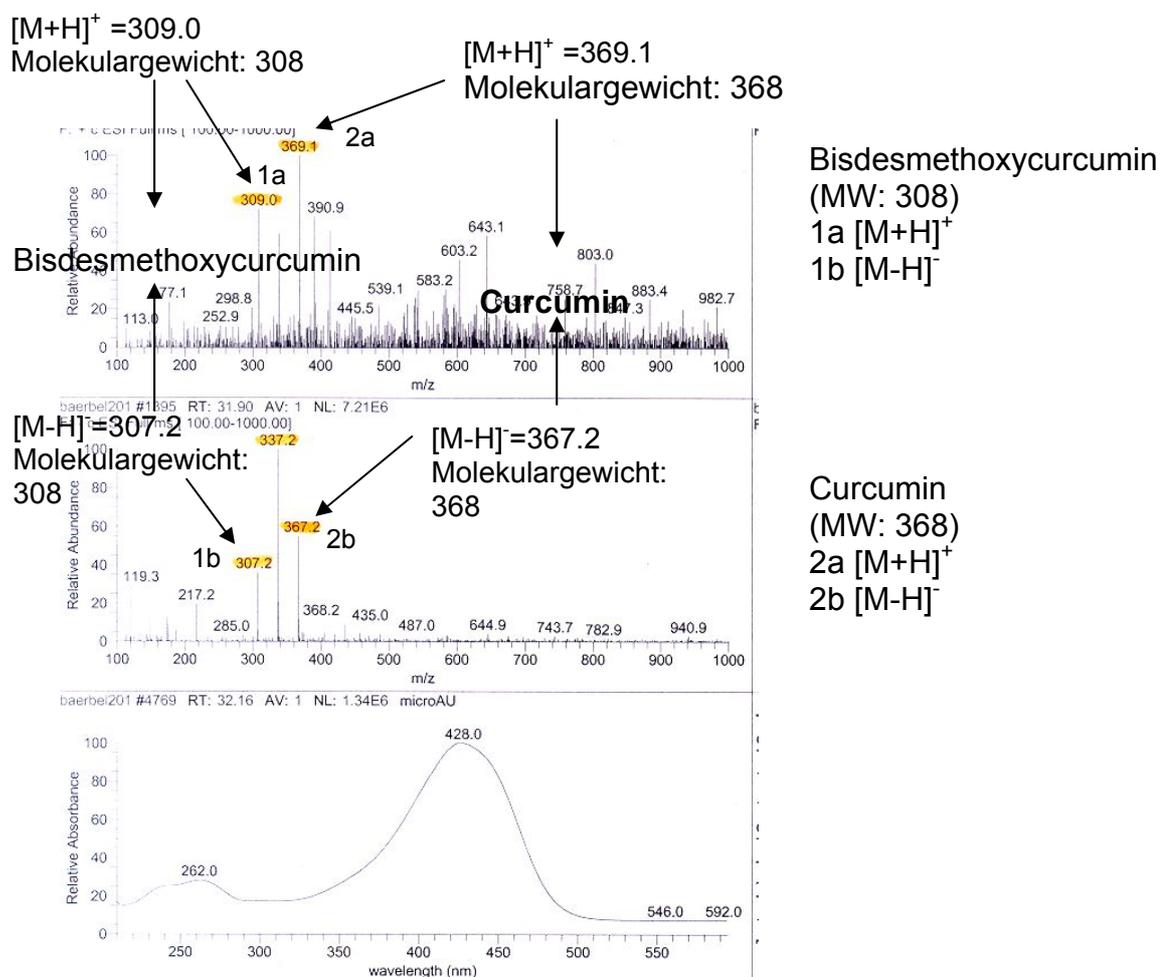


Abb. E1: Massen- und UV-Spektren der aktiven Fraktionen des Ethylacetatextraktes von *Curcuma domestica* gemeinsamer Peaks

3.2. Ergebnisse des antioxidativen Screenings

In dem mittels DC-Platten-DPPH-Assay durchgeführten antioxidativen Screening fielen die Methanolextrakte von *Alyxia reinwardtii* Bl., Apocynaceae ('Pulosari'), *Alstonia scholaris* L., Apocynaceae ('Pule') und *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae ('Daun Jati Belanda') durch ihre antioxidative Aktivität auf (**Tab. E1**) und wurden deshalb für die Extraktion in grösserem Maßstab zwecks Isolierung der aktiven Inhaltsstoffe (3.3.) ausgewählt.

Obwohl die Extrakte von *Sauropus androgynus* Merr., Euphorbiaceae ('Daun Katuk') ebenso wie die von *Sonchus arvensis* L., Asteraceae ('Daun Tempuyung') und *Graptophyllum pictum* Griff., Acanthaceae ('Daun Ungu') keine auffällige Aktivität zeigten, wurde der Methanolextrakt von *Sauropus androgynus* ebenfalls in grösserer Menge hergestellt und genauer untersucht, da für diese Pflanze bereits Kämpferolglykoside beschrieben worden waren (Wang und Lee 1997), und es interessant schien, diese zu isolieren und die antioxidativen Eigenschaften eines Glykosids mit denen des entsprechenden Aglykons zu vergleichen.

Tab. E1: R_f-Werte der aktiven Banden der Ethylacetat- und Methanolextrakte der sechs getesteten Pflanzen nach Entwickeln mit Dichlormethan:Methanol (95:5) und anschliessendem Besprühen mit 1%iger DPPH-Lösung

Pflanze	Ethylacetatextrakt	Methanolextrakt
<i>Alyxia reinwardtii</i>	Startzone (schwach), 0.29, 0.33, 0.56	Startzone, 0.07, 0.29, 0.33, 0.56
<i>Guazuma ulmifolia</i>	negativ	Startzone (sehr stark)

<i>Sonchus arvensis</i>	negativ	Startzone (schwach), 0.47, 0.69, 0.79 (alle drei sehr schwach)
<i>Sauropus androgynus</i>	negativ	Startzone (schwach)
<u><i>Graptophyllum pictum</i></u>	negativ	Startzone
<u><i>Alstonia scholaris</i></u>	negativ	Startzone (sehr stark)

3.3. Isolierte Inhaltsstoffe

Auf der Basis des im Abschnitt 3.2. beschriebenen antioxidativen Screenings wurden die Methanolextrakte von *Alyxia reinwardtii*, *Alstonia scholaris*, *Guazuma ulmifolia* und *Sauropus androgynus* zur weiteren Aufarbeitung ausgewählt, um die antioxidativ wirksamen Sekundärmetaboliten zu isolieren und zu identifizieren. Von *Guazuma ulmifolia* wurden zusätzlich Blätter und Rinde der im Gewächshaus angezogenen Pflanze extrahiert und jeweils die aktiven Inhaltsstoffe isoliert, um diese mit denen aus der Pflanze aus Indonesien zu vergleichen.

Dabei wurde im Laufe der Aufarbeitung jede Fraktion auf DC-Platte mittels DPPH-Assay auf antioxidative Aktivität hin überprüft, und die jeweils aktiven Fraktionen wurden weiter aufgetrennt (bioaktivitätsgeleitete Isolierung).

3.3.1. Inhaltsstoffe aus *Guazuma ulmifolia*, Sterculiaceae

3.3.1.1. Droge aus Indonesien

Die aus Indonesien bezogene Droge (760 g) wurde wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.1. beschrieben in einer Soxhlet-Apparatur sukzessive mit Dichlormethan und Methanol jeweils erschöpfend extrahiert. Da in dem antioxidativen Screening der Methanolextrakt aufgefallen war, wurde dieser weiter bearbeitet. Wie in dem Isolierschema (**Abb. E2**) gezeigt, wurde zunächst eine Flüssig-Flüssig-Verteilung Methanol:Wasser (9:1) gegen n-Hexan durchgeführt und dann die wässrige Methanolphase einer erneuten Flüssig-Flüssig-Verteilung mit

Ethylacetat gegen Wasser unterzogen. Die Ethylacetatphase (3.45 g) wurde wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.4. beschrieben mittels Vakuumflüssigchromatographie aufgetrennt.

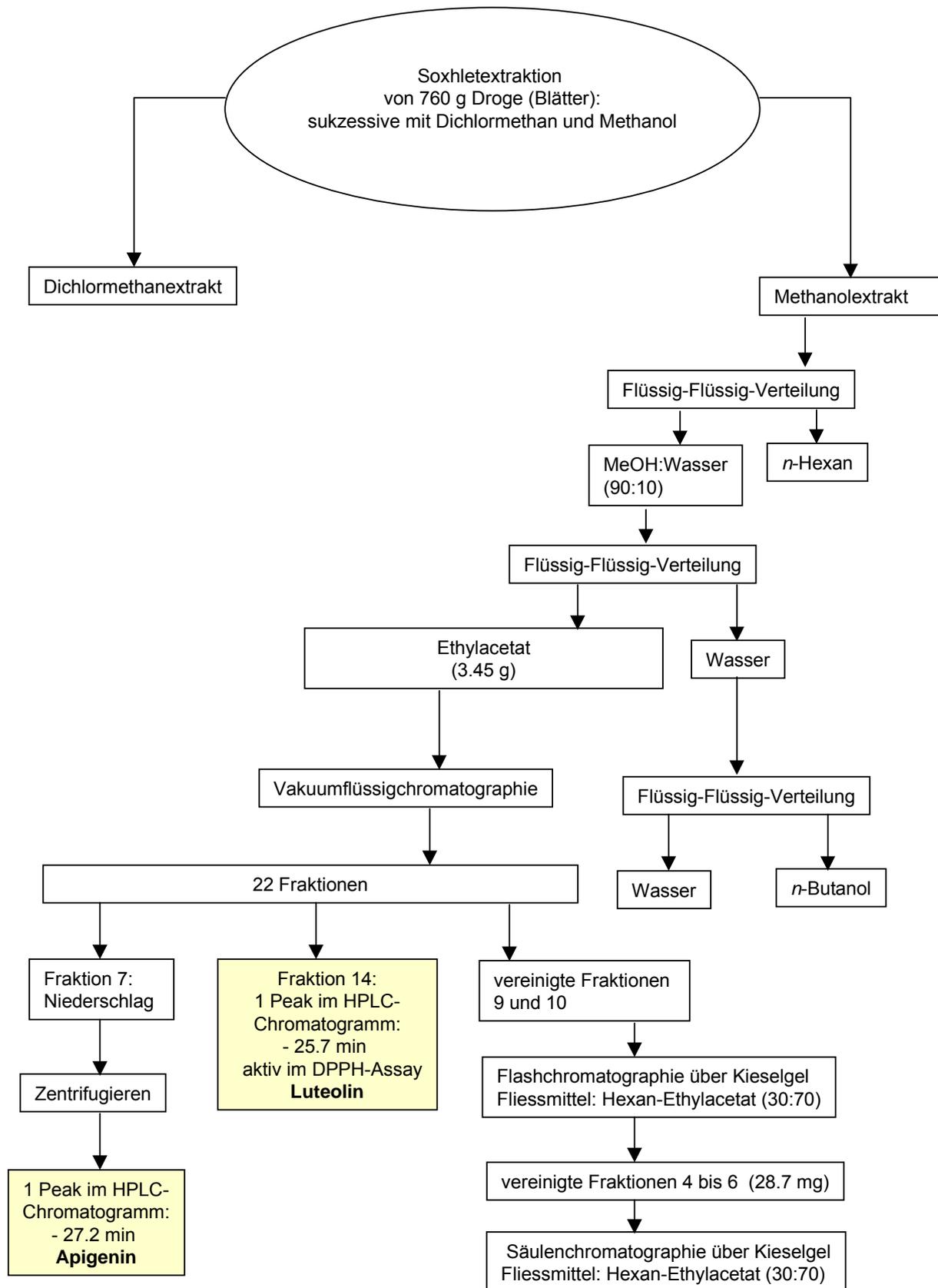


Abb. E2: Isolierung von Apigenin und Luteolin aus *Guazuma ulmifolia*

Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavon)

In Fraktion 7, die mit 35% *n*-Hexan und 65% Ethylacetat erhalten worden war, trat ein leicht gelblich-grüner Niederschlag auf, der nach Abzentrifugieren des Überstandes und erneutem Lösen in Methanol per HPLC untersucht wurde. Das Chromatogramm zeigte einen einzelnen Peak bei einer Retentionszeit von 27.2 min, dessen UV-Spektrum nach Vergleich mit der Spektrenbibliothek auf ein Flavon hindeutete. Per HPLC-MS konnte ein Molekulargewicht von 270 ermittelt werden.

Im ¹H-Spektrum, das in deuteriertem Methanol gemessen worden war, fielen zwei miteinander koppelnde Dubletts auf, von denen eines bei 7.76 ppm und das andere bei 6.84 ppm lag. Die Kopplungskonstante betrug 8.8 Hz. Bei dem weiter ins tiefe Feld verschobenen Dublett handelt es sich um die Signale der Protonen in den Positionen 2' und 6' im B-Ring, die zusammenfielen, da sie chemisch äquivalent sind. Bei dem Dublett bei 6.84 ppm handelte es sich um die entsprechenden Signale der chemisch äquivalenten Protonen in den Positionen 3' und 5'. Es handelte sich also um ein AA'BB'-Spinsystem. Die Kopplungskonstante von 8.8 Hz ergibt sich aus der *ortho*-Kopplung von H-2' mit H-3' bzw. der *ortho*-Kopplung von H-5' mit H-6'.

Das Proton in 3-Position des C-Rings trat bei 6.5 ppm als Singulett auf, während die *meta*-koppelnden Protonen in Position 6 und 8 des A-Rings jeweils ein Dublett bei 6.11 bzw. 6.36 ppm mit einer Kopplungskonstante von 2.2 Hz für die *meta*-Kopplung ergaben. Durch Vergleich der NMR-Daten mit den entsprechenden Literaturdaten (Pouchert und Behnke 1993, gemessen in DMSO-*d*₆) konnte die Verbindung als Apigenin identifiziert werden. Apigenin ist bereits aus diversen Pflanzen isoliert worden, unter anderem aus dem Harz von *Xanthorrhoea*-Arten (Batterham und Hight 1964). Aus *Guazuma ulmifolia* wurde es hier erstmals isoliert.

Apigenin

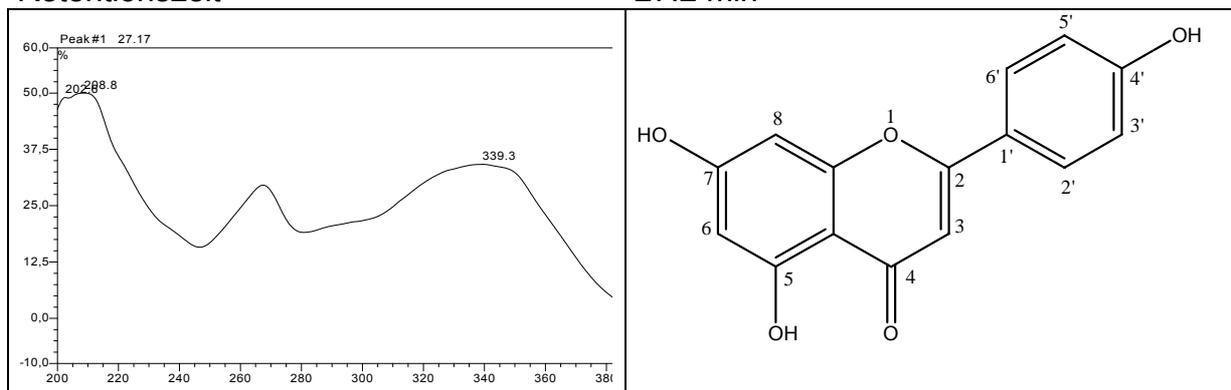
Systematischer Name	5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-on
Beschreibung	gelblich-grünes Pulver
Molekulargewicht	270 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	271.3 [M+H] ⁺ (positiv) 269.6 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₁₅ H ₁₀ O ₅

Substanzmenge

0.3 mg

Retentionszeit

27.2 min



Tab. E2: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Apigenin (aufgenommen in CD_3OD)

Apigenin		
	δ_{H} (J Hz)	δ_{H} (*Literatur)
2' / 6'	7.76 d (2H, 8.8)	7.98
3	6.50 s	6.87
3' / 5'	6.84 d (2H, 8.7)	6.98
6	6.11 d (2.2)	6.27
8	6.36 d (2.2)	6.55

(*)Literaturvergleich mit Batterham und Hightet 1964, gemessen in $\text{DMSO-}d_6$

Apigenin wurde nicht quantifiziert, da es im DPPH-Assay keine antioxidative Aktivität gezeigt hatte (siehe Abschnitt 3.4.).

Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon)

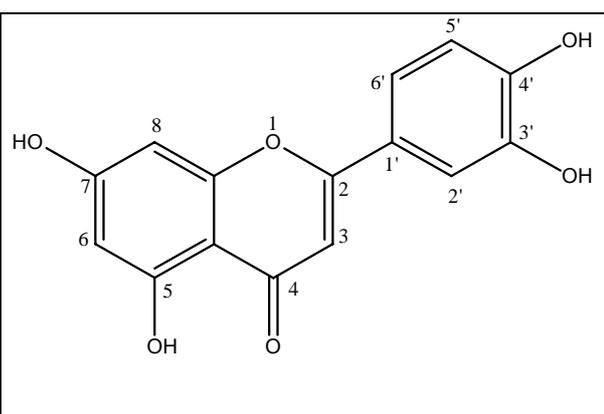
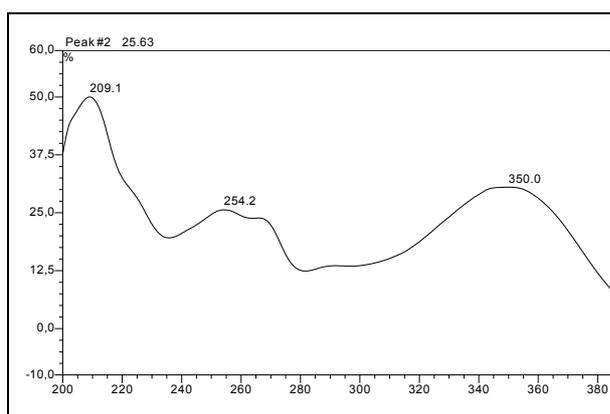
Fraktion 11, die mit 10% *n*-Hexan und 90% Ethylacetat eluiert wurde, zeigte im HPLC-Chromatogramm einen Hauptpeak bei einer Retentionszeit von 25.7 min, dessen UV-Spektrum ebenfalls auf ein Flavon hindeutete. Nach der Trennung über eine Sephadex-Säule (100% Methanol) wurde dieser Hauptpeak isoliert und zunächst per HPLC-MS analysiert. Hierbei wurde für die Verbindung ein Molekulargewicht von 286 ermittelt.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Luteolin, das ebenfalls in deuteriertem Methanol aufgenommen wurde, lag ein Dublett vom Dublett bei 7.37 ppm, das die Kopplungskonstanten 8.2 und 2.5 Hz aufwies. Dieses Signal war dem Proton in Position 6' des B-Rings zuzuordnen, das zum einen eine *ortho*-Kopplung zu H-5' des

B-Rings und zum anderen eine *meta*-Kopplung zu H-2' des B-Rings zeigt. Proton 5' ergab dementsprechend ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 8.8 Hz bei 6.89 ppm, während H-2' als Dublett mit der Kopplungskonstante 2.5 Hz bei 7.36 ppm auftrat. Hierbei handelte es sich folglich um ein ABC-Spinsystem eines 1,2,4-trisubstituierten Aromaten. Analog zu Apigenin zeigte das Proton in Position 3 im C-Ring ein Singulett bei 6.52 ppm, und die *meta*-koppelnden Protonen in Position 6 und 8 des A-Rings waren den Dubletts mit einer Kopplungskonstante von 1.9 Hz bei 6.12 bzw. 6.42 ppm zuzuordnen. Luteolin ist ebenfalls schon aus verschiedenen Pflanzen bekannt, unter anderem aus der Asteracee *Centaurea scoparia* (Youssef und Frahm 1995). Aus *Guazuma ulmifolia* wurde es hier erstmals isoliert.

Luteolin

Systematischer Name	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-on
Beschreibung:	gelbliches Pulver
Molekulargewicht	286 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	287.4 [M+H] ⁺ (positiv) 285.7 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Substanzmenge	4.1 mg
Retentionszeit	25.6 min



Tab. E3: ^1H -NMR-Daten von Luteolin (aufgenommen in CD_3OD)

Luteolin		
	δ_{H} (J Hz)	δ_{H} (*Literatur)
2'	7.36 d (2.5)	7.38 d (2.4)
3	6.52 s	6.64 s
5'	6.89 d (8.8)	6.87 d (8.6)
6'	7.37 dd (8.2, 2.5)	7.39 dd (8.6, 2.4)
6	6.19 d (1.9)	6.17 d (2.0)
8	6.42 d (1.9)	6.43 d (2.0)

(*)Literaturvergleich mit Youssef und Frahm 1995, gemessen in $\text{DMSO}-d_6$

Ergebnis der Quantifizierung:

Luteolin wurde in den Blättern von *Guazuma ulmifolia* aus Indonesien mit Hilfe eines externen Standards quantifiziert. Dabei wurde die Kalibriergerade mit Apigenin erstellt, da Luteolin nicht in ausreichender Menge vorlag.

Der Gehalt in der Pflanze betrug insgesamt $0.0040 (\pm 0.0002)\%$ bezogen auf das Trockengewicht. Dabei war im Ethylacetatextrakt kein Luteolin zu finden, während die Menge im Methanolextrakt $0.24 (\pm 0.04)\%$ bezogen auf den getrockneten Extrakt betrug.

3.3.1.2. Vergleichende Untersuchung des Inhaltsstoffspektrums der Gewächshauspflanze (*Guazuma ulmifolia*)



Abb. E3: Gewächshauspflanzen kurz nach dem Keimen am 13.01.2003



Abb. E4: Blätter und Rinde der Gewächshauspflanze (*Guazuma ulmifolia*) beim Trocknen kurz nach der Ernte

I.) Blätter

Im HPLC-Chromatogramm des Methanolextraktes (1.53 g) der getrockneten Blätter von *Guazuma ulmifolia* aus dem Gewächshaus befanden sich zwei Hauptpeaks mit den Retentionszeiten 18.9 min und 20.5 min. Beide Verbindungen wiesen ein

Molekulargewicht von jeweils 624 auf. Die UV-Spektren mit Absorptionsmaxima bei 219 und 231 nm bzw. bei 218 und 327 nm liessen jeweils den Rückschluss auf ein Kaffeesäure-Derivat zu.

Mit Hilfe einer Sephadex-Säule (100% Methanol) konnten diese beiden Substanzen isoliert und durch NMR-Spektroskopie als Acteosid und Isoacteosid identifiziert werden.

Dabei wurde bei beiden Verbindungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sowohl über die charakteristische *trans*-Kopplung mit der Kopplungskonstante 15.9 Hz als auch über das ABC-Spinsystem des 1,2,4-trisubstituierten Aromaten ein Kaffeesäurerest identifiziert. Ausserdem fiel in beiden Spektren das für Rhamnose charakteristische Dublett ($J = 6.3 \text{ Hz}$, 3H) bei 1.09 bzw. 1.24 ppm auf. Ausserdem liessen ein Dublett mit *ortho*-Kopplung, ein Dublett vom Dublett mit *ortho*- und *meta*-Kopplung sowie ein Dublett mit *meta*-Kopplung auf jeweils ein weiteres 1,2,4-trisubstituiertes aromatisches System schliessen. Eine Suche in einer Substanzdatenbank (Dictionary of Natural Products 2004) nach dem Molekulargewicht 624 und diesen Strukturelementen gab den ersten Hinweis auf die Substanzklasse der Acteoside. Da sich Acteosid und Isoacteosid strukturell sehr ähnlich sind, wird die Aufklärung ihrer Strukturen hier gemeinsam beschrieben, wobei auf die Unterschiede zwischen den Spektren der Verbindungen an gegebener Stelle explizit hingewiesen wird.

Die beiden *trans*-ständigen Protonen an der Doppelbindung des Kaffeesäurerestes traten jeweils als Dublett bei 7.59 bzw. 7.55 ppm (H-7') und 6.27 bzw. 6.28 ppm (H-8') auf, während das Proton in Position 2' am Aromaten bei 7.05 bzw. 7.03 ppm eine *meta*-Kopplung zu H-6' von 2.1 Hz zeigte. Das Proton in Position 6' ergab bei Isoacteosid ein Dublett vom Dublett bei 6.88 ppm mit den Kopplungskonstanten 2.2 Hz für die *meta*-Kopplung zu H-2' und 8.2 Hz für die *ortho*-Kopplung zu H-5'. Im ^1H -Spektrum von Acteosid dagegen war das Dublett vom Dublett von H-6' (6.95 ppm) teilweise von anderen Signalen überlagert, so dass hier nur die *ortho*-Kopplung von 8.2 Hz zu H-5' zu erkennen war. H-5' ergab dementsprechend ein Dublett bei 6.77 bzw. 6.76 ppm ($J=8.2 \text{ Hz}$). Dass es sich bei diesem 1,2,4-trisubstituierten Aromaten um den Aromaten des Kaffesäurerestes handelte, wurde durch die HMBC-Korrelation von H-7' zu den Kohlenstoffen C-2' und C-6' bestätigt. Ausserdem war eine Korrelation von H-7' zu dem Carboxyl-Kohlenstoff in Position 9' zu sehen. Dieses Kohlenstoffatom zeigte bei Acteosid auch eine Korrelation zu H-4'' (4.92 ppm) des Glucoserestes. Bei Isoacteosid dagegen fehlte diese Korrelation, stattdessen

korrelierte C-9' hier mit den beiden Protonen in Position 6'' der Glucose. Daraus ergab sich, dass es sich bei den beiden Verbindungen um Stellungsisomere handelte, wobei die Glucose bei Acteosid an Position 4'' und bei Isoacteosid an Position 6'' mit dem Kaffeesäurerest verestert ist. Die Identität der Glucose wurde über die Kopplungskonstanten ihrer Protonen ermittelt, die jeweils aussagten, ob es sich um eine axial-axiale oder um eine axial-äquatoriale oder äquatorial-äquatoriale Kopplung handelte. Das Proton in Position 3'' ergab im $^1\text{H-NMR}$ ein Triplett mit der Kopplungskonstante 9.1 Hz. Hier spiegelten sich die jeweils axial-axialen Kopplungen zu H-4'' und zu H-2'' wider, die beide ungefähr gleich grosse Kopplungskonstanten aufwiesen. An dieser Stelle wurde deutlich, dass es sich um Glucose und nicht um Galactose handeln musste, da bei Galactose die Kopplungskonstante zwischen H-3'' und H-4'' viel kleiner ist. Proton 4'' lag bei Acteosid bei 4.92 ppm und war damit gegenüber dem von Isoacteosid (3.40 ppm) stark tieffeldverschoben, da es bei Acteosid durch den -I-Effekt des Estersauerstoffs des Kaffeesäurerestes stärker entschirmt wird. Da 4'' im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von anderen Signalen überlappt wurde, konnten hier keine Kopplungskonstanten ermittelt werden. Dass es sich bei den entsprechenden Signalen tatsächlich jeweils um Proton 4'' der Glucose handelte, konnte aufgrund des HMBC-Spektrums bestätigt werden. H-4'' korrelierte jeweils mit den Kohlenstoffen C-5'' (70.0 bzw. 75.5 ppm), C-6'' (61.7 bzw. 64.7 ppm) und C-3'' (80.9 bzw. 83.3 ppm). Die jeweils dazugehörigen Protonen wurden über ein HMQC-Spektrum ermittelt, das für das Isoacteosid gemessen worden war.

Die Protonen an C-5'' lagen für die beiden Verbindungen jeweils bei 3.50 bzw. 3.53 ppm. Allerdings konnten auch hier aufgrund von Signalüberlagerungen keine Kopplungskonstanten errechnet werden. Die chemische Verschiebung der beiden geminalen Protonen von C-6'' konnte bei Acteosid nicht ermittelt werden, da die Signale von anderen Signalen überlagert wurden. Bei Isoacteosid erschienen sie jeweils als Dublett vom Dublett bei 4.48 ppm für 6''_A-H ($J = 12.0; 1.9$ Hz) und bei 4.36 ppm für 6''_B-H ($J = 12.0; 7.3$ Hz).

Das Proton in Position 5'' (3.50 bzw. 3.53 ppm) korrelierte im HMBC-Spektrum beider Verbindungen mit C-4'' (75.0 bzw. 70.0 ppm). Ebenso zeigte H-3'' (3.81 bzw. 3.52 ppm) in beiden HMBC-Spektren eine Korrelation zu dem Kohlenstoff C-1'' der Rhamnose bei 102.0 bzw. 102.2 ppm. Dies deutete darauf hin, dass die Rhamnose bei beiden Verbindungen in Position 3'' mit der Glucose verethert ist. H-2'' ergab ein

Signal bei 3.38 bzw. 3.30 ppm. Da auch dieses teilweise verdeckt war, konnte nur bei Acteosid eine Kopplungskonstante von 7.9 Hz ermittelt werden. Diese spiegelte die axial-axiale Kopplung von H-2'' zu H-1'' wider, denn die Kopplungskonstante des Dubletts von H-1'' (4.37 bzw. 4.32 ppm) betrug bei beiden Verbindungen jeweils 7.9 Hz. Das Proton in Position 1'' zeigte im HMBC-Spektrum beider Verbindungen eine Korrelation zu Kohlenstoff C-8. Dieser lag bei 71.5 bzw. 72.1 ppm. Proton 8_A-H lag bei 4.04 bzw. 3.96 ppm, Proton 8_B-H bei 3.70 ppm. Die CH₂-Protonen in Position 8 zeigten HMBC-Korrelationen zu den Kohlenstoffen C-1'' (103.4 bzw. 103.8 ppm), C-7 (35.7 bzw. 36.4 ppm) und C-1 (130.6 bzw. 131.3 ppm). Die geminalen Protonen in Position 7 ergaben ein teilweise von anderen Signalen überlagertes Multiplett bei 2.28 bzw. 2.77 ppm. Sie zeigten HMBC-Korrelationen C-8 und zu C-1 sowie C-2 (116.4 bzw. 116.3 ppm) und C-6 (120.4 und 120.7 ppm). Die Protonen H-2 und H-6 gehörten einem 1,2,4-trisubstituierten Aromaten an, bei dem Proton H-2 (6.69 bzw. 6.66 ppm) eine *meta*-Kopplung von 2.1 Hz zu H-6 (6.55 bzw. 6.52 ppm) aufwies, und H-6 wiederum *ortho* mit 7.9 Hz zu H-5 (6.67 bzw. 6.62) koppelte. Dementsprechend lag H-6 als Dublett vom Dublett und H-5 als Dublett vor.

Das Proton in Position 1''' der Rhamnose lag bei 5.18 bzw. 5.17 ppm, koppelte mit 1.6 Hz zu H-2''' und zeigte HMBC-Korrelationen zu C-3''' (71.8 ppm, nur beim Isoacteosid zu sehen), C-5''' (69.5 bzw. 69.4 ppm) und zu C-3'', was hier noch einmal die Bindung an die Glucose in Position 3'' bestätigte. Das Proton in Position 2''' (3.92 bzw. 3.94 ppm) koppelte mit H-1''' (J = 1.6 Hz) und mit H-3''' (J = 3.2 Hz). Dieses Dublett vom Dublett war allerdings nur bei Acteosid zu sehen, während bei Isoacteosid wegen Überlappung keine Kopplungskonstanten ermittelt werden konnten. Die Protonen H-3''', H-4''', und H-5''' der Rhamnose überlappten ebenfalls stark, so dass hier die Signalaufspaltungen nicht zu erkennen waren. Die chemischen Verschiebungen dieser Protonen wurden teilweise über ihre Korrelationen aus dem HMBC-Spektrum entnommen und sind in Tabelle **E4** bzw. **E5** aufgelistet.

Durch Vergleich mit den in den Tabellen **E4** und **E5** aufgeführten Literaturdaten konnten die beiden postulierten Strukturen bestätigt werden. Sowohl der Drehwert von Acteosid mit -89.1° als auch der von Isoacteosid mit -56.6° stimmten nahezu mit den jeweiligen Literaturwerten von -87.5° (c 0.71 in Methanol) für Acteosid und -52.3° (c 0.58 in Methanol) für Isoacteosid überein (Kasai et al. 1991). Beide Substanzen

waren jeweils grün gefärbt, was auf leichte Verunreinigungen mit Chlorophyll zurückgeführt wurde.

Acteosid und Isoacteosid wurden unter anderem bereits aus der Lamiacee *Leucoseprum japonicum* isoliert (Toshio et al. 1982), aber aus *Guazuma ulmifolia* waren sie bisher noch nicht bekannt.

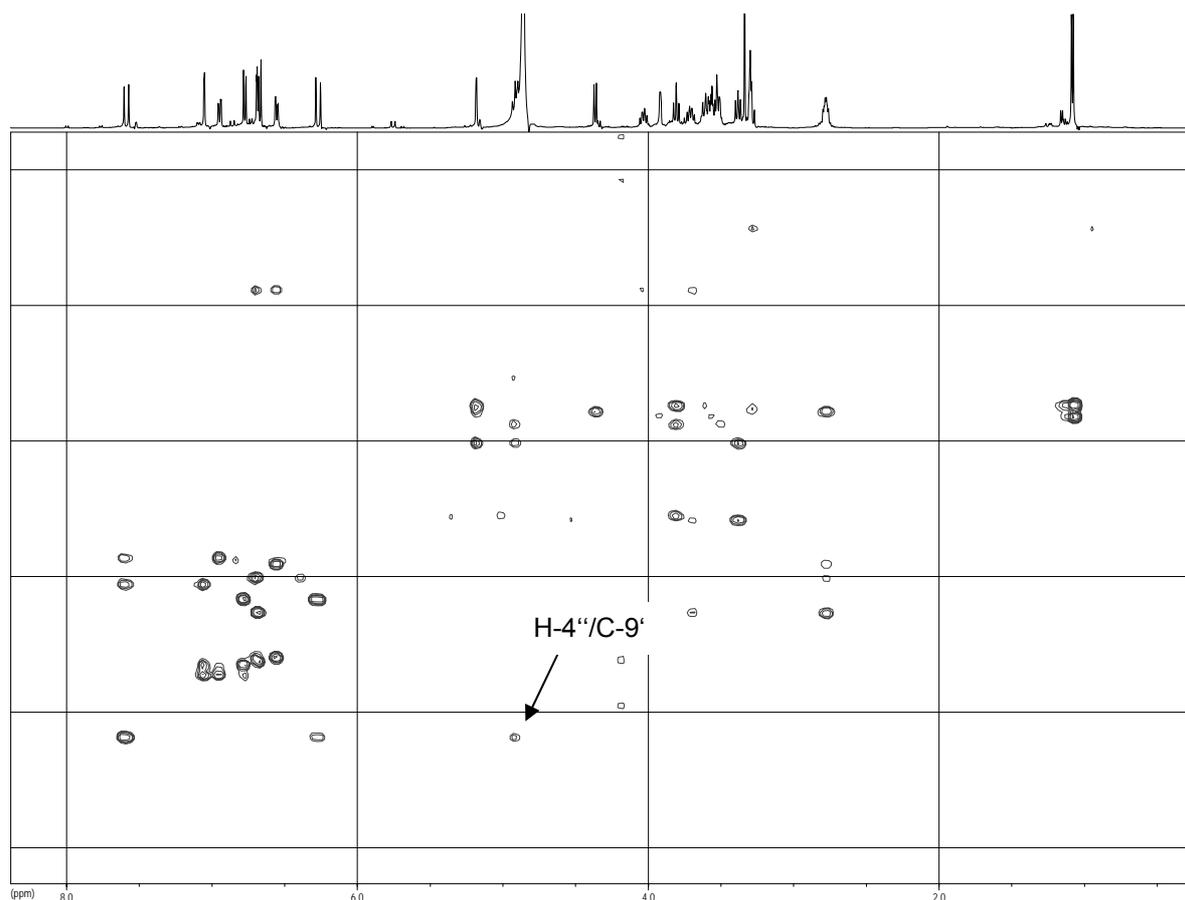
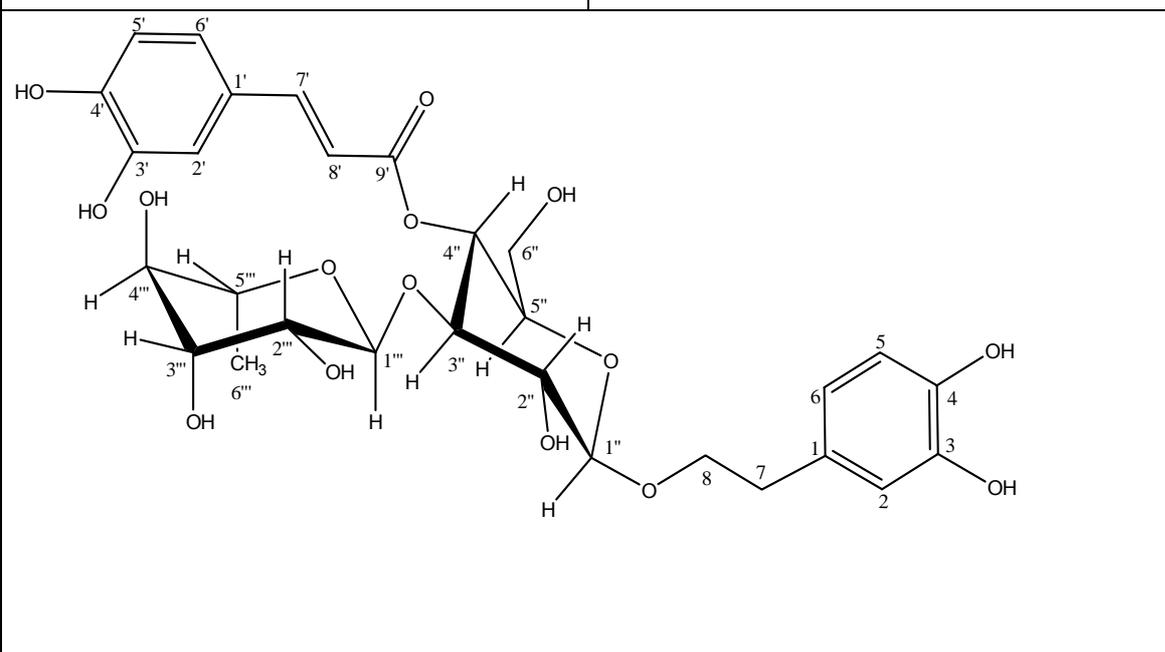
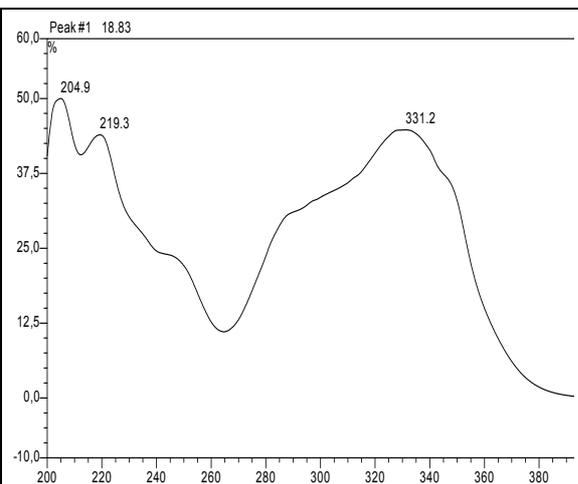


Abb. E5: HMBC-Spektrum von Acteosid

Acteosid

Systematischer Name	1-O-[α -L-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[3,4-dihydroxy- <i>E</i> -cinnamoyl-(\rightarrow 4)]- β -D-glucopyranosid)
Beschreibung	grünes Pulver
Spezifische Drehung	-89.1° (c 1.15 in Methanol)
Molekulargewicht	624 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	624.8 [M+H] ⁺ (positiv) 623.4 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅
Substanzmenge	45.6 mg
Retentionszeit	18.8 min



Tab. E4: ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Daten von Acteosid (aufgenommen in CD_3OD)

Acteosid				
	δ_{H} (J Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{C} (*Literatur)	HMBC ^b
1		130.6 s	131.4	
2	6.69 d (2.0)	116.4 d	116.3	6, 7
3		145.0 s	145.5	
4		143.7 s	144.0	
5	6.67 d (7.9)		117.0	1, 3
6	6.55 dd (7.9, 1.9)	120.4 d	121.2	2, 4, 7
7	2.78 m	35.7 t	36.1	1, 2, 6, 8
8	A 4.04 m	71.5 t	71.9	1, 1''w, 7w
	B 3.70 m			1, 7w
1'		126.7 s	127.4	
2'	7.05 d (1.9)	114.6 d	114.5	3', 4', 6'
3'		146.1 s	146.2	
4'		148.9 s	149.1	
5'	6.77 d (8.2)		116.3	1', 3', 4'
6'	6.95 dd (8.2, 1.9)	122.3 d	123.1	2', 4'
7'	7.59 d (15.8)		147.8	2', 6', 9'
8'	6.27 d (16.0)		115.3	1', 9'
9'		167.4 s	168.2	
1''	4.37 d (7.9)	103.4 d	103.7	8
2''	3.38 dd (9.1, 7.9)		75.4	1'', 3''
3''	3.81 bt (9.1)	80.9 d	81.5	1''', 4'', 5''
4''	4.92 bt (9.3)	75.0 d	75.7	3'', 5'', 6''w, 9'
5''	3.50 m ^c	70.0 d	70.1	4''
6''AB	3.61 ^c	61.7 t	62.1	
1'''	5.18 d (1.6)	102.0 d	102.6	3'', 5''
2'''	3.92 dd (3.2, 1.6)		71.9	4'''w
3'''	3.59 m ^c	70.8 d	71.9	5'''w
4'''	3.29 m ^c	72.8 d	73.6	3'''w, 6'''w
5'''	3.57 m ^c	69.5 d	70.1	4'''
6'''	1.09 d (6.3)	17.5 q	18.2	4''', 5'''

^a aus dem HMBC-Spektrum entnommen

^b H nach C

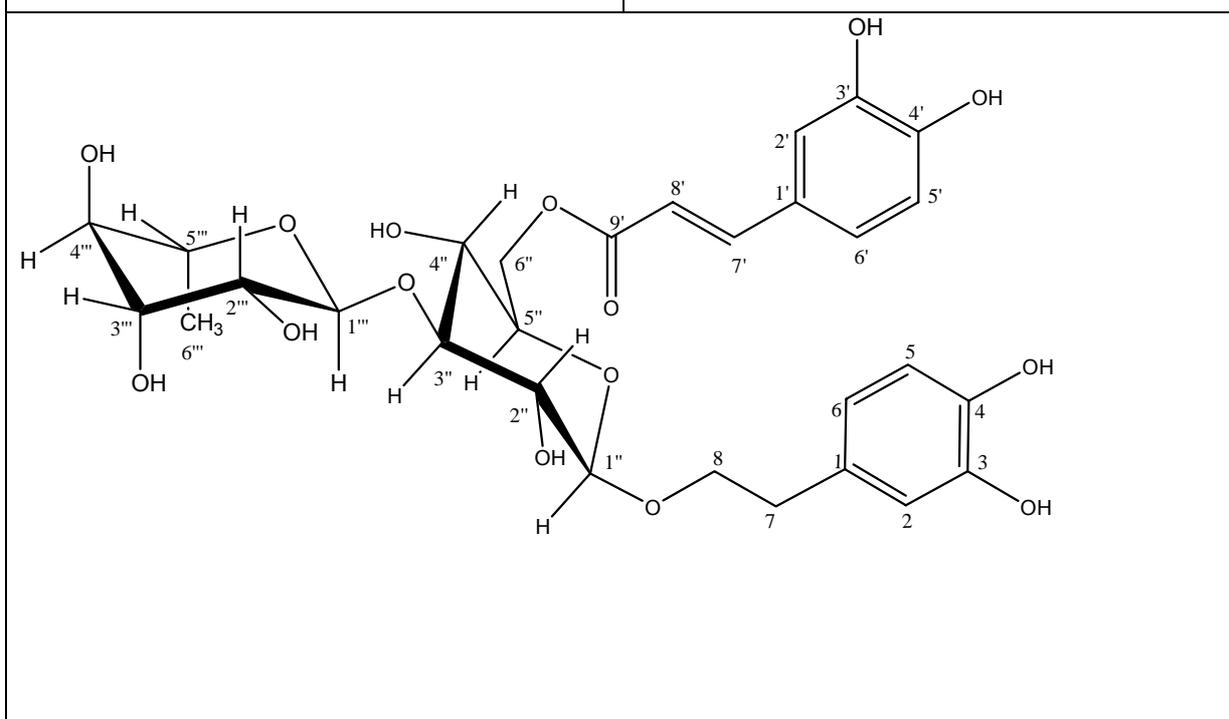
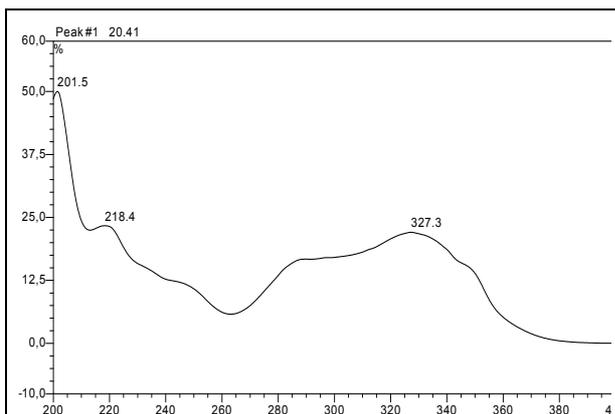
^c verdeckt durch Signalüberlappung

w = schwach

(*) Literaturvergleich mit Toshio et al. 1982, gemessen in CD_3OD

Isoacteosid**Synonym: Isoverbascosid**

Systematischer Name	1-O-[α -L-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[3,4-dihydroxy- <i>E</i> -cinnamoyl-(\rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosid)
Beschreibung	grünliches Pulver
Spezifische Drehung	-56.6° (c 0.58 in Methanol)
Molekulargewicht	624 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	624.8 [M+H] ⁺ (positiv) 623.4 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅
Substanzmenge	12.8 mg
Retentionszeit	20.5 min



Tab. E5: ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Daten von Isoacteosid (aufgenommen in CD_3OD)

Isoacteosid				
	δ_{H} (J Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{C} (*Literatur)	HMBC ^b
1		131.3 s	131.4	
2	6.66 d (2.2)	116.3 d	116.6	4, 6, 7
3		145.5 s	145.9	
4		144.4 s	144.5	
5	6.62 d (7.9)		117.1	1, 3
6	6.52 dd (7.9, 2.2)	120.7 d	121.3	2, 4, 7
7	2.77 m	36.4 t	36.6	1, 2, 6, 8
8	A 3.96 m B 3.70 m	72.1 t	72.3	1w, 1'', 7w
1'		127.2 s	127.7	
2'	7.03 d (2.2)	114.7 d	115.0	3'w, 4', 6'
3'		146.4 s	146.5	
4'		148.8 s	149.4	
5'	6.76 d (8.2)		116.4	1', 3', 4'w
6'	6.88 dd (8.2, 2.2)	122.6 d	123.1	2', 4'
7'	7.55 d (15.8)		147.2	2', 6', 9'
8'	6.28 d (16.0)		115.1	1', 9'
9'		168.6 s	169.1	
1''	4.32 d (7.9)	103.8 d	104.2	8
2''	3.30 dd (9.0, 7.9)		75.3	1'', 3''
3''	3.52 t (9.0)	83.3 d	84.2	1''', 5''
4''	3.40 m ^c	70.0 d	70.0	3'', 5''w
5''	3.53 m ^c	75.3 d	75.5	4''
6''	A 4.48 dd (12.0, 1.9) B 4.36 dd(12.0, 7.3)		64.7	9'
1'''	5.17 d (1.6)	102.2 d	102.6	3'', 3''', 5'''
2'''	3.94 m ^c		72.3	4'''w
3'''	3.70 m ^c	71.8 d	72.3	4'''w
4'''	3.39 m ^c	73.5 d	74.0	3''', 5'''w, 6'''
5'''	4.00 m ^c	69.4 d	70.4	
6'''	1.24 d (6.3)	17.8 q	17.9	4''', 5''', <u>6'''</u>

^a aus dem HMBC-Spektrum entnommen

^b H nach C

^c verdeckt durch Signalüberlappung

¹ $J_{\text{C-H}}$ unterstrichen

w = schwach

(*) Literaturvergleich mit Toshio et al. 1982, gemessen in CD_3OD

Ergebnis der Quantifizierung:

Acteosid und Isoacteosid wurden in den Blättern von *Guazuma ulmifolia* aus dem Gewächshaus mit Hilfe von Rosmarinsäure als internem Standard quantifiziert. Zunächst wurde wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.8.2.1. beschrieben der substanzspezifische Korrekturfaktor (skf) für Rosmarinsäure und Acteosid ermittelt, der in diesem Fall 0.212 betrug. Zur Berechnung des Acteosid- bzw. Isoacteosidgehaltes wurde dem Methanolextrakt der Blätter von *Guazuma ulmifolia* eine definierte Menge Rosmarinsäure zugesetzt. Anschliessend wurde die Mischung geeignet verdünnt und per HPLC analysiert. Dann wurden mit Hilfe der Peakflächen von Acteosid bzw. Isoacteosid, der Peakfläche von Rosmarinsäure und der eingewogenen Menge an Rosmarinsäure mittels Dreisatz und anschliessender Division durch den skf (0.212) der Gehalt an Acteosid bzw. Isoacteosid, jeweils bezogen auf das Trockengewicht, berechnet.

Dabei ergab sich für Acteosid ein Gehalt in der Droge von insgesamt 0.18 (\pm 0.06)%. Im Ethylacetatextrakt war kein Acteosid zu finden, und im Methanolextrakt waren 2.87 (\pm 0.14)% Acteosid enthalten.

Die Quantifizierung von Isoacteosid ergab einen Gesamtgehalt in der Droge von 0.07 (\pm 0.01)% während im Methanolextrakt 1.13 (\pm 0.22)% enthalten waren. Isoacteosid war ebenso wie Acteosid im Ethylacetatextrakt nicht vorhanden.

Vergleich der Methanolextrakte von indonesischer Droge und Gewächshausdroge:

Vergleicht man das HPLC-Chromatogramm des Methanolextraktes der Blattdroge aus Indonesien mit dem des Methanolextraktes der Blattdroge aus dem Gewächshaus, so fällt auf, dass die Gewächshauspflanze keine Flavonoide, sondern nur Acteosid und Isoacteosid enthält. Die letzteren sind dafür nicht in der indonesischen Blattdroge enthalten (**Abb. E6**).

Um festzustellen, ob auch die in Deutschland angezogene Pflanze mit UV-Strahlung zur Bildung von Flavonoiden angeregt werden kann, wurde die Pflanze für vier Wochen ins Freiland an einen Ort mit intensiver Sonneneinstrahlung transferiert.

Nach zwei bzw. vier Wochen wurden jeweils einige Blätter von der Pflanze geerntet, sofort gefriergetrocknet und anschliessend wie in ‚Material und Methoden‘ beschrieben sukzessive mit Ethylacetat und Methanol extrahiert. Nach dem Trocknen der Extrakte im Rotationsverdampfer wurden sie in geeigneter Verdünnung mittels HPLC und LC-MS auf Flavonoide hin untersucht. Anhand der UV-Spektren

und der in der HPLC-MS ermittelten Molekülmassen konnten die Peaks den in **Tabelle 6** angegebenen Verbindungen zugeordnet werden.

Unter Sonneneinstrahlung bildete *Guazuma ulmifolia* Glucuronide oder Galacturonide der Flavonoide Apigenin und Luteolin sowie ein Quercetindiglycosid, an das eine Hexose und ein Desoxyzucker gebunden war.

Tab. E6: Molekulargewichte und Gewichte von Fragmentionen der im Freiland gebildeten Inhaltsstoffe

Retentionszeit (min)	Verbindung	Molekülion (g/mol)	abgespaltene Fragmentionen
14.7	Chlorogensäure	730.9 [2M+Na] ⁺ 354.9 [M+H] ⁺	
18.3	Acteosid	647.2 [M+Na] ⁺ 624.8 [M+H] ⁺	501.0, 467.3
20.8	Luteolinglucuronid oder – galacturonid	463.0 [M+H] ⁺ 461.0 [M-H] ⁻	287.2 285.2
21.1	Quercetindiglycosid (mit Hexose und Desoxyzucker)	611.0 [M+H] ⁺ 609.1 [M-H] ⁻	465.0, 303.2 301.0
22.0	Apigeninglucuronid oder - galacturonid	447.0 [M+H] ⁺ 444.9 [M-H] ⁻	271.2 269.1

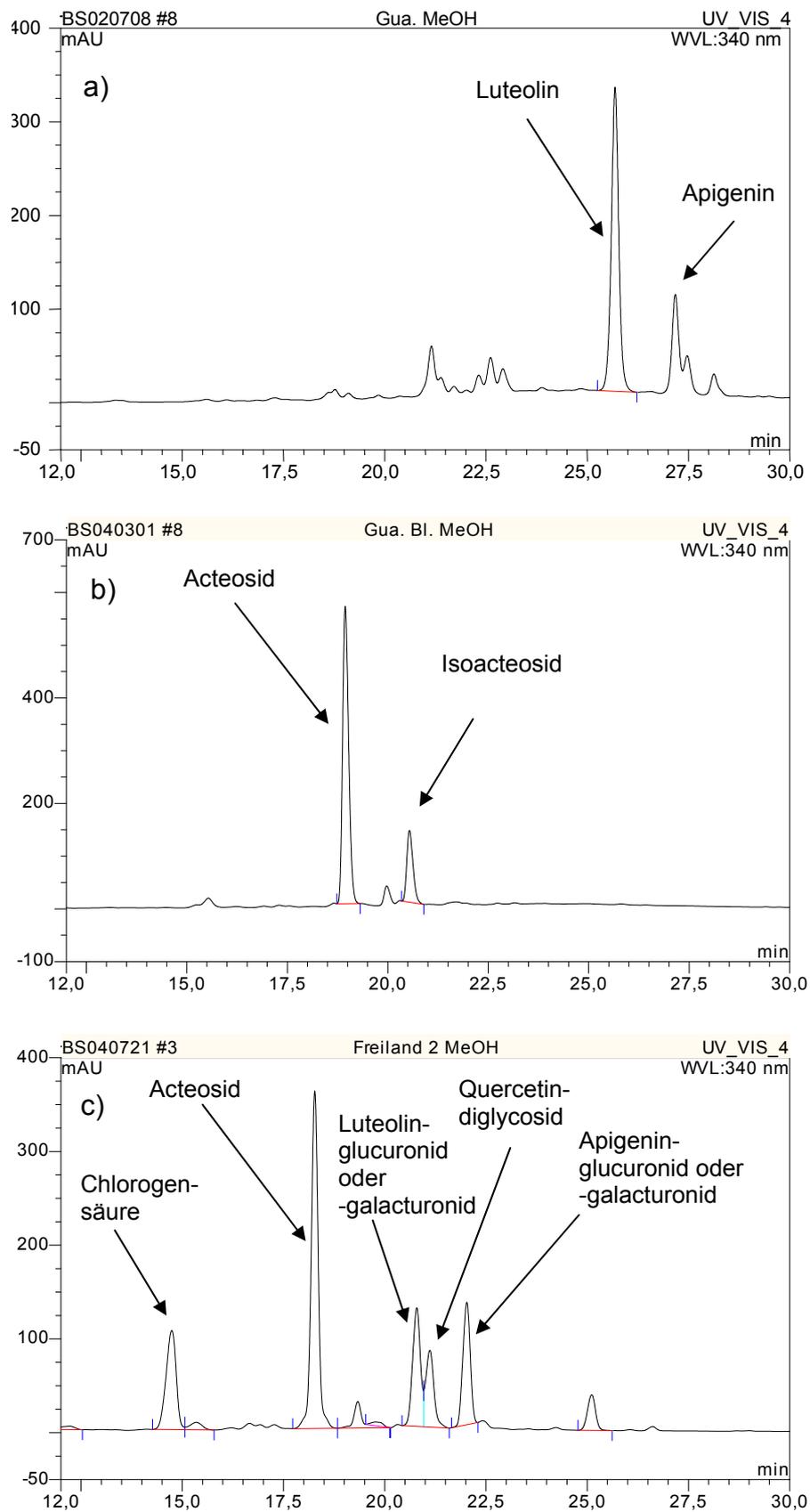


Abb. E6: Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Methanolextrakte der Blätter aus Indonesien (a), aus dem Gewächshaus (b) und aus dem Freiland (c)

Mikroskopischer Vergleich der indonesischen Droge mit der Gewächshausdroge:

Da sich das Inhaltsstoffspektrum der im Gewächshaus angezogenen Pflanze stark von dem der Droge aus Indonesien unterschied, wurden die Blätter der beiden Pflanzen mikroskopisch verglichen, um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um identische Pflanzenspezies handelte. Dazu wurde aus einem frischen Blatt von *Guazuma ulmifolia* (Gewächshaus) ein Blattquerschnitt angefertigt und dieser ebenso wie der eines getrockneten Blatts der Droge aus Indonesien auf je einem Objektträger mit Chloralhydrat über einem Bunsenbrenner kurz aufgeköcht, um Chlorophyll zu entfernen und das Präparat aufzuhellen.

Danach wurden beide Präparate bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet.

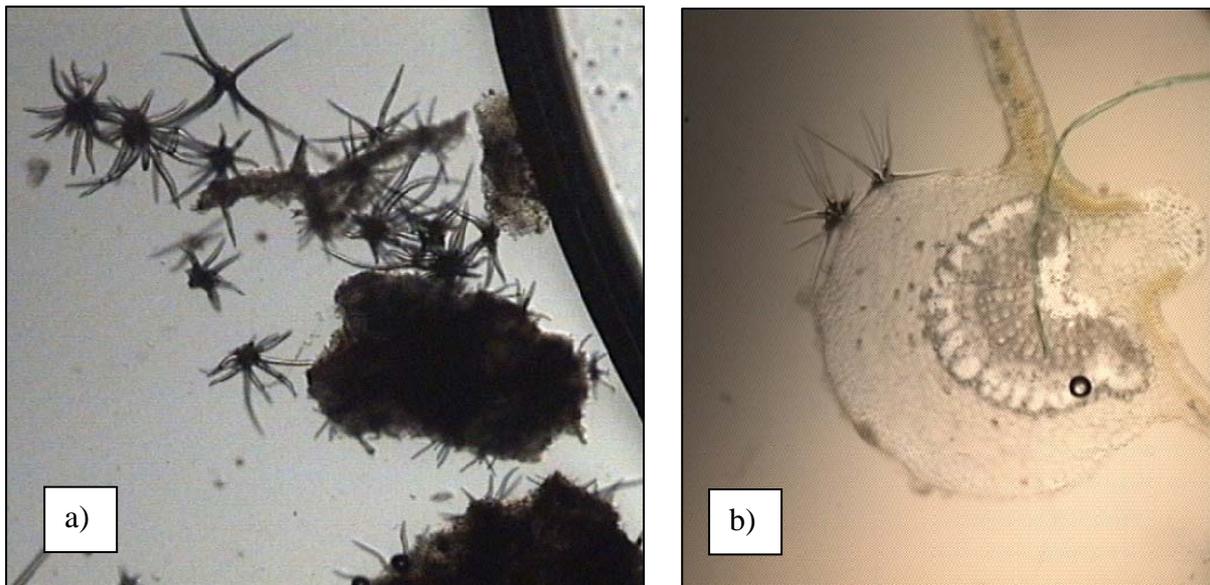


Abb. E7: Mikroskopischer Vergleich der Droge aus Indonesien (a) mit einem Blatt der Gewächshauspflanze (b) (Querschnitt, 100-fache Vergrößerung)

Beide Drogen enthielten Büschelhaare, die unter anderem für *Guazuma ulmifolia* typisch sind. Es handelte sich also bei beiden Pflanzen um *Guazuma ulmifolia*

II.) Rinde

Nach dem Ernten wurde die Rinde der Gewächshauspflanze mit einem scharfen Messer vom Stamm abgetrennt und für einige Tage an der Luft getrocknet. Dann

wurde sie in einer Drogenmühle zerkleinert und wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.1. beschrieben sukzessive mit Ethylacetat und Methanol extrahiert.

Die Abbildung **E8** zeigt die dann folgende weitere Aufarbeitung des Methanolextraktes.

Dieser wurde zunächst einer Flüssig-Flüssig-Verteilung mit *n*-Hexan gegen Methanol:Wasser (9:1) unterzogen. Die wässrige Methanolphase wurde dann im Rotationsverdampfer eingengt, in Wasser gelöst und gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wurde mittels VLC wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.4. beschrieben weiter aufgetrennt.

Die Fraktion, die mit 100% Ethylacetat eluiert worden war, wurde auf eine Sephadex-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 100% Methanol. Eine Trennung der vereinigten Fraktionen 48-52 in der präparativen HPLC lieferte (+)-Abscisinsäure. Eine weitere Trennung der vereinigten Fraktionen 62-80 mit präparativer HPLC lieferte 7-Hydroxy-6-methoxycumarin. In den vereinigten Fraktionen 111-123 trat ein gelber Niederschlag auf, der nach Abzentrifugieren mit Hilfe seines UV-Spektrums, seinem Molekulargewicht und seines ¹H-NMR-Spektrums als (-)-Epicatechin identifiziert werden konnte. Der Überstand wurde mit Hilfe einer RP-Lobarsäule wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.6. beschrieben weiter aufgetrennt.

Die Fraktion, die mit 25% Methanol eluiert worden war, wurde mit Hilfe der präparativen HPLC weiter aufgereinigt und lieferte (-)-Catechin, während aus der Fraktion, die mit 30% Methanol eluiert worden war, mittels präparativer HPLC Procyanidin B2 (oder Procyanidin B5) und weiteres (-)-Epicatechin isoliert und identifiziert werden konnten.

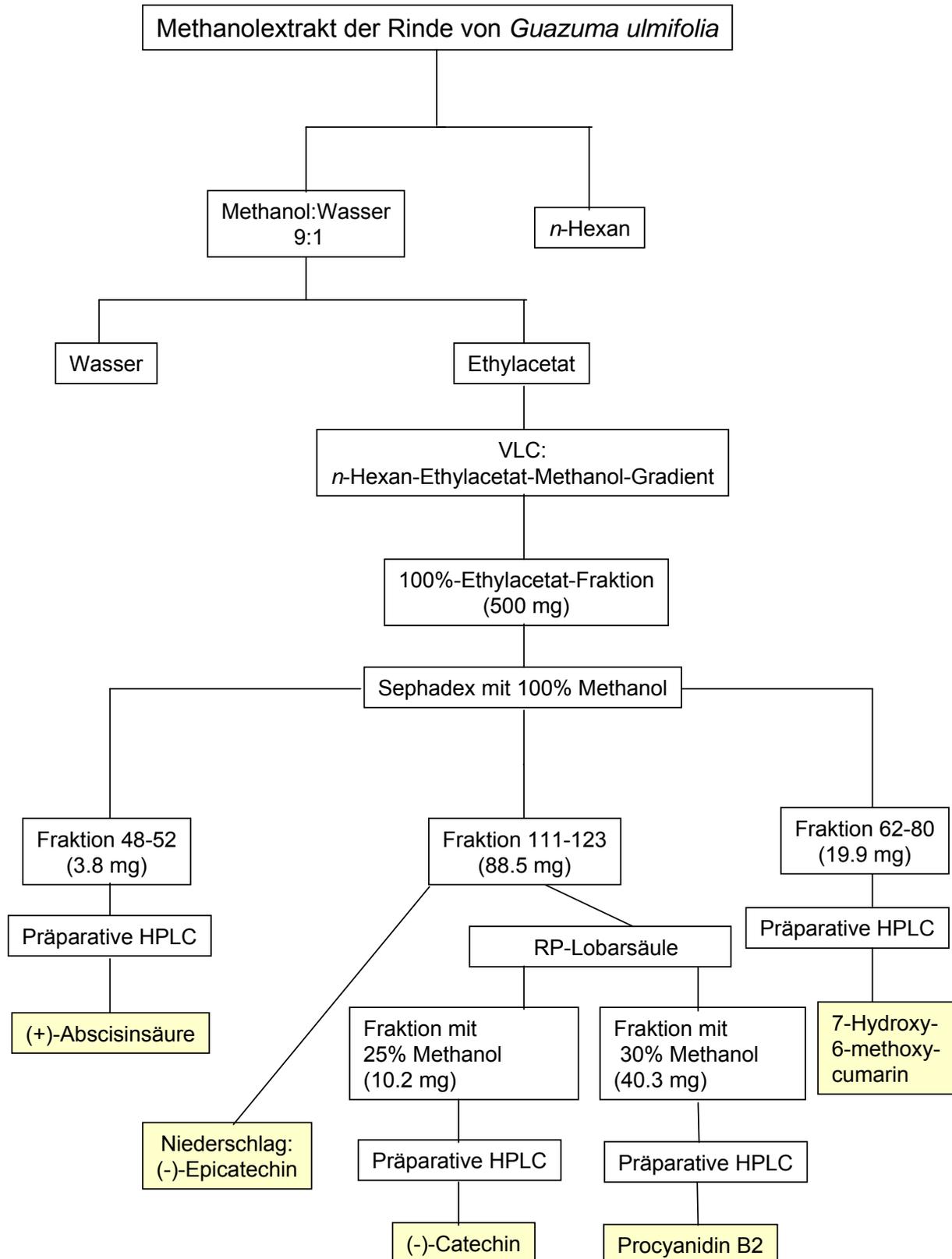


Abb E8: Isolierung verschiedener Inhaltsstoffe aus der Rinde von *Guazuma ulmifolia*

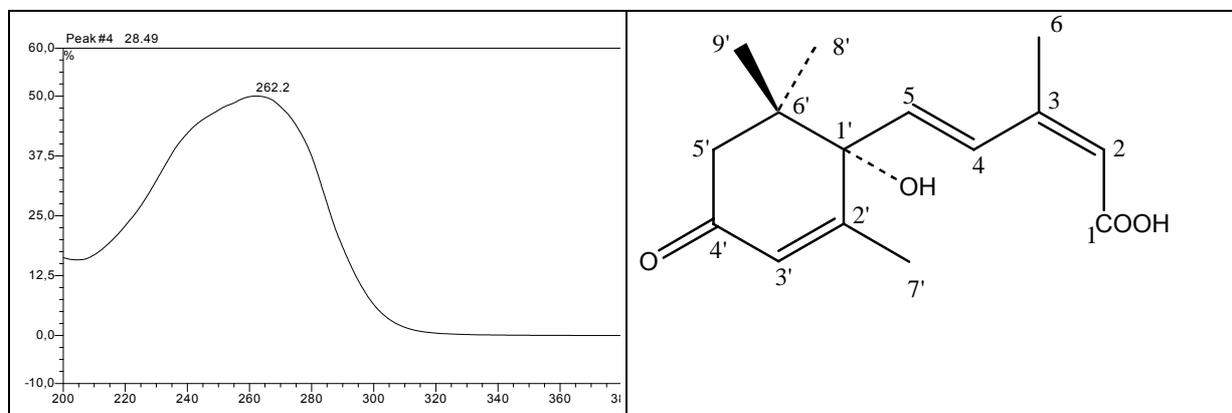
(+)-Abscisinsäure

Im ^1H -Spektrum von (+)-Abscisinsäure erschien Proton H-2 als Singulett bei 5.89 ppm und zeigte im COSY-Spektrum eine Long-Range-Kopplung zu den Protonen der zu H-2 *cis*-ständigen Methylgruppe CH_3 -6. Diese wies ein breites Singulett bei 1.97 ppm auf. Die Verbreiterung dieses Signals liess sich auf die Long-Range-Kopplung zu H-2 zurückführen. Die Protonen in Position 4 (6.09 ppm) und 5 (7.66 ppm), die an der Doppelbindung in *trans*-Position zueinander stehen, zeigten jeweils ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 16.4 Hz. Dabei war das Dublett von H-5 ebenfalls verbreitert. Es war aufgrund des $-\text{I}$ -Effektes der benachbarten OH-Gruppe in Position 1' stärker entschirmt und deshalb dem Signal von H-4 gegenüber tieffeldverschoben. Die Signale der Methylgruppen CH_3 -8' oder CH_3 -9' erschienen bei 1.02 ppm bzw. bei 1.05 ppm jeweils als Singulett mit der Integration 3. Proton H-3' erschien ebenfalls als breites Singulett bei 5.79 ppm. Eine Long-Range-Kopplung zu den Protonen der Methylgruppe CH_3 -7' (1.93, d, Integration 3) fehlte allerdings auch hier im COSY-Spektrum. Die beiden geminalen Protonen $5'_\text{A}$ -H und $5'_\text{B}$ -H erschienen jeweils als Dublett mit der für die geminale Kopplung charakteristischen Kopplungskonstante von 16.7 Hz bei 2.54 bzw. 2.16 ppm. Der Drehwert der Abscisinsäure von $+127^\circ$ stimmte nahezu mit dem in einer im eigenen Arbeitskreis angefertigten Dissertation (Jadulco 2002) angegebenen Drehwert für (+)-Abscisinsäure von $+138.4^\circ$ (c 0.47 in Ethanol) überein, unterschied sich aber deutlich von dem in der Literatur angegebenen Drehwert von $+383^\circ$ (c 0.23 in Ethanol, Assante et al. 1977). Aufgrund des positiven Drehwertes wurde angenommen, dass es sich um (+)-Abscisinsäure handelte. Die Identifikation der Struktur als (+)-Abscisinsäure konnte durch Vergleich mit Literaturdaten (Constantino et al. 1986) bestätigt werden.

(+)-Abscisinsäure

Systematischer Name	(S)-5-(1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-2,4-pentadiensäure
Beschreibung	farblose, ölige Flüssigkeit
Spezifische Drehung	$+127^\circ$ (c 0.1 in Methanol)
Molekulargewicht	264 g/mol

ESI-MS (m/z)	264.8 $[M+H]^+$ (positiv)
Summenformel	$C_{15}H_{20}O_4$
Substanzmenge	0.5 mg
Retentionszeit	22.8 min [#]



Tab E7: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von (+)-Abscisinsäure (aufgenommen in CD_3OD)

(+)-Abscisinsäure		
	δ_{H} (J Hz)	δ_{H} (*Literatur)
2	5.89 s	5.91 bs
3'	5.79 bs	5.74 bs
4	6.09 d (16.4)	6.11 d (16.0)
5	7.66 bd (16.4)	7.73 d (16.0)
5'	A 2.54 d (16.7)	2.41 d (17.0)
	B 2.16 d (16.7)	2.25 d (17.0)
6	1.97 bs	1.99 d (1.5)
7'	1.93 d (1.26)	1.89 d (1.5)
8'	1.02 s	1.00 s
9'	1.05 s	1.07 s

(*): Literaturvergleich mit Constantino et al. 1986, gemessen in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$

Catechin und Epicatechin

Sowohl das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Catechin als auch das von Epicatechin zeigen *meta*-Kopplung der Protonen in den Positionen 6 und 8 im Ring A. Die Signale lagen jeweils bei 5.84 bzw. 5.90 ppm für H-6 und bei 5.91 bzw. 5.93 ppm für H-8. Die Kopplungskonstante betrug 2.5 Hz. Auch das ABC-Spinsystem eines 1,2,4-trisubstituierten Aromaten in Ring B war in beiden Spektren gleichermassen zu finden. Dabei zeigte das Proton in Position 2', dessen Signal bei 6.83 bzw. 6.96 ppm lag, eine *meta*-Kopplung zu H-6' (6.71 bzw. 6.79 ppm) mit einer Kopplungskonstante

von 1.9 Hz, während H-6' diese Kopplung ebenfalls zeigte. Darüberhinaus war für H-6' noch eine *ortho*-Kopplung zu H-5' mit der Kopplungskonstante 8.2 Hz zu erkennen, weshalb dieses Signal als Dublett vom Dublett erschien. H-5' trat als Dublett mit 8.2 Hz bei jeweils 6.75 ppm auf.

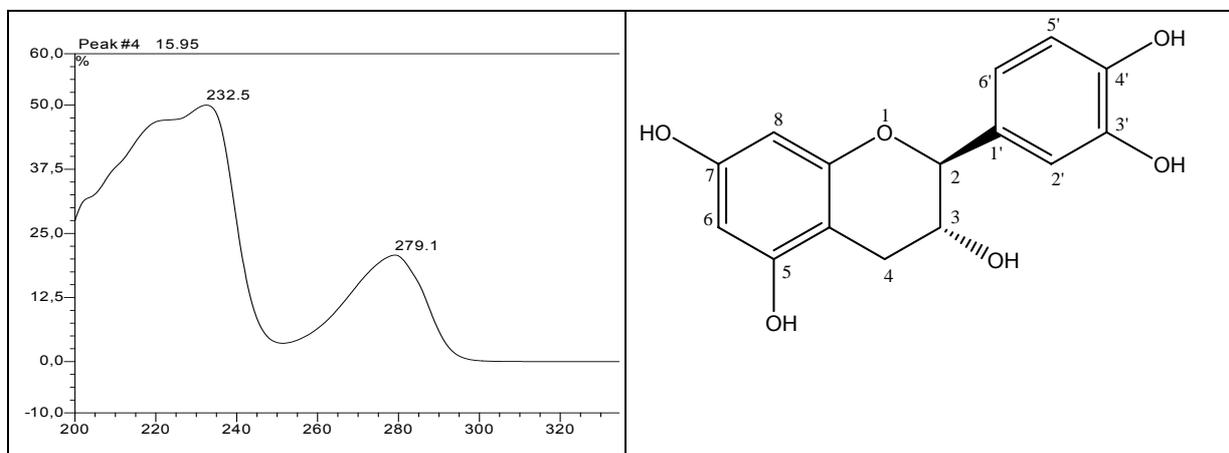
Bei Catechin lag das Proton in Position 2 bei 4.55 ppm und zeigte eine Kopplung mit 7.6 Hz zu H-3. Dieses lag bei 3.96 ppm als Dublett vom Dublett vom Dublett vor. Es koppelte ebenfalls mit 7.6 Hz mit H-2 und mit 8.2 Hz mit Proton H-4_B, welches bei 2.49 ppm lag. Bei diesen beiden Kopplungen musste es sich aufgrund der Grösse der Kopplungskonstanten jeweils um äquatorial-äquatoriale Kopplungen handeln, so dass H-3 hier in α -Position und die Protonen H-4_B und H-2 jeweils in β -Position standen. Das Signal von H-4_A erschien bei 2.84 ppm und koppelte mit H-3 ($J = 5.7$ Hz). Die Protonen in den Positionen 4_A und 4_B zeigten zusätzlich noch eine geminale Kopplung von 15.8 Hz.

Das Spektrum von Epicatechin unterschied sich von dem von Catechin in der Kopplungskonstante zwischen H-2 und H-3 sowie zwischen H-3 und H-4_A und H-4_B. H-2 wies hier nur ein Singulett bei 4.81 ppm und H-3 ein breites Multiplett bei 4.17 ppm auf. Diese Signale waren damit zu erklären, dass es sich hier um eine axial-äquatoriale Kopplung handelte, da Epicatechin das 3-Epimer von Catechin ist. H-2 und H-3 standen beide in β -Position. Deshalb war die Kopplungskonstante so klein, dass keine Aufspaltung der Signale zu erkennen war. Das gleiche galt für die Kopplung zwischen H-3 und H-4_A (2.85 ppm, $J = 4.4$ Hz) und H-4_B (2.72 ppm, $J = 2.5$ Hz). Wie auch bei Catechin koppelten die geminalen Protonen H-4_A und H-4_B miteinander, hier allerdings mit einer Kopplungskonstante von 16.4 Hz.

Durch Vergleich der NMR-Daten der beiden isolierten Verbindungen mit den in der Literatur angegebenen Werten wurde die Identifikation der beiden Verbindungen als Catechin bzw. Epicatechin bestätigt. Sowohl der gemessene Drehwert des (-)-Catechins von -17° als auch der des (-)-Epicatechins von -48° in Methanol stimmten jeweils in ihrem Betrag mit den in der Literatur angegebenen Drehwerten von $+17^\circ$ für (+)-Catechin und $+52^\circ$ für (+)-Epicatechin in Ethanol überein (Porter 1988). Aufgrund der Drehwerte handelte es sich bei beiden Verbindungen jeweils um das (-)-Enantiomer. (-)-Epicatechin ist bereits bekannt aus *Guazuma ulmifolia* (Hör et al. 1996).

(-)-Catechin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavan)

Systematischer Name	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1-benzopyran-3,5,7-triol
Beschreibung	bräunlich-gelbes Pulver
Spezifische Drehung	-17° (c 0.2 in Methanol)
Molekulargewicht	290 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	291.0 [M+H] ⁺ (positiv) 289.3 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Substanzmenge	4.2 mg
Retentionszeit	16.0 min [#]

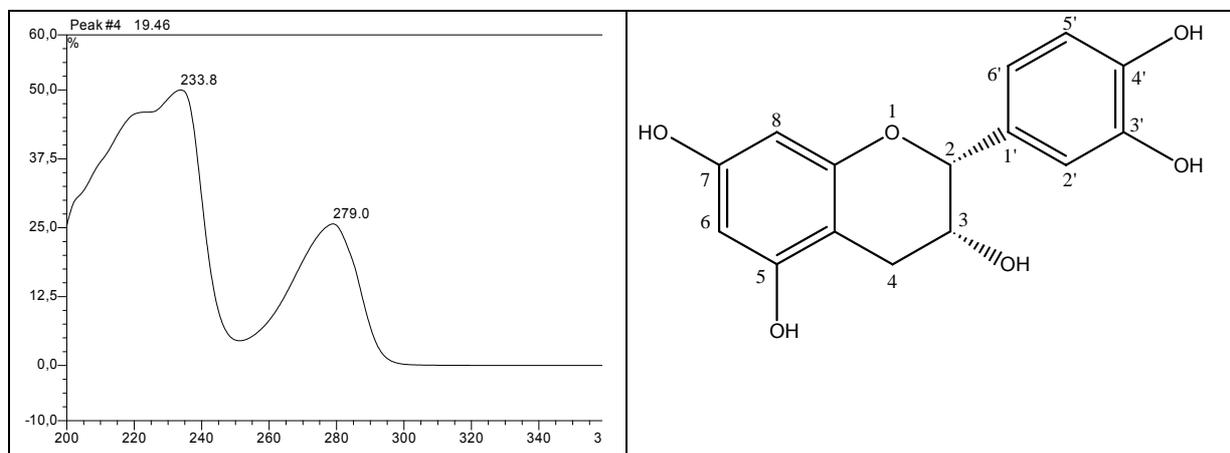
**Tab E8:** ¹H-NMR-Daten von (-)-Catechin (aufgenommen in CD₃OD)

(-)-Catechin		
	δ_H (J Hz)	δ_H (*Literatur)
2	4.55 d (7.6)	4.56 d (7.8)
2'	6.83 d (1.9)	6.90 d (1.9)
3	3.96 ddd (8.2, 7.6, 5.7)	3.99 m (8.4, 7.8, 5.5)
4	A 2.84 dd (15.8, 5.7)	2.91 dd (16.1, 5.5)
	B 2.49 dd (15.8, 8.2)	2.53 dd (16.1, 8.4)
5'	6.75 d (8.2)	6.80 d (8.1)
6	5.84 d (2.5)	6.02 d (2.3)
6'	6.71 dd (8.2, 1.9)	6.76 dd (8.1, 1.9)
8	5.91 d (2.5)	5.88 d (2.3)

(*)Literaturvergleich mit Davis et al. 1996, gemessen in Aceton-d₆

(-)-Epicatechin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavan)

Systematischer Name	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1-benzopyran-3,5,7-triol
Beschreibung	gelbes Pulver
Spezifische Drehung	-48.0° (c 0.3 in Methanol)
Molekulargewicht	290 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	291.0 [M+H] ⁺ (positiv) 289.3 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Substanzmenge	32.5 mg
Retentionszeit	19.5 min [#]

**Tab E9:** ¹H-NMR-Daten von (-)-Epicatechin (aufgenommen in CD₃OD)

(-)-Epicatechin		
	δ_{H} (J Hz)	δ_{H} (*Literatur)
2	4.81 s	4.88 d (1.6)
2'	6.96 d (1.9)	7.05 d (2.0)
3	4.17 bm	4.21 m (4.6, 3.2, 1.6)
4	A 2.85 dd (16.4, 4.4)	2.87 dd (16.5, 4.6)
	B 2.72 dd (16.4, 2.5)	2.74 dd (16.5, 3.2)
5'	6.75 d (8.2)	6.79 d (8.1)
6	5.90 d (2.5)	6.02 d (2.3)
6'	6.79 dd (8.2, 1.9)	6.84 dd (8.1, 2.0)
8	5.93 d (1.9)	5.92 d (2.3)

(*) Literaturvergleich mit Davis et al. 1996, gemessen in Aceton-*d*₆

Procyanidin B2 (oder Procyanidin B5)

Das UV-Spektrum dieser Verbindung war denen von Catechin und Epicatechin sehr ähnlich mit einem Absorptionsmaximum bei 279 nm und einer Schulter bei 221 nm, und per LC-MS wurde ein Molekulargewicht von 578 ermittelt. Dieses entsprach dem Zweifachen der Monomere (MW=290) minus zwei Protonen. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der Substanz um ein dimeres Catechin-Derivat handeln könnte (bestehend entweder aus 2 x Catechin, 2 x Epicatechin oder je 1 x Catechin und Epicatechin), bei dem die beiden Flavanole über eine C-C-Bindung miteinander verknüpft sind.

Zunächst wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in $\text{DMSO-}d_6$ aufgenommen, das allerdings sehr breite Signale zeigte, bei denen es kaum möglich war, die Kopplungskonstanten zu bestimmen. Die Verbreiterung der Signale war damit zu erklären, dass bei dieser Verbindung die Rotation um die Interflavan-Bindung eingeschränkt war und somit mehrere energetisch begünstigte Konformationen, sogenannte Rotamere, auftraten, die dazu führten, dass für jedes Proton im NMR-Spektrum mehrere Resonanzen mit ähnlichen chemischen Verschiebungen auftraten. Unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen dieser Resonanzen stärker voneinander, kann es auch zu einem Auftreten mehrerer getrennter Signale kommen. Anhand der Literaturdaten wurde dieses vor allem für Dimere beschrieben, die eine (+)-Catechin-Einheit als „obere“ Einheit haben (De Bruyne et al. 1996). Bei diesen Verbindungen treten zwei energetisch begünstigte Konformationen auf, die zu zwei Signalen für die Protonen in räumlicher Nähe zur Interflavanbindung führen. Ist der Energieunterschied zwischen den verschiedenen Rotameren dagegen geringer, trennen sich die Signale nicht voneinander, und es kommt nur zu einer Verbreiterung. Dies trifft zu für Dimere mit einer (-)-Epicatechin-Einheit als „obere“ Einheit (De Bruyne et al. 1996).

Grundsätzlich kann man dieses Phänomen näher untersuchen, indem man bei unterschiedlichen Temperaturen NMR-Spektren aufnimmt. Im Falle der Procyanidine werden bei Temperaturen über 100 °C die besagten Energiebarrieren überwunden, so dass dann eine freie Rotation um die Interflavan-Bindung möglich wird und es nicht mehr zum Auftreten mehrerer Konformere kommt.

Deshalb wurden bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig von Herrn Dr. Victor Wray jeweils bei 27 °C, 61 °C, 81 °C und 100 °C ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gemessen. Mit zunehmender Temperatur wurden viele

Signale deutlicher, das heisst, die Aufspaltungen waren jetzt zu erkennen, und die Kopplungskonstanten konnten ermittelt werden. Manche Signale, die bei Raumtemperatur gar nicht zu sehen gewesen waren, da sie vorher mit anderen Signalen überlappt hatten, wurden erst bei den höheren Temperaturen sichtbar (**Abb. E9**).

Das ^1H -NMR-Spektrum dieser Verbindung hatte Gemeinsamkeiten mit den Spektren der monomeren Catechine. So waren zum Beispiel die beiden ABC-Spinsysteme eines 1,2,4-trisubstituierten Aromaten zu erkennen, woraus geschlossen wurde, dass die Verknüpfung der Monomeren nicht über die B-Ringe erfolgt sein konnte.

Die jeweils kleinen Kopplungskonstanten zwischen H-2 und H-3 sowie zwischen H-3 und H-4 sowohl bei der oberen als auch bei der unteren Flavanol-Einheit liessen den Schluss zu, dass es sich bei beiden Einheiten jeweils um Epicatechin handelte (siehe auch Abschnitt ‚Catechin und Epicatechin‘). Dabei könnten diese beiden Einheiten entweder aus zwei (-)-, aus zwei (+)- oder aus jeweils einem (+)- und einem (-)-Epicatechin bestehen.

Im folgenden werden gemäss der Konvention bei Catechin-Polymeren die Atome des ersten („oberen“) Flavanols als ‚u‘ (upper unit, obere Einheit) und die des zweiten („unteren“) Flavanols als ‚t‘ (terminal unit, terminale, hier untere Einheit) bezeichnet. Dabei wird das Molekül so betrachtet, dass der Chromon-Sauerstoff jeweils oben ist. Das Spektrum wies ein Spinsystem mit zwei *meta*-koppelnden Protonen auf (zwei Dubletts bei 5.89 und 5.72 ppm, Kopplungskonstante 2.2 Hz), die die Signale H-6 und H-8 eines der beiden A-Ringe darstellten. Für den zweiten A-Ring wurde lediglich jeweils ein Singulett bei 5.81 bzw. 5.79 ppm für beide Rotamere (bei Raumtemperatur zwei breite Singulett, die beim Erhitzen auf 81 °C zu einem scharfen Singulett zusammenfielen) beobachtet. Somit musste Proton H-6 oder H-8 einer der Flavanol-Einheiten an der Verknüpfung der beiden Monomere beteiligt sein. Des weiteren enthielt das Spektrum nur zwei Dubletts vom Dublett, die für die geminalen Protonen in 4-Position von Flavanolen charakteristisch sind, während für die andere Flavanol-Untereinheit lediglich jeweils ein Singulett bei 4.95 bzw. 4.91 ppm für die beiden Rotamere (bei Raumtemperatur zwei breite Singulett, die beim Erhitzen auf 61 °C zu einem breiten und bei 81 °C zu einem scharfen Singulett zusammenfielen) beobachtet wurden. Dies liess vermuten, dass die Monomere über die Position 4u des oberen Flavanols mit der Position 6t oder 8t des unteren

Flavanols miteinander verknüpft waren. Diese Verknüpfungen sind für dimere Flavanole bereits beschrieben (Khan et al. 1997, Hör et al. 1996).

Das oben genannte Dublett vom Dublett lag bei 2.68 ppm, hatte die Kopplungskonstanten 16.4 und 4.4 Hz und wurde Proton H-4_{tA} zugeordnet. Im COSY-Spektrum wurden dann die Signale der Kopplungspartner ermittelt. Dabei erschien eines bei 4.31 ppm als breites Singulett. Aufgrund der Tieffeldverschiebung musste es sich um H-3_t handeln, das geminal zu einer Hydroxygruppe stand. Das Signal von H-4_{tB} wurde ebenfalls mittels COSY identifiziert, war aber vom Lösungsmittelpeak des DMSO bei 2.49 ppm überlagert, so dass hier keine Kopplungskonstanten ermittelt werden konnten. Ein weiterer Kopplungspartner von H-3_t war H-2_t, das bei 4.44 ppm ebenfalls als breites Singulett auftrat. Bei 4.95 und 4.91 ppm fanden sich zwei breite Singuletts, die im COSY-Spektrum eine Korrelation zu H-3_u zeigten. Es handelte sich hier also um H-4_u, wobei die Integration der beiden Singuletts ein Verhältnis von 10:9 ergab, das dem Verhältnis der beiden Rotamere zueinander entsprach.

Eine Suche in einer Substanzdatenbank (Dictionary of Natural Products 2004) nach einem dimeren Epicatechin, das über 4 β →8 oder über 4 β →6-verknüpft ist, führte zu Procyanidin B2 (4 β →8-Verknüpfung) und zu Procyanidin B5 (4 β →6-Verknüpfung). Da H-3_u im HMBC-Spektrum weder eine Korrelation zu C-8_t noch eine zu C-6_t zeigte und aufgrund des Vergleichs mit den in der Literatur angegebenen NMR-Daten keine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Verbindungen getroffen werden konnte (**Tab. E10**), konnte hier nicht abschliessend geklärt werden, ob es sich bei der isolierten Verbindung um Procyanidin B2 oder um Procyanidin B5 handelte. Deshalb sind unten die Strukturformeln beider Verbindungen angegeben.

Die Stereochemie in Position 4_u wurde in Anlehnung an die von Khan et al. durchgeführten Berechnungen der theoretischen Kopplungskonstanten zwischen H-3_u und H-4_u bestimmt. Diese hatten aufgrund der Ergebnisse von Molecular-Modelling-Untersuchungen postuliert, dass die Pyranringe im Procyanidin B2 als Halbsessel-Konformation vorliegen und damit die B-Ringe quasi-äquatorial, das Proton in Position 2 axial und die Protonen in den Positionen 3 und 4 äquatorial stehen müssen (**Abb. E10**). Dies führte bei den Untersuchungen zu sehr kleinen berechneten Kopplungskonstanten zwischen H-2 und H-3 sowie zwischen H-3 und H-4 des C-Rings der oberen Einheit, während beispielsweise eine quasi-axiale

Konformation des C-Rings mit dem Ring B zwischen H-2 und H-3 zu einer Kopplungskonstante von 4.5 Hz führen würde. Die Tatsache, dass bei der isolierten Verbindung die Protonen in den Positionen 2u, 3u und 4u als breite Singulett auftraten, zeigte, dass die Kopplungskonstanten hier ebenfalls sehr klein waren bzw. so klein, dass sie nicht gemessen werden konnten.

Diess liess den Schluss zu, dass die untere Epicatechin-Einheit axial, das heisst in β -Position an C-4 der oberen Einheit gebunden war.

Im folgenden soll die Temperaturabhängigkeit der einzelnen Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beschrieben werden (**Abb. E9**).

Die beiden oben beschriebenen Singulett von H-4u bei 4.95 und 4.91 ppm fielen bei 61 °C zu einem Singulett zusammen, und auch die Signale von H-6t (5.79 und 5.81 ppm) fielen bei 81 °C zu einem Singulett zusammen. Die Signale der Hydroxygruppen in Position 5u (7.00 ppm) und 7u (8.01 ppm) verschwanden bei 61 °C, da die Protonen bei dieser Temperatur gegen Deuterium ausgetauscht wurden. Das Signal von H-5't, das bei Raumtemperatur gar nicht zu sehen gewesen war, wurde hier sichtbar, während H-6'u zunächst verschwand, aber bei höheren Temperaturen wieder auftauchte (siehe unten).

Bei 81 °C erfolgte eine weitere Aufspaltung der Signale von H-6't und H-2't, so dass das Signal von H-6't jetzt als Dublett vom Dublett und das von H-2't als Dublett zu erkennen war.

Im Laufe des weiteren Erhitzens verbesserte sich die Auflösung der Signale nochmals, so dass bei 100 °C H-2'u als Dublett und H-6'u und H-5'u getrennt voneinander zu sehen waren. Jetzt war das Signal H-6'u gegenüber dem von H-5'u leicht tieffeldverschoben, während es bei 27 °C noch leicht hochfeldverschoben war. Die beiden Signale hatten also den Platz im Spektrum getauscht.

Die Signale von H-6u und H-8u wurden dagegen mit zunehmender Temperatur undeutlicher, und es traten zusätzlich zwei breite Singulett auf, die auf das Auftreten eines zweiten stabilen Konformers schliessen liessen.

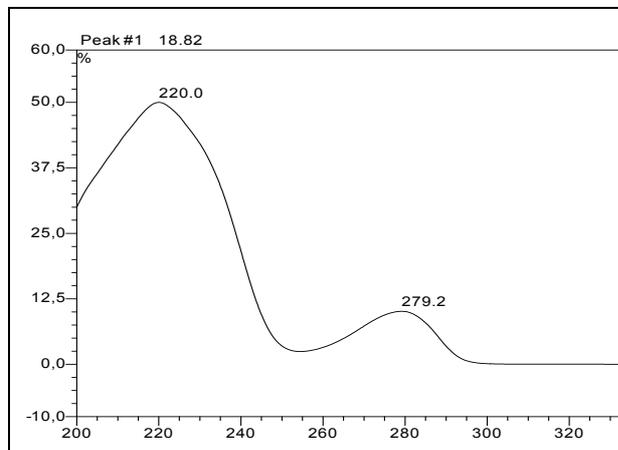
Leider führte die Messung bei erhöhten Temperaturen zu einer Zersetzung der Verbindung. Daher konnte kein Drehwert mehr gemessen werden, und die Verbindung stand auch nicht mehr für die Biotests zur Verfügung.

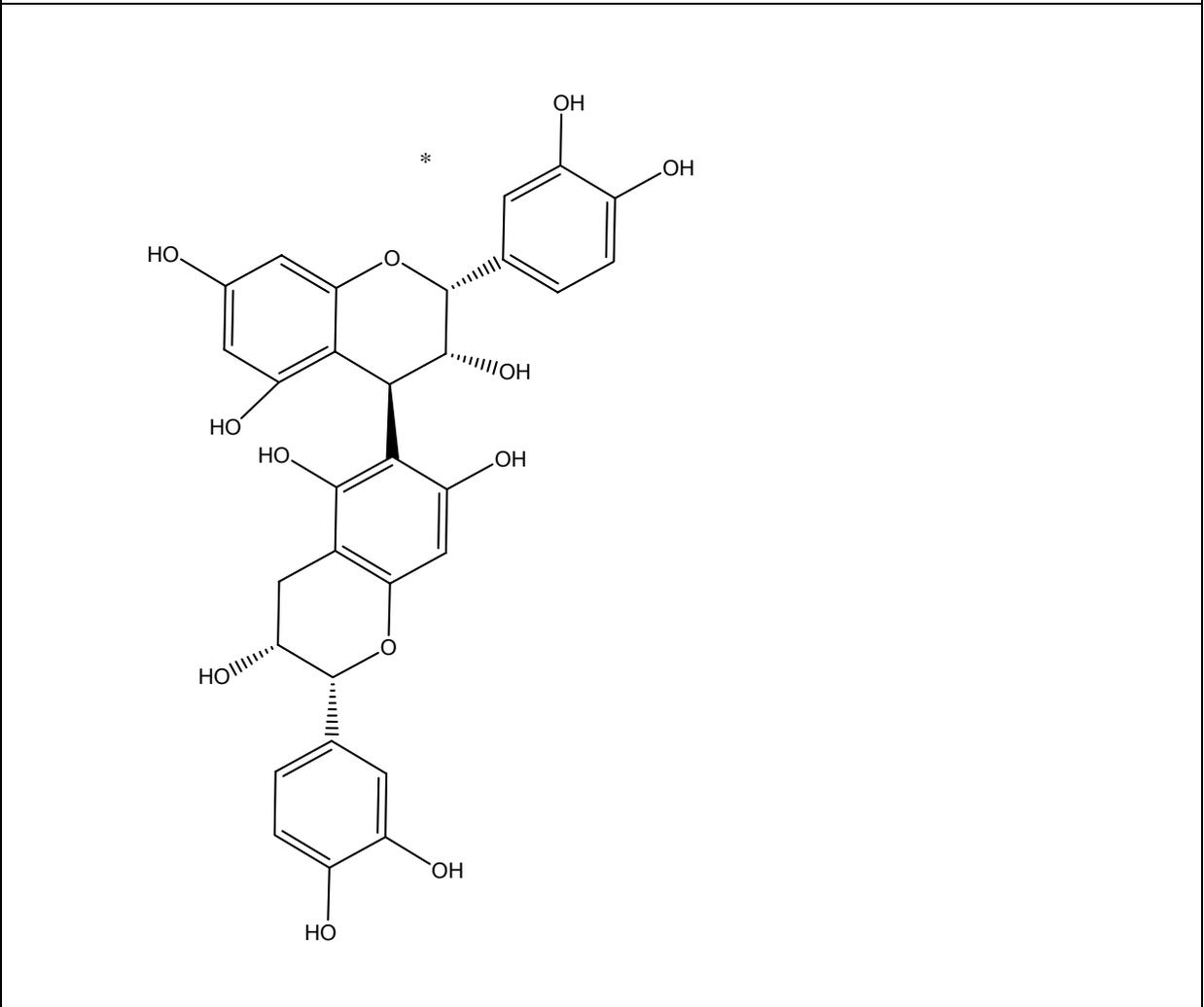
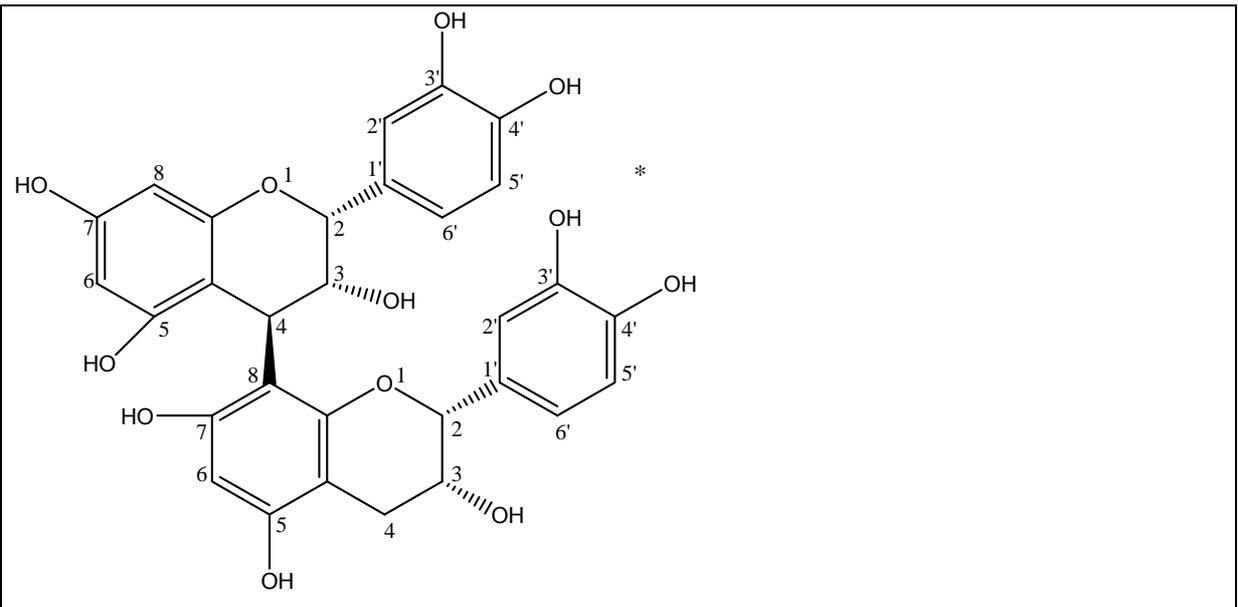
Da kein Drehwert gemessen werden konnte, konnte nicht geklärt werden, ob die Verbindung aus zwei (-), aus zwei (+)- oder aus je einer (-)- und einer (+)-Epicatechineinheit bestand. Es wurde angenommen, dass es sich um 2 (-)-

Epicatcheineinheiten handelte, da zuvor aus der gleichen Droge nur reines (-)-Epicatechin als Monomer isoliert worden war. Deshalb sind die unten angegebenen Strukturformeln nicht absolut zu verstehen, sondern beschreiben jeweils nur die wahrscheinlichste der 4 möglichen stereochemischen Varianten.

Procyanidin B2 oder Procyanidin B5

Systematischer Name	(-)-Epicatechin (4 β →6) (-)-epicatechin oder (-)-Epicatechin (4 β →8) (-)-epicatechin
Beschreibung	hellbraunes Pulver
Spezifische Drehung	keine Messung möglich
Molekulargewicht	578 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	579.9 [M+H] ⁺ (positiv) 577.3 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
Substanzmenge	2.3 mg
Retentionszeit	18.8 min [#]





* relative Stereochemie

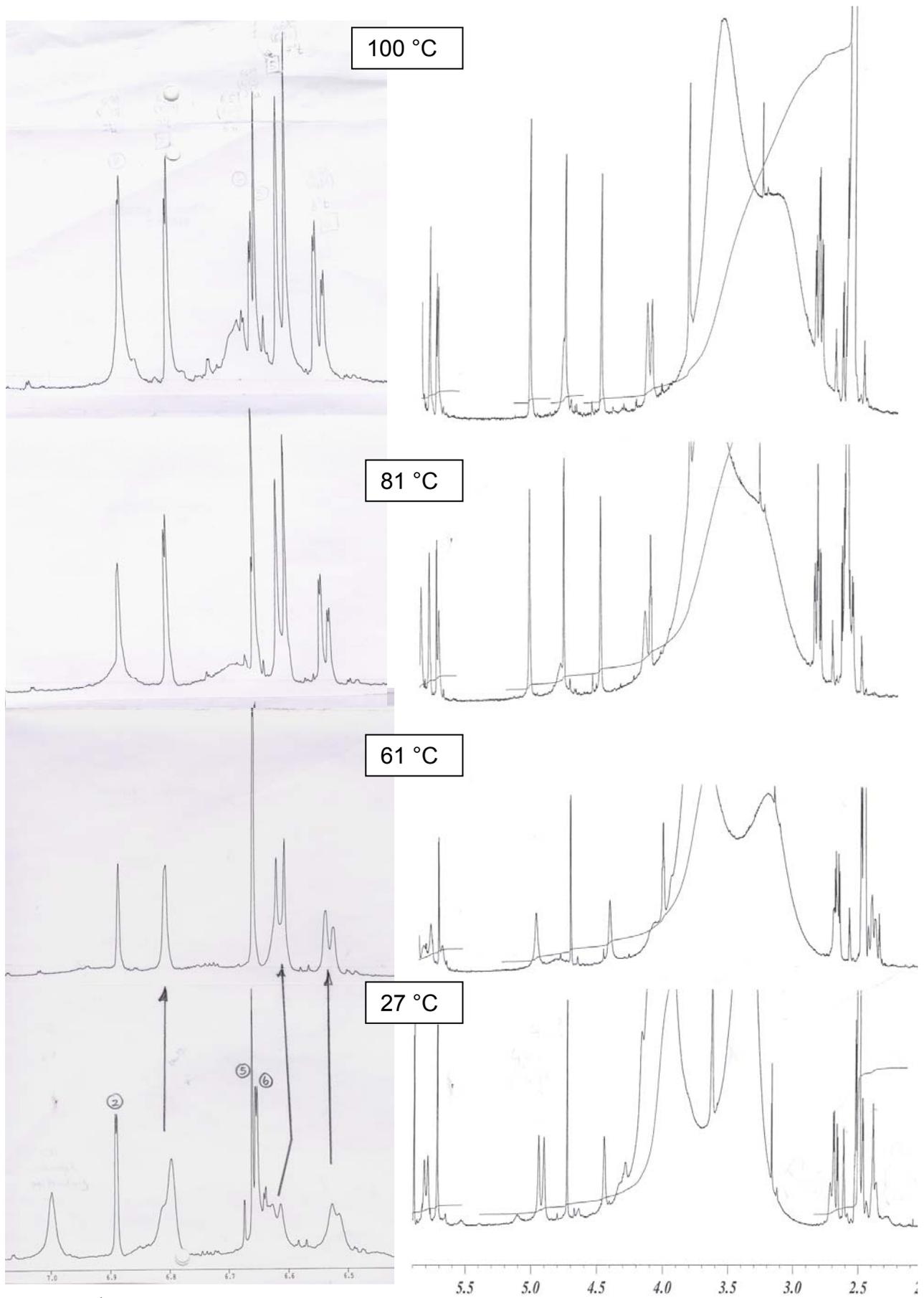


Abb E9: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Procyanidin B2 (oder Procyanidin B5) bei verschiedenen Temperaturen

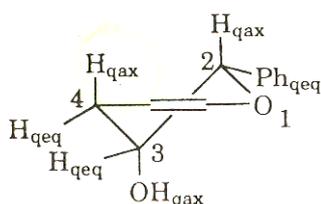


Abb. E10: Bevorzugte Konformation des Pyranrings von Catechinderivaten nach Khan et al. 1997

Tab. E10: ^1H - und HMBC-Daten von Procyanidin B2 (oder Procyanidin B5) (aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$)

Procyanidin B2 oder Procyanidin B5						
	δ_{H} (J Hz)	δ_{H} (J Hz) (* 1 Literatur) Procyanidin B2	δ_{H} (J Hz) (* 2 Literatur) Procyanidin B5	δ_{C} ^a	HMBC ^b	ROESY
2 u	4.74 bs	5.11 bs	4.98 bs			3u
2'u	6.89 d (1.3)	6.99 m	6.98 d (1.8)		4'u	2u, 3u
3u	4.17 bs	4.02 bs	4.08 bs			2u
3'u						
4u	4.95 und 4.91 jeweils bs	4.74 bs	4.66 d (1.8)			
4au				98.5		
4'u				144.2		
5u	7.00 bs					
5'u	6.67 d (8.2)	6.73 m	6.76 d (8.3)			
6u	5.89 d (2.5)	6.01 bs	6.10 d (2.6)		8u, 4au	
6'u	6.66 dd (ca 8, 1.9) teilweise überlappend	6.99 m	6.73 dd (8.3, 1.8)		4'u	2u, 3u
7u	8.01 bs					
8u	5.72 d (1.9)	6.00 bs	6.08 d (2.6)	94.1	4au	
1't				130.1		
2t	4.44 bs	4.97 bs	4.84 bs		2't, 1't	3t
2't	6.81 m	6.99 m	7.06 d (1.8)	115.0		
3t	4.31 bs	4.31 bs	4.17 bs			4t _A , 4t _B
4t A		2.91 dd (16.7, 4.7)	2.80 dd (16.5, 4.2)			
B	2.68 dd (16.4, 4.4) teilweise überlappend	2.74 dd (16.6, 3.8)	2.66 dd (16.5, 2.1)			
5't	6.63 d (8.8)	6.71 m	6.78 d (8.3)			
6t	5.81 und 5.79 bs	5.97 bs				
6't	6.52 m	6.99 m	6.85 dd (8.3, 1.8)			
8t			6.05 s			

^a aus dem HMBC-Spektrum entnommen

^b H nach C

(*¹) Literaturvergleich mit Khan et al. 1997, gemessen in Aceton-*d*₆

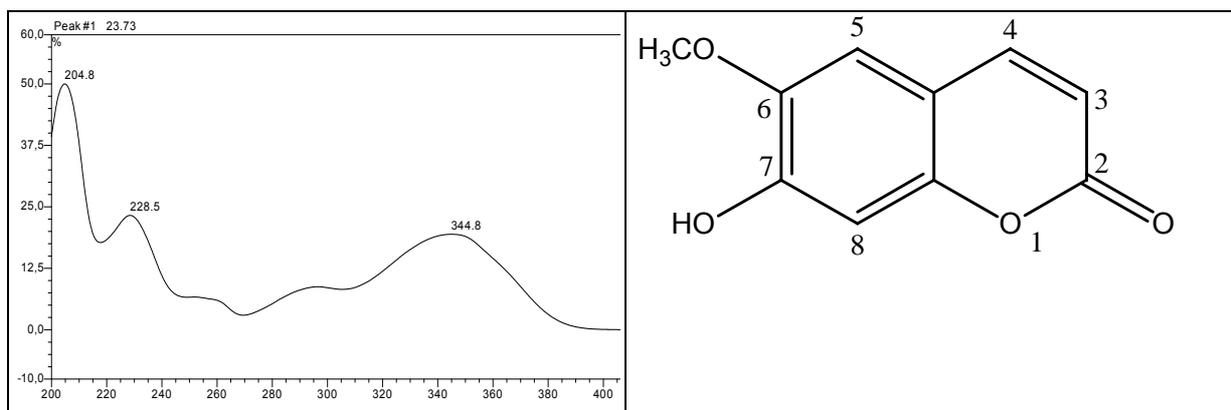
(*²) Literaturvergleich mit Hör et al. 1996, gemessen in Aceton-*d*₆

Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycumarin)

Bei dieser Verbindung gab das UV-Spektrum den Hinweis auf die Substanzklasse der Cumarine. Das Molekulargewicht von 192 deutete auf eine kleinere Verbindung hin. Im ¹H-NMR-Spektrum fielen zunächst zwei miteinander koppelnde Protonen mit einer Kopplungskonstante von 9.5 Hz auf, die charakteristisch für Protonen in den Positionen 3 und 4 im B-Ring von Cumarinen ist. Das Signal bei 7.87 ppm wurde H-4 im B-Ring und das bei 6.14 ppm H-3 zugeordnet, da in einem α,β -ungesättigten Keton das Proton in β -Position aufgrund des $-M$ -Effektes der Carbonylgruppe stärker entschirmt und damit gegenüber dem Proton in α -Position tieffeldverschoben ist. Das Signal der Methoxygruppe in Position 6 erschien bei 3.77 ppm (3H), während H-5 und H-8 des A-Rings jeweils als Singulett bei 7.15 bzw. 6.69 ppm auftraten. Im ROESY-Spektrum wurden nOe-Effekte zwischen H-3 und H-4, zwischen H-4 und H-5 sowie zwischen H-5 und der Methoxygruppe beobachtet. Letztere zeigte wiederum einen nOe-Effekt mit dem Proton der Hydroxygruppe. Daraus ergab sich, dass die genannten Protonen nebeneinander angeordnet waren und sich somit die Methoxygruppe in Position 6 und die Hydroxygruppe in Position 7 befinden musste. Durch Vergleich der ¹H-NMR-Daten mit den entsprechenden Literaturdaten (Pouchert und Behnke 1993, gemessen in CDCl₃ + DMSO-*d*₆) konnte die Identifizierung der Verbindung als Scopoletin bestätigt werden.

Scopoletin

Systematischer Name	7-Hydroxy-6-Methoxy-2H-1-benzopyran-2-on
Beschreibung	gelb-grünes Pulver
Molekulargewicht	192 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	193.2 [M+H] ⁺ (positiv)
Summenformel	C ₁₀ H ₈ O ₄
Substanzmenge	0.6 mg
Retentionszeit	23.8 min [#]

**Tab E11:** ¹H-NMR-Daten von Scopoletin (aufgenommen in DMSO-*d*₆)

Scopoletin		
	δ _H (J Hz)	ROESY
3	6.14 d (9.5)	4
4	7.87 d (9.5)	3, 5
5	7.15 s	4, 6-OCH ₃
6-OCH ₃	3.77 s	5, 7-OH
7-OH	6.91 bs	6-OCH ₃
8	6.69 s	

Ergebnis der Quantifizierung:

(-)-Catechin und (-)-Epicatechin wurden in der Rinde von *Guazuma ulmifolia* nach der Methode des externen Standards quantifiziert. Dabei wurde die Eichgerade mit (±)-Catechin erstellt.

Für (-)-Catechin ergab sich ein Gehalt von 0.22 (± 0.07)%, bezogen auf das Trockengewicht der Droge, und 4.64 (± 0.29)% bezogen auf den getrockneten Methanolextrakt. Der Gehalt des (-)-Epicatechins betrug 0.54 (± 0.19)% in der Droge (bezogen auf das Trockengewicht) und 11.07 (± 1.10)% im Methanolextrakt

(bezogen auf den getrockneten Extrakt). Im Ethylacetatextrakt waren (-)-Catechin und (-)-Epicatechin nicht enthalten.

3.3.2. Inhaltsstoffe aus *Alyxia reinwardtii*, Apocynaceae

300 g der Rinde von *Alyxia reinwardtii* wurden in einer Drogenmühle zerkleinert und wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.1. beschrieben sukzessive mit Ethylacetat und Methanol extrahiert. Der Methanolextrakt wurde einer Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Ethylacetat gegen Wasser unterzogen, und die Ethylacetatphase wurde in Methanol gelöst und erneut gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt. Die Methanolphase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und in einem Methanol-Wasser-Gemisch (50:50) gelöst. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, der Überstand erneut getrocknet und säulenchromatographisch über Kieselgel mit *n*-Hexan:Ethylacetat (30:70) aufgetrennt. Dabei konnten Salicifoliol, 8-Hydroxycumarin, 9 α -Hydroxypinoresinol, Cumarin und Pinoresinol als Reinsubstanzen gewonnen werden. Das HPLC-Chromatogramm einer Fraktion enthielt zwei Peaks, nämlich einen bei 17.8 min, der anhand seiner Retentionszeit, seines UV-Spektrums und seiner Masse als das bereits zuvor isolierte 8-Hydroxycumarin identifiziert werden konnte, und einen bei 18.6 min. Aus dieser Fraktion wurde mittels präparativer HPLC 5-Hydroxycumarin (Peak bei 18.6 min) isoliert.

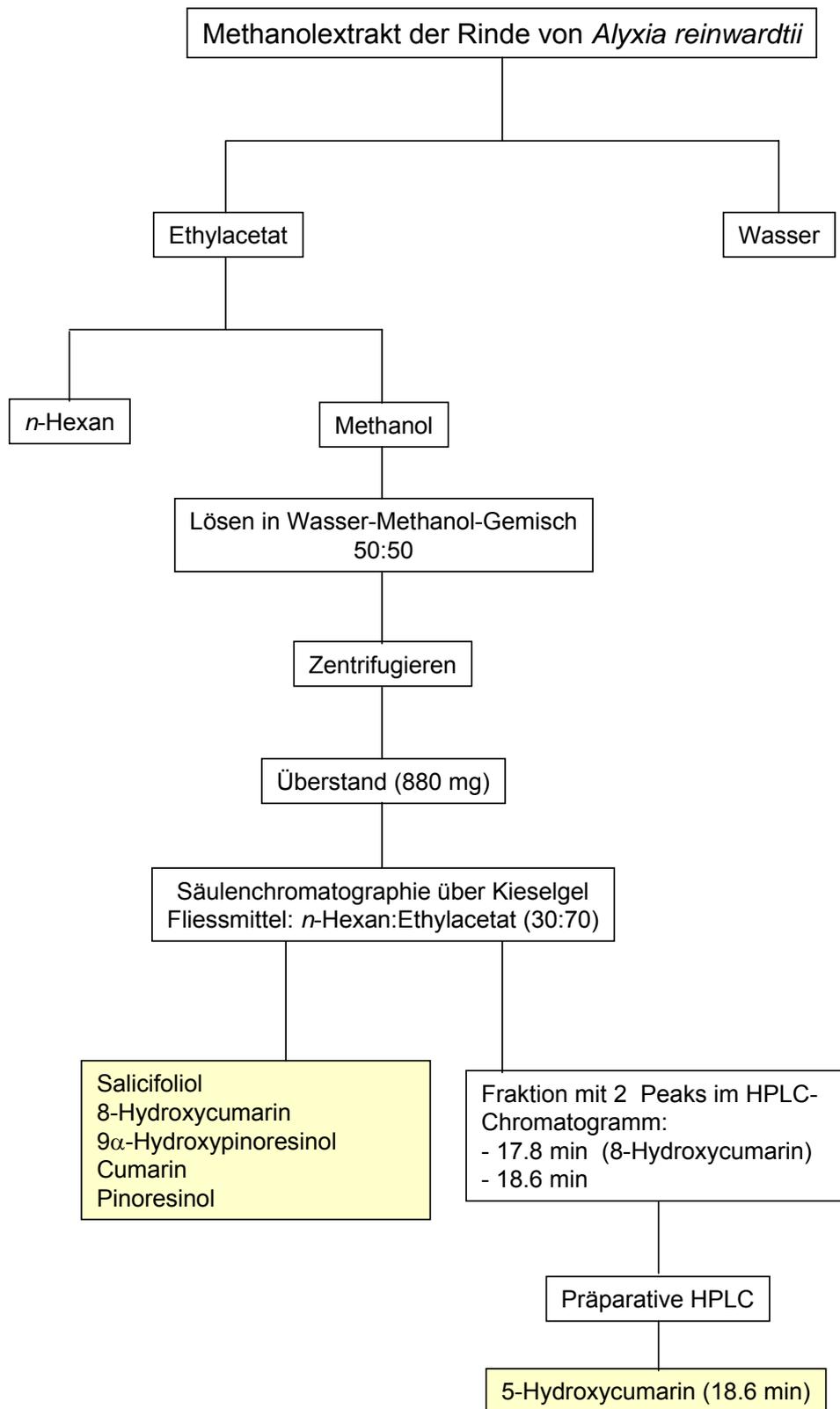


Abb E11: Isolierung von Cumarinen und Lignanen aus der Rinde von *Alyxia reinwardtii*

I.) Cumarine

Die Cumarine fielen zunächst durch ihren charakteristischen Geruch auf und gaben damit einen ersten Hinweis auf die Substanzklasse. Die jeweiligen UV-Spektren und die ermittelten Molekülmassen sowie die daraufhin gemessenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestätigten diese Vermutung.

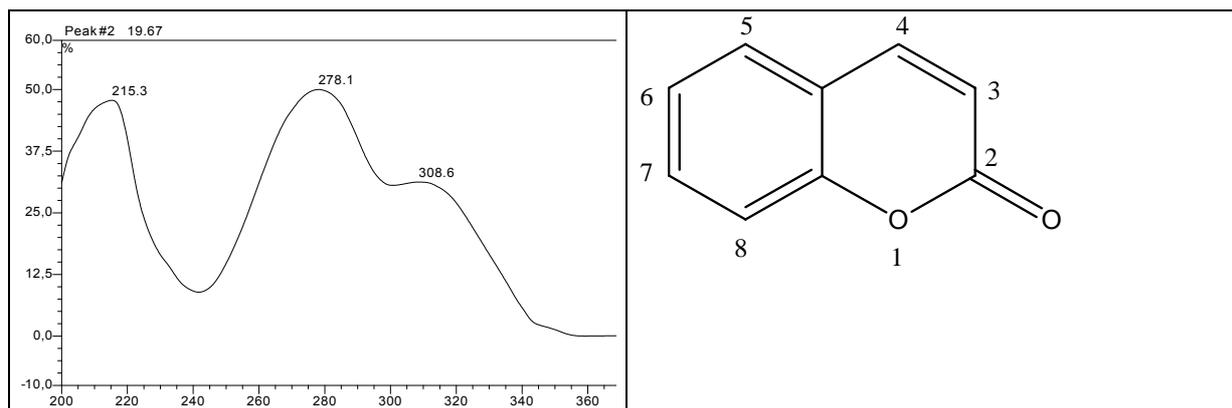
Cumarin

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieser Verbindung zeigte eine für Protonen in den Positionen 3 und 4 im B-Ring von Cumarinen typische Kopplung von 9.8 Hz. Die entsprechenden Dubletts lagen in Methanol bei 6.43 ppm für H-3 und bei 7.95 ppm für H-4. H-8 (7.59 ppm) zeigte eine *ortho*-Kopplung von 7.6 Hz zu H-7 und eine *meta*-Kopplung von 1.09 Hz zu H-6. Bei H-6 und H-7 waren diese Aufspaltungen nicht zu erkennen. Sie fielen in Methanol bei 7.63 ppm als Multiplett zusammen. Das Signal von H-5 dagegen erschien bei 7.34 ppm als Dublett mit einer *ortho*-Kopplung zu H-6 von 8.2 Hz.

Durch Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten mit den entsprechenden Literaturdaten (Pouchert und Behnke, gemessen in CDCl_3) wurde die Identifikation der Verbindung als Cumarin bestätigt. Unsubstituiertes Cumarin wurde bereits aus *Alyxia lucida* isoliert (Sadavongvivad und Supavilai 1977).

Cumarin

Systematischer Name	2H-1-benzopyran-2-on
Beschreibung	weisses Pulver mit charakteristischem Geruch
Molekulargewicht	146 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	147.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (positiv)
Summenformel	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$
Substanzmenge	4.9 mg
Retentionszeit	19.7 min



Tab E12: ¹H-NMR-Daten von Cumarin

Cumarin ^a		b	
	δ_H (J Hz)		δ_H (J Hz)
3	6.43 d (9.8)	3	6.43 d (10.1)
4	7.71 d (9.8)	4	7.95 d (9.5)
5 ^d	7.34 d (8.2)	5 ^e	7.34 d (8.2)
6 ^c	7.28 m	6, 7	7.63 (m, 2H)
7 ^c	7.54 m		
8 ^d	7.49 dd (7.6, 1.6)	8 ^e	7.59 dd (7.6, 1.9)

^a aufgenommen in CDCl₃

^b aufgenommen in CD₃OD

^{c, d bzw. e} können nicht eindeutig zugeordnet werden

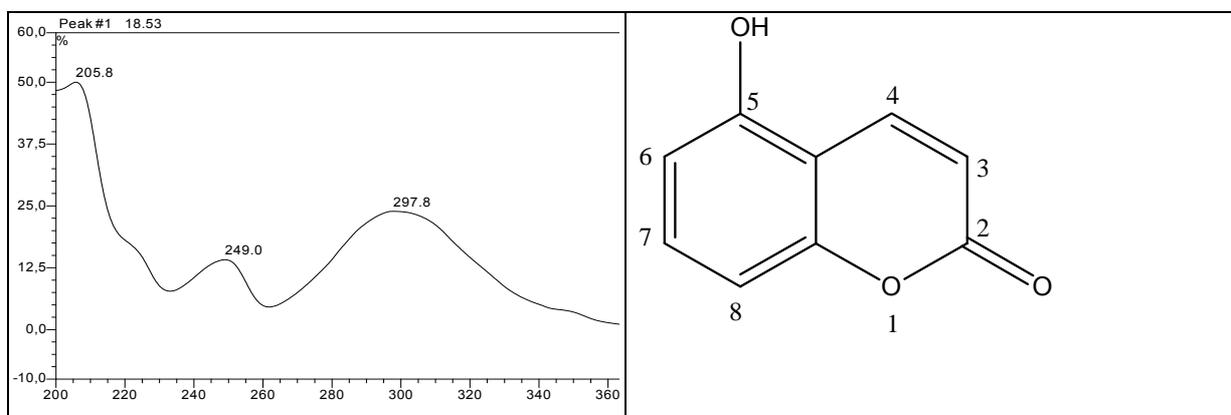
5-Hydroxycumarin

Das ¹H-NMR-Spektrum dieser Verbindung zeigte ebenso wie das des unsubstituierten Cumarins die typische 9.8-Hz-Kopplung zwischen H-3 und H-4 des B-Rings. Das Proton in Position 7 erschien hier als Triplett mit den Kopplungskonstanten 8.4 Hz bei 7.36 ppm, da es sowohl zu H-6 als auch zu H-8 eine *ortho*-Kopplung aufwies. Auch bei den Protonen H-6 und H-8 waren diese *ortho*-Kopplungen mit 8.2 Hz zu sehen. Sie erschienen jeweils als Dublett bei 6.70 bzw. 6.76 ppm. Dabei konnte aber nicht eindeutig festgelegt werden, welches der beiden Signale H-6 und H-8 zuzuordnen war.

Ausserdem konnte an dieser Stelle ebenfalls noch nicht geklärt werden, ob es sich hier um das 5- oder das 8-Hydroxyderivat handelte, da für beide Verbindungen aufgrund der gleichen Spinsysteme ein ähnliches ¹H-NMR-Spektrum zu erwarten war.

5-Hydroxycumarin

Systematischer Name	5-Hydroxy-2 <i>H</i> -1-benzopyran-2-on
Beschreibung	weisses Pulver mit charakteristischem Geruch
Molekulargewicht	162 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	161.8 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₉ H ₆ O ₃
Substanzmenge	0.8 mg
Retentionszeit	18.6 min

**Tab E13:** ¹H-NMR-Daten von 5-Hydroxycumarin (aufgenommen in CD₃OD)

5-Hydroxycumarin		
	δ_H (J Hz)	δ_H (*Literatur)
3	6.29 d (9.5)	6.35 d (10)
4	8.20 d (9.8)	8.18 d (10)
6 ^a	6.70 d (8.2)	6.80 d (9)
7	7.36 t (8.5, 8.2)	7.44 t (9)
8 ^a	6.76 d (8.2)	6.81 d (9)

^a können nicht eindeutig zugeordnet werden

(*) Literaturvergleich mit Sadavongvivad und Supavilai 1977, gemessen in DMSO-*d*₆

8-Hydroxycumarin

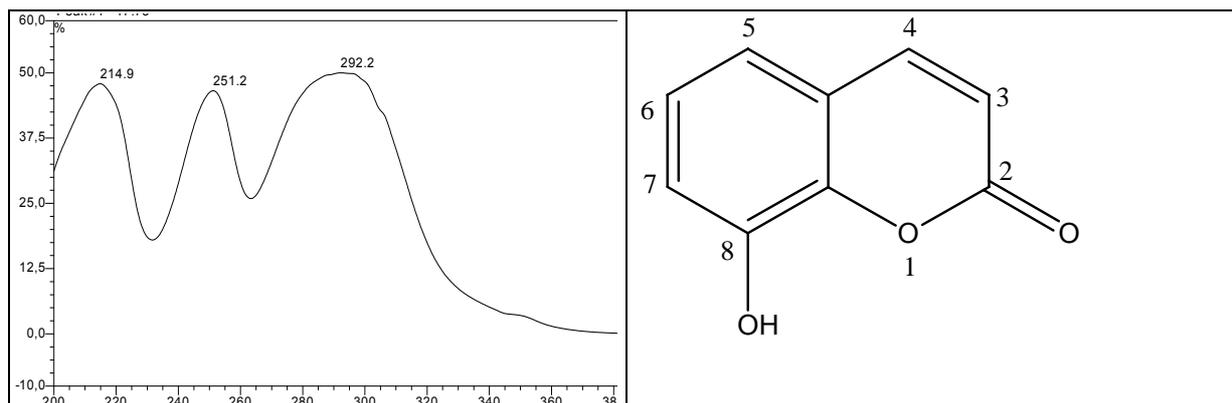
Das ¹H-NMR-Spektrum dieser Verbindung war dem des 5-Hydroxycumarins sehr ähnlich. Auch hier fand sich die besagte 9.5-Hz-Kopplung zwischen H-3 und H-4. Bei 8-Hydroxycumarin erschien H-6 als Triplett bei 7.05 ppm mit jeweils einer *ortho*-

Kopplung von 7.9 Hz zu H-5 und H-7. Letztere fielen bei 7.98 ppm als Multipllett zusammen.

Da zunächst nicht sicher war, ob es sich bei der ersten Verbindung wirklich um das 5-Hydroxy- und bei der zweiten tatsächlich um das 8-Hydroxyderivat handelte, wurde ein HMBC-Spektrum gemessen. Entscheidend war dabei die deutliche Korrelation von H-5 zu Kohlenstoff C-4, die nur vorliegen konnte, wenn die Verbindung in Position 8 substituiert war und in 5-Position ein Proton trug. Hätte es sich bei diesem Proton um H-8 gehandelt, wäre eine HMBC-Korrelation zu Kohlenstoff 4 nicht möglich gewesen. Damit konnte die Verbindung mit diesen Spektraldaten als 8-Hydroxycumarin identifiziert werden. Bei dem oben beschriebenen hydroxylierten Cumarin handelte es sich folglich um das 5-Hydroxyderivat, da das aus dem $^1\text{H-NMR}$ hervorgehende Spinsystem kein anderes Substitutionsmuster zuließ. Durch Vergleich der NMR-Daten mit den Literaturdaten (Sadavongvivad und Supavilai 1977, gemessen in $\text{DMSO-}d_6$) konnten die beiden postulierten Strukturen 5-Hydroxycumarin und 8-Hydroxycumarin jeweils bestätigt werden. Diese beiden Verbindungen wurden schon aus *Alyxia lucida* isoliert (Sadavongvivad und Supavilai 1977).

8-Hydroxycumarin

Systematischer Name	8-Hydroxy-2H-1-benzopyran-2-on
Beschreibung	weisses Pulver mit charakteristischem Geruch
Molekulargewicht	162 g/mol
ESI-MS (m/z)	163.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (positiv) 161.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (negativ)
Summenformel	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$
Substanzmenge	26.8 mg
Retentionszeit	17.8 min



Tab E14: ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Daten von 8-Hydroxycumarin (aufgenommen in CD_3OD)

8-Hydroxycumarin				
	δ_{H} (J Hz)	δ_{H} (*Literatur)	δ_{C} (J Hz)	HMBC ^a
2			162.6 s	
3	6.37 d (9.5)	6.48 d (10)	116.9 d	2, <u>3</u> , 4 _A ,
4	7.87 d (9.5)	8.05 d (10)	146.1 d	2, 5, 8 _A
4 _A			121.2 s	
5,7	7.05 (m, 2H)	7.18 s	119.6 d	4, 5, <u>5</u> , 7, <u>7</u> , 8 _A
			119.7 d	
6	7.12 t (7.9)		125.8 d	
8			146.0 s	
8 _A			143.8 s	

^a H nach C

¹ $J_{\text{C-H}}$ unterstrichen

(*) Literaturvergleich mit Sadavongvivad und Supavilai 1977, gemessen in $\text{DMSO}-d_6$

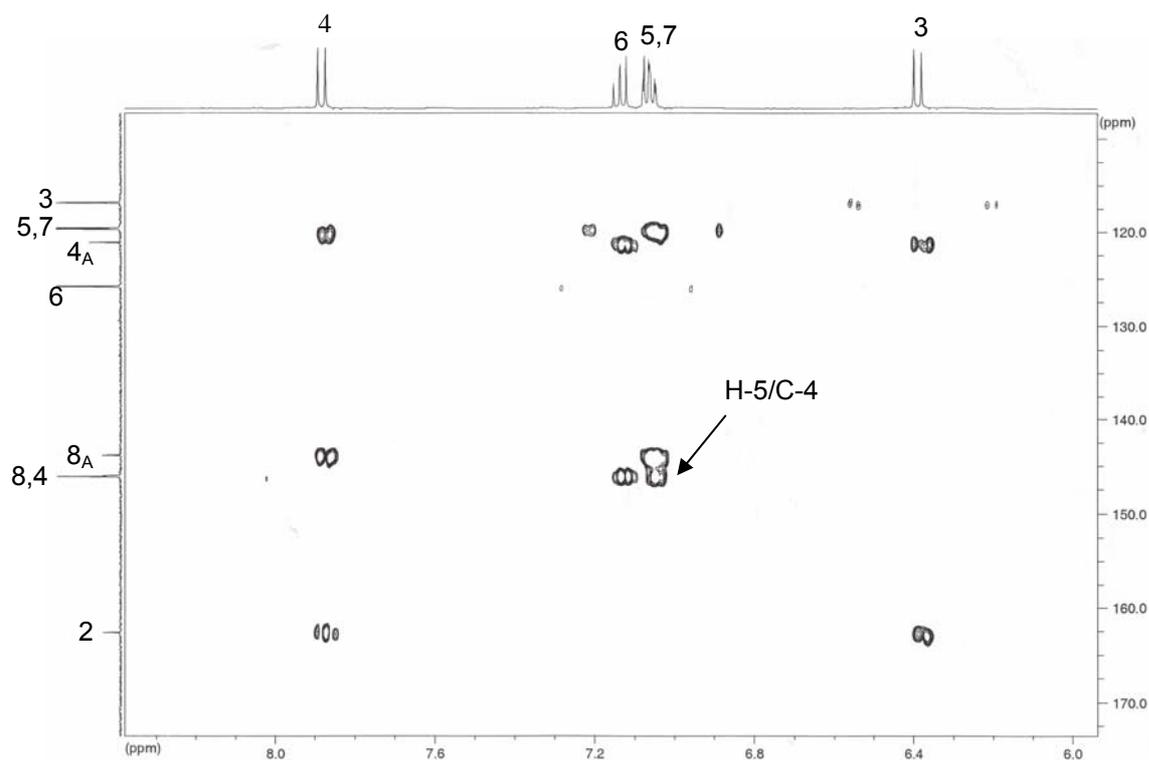


Abb. E12: HMBC-Spektrum von 8-Hydroxycoumarin

II.) Lignane

Pinoresinol

Die Besonderheit von Pinoresinol besteht in der Symmetrie des Moleküls, wodurch sowohl im ^1H -NMR-Spektrum als auch im ^{13}C -Spektrum die entsprechenden Signale zusammenfielen. So wurde zunächst aufgrund der Spektren eine Summenformel ermittelt, die nur die Hälfte der tatsächlichen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome umfasste. Diese Summenformel stimmte aber nicht mit dem ermittelten Molekulargewicht überein, das doppelt so hoch wie erwartet war, so dass der Schluss nahe lag, dass es sich bei dieser Verbindung um ein symmetrisches und möglicherweise dimeres Molekül handelte.

Bedingt durch die Signalverbreiterung war das ABC-Spinsystem der beiden 1,2,4-trisubstituierten Aromaten bei Pinoresinol sehr schlecht zu erkennen. Die zu H-6/H-6' *meta*-koppelnden Protonen H-2/H-2' fielen bei 6.92 ppm als breites Singulett zusammen, so dass hier die Kopplungskonstante für die *meta*-Kopplung nicht

ermittelt werden konnte. Dass es sich bei diesem Proton dennoch um H-2/H-2' handelte, konnte über dessen HMBC-Korrelationen zu den Kohlenstoffatomen C-1/C-1' (133.8 ppm), C-3/C-3' (149.0 ppm) und C-4/C-4' (147.2 ppm) abgesichert werden.

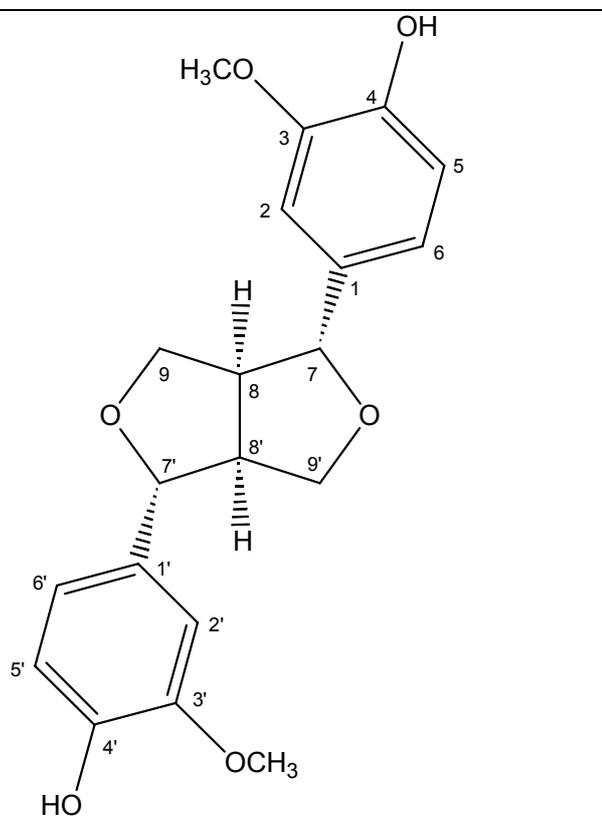
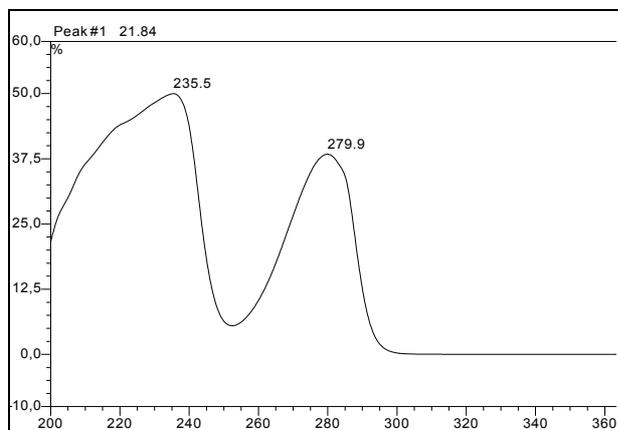
Auch die miteinander *ortho*-koppelnden Protonen H-5/H-5' und H-6/H-6' fielen bei 6.74 bis 6.78 ppm zu einem Multiplett zusammen, so dass auch hier keine Kopplungskonstanten errechnet werden konnten. H-5/H-5' zeigte im HMBC-Spektrum eine CH-Direktkorrelation zu dem Kohlenstoffatom bei 116.1 ppm (C-5/C-5') und weitere Korrelationen zu C-1/C-1' und C-3/C-3'. H-6/H-6' wies ebenfalls eine CH-Direktkorrelation zu dem Kohlenstoffatom bei 120.0 ppm (C-6/C-6') und weitere Korrelationen zu C-1/C-1' und zu C-2/C-2' (110.9 ppm) auf. Sowohl H-2/H-2' als auch H-6/H-6' korrelierten mit einem Kohlenstoffatom ausserhalb des aromatischen Systems bei 87.4 ppm: C-7/C-7'. Das über das HMQC-Spektrum ermittelte dazugehörige Proton H-7/H-7' wies eine chemische Verschiebung von 4.66 ppm auf und lag als Dublett mit einer Kopplungskonstante von 4.5 Hz. vor. Der dazugehörige Kopplungspartner war H-8/H-8' (3.08 ppm), ein lag als Dublett vom Dublett, das eine weitere Kopplung H-9_A/9'_A (4.18 ppm) mit 6.4 Hz zeigte. Die zweite Kopplungskonstante von H-9_A/H-9'_A von 9.0 Hz rührte von der geminalen Kopplung zu H-9_B/H-9'_B her, dessen Signale ebenfalls als Dublett vom Dublett bei 3.78 ppm im ¹H-Spektrum vorlagen. Das Proton H-7 bzw. H-7' korrelierte im HMBC-Spektrum mit C-1 bzw. C-1', C-2 bzw. C-2', C-6 bzw. C-6', C-8 bzw. C-8' und C-9 bzw. C-9'. Proton H-8 bzw. H-8' zeigte eine Korrelation zu dem Kohlenstoffatom bei 55.3 ppm (H-8' bzw. H-8). Darüberhinaus wiesen diese Protonen schwache Korrelationen zu C-1 bzw. C-1' und C-7 bzw. C-7', während H-9 bzw. H-9' nur mit C-7 bzw. C-7' und C-8 bzw. C-8' korrelierte. Diese HMBC-Korrelationen bestätigten die postulierte Struktur, und durch Vergleich der ¹³C-Daten dieser Verbindung mit den Literaturwerten konnte die Verbindung als Pinoresinol identifiziert werden.

Stereochemisch waren für Pinoresinol (symmetrisches Furofuran-Lignan) zwei Formen möglich. Für die Protonen H-8 und H-8' war aufgrund der Stereochemie der beiden Furanringe nur eine *cis*-Stellung möglich. Allerdings konnten die Arylreste in diäquatorialer (Eudesmin-Form) oder in diaxialer (*dia*-Eudesmin-Form) Orientierung an das Furofuran-Strukturelement gebunden sein. Diese beiden Formen unterscheiden sich in den chemischen Verschiebungen der Protonen in Position 7 bzw. 7', 9_A bzw. 9'_A und 9_B bzw. 9'_B. Nach Vergleich mit den Literaturwerten (Schmidt

1994) für die jeweiligen chemischen Verschiebungen beider Formen konnte die isolierte Verbindung der Eudesmin-Form zugeordnet werden. Pinoresinol wurde bereits zuvor aus *Alyxia reinwardtii* isoliert (Kitagawa et al.1988).

Pinoresinol

Systematischer Name	4,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9':7',9'-diepoxylignan
Beschreibung	hellbraunes Pulver
Spezifische Drehung	+56.7° (c 1.0 in Aceton)
Molekulargewicht	358 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	717.1 [2M+H] ⁺ (positiv) 716.0 [2M-H] ⁻ (negativ)
EI-MS (<i>m/z</i>)	358, 151
Summenformel	C ₂₀ H ₂₂ O ₆
Substanzmenge	79.1 mg
Retentionszeit	21.8 min



Tab E15: ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Daten von Pinoresinol (aufgenommen in CD_3OD)

Pinoresinol				
	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	δ_{C} (*Literatur)	HMBC ^a
1		133.8 s	132.0 s	
2	6.92 s	110.9 d	108.8 d	1, 3, 4, 6, 7
3		149.0 s	146.8 s	
4		147.2 s	145.2 s	
5	6.74 – 6.78 m	116.1 d	114.4 d	1, 3, <u>5</u>
6		120.0 d	118.5 d	1, 2, <u>6</u> , 7
7	4.66 d (4.5)	87.4 d	85.7 d	1, 2, 6, 8, 9
8	3.08 dd breit (6.4, 4.7)	55.3 d	53.7 d	1w, 7w, 8
9 A B	4.18 dd (9.0, 6.9) 3.78 dd (9.1, 3.6)	72.5 t	71.3 t	7, 8 7, 8
3-OCH ₃	3.81 s	56.4 q	55.6 q	3

^a H nach C

¹ $J_{\text{C-H}}$ unterstrichen

w = schwach

(*)Literaturvergleich mit Fonseca et al. 1979, gemessen in CDCl_3

Da der Drehwert des Pinoresinols mit $+56.7^\circ$ (c 1.0 in Aceton) nicht mit dem Literaturwert von $+64^\circ$ (c 1.0 in Chloroform, Fonseca et al. 1979) übereinstimmte, wurde die Substanz per chiraler HPLC analysiert, um festzustellen, ob es sich bei der isolierten Substanz möglicherweise um ein Enantiomergemisch handelte.

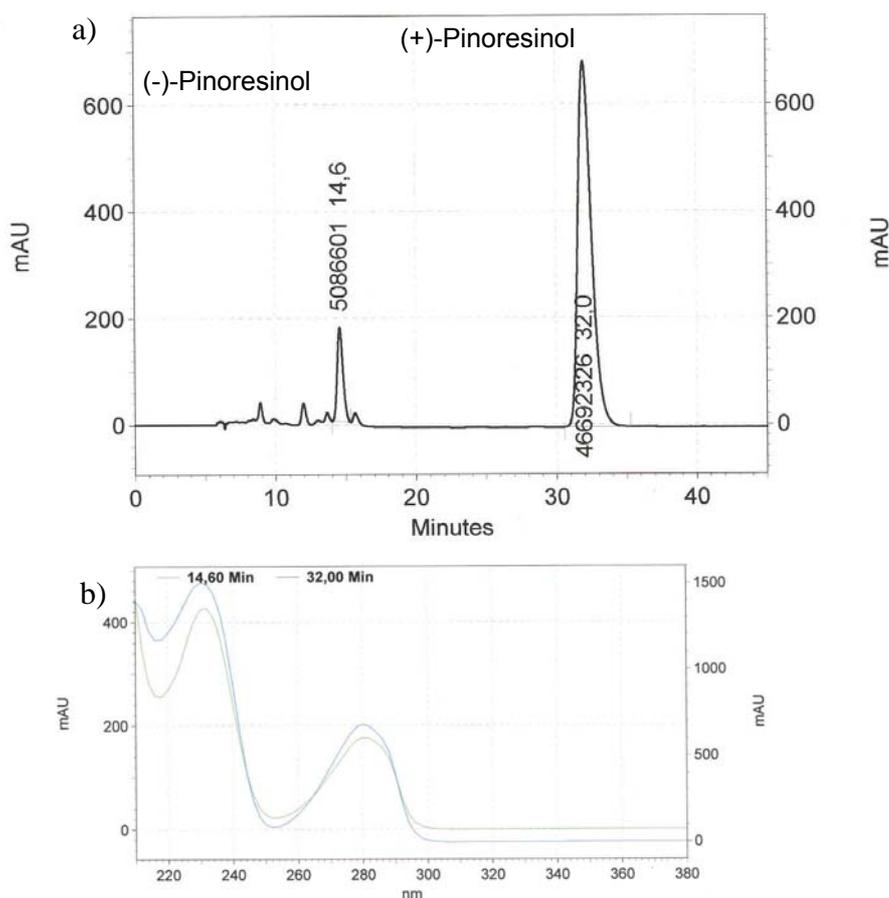


Abb. E13: Chirale Analyse von Pinoselin: HPLC-Chromatogramm (a) und UV-Spektren der beiden Peaks (b)

Das HPLC-Chromatogramm zeigte, dass es sich bei der isolierten Substanz um ein Gemisch aus (+)- und (-)-Pinoselin in einem Mischungsverhältnis von 9:1 handelte. Als Standard diente reines (+)-Pinoselin. Dieser Enantiomerenüberschuss entspricht ziemlich gut der Verminderung des gefundenen Drehwertes.

9 α -Hydroxypinoselin

Diese Verbindung fiel zunächst dadurch auf, dass sie ein sehr ähnliches UV-Spektrum zeigte wie Pinoselin, aber ein um 16 höheres Molekulargewicht aufwies. Da auch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum grosse Ähnlichkeit zu dem von Pinoselin zeigte, lag die Vermutung nahe, dass es sich um ein hydroxyliertes Derivat von Pinoselin handeln könnte. Eine solche Monohydroxylierung des symmetrischen Pinoselins führt zwangsläufig dazu, dass das Molekül nicht mehr symmetrisch aufgebaut ist. Folgerichtig traten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieser Verbindung alle Signale getrennt voneinander auf. Hier waren die beiden ABC-Spinsysteme der 1,2,4-trisubstituierten

Aromaten deutlich zu erkennen und konnten somit klar voneinander unterschieden werden. Die beobachteten HMBC-Korrelationen entsprachen dabei den entsprechenden Korrelationen des Pinoresinols.

H-6 bzw. H-6' ergaben aufgrund einer *meta*-Kopplung zu H-2 bzw. H-2' und einer *ortho*-Kopplung zu H-5 bzw. H-5' ein Dublett vom Dublett im $^1\text{H-NMR}$, während H-2 bzw. H-2' mit einer *meta*-Kopplung zu H-6 bzw. H-6' und Proton H-5 bzw. H-5' mit einer *ortho*-Kopplung zu H-6 bzw. H-6' jeweils ein Dublett zeigten. Dabei lagen die Kopplungskonstanten für die *meta*-Kopplung bei 1.6 bzw. 1.9 Hz und für die *ortho*-Kopplung bei 8.1 Hz.

In Position 4 bzw. 4' befand sich jeweils eine Hydroxy-Gruppe, und die chemische Verschiebung des Kohlenstoffatoms in dieser Position lag jeweils bei 147.3 bzw. 147.1 ppm. In Position 3 bzw. 3' war der aromatische Ring jeweils mit einer Methoxygruppe substituiert. Der Kohlenstoff 3 bzw. 3' lag im ^{13}C -Spektrum bei 148.8 ppm. Die Protonen der Methoxygruppe lagen jeweils bei 3.85 bzw. 3.86 ppm als Singulett (3H) und zeigten im HMBC-Spektrum jeweils eine Korrelation zu Kohlenstoff C-3 bzw. C-3', an den die Methoxygruppe gebunden war. Die exakte Position der Hydroxy- und Methoxygruppen wurde über HMBC-Korrelationen innerhalb des Ringsystems bestimmt. So wiesen nur die Protonen H-2 bzw. H-2' und H-5 bzw. H-5' eine Korrelation zu dem Kohlenstoff bei 148.8 ppm auf, zu welchem auch die Methoxy-Protonen korrelierten. Damit verblieb für die Methoxygruppe nur Position 3 bzw. 3', während H-6 bzw. H-6' zu C-4 bzw. C-4' Korrelationen aufwiesen. Da beide ABC-Spinsysteme intakt waren, musste die zusätzliche Hydroxygruppe an einen der beiden Tetrahydrofuranringe gebunden sein. Auffallend war dabei die Tieffeldverschiebung von H-9 (5.47 ppm), aus der geschlossen wurde, dass die Hydroxygruppe sich in Position 9 befand. Mit Hilfe des COSY-Spektrums wurde für H-9 ein Proton mit einer chemischen Verschiebung von 2.88 ppm als Kopplungspartner ermittelt (H-8), welches wiederum eine Kopplung zu H-7 (4.83 ppm) und eine zu H-8' (3.14 ppm) zeigte. H-8' koppelte zu H-9'_A (4.20 ppm), zu H-9'_B (4.00 ppm) und zu H-7' (4.87 ppm). Die geminale Kopplung zwischen H-9'_A und H-9'_B war im COSY-Spektrum ebenfalls zu beobachten.

Analog zu Pinoresinol wiesen H-2' und H-6' im HMBC-Spektrum eine Korrelation zu C-7' auf, das hier bei 88.5 ppm lag, und H-2 korrelierte mit C-7 (84.7 ppm). Wie beim Pinoresinol wurde die Struktur auch hier durch die HMBC-Korrelationen der

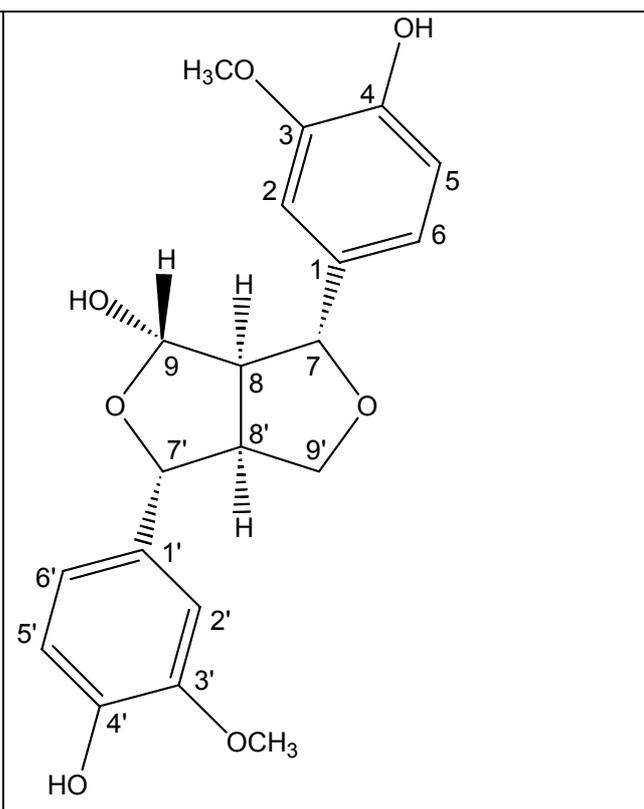
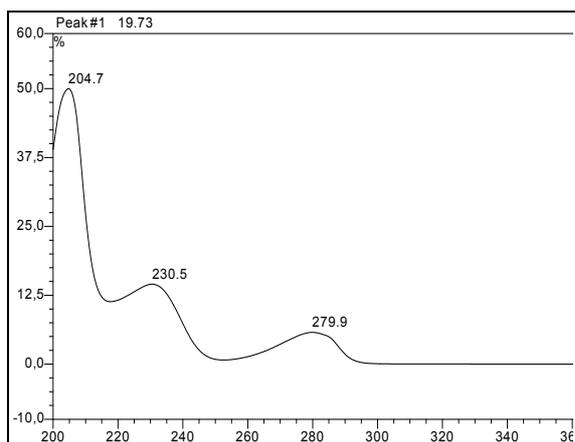
einzelnen Protonen bestätigt. So korrelierte H-9'_A mit Kohlenstoffatom C-7' (88.5 ppm) und H-9 mit den Kohlenstoffatomen C-7 und C-7'. H-8 korrelierte mit C-1 (134.8 ppm), während H-8' dagegen überhaupt keine HMBC-Korrelationen aufwies. H-7 zeigte eine CH-Direktkorrelation bei 84.7 ppm und weitere Korrelationen zu C-2 (110.6 ppm) und C-6 (119.7 ppm). Ebenso korrelierte H-7' mit C-2' (110.9 ppm) und C-6' (119.7 ppm) und zusätzlich auch noch mit C-9' (72.6 ppm).

Um herauszufinden, ob sich die Hydroxygruppe in Position 9 in α - oder β -Stellung befand, wurde auch hier zunächst ein Literaturvergleich angestellt, der zeigte, dass die ^{13}C -Daten der isolierten Verbindung mit denen des 9α -Hydroxypinoresinols übereinstimmten. Ausserdem ist in der Literatur zu 9β -Hydroxypinoresinol (Khan und Shoeb 1985) das Signal des Protons in Position 9 als breites Singulett beschrieben, da das Proton hier ebenso wie H-8 in α -Position steht und es sich daher um eine äquatorial-axiale Kopplung mit einer sehr kleinen Kopplungskonstante handelt. Für 9α -Hydroxypinoresinol dagegen ist in der Literatur (Abe und Yamauchi 1988) das Signal von H-9 als Dublett mit einer Kopplungskonstante von 1 Hz beschrieben. Bei der hier isolierten Verbindung hatte sich das Signal von H-9 ebenfalls deutlich zu einem Dublett aufgespalten und koppelte zu H-8 mit 1.6 Hz. Daher wurde angenommen, dass es sich um 9α -Hydroxypinoresinol handelte.

Um die ermittelte relative Stereochemie der Verbindung abzusichern, wurde zusätzlich ein ROESY-Spektrum aufgenommen. Mit Hilfe dieses NMR-Experiments konnte zunächst gezeigt werden, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um 9α -Hydroxypinoresinol und nicht um 9β -Hydroxypinoresinol handelte, da H-9 einen nOe-Effekt zu dem β -ständigen Proton in Position 7 zeigte. Ferner wurden nOe-Effekte zwischen H-2 bzw. H-6 des Arylrestes und H-8 beobachtet. In analoger Weise wurden nOe-Effekte zwischen H-2' bzw. H-6' und H-8' festgestellt. Damit wurde deutlich, dass hier beide Arylreste ebenso wie die Protonen in Position 8 und 8' in α -Position zu dem Furofuranrest standen, das heisst die Arylreste standen beide äquatorial, und die Verbindung lag wie Pinoresinol in der Eudesmin-Form vor. 9α -Hydroxypinoresinol ist bereits bekannt aus der Apocynacee *Allamanda neriifolia* (Abe und Yamauchi 1988), wurde hier allerdings zum ersten Mal aus *Alyxia reinwardtii* isoliert.

9 α -Hydroxypinoresinol

Systematischer Name	4,4',9-Trihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9':7',9-diepoxylyngan
Beschreibung	hellbraunes Pulver
Spezifische Drehung	+35.0° (c 0.46 in Methanol)
Molekulargewicht	374 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	357.4 [M+H- H ₂ O] ⁺ (positiv) 373.6 [M-H] ⁻ , 420.0 [M-H+HCOOH] ⁻ (negativ)
EI-MS (<i>m/z</i>)	374
Summenformel	C ₂₀ H ₂₂ O ₇
Substanzmenge	19.6 mg
Retentionszeit	19.7 min



Tab E16: ¹H-, ¹³C- und HMBC- und ROESY-Daten von 9 α -Hydroxypinoresinol (aufgenommen in CD₃OD)

9 α -Hydroxypinoresinol ^e					
	δ_H	δ_C^a	δ_C (*Literatur)	HMBC ^b	ROESY
1		134.8			
1'		135.6			
2	6.94 d (1.6)	110.6	110.8	3, 4, 6, 7	3, 8, 9' _A

2'	7.16 d (1.9)	110.9	111.4	3', 4', 6', 7'	3', 8', 7'
3		148.8	147.7		
3'		148.8	147.8		
4		147.3	148.8		
4'		147.1	148.9		
5	6.76 d (8.2)	115.7	116.2	1, 3	-
5'	6.74 d (8.2)	115.7	116.5	1', 3'	7
6	6.81 dd (7.9, 1.6)	119.7	119.5	2, 4	7, 8, 9
6'	6.86 dd (7.9, 1.9)	119.7	120.0	2', 4', 7'	7', 8'
7	4.83 d (6.9)	84.7	84.2	2, 6, <u>7</u>	
7'	4.87 d (6.9)	88.5	87.9	2', 6', 9'	2', 6', 8', 9, 9' _A , 9' _B
8	2.88 dt (8.5, 6.6, 1.6)	63.1	63.2	1	2, 6, 8', 9, 9' _A
8'	3.14 m (8.5, 6.3, 2.2)	54.6	54.7		2', 7', 8, 9' _A , 9' _B
9	5.47 d (1.6)	102.6	102.6	7, 7'	7, 8
9'	A 4.20 dd (9.1, 6.0)	72.6	72.5	7'	2, 7', 8, 8'
	B 4.00 dd (9.1, 2.5)				7, 7', 8'
3-OCH ₃	3.85 s	55.9	55.9	3	2
3'-OCH ₃	3.86 s	55.9	55.8	3'	2'

^a aus dem HMBC-Spektrum entnommen

^b H nach C

¹ J_{C-H} unterstrichen

(*) Literaturvergleich mit Abe und Yamauchi 1988, Lösungsmittel nicht angegeben

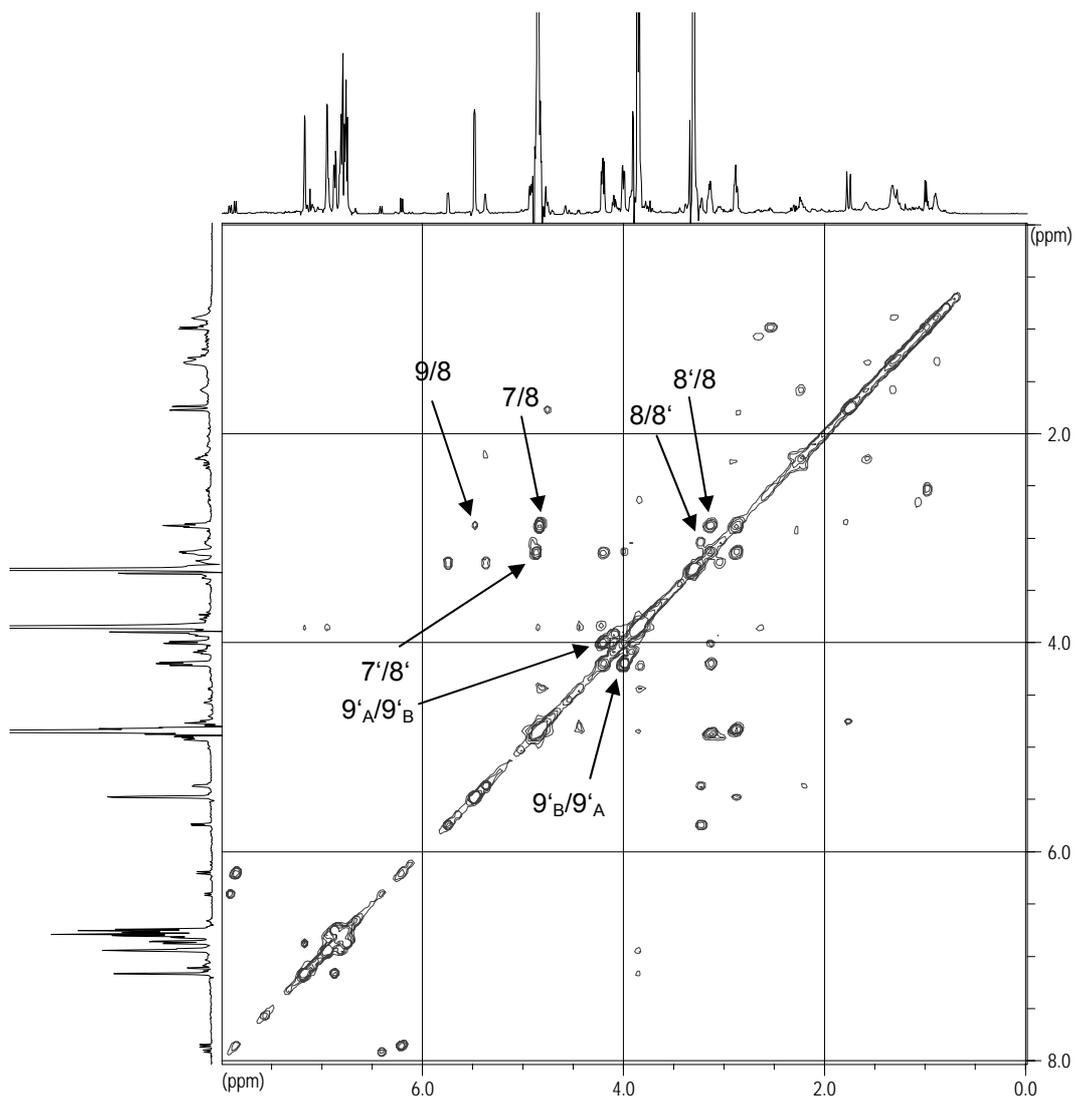


Abb. E14: HMBC-Spektrum von 9α -Hydroxypinoresinol

Auch bei 9α -Hydroxypinoresinol war wie bei Pinoresinol der gemessene Drehwert mit $+35^\circ$ (c 0.46 in Methanol) etwas zu niedrig (vgl. Abe und Yamauchi 1988: $+55^\circ$, c 0.95 in Methanol). Deshalb wurde auch diese Substanz analog zu Pinoresinol einer chiralen HPLC-Analyse unterzogen.

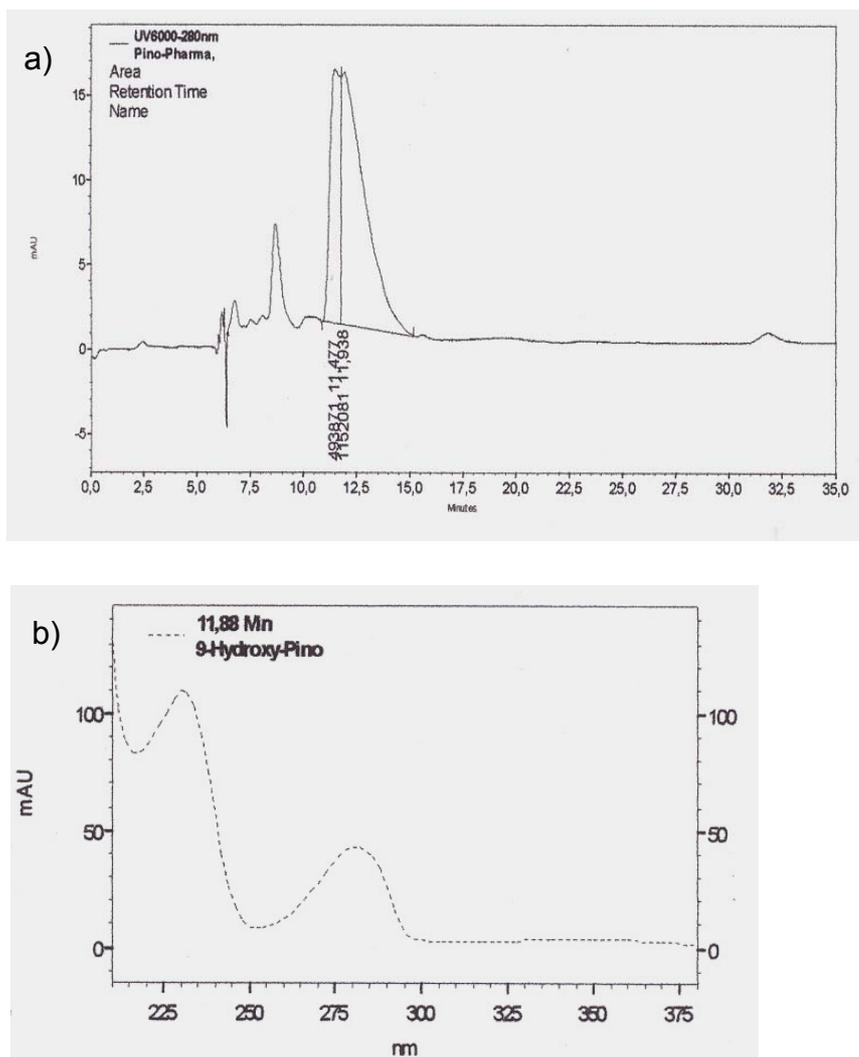


Abb. E15: Chirale Analyse von 9α -Hydroxypinoresinol: HPLC-Chromatogramm (a) und UV-Spektrum des Peaks (b)

Auch bei 9α -Hydroxypinoresinol handelte es sich um ein Enantiomergemisch. Da die Peaks hier jedoch nicht sauber voneinander getrennt werden konnten, konnte in diesem Fall keine Aussage zu dem Verhältnis der beiden Enantiomere zueinander getroffen werden.

Salicifoliol

Charakteristisch für diese Verbindung war, dass sie ebenso wie 9α -Hydroxypinoresinol ein ähnliches UV-Spektrum wie Pinoresinol aufwies, aber mit 250 ein viel kleineres Molekulargewicht hatte. Ausserdem zeigte das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten (siehe NMR-Tabelle). Im aliphatischen Bereich lag bei 4.66 ppm ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 6.6 Hz (H-2).

Der dazugehörige Kopplungspartner war ein Dublett vom Dublett vom Dublett bei 3.20 ppm (H-1), das mit 7.0 Hz zu H-8_A (4.53 ppm), mit 2.2 Hz zu H-8_B (4.35 ppm) und mit 8.7 Hz zu H-5 (3.54 ppm) koppelte. H-8_A und H-8_B lagen jeweils als Dublett vom Dublett vor und zeigten eine geminale Kopplung mit 9.7 Hz. H-5 zeigte ein Dublett vom Dublett vom Dublett, das ausser der Kopplung zu H-1 mit 8.8 Hz noch eine weitere Kopplung ebenfalls mit 8.8 Hz zu H-4_A (4.28 ppm) und eine mit 3.5 Hz zu H-4_B (4.07 ppm) aufwies. H-4_A erschien als breites Triplett mit einer Kopplungskonstante von 8.8 Hz, da die Kopplungskonstante der vicinalen Kopplung zu H-5 (8.8 Hz) fast gleich gross war wie die der geminalen Kopplung zu H-4_B (ca. 9 Hz).

Nach einer Suche in einer Substanzdatenbank (Dictionary of Natural Products 2004) nach einer Verbindung mit diesen Strukturelementen und einem Molekulargewicht von 250 konnte die isolierte Verbindung als das Furoolacton-Lignan Salicifoliol identifiziert werden, was durch Literaturvergleich (Gonzalez et al. 1989) bestätigt wurde.

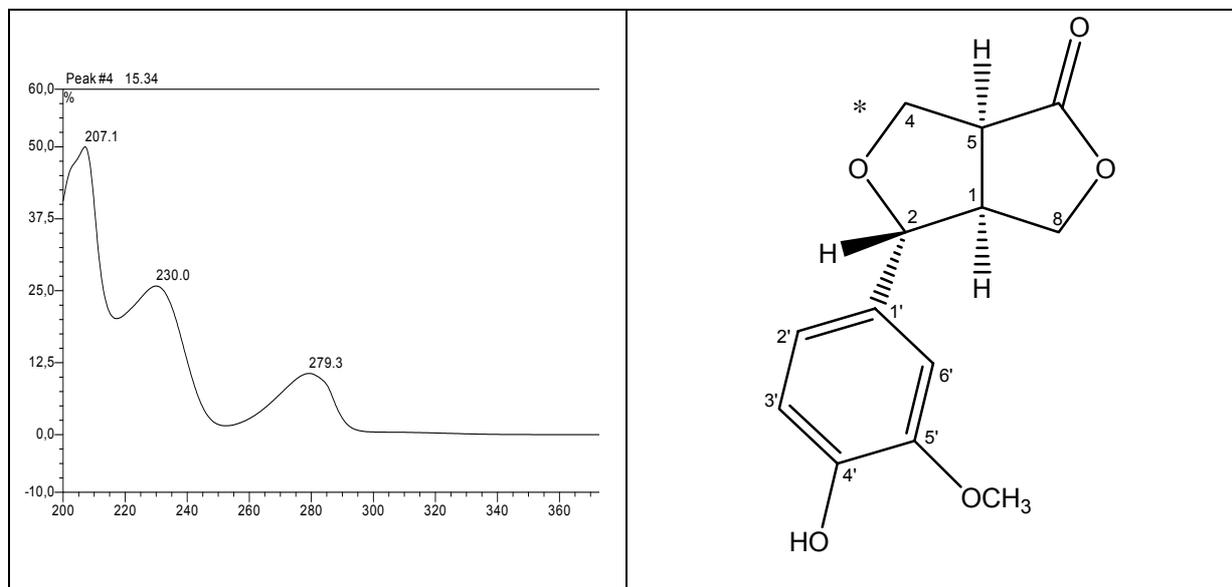
Um herauszufinden, ob der Arylrest tatsächlich wie in der in der Literatur beschriebenen Verbindung in α -Position stand, wurde zusätzlich ein NOESY-Spektrum gemessen. Dabei konnte ein nOe-Effekt zwischen H-2' bzw. H-6' des Arylrestes und H-1 festgestellt werden. Daraus wurde geschlossen, dass der Arylrest ebenso wie H-1 in α -Position zu dem Furofuranrest stand. Ausserdem wurde ein nOe-Effekt zwischen H-1 und H-8_A sowie zwischen H-2 und H-8_B beobachtet, wodurch die Schlussfolgerung hinsichtlich der relativen Stereochemie bestätigt wurde. Der gemessene Drehwert der Verbindung betrug +55°. In der Literatur wurden zum Drehwert von Salicifoliol keine Angaben gefunden. Aus diesem Grund kann für die vorliegende Verbindung nur die relative Stereochemie angegeben werden.

Salicifoliol ist bereits bekannt aus der Apiacee *Bupleurum salicifolium* (Gonzalez et al. 1989), wurde hier aber erstmals aus *Alyxia reinwardtii* isoliert.

Salicifoliol

Beschreibung	hellbraunes Pulver
Spezifische Drehung	+55.0° (c 0.24 in Methanol)
Molekulargewicht	250 g/mol

ESI-MS (m/z)	251.5 $[M+H]^+$ (positiv) 249.8 $[M-H]^-$ (negativ)
Summenformel	$C_{13}H_{14}O_5$
Substanzmenge	1.5 mg
Retentionszeit	15.3 min



* relative Stereochemie

Tab E17: 1H - und NOE-Daten von Salicifoliol (aufgenommen in CD_3OD)

Salicifoliol			
	δ_H (J Hz)	δ_H (*Literatur)	NOESY
1	3.20 ddd (8.7, 7.0, 2.2)		2', 5, 6', 8 _A
2	4.66 d (6.6)	4.62	2', 6', 8 _B
2'	6.95 d (2.0)	6.89	1, 2, 6', 7'
4	A 4.28 bt (8.8)	4.36	4 _B
4	B 4.07 dd (9.1, 3.5)	4.18	4 _A
5	3.54 ddd (8.8, 8.8, 3.5)	3.42	1
5'	6.77 d (8.2)	6.91	
6'	6.82 dd (8.1, 2.0)	6.81	1, 2, 2'
8	A 4.53 dd (9.7, 6.9)	4.50	1, 8 _B
8	B 4.35 dd (9.7, 2.1)	4.32	2, 8 _A
7'-OCH ₃	3.85 s	3.85	2'

(*)Literaturvergleich mit Gonzalez et al. 1989, gemessen in $CDCl_3$ Ergebnis der Quantifizierung:

Die Quantifizierung von Pinoresinol in der Rinde von *Alyxia reinwardtii* erfolgte mit Hilfe eines externen Standards. Mit dem aus *Alyxia reinwardtii* isolierten reinen

Pinoresinol wurde eine Kalibriergerade erstellt, aus der dann die Konzentration des Pinoresinols in der jeweiligen Probe (Ethylacetat- und Methanolextrakt) abgeleitet werden konnte.

Der Gehalt an Pinoresinol betrug insgesamt 0.160 (\pm 0.009)% in der Rinde (bezogen auf das Trockengewicht), 1.86 (\pm 0.20)% im Ethylacetatextrakt und 5.78 (\pm 0.35)% im Methanolextrakt (bezogen jeweils auf den getrockneten Extrakt).

3.3.3. 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol aus *Sauropus androgynus*

Der Methanolextrakt der Blätter von *Sauropus androgynus* wurde wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.4. beschrieben mittels VLC aufgetrennt. Die Fraktion, die beim zweiten Spülen mit Methanol (100%) eluiert wurde, enthielt einen Hauptpeak, dessen UV-Spektrum auf ein Flavonol hindeutete. Das ESI-Positiv-Spektrum wies ein Signal bei 611.2 und eines bei 287.5 auf. Das ESI-Negativ-Spektrum zeigte nur ein Signal bei 609.6. Daraus ergab sich ein Molekulargewicht von 610. Das Fragment mit m/z = 286 deutete auf ein Flavonoid-Aglykon hin, und die Massendifferenz von 324 liess vermuten, dass das Aglykon mit zwei Hexosen (Molekulargewicht: jeweils 180) verbunden war.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieser Verbindung zeigte ähnlich wie die Spektren der aus *Guazuma ulmifolia* isolierten Flavonoide Apigenin und Luteolin die beiden für die *meta*-koppelnden Protonen in den Positionen 6 und 8 des A-Rings typischen Dubletts bei 6.20 und 6.41 ppm mit der Kopplungskonstante 2.5 Hz. Ausserdem wies das Spektrum ebenso wie das des Apigenins ein AA'BB'-Spinsystem im B-Ring auf. Dabei fielen die Dubletts von H-2' und H-6' mit einer Kopplungskonstante von 8.8 Hz bei 8.10 ppm zusammen, da sie chemisch, aber nicht magnetisch äquivalent sind. H-2' hatte eine *ortho*-Kopplung zu H-3', während H-6' eine solche zu H-5' aufwies. H-3' und H-5' fielen ihrerseits aufgrund ihrer chemischen Äquivalenz bei 6.88 ppm als Dublett mit der Kopplungskonstante 8.8 Hz zusammen.

Im Gegensatz zu den Spektren von Apigenin und Luteolin wies dieses Spektrum kein Singulett bei 6.50 ppm auf, das auf die Existenz eines Protons in Position 3 des C-Rings hingedeutet hätte. Daraus ergab sich zusammen mit dem Molekulargewicht

von 286 und dem UV-Spektrum, dass es sich bei dem Aglykon um das Flavonol Kämpferol handelte.

Bei der Strukturaufklärung der beiden Hexosen wurde zunächst die Natur der Verknüpfung der beiden Zucker untereinander und anschliessend die der Bindung des Dihexosids an das Aglykon ermittelt. Dazu dienten die Kopplungskonstanten der anomeren Protonen, von denen eines als Dublett bei 5.23 ppm erschien (H-1''). Seine Kopplungskonstante betrug 6.94 Hz; sie liess den Schluss auf eine axial-axiale Kopplung zu Proton 2'' desselben Zuckers und somit auf eine β -glykosidisch verknüpfte Hexose zu. H-2'', das ein Dublett vom Dublett bei 3.44 ppm mit den Kopplungskonstanten 9.5 Hz und 8.2 Hz darstellte, koppelte somit nicht nur mit H-1'', sondern auch mit H-3'' axial-axial, während H-3'' als Multipllett vor lag und von anderen Zuckersignalen überlagert wurde, so dass hier weder die Kopplungskonstante noch die chemische Verschiebung ermittelt werden konnte.

Das anomere Proton H-1''' des zweiten Zuckers ergab ein Dublett bei 4.13 ppm mit der Kopplungskonstante 7.6 Hz. Auch hier stand das Proton axial-axial zu seinem Kopplungspartner H-2'''. Daraus wurde geschlossen, dass auch diese Hexose β -glykosidisch verknüpft war.

Bei 3.97 ppm fand sich ein Dublett vom Dublett mit den Kopplungskonstanten 12.0 und 1.9 Hz, das 6''_A-H des ersten Zuckers zugeordnet werden konnte. Bei den im COSY-Spektrum ermittelten Kopplungspartnern handelte es sich zum einen um ein weiteres Dublett vom Dublett bei 3.63 ppm, das die Kopplungskonstanten von 12.0 Hz und 5.0 Hz aufwies. Hierbei handelte es sich um das mit 6''_A-H mit 12.0 Hz geminal koppelnde Proton 6''_B-H. Dieses Proton koppelte mit 5.0 Hz zu H-5'', das auch den zweiten Kopplungspartner von 6''_A-H darstellte. Ein ähnliches Aufspaltungsmuster zeigten 6'''_A-H (3.74 ppm) und 6'''_B-H (3.57 ppm) des zweiten Zuckers. Auch sie koppelten geminal mit 12 Hz miteinander und vicinal zu H-5''' mit 2.5 Hz bzw. 5.7 Hz.

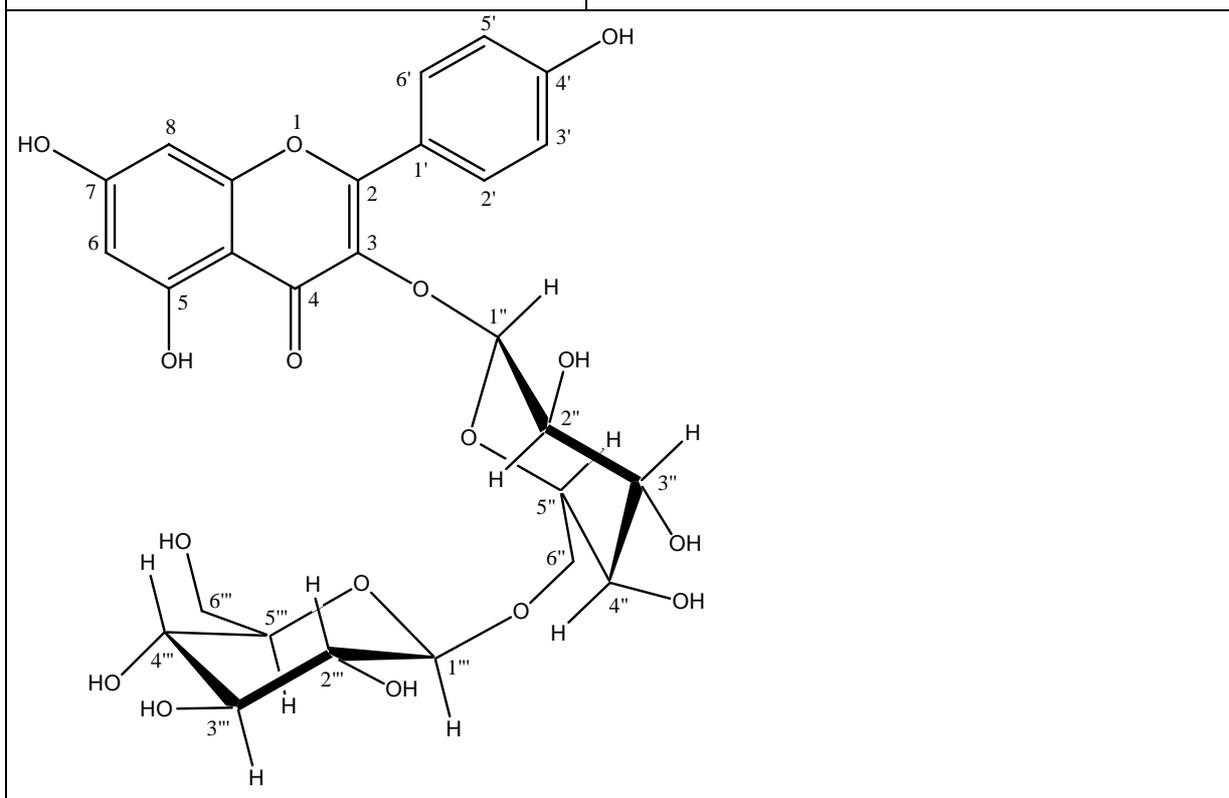
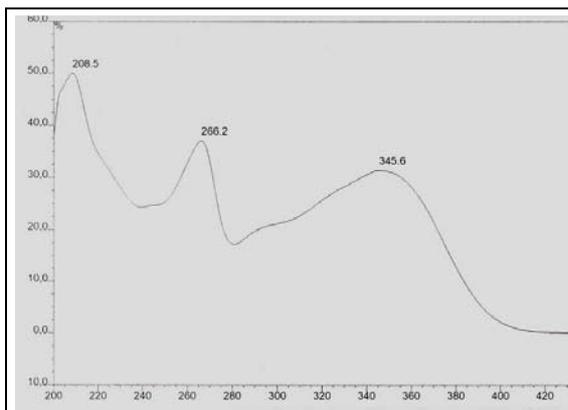
Die Signale der Protonen in den Positionen 3'', 4'' und 5'' des ersten Zuckers sowie die Signale von H-2''', H-3''', H-4''' und H-5''' waren jeweils aufgrund von Signalüberlagerung auch mit Hilfe des COSY-Spektrums nicht zuzuordnen, die teilweise überlagerten, so dass hier keine Kopplungskonstanten errechnet und damit auch nicht die Identität der Zucker bestimmt werden konnte.

Mit Hilfe der NMR-Experimente konnte somit nur die β -Verknüpfung der beiden Hexosen, nicht aber ihre Identität sowie ihre absolute Konfiguration festgestellt werden. Deshalb wurde die Verbindung wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.4.4. beschrieben hydrolysiert, einer Butanolyse mit anschließender Trimethylsilylierung unterzogen und dann gaschromatographisch untersucht. Mit den entsprechenden in Frage kommenden Zuckerstandards wurde ebenso verfahren wie mit der Probe, und die Chromatogramme der Probe wurden mit denen der Standards verglichen. In diesem Fall zeigte die Probe das gleiche charakteristische Peakmuster wie der Standard D-Glucose (siehe Anhang). Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei beiden Hexosen um D-Glucose handelte.

Der Drehwert der Verbindung stimmte mit -5.6° nahezu mit dem in der Literatur angegebenen Wert von -6.0° (c 0.5 in Methanol, Wang und Lee 1997) für 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol überein. Die Verbindung wurde bereits aus *Sauropus androgynus* isoliert (Wang und Lee 1997).

3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol

Systematischer Name	3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyloxy-4',5,7-trihydroxyflavon
Beschreibung	gelbes Pulver
Spezifische Drehung	-5.6° (c 0.5 in Methanol)
Molekulargewicht	610 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	611.2 [M+H] ⁺ , 287.5 (Aglykon) (positiv) 609.6 [M-H] ⁻ (negativ)
Summenformel	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Substanzmenge	4.2 mg
Retentionszeit	21.9 min



Tab E18: ^1H -NMR-Daten von 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol (aufgenommen in CD_3OD)

	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	δ_{C} (*Literatur)
2		158.9 s	159.0 s
3		135.5 s	135.5 s
4		179.4 s	179.5 s
5		163.0 s	163.0 s
6	6.20 d (2.5)	100.1 d	99.9 d
7		168.7 s	166.0 s
8	6.41 d (2.5)	95.0 d	94.9 d
9		158.9 s	158.5 s
10		105.7 s	105.8 s
1'		122.7 s	122.7 s
2'	8.10 d (8.8)	132.4 d	132.4 d

3'		6.88 d (8.8)	116.2 d	116.2 d
4'			161.6 s	161.6 s
5'		6.88 d (8.8)	116.2 d	116.2 d
6'		8.10 d (8.8)	132.4 d	132.4 d
1''		5.23 d (6.94)	104.1 d	104.0 d
2''		3.44 dd (9.5, 8.2)	75.8 d	75.8 d
3''		m	78.0 d	78.0 d
4''		m	71.3 d	71.3 d
5''		m	77.8 d	77.8 d
6''	A	3.97 dd (12.0, 1.9)	69.6 t	69.6 t
	B	3.63 dd (12.0, 5.0)		
1'''		4.13 d (7.6)	104.6 d	104.6 d
2'''		m	75.1 d	75.1 d
3'''		m	77.8 d	77.8 d
4'''		m	71.4 d	71.4 d
5'''		m	77.7 d	77.7 d
6'''	A	3.74 dd (12.0, 2.5)	62.6 t	62.6 t
	B	3.57 dd (12.0, 5.7)		

(*)Literaturvergleich mit Wang und Lee 1997, gemessen in CD₃OD

Ergebnis der Quantifizierung:

3-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosylkämpferol wurde in den Blättern von *Sauropus androgynus* mit Hilfe von Kämpferol als externem Standard quantifiziert. Da für die Kalibrierung nur das Aglykon zur Verfügung stand, wurde dieses zur Quantifizierung herangezogen und die Unterschiede in den Molekulargewichten entsprechend berücksichtigt.

Für 3-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosylkämpferol ergab sich ein Gehalt von 0.12 (± 0.02)% in den Blättern (bezogen auf das Trockengewicht) und ein Gehalt von 1.14 (± 0.15)% im Methanolextrakt (bezogen auf den getrockneten Extrakt). Im Ethylacetatextrakt war die Verbindung nicht enthalten.

3.3.4. Inhaltsstoffe aus *Alstonia scholaris*, Apocynaceae

950 g der getrockneten Rindendroge wurden wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.1 beschrieben extrahiert und dann einer Flüssig-Flüssig-Verteilung mit

Methanol:Wasser (9:1) gegen *n*-Hexan unterzogen. Die getrocknete wässrige Methanolphase wurde in Ethylacetat gelöst und erneut gegen Wasser ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wurde dann wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.4. beschrieben mittels VLC weiter aufgetrennt. Die Fraktion, die mit 95.5% Dichlormethan eluiert wurde, wurde einer FCPC unterzogen (genaue Bedingungen siehe ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.3.5.). Dabei fielen die Fraktionen 32 bis 36 durch ihre antioxidative Aktivität auf. Da diese Fraktionen auf der DC-Platte alle die gleiche Zusammensetzung zeigten, wurden sie vereinigt. Diese vereinigte Fraktion (431.3 mg) wurde nach dem Trocknen auf einer Sephadex-Säule (100% Methanol) weiter aufgetrennt. Aus Fraktion 126 bis 130 (5.5 mg) konnte mittels präparativer HPLC Vanillin isoliert werden, während Fraktion 175-Ende (2.4 mg) das reine Sch53823 darstellte.

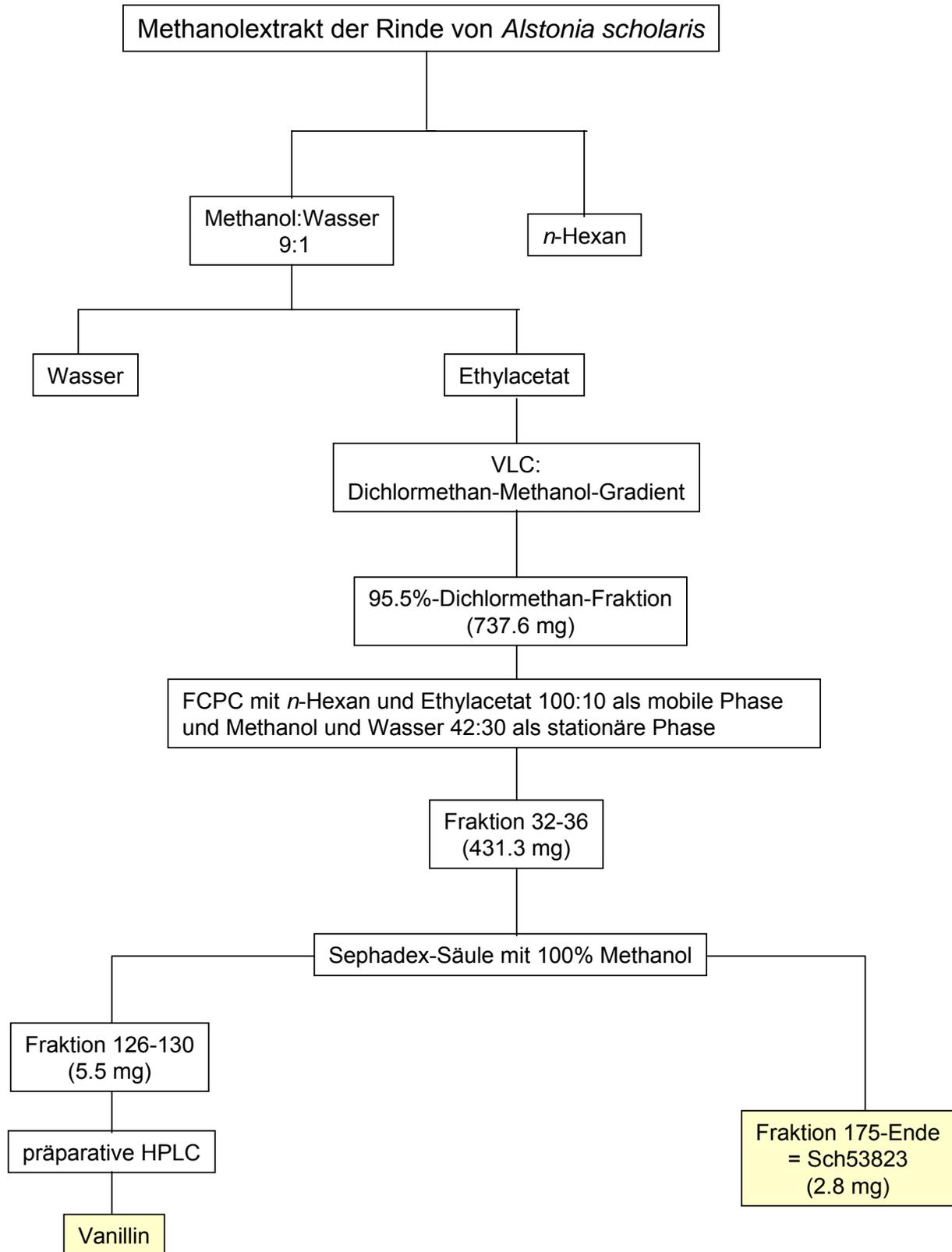


Abb. E16: Isolierung von Sch53823 und Vanillin aus der Rinde von *Alstonia scholaris*

Sch53823

Für diese Verbindung wurde per LC-MS ein Molekulargewicht von 334 ermittelt. Dabei wurde die Verbindung im positiven Mode nicht ionisiert, aber im negativen wurde dafür ein Ion bei $m/z = 333.1$ für $[M-H]^-$ und ein Ion bei $m/z = 666.7$ für $[2M-H]^-$ detektiert.

Das UV-Spektrum zeigte ein Absorptionsmaximum bei 225 nm und eine Schulter bei 287 nm und konnte durch Vergleich mit der Spektrenbibliothek keinem bekannten Standard zugeordnet werden.

Die NMR-Experimente mit dieser Verbindung wurden an der Beijing Normal University in Peking/China durchgeführt. Bei der Strukturaufklärung fiel zunächst das Signal des Protons in Position 4' auf, ein Dublett bei 7.65 ppm mit der Kopplungskonstante 8.3 Hz. Die chemische Verschiebung und die Kopplungskonstante liessen den Schluss auf ein aromatisches Proton mit *ortho*-Kopplung zu. Der im COSY-Spektrum ermittelte Kopplungspartner war H-3', das als Dublett vom Dublett bei 7.56 ppm vorlag. Dieses koppelte wiederum mit 7.8 Hz zu einem weiteren Proton (H-2'), dessen chemische Verschiebung von 7.13 ppm ebenfalls über das COSY-Spektrum ermittelt wurde. Das Signal von H-2' war ein Dublett mit der Kopplungskonstante 7.1 Hz. Auch hier handelte es sich also um eine *ortho*-Kopplung. Ein ähnliches ABC-Spinsystem fand sich noch zwei weitere Male im ^1H -NMR-Spektrum von Sch53823. Das Signal von H-5' (7.62 ppm) stellte ebenfalls ein Dublett (8.4 Hz) mit einer *ortho*-Kopplung zu H-6' dar. Das Signal von H-6' lag bei 7.51 ppm und war ein Dublett vom Dublett mit den Kopplungskonstanten 8.4 Hz und 7.4 Hz. H-6' zeigte also noch eine weitere *ortho*-Kopplung. Der dazugehörige Kopplungspartner wurde auch hier wieder dem COSY-Spektrum entnommen. Es handelte sich um H-7', das ein Dublett bei 6.97 ppm mit einer *ortho*-Kopplung von 7.4 Hz zu H-6' ergab.

Im HMBC-Spektrum zeigten H-3' und H-6' jeweils eine Korrelation zu demselben C-Atom (134.3 ppm, C-4'a), darüberhinaus jeweils eine Korrelation zu verschiedenen oxygenierten aromatischen Kohlenstoffen (147.7 ppm, C-1' bzw. 147.8 ppm, C-8'). Aus diesen Befunden wurde das Vorhandensein eines 1,8-Dihydroxynaphthalins abgeleitet, was durch gegenseitige Korrelation von H-4'/C-4' und H-5'/C-5' bestätigt wurde. Eine weitere Bestätigung ergab sich durch die gemeinsame Korrelation von H-2', H-4', H-5' und H-7' zu C-8'a.

Das dritte ABC-Spinsystem bestand aus H-8 (7.13 ppm, d, 7.6 Hz), H-7 (7.24 ppm, dd, 7.7, 7.6 Hz) sowie H-6 (6.98 ppm, d, 7.7 Hz). HMBC-Korrelationen von H-7 und H-6 zu einem Kohlenstoffatom bei 156.4 ppm (C-5) belegten, dass sich H-6 neben einem phenolischen Kohlenstoffatom befinden musste. Ein weiteres Proton korrelierte mit diesem Kohlenstoffatom. Dabei handelte es sich um H-4, dessen chemische Verschiebung (5.33 ppm) darauf schliessen liess, dass es sich an einem oxygenierten aliphatischen Kohlenstoffatom befand. H-4 zeigte weitere HMBC-Korrelationen zu C-4a (123.1 ppm) und C-8a (132.4 ppm), wodurch der phenolische Ring geschlossen wurde. Den mittels COSY ermittelten Kopplungspartner von H-4 stellte H-3 (3.50 ppm) dar, welches wiederum mit H-2 koppelte.

Die Existenz eines weiteren sechsgliedrigen Ringsystems ergab sich aus HMBC-Korrelationen von H-2 nach C-8a sowie H-8 nach C-1 (98.1 ppm). Anhand der Betrachtung der chemischen Verschiebung der verschiedenen Sauerstoff-substituierten Kohlenstoffatome C-1 bis C-4 ergab sich das Vorhandensein eines Epoxids zwischen C-2 und C-3 sowie von zwei Sauerstoff-Substituenten an C-1, das somit acetalischer bzw. ketalischer Natur sein musste. Diese Befunde waren nur mit der Existenz eines Spiroketals, bei dem C-1 über Sauerstoffbrücken mit C-1' und C-8' des 1,8-Dihydroxynaphthalins verbunden ist, in Einklang zu bringen.

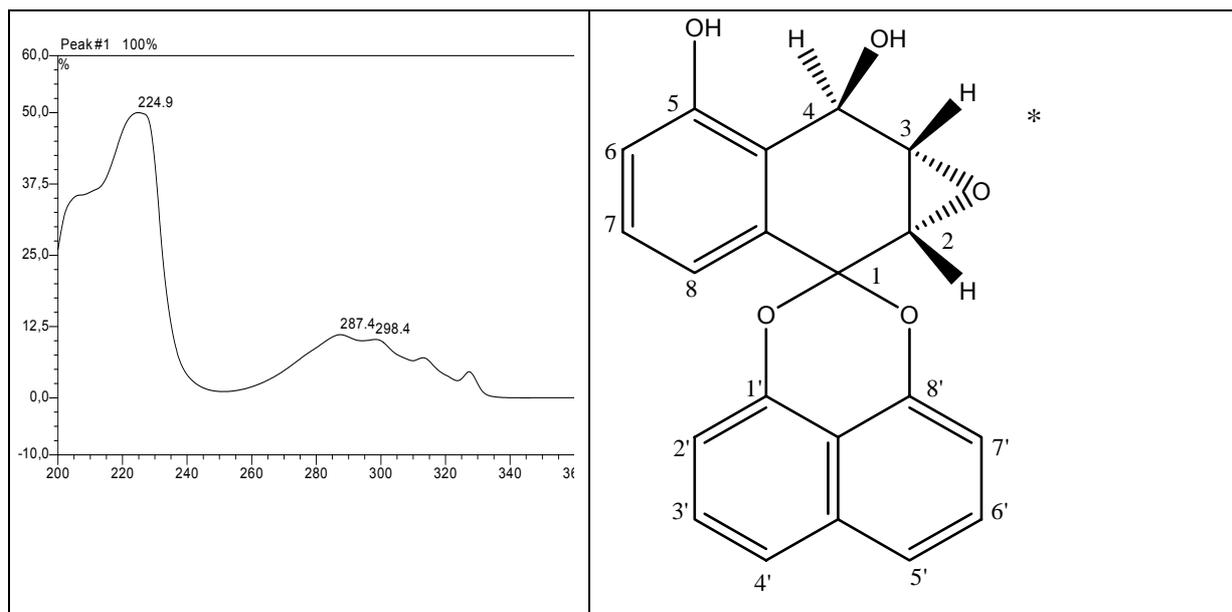
Nach einer Suche in einer Substanzdatenbank (Dictionary of Natural Products 2004) nach dieser Planarstruktur und dem Molekulargewicht 334 und darauf folgenden verschiedenen Literaturvergleichen konnte die isolierte Verbindung als Sch53823 identifiziert werden. Für die ermittelte Planarstruktur waren zunächst vier stereochemische Varianten möglich, von denen zwei im NMR unterschieden werden können. Da das Epoxid nur *cis*-konfiguriert sein kann, müssen die C-Atome in den Positionen 2 und 3 beide in *S*- oder beide in *R*- Konfiguration vorliegen. Liegt in den Positionen 3 und 4 die *anti*-Konfiguration vor, so kann die 2*S*,3*S*,4*R*-Form oder deren Enantiomer, die 2*R*,3*R*,4*S*-Form vorliegen. Stehen H-3 und H-4 dagegen in *syn*-Position zueinander, ist die Struktur entweder 2*S*,3*S*,4*S*- oder 2*R*,3*R*,4*R*-konfiguriert. Bei der von Chu et al. 1996 sowie von Kizu et al. 1994 beschriebenen Verbindung Sch53823, bei der die Protonen in den Positionen 3 und 4 in *anti*-Position zueinander stehen, waren die chemischen Verschiebungen im ¹³C-NMR-Spektrum nahezu identisch mit denen der isolierten Verbindung, während beim Vergleich mit dem von Krohn et al. 1994 beschriebenen *syn*-konfigurierten Palmarumycin C₁₁ dagegen Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe C-1, C-2, C-3, C-

4, C-4_A, C-6 und C-8 auftraten. Die *anti*-Konfiguration in Position 3 und 4 widersprach nicht dem zwischen diesen beiden Protonen gemessenen nOe-Effekt, denn durch Nachbau des Moleküls als Dreiding-Modell und durch Ausmessen des Abstands zwischen den beiden Protonen konnte festgestellt werden, dass dieser etwas weniger als 3 Angström betrug und damit ein nOe-Effekt möglich war.

Für die Verbindung wurde ein Drehwert von +66.0° (c 0.1 in DMSO) gemessen. Dieser stimmte nicht mit dem Literaturwert von +227.0° (c 0.1 in DMSO, Chu et al. 1996) für Sch53823 überein. Aber der Betrag des Drehwertes war ähnlich dem zweiten in der Literatur angegebenen Wert von -52.9° (c 0.14 in Pyridin, Kizu et al. 1994). Da weder von Chu noch von Kizu die absolute Stereochemie bestimmt wurde, kann hier nur die relative Stereochemie der Struktur angegeben werden.

Sch53823

Systematischer Name	5-Hydroxyspiro[naphthalen-1(4 <i>H</i>),2'-naphthol[1,8- <i>de</i>][1,3]dioxin]-4-on-2 α ,3 α -epoxid,4 β -alkohol
Beschreibung	gelbes Pulver
Spezifische Drehung	+66.0° (c 0.1 in DMSO)
Molekulargewicht	334 g/mol
ESI-MS (<i>m/z</i>)	333.1 [M-H] ⁻ , 378.6 [M-H] ⁻ +HCOOH, 666.7 [2M-H] ⁻ (negativ)
EI-MS (<i>m/z</i>)	374
Summenformel	C ₂₀ H ₁₄ O ₅
Substanzmenge	2.4 mg
Retentionszeit	33.5 min



* relative Stereochemie

Tab E19: ^1H -NMR-, ^{13}C -, HMBC- und NOESY-Daten von Sch53823 (aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$)

Sch53823						
	δ_{H} (J Hz)	δ_{C}	δ_{C} (Literatur ^{1*})	δ_{C} (Literatur ^{2*})	HMBC ^a	NOESY
1		98.1 s	97.0 s	97.7		
1'		147.7 s	146.7 s	147.4 s		
2	3.61 d (3.9)	50.2 d	49.2 d	49.8 d	8a	3, 7', 2'
2'	7.13 d (7.1)	109.8 d	108.8 d	108.9 d	1', 8'a, 4'	
3	3.50 dd (3.9, 2.3)	53.8 d	52.7 d	53.2 d	4a	2, 4
3'	7.56 dd (8.3, 7.8)	128.3 d	127.3 d	127.9 d	1', 4'a	
4	5.33 d (2.3)	59.6 d	58.5 d	59.1 d	8a, 4a, 5, 2, 3	
4'	7.65 d (8.3)	121.2 d	120.2 d	120.7 d	2', 8'a, 5', 4'a	
4a		123.1 s	122.0 s	122.7 d		
4'a		134.3 s	133.2 s	133.9 d		
5		156.4 s	155.1 s	155.8 s		
5'	7.62 d (8.4)	121.0 d	120.0 d	120.8 d	4', 8'a, 4'a	
6	6.98 d (7.7)	117.0 d	115.7 d	116.4 d	5, 4a, 8	
6'	7.51 dd (8.4, 7.4)	128.3 d	127.2 d	127.9 d	8', 4'a	
7	7.24 dd (7.7, 7.6)	129.4 d	128.4 d	129.1 d	5, 8a	
7'	6.97 d (7.4)	109.4 d	108.3 d	109.4 d	8', 8'a, 5'	
8	7.13 d (7.6)	117.4 d	116.6 d	117.2 d	6, 4a, 1	
8'		147.8 s	146.6 s	147.4 s		
8a		132.4 s	131.4 s	132.1 s		
8'a		112.9 s	111.8 s	112.5 s		

^aH nach C

(1*) Literaturvergleich mit Chu et al. 1996, gemessen in DMSO-*d*₆

(2*) Literaturvergleich mit Kizu et al. 1994, gemessen in DMSO-*d*₆

Um festzustellen, ob es sich bei Sch53823 um ein reines Enantiomer, um ein Gemisch aus beiden Enantiomeren oder um ein Razemat handelte, wurde auch diese Verbindung per HPLC mit chiraler Säule analysiert. Dabei zeigte das Chromatogramm nur einen Peak. Es könnte sich also um ein reines Enantiomer handeln. Allerdings ist nicht auszuschliessen, dass zwar beide Enantiomere vorlagen, diese sich aber auf dieser chiralen Säule unter den gewählten Bedingungen nicht trennen liessen.

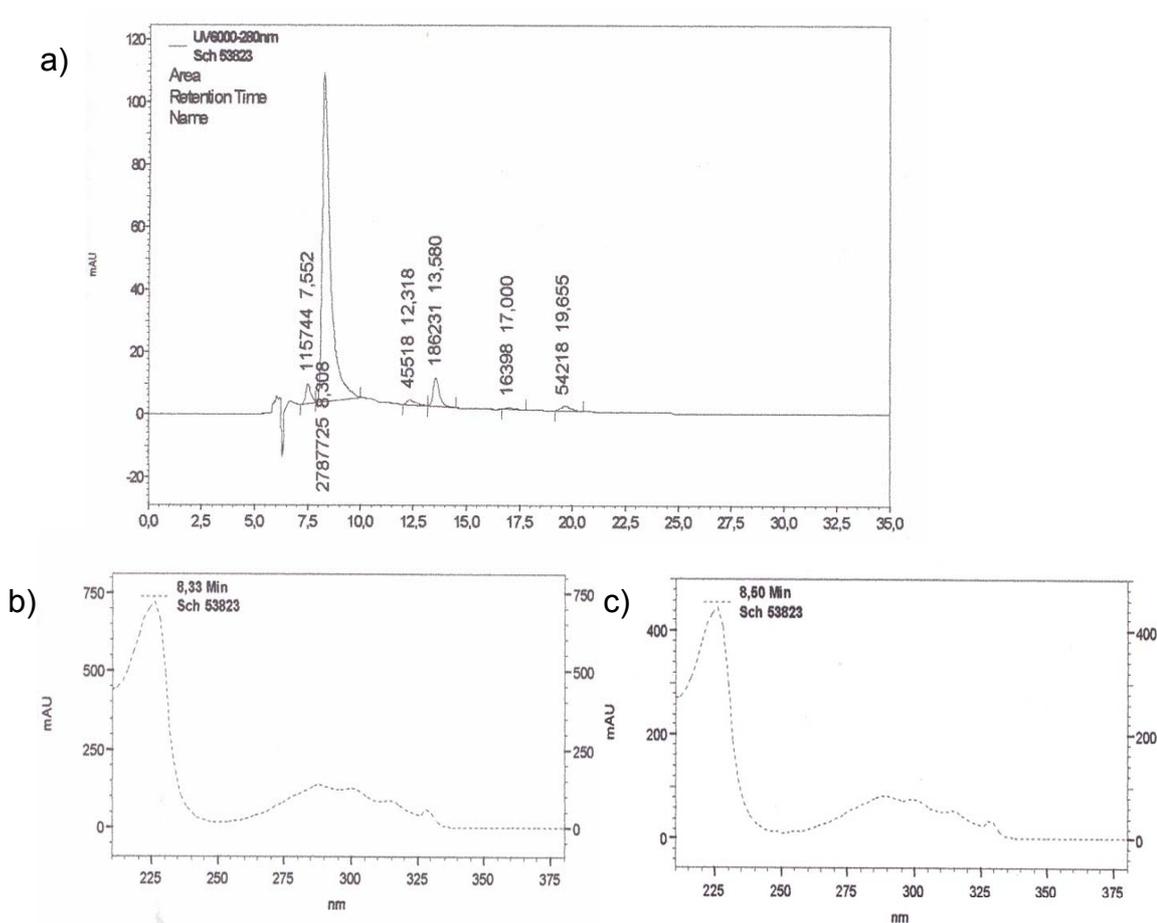


Abb. E17: Chirale Analyse von Sch53823: HPLC-Chromatogramm (a) und UV-Spektren der Peaks (b, c)

Ergebnis der Testung von Sch53823 an Krebszelllinien:

Im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W.E.G. Müller wurden am Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie (Johannes Gutenberg Universität Mainz) für Sch53823 mit Hilfe des MTT-Assays folgende ED₅₀-Werte hinsichtlich der Wachstumshemmung auf verschiedene Krebszelllinien ermittelt:

L-Zellen: >10 µg/ml

Hela-Zellen: >10 µg/ml

PC12-Zellen. >10 µg/ml

Ergebnis der Testung von Sch53823 auf Hemmwirkung gegenüber *Cladosporium cucumerinum*:

Da mit Sch53823 verwandte Verbindungen wie Palmarumycine aus einer bis jetzt nicht identifizierten *Coniothyrium*-Art bekannt sind, deren Extrakte eine hemmende Wirkung auf *Cladosporium cucumerinum* zeigen (Krohn et al. 1994), wurde die Verbindung auf ihre Hemmwirkung gegenüber diesem Pilz getestet. Dabei war allerdings keine hemmende Wirkung von Sch53823 auf *Cladosporium cucumerinum* zu beobachten.

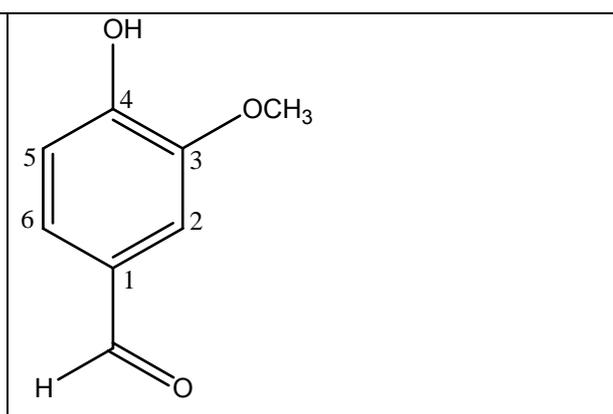
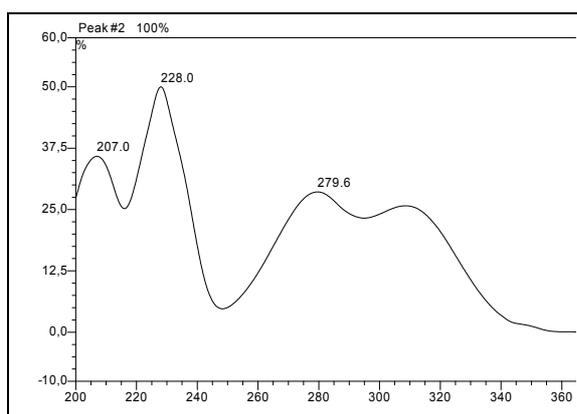
Vanillin

In Fraktion 126-130 fiel zunächst der charakteristische Geruch des Vanillins auf. Das UV-Spektrum sowie das Molekulargewicht des Hauptpeaks dieser Fraktion deuteten ebenfalls auf Vanillin hin. Nach dem Reinigen der Fraktion mittels präparativer HPLC wurde ein ¹H-Spektrum gemessen, das die angenommene Struktur dann bestätigte. Das Singulett bei 9.74 ppm stellte das Signal des Carbonyl-Prottons dar. Das nächst höher liegende Signal bei 7.43 ppm, ein Dublett, hatte eine Kopplungskonstante von 8.2. Hierbei handelte es sich um das Signal von H-6, das zu H-5 eine *ortho*-Kopplung aufwies. Allerdings war das Signal etwas verbreitert, da das Proton zusätzlich noch eine *meta*-Kopplung zu H-2 zeigte. H-5 ergab ein Dublett mit der

Kopplungskonstante 7.6 bei 6.93 ppm. H-2 wies ein breites Singulett bei 7.23 ppm auf. Die Verbreiterung dieses Signals war auch hier auf die *meta*-kopplung zu H-6 zurückzuführen, die zu klein war, um eine Aufspaltung des Signals hervorzurufen. Schliesslich fand sich das Signal der Protonen der Methoxygruppe bei 3.91 ppm als Singulett mit einer Integration von 3 Protonen. Nach Vergleich der NMR-Daten mit den entsprechenden Literaturdaten (gemessen in CDCl_3 , Aldrich 1992) konnte die Verbindung als Vanillin identifiziert werden. Vanillin ist aus *Vanilla planifolia* seit langem bekannt (Walton et al. 2003) und wurde mittlerweile auch aus diversen anderen Pflanzen isoliert. Aus *Alstonia scholaris* wurde es hier zum ersten Mal isoliert.

Vanillin

Systematischer Name	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd
Beschreibung	farbloses Pulver mit charakteristischem Geruch
Molekulargewicht	152 g/mol
ESI-MS (m/z)	153.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (positiv) 151.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (negativ)
Summenformel	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$
Substanzmenge	0.5 mg
Retentionszeit	16.3 min



Tab E20: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Vanillin (aufgenommen in CD_3OD)

Vanillin	
	δ_{H} (J Hz)
2	7.23 s breit
5	6.93 d (7.6)
6	7.43 d (8.2) breit
3-OCH ₃	3.91 s
1-CH=O	9.74 s

Endophyten aus *Alstonia scholaris*:

Vertreter der Substanzklasse der Palmarumycine wurden bisher unter anderem aus Pilzen der Gattung *Coniothyrium* isoliert (Krohn et al. 1994). Ihr Vorkommen in Pflanzen ist dagegen eher untypisch. Um zu klären, ob in der Rinde von *Alstonia scholaris* ein endophytischer Pilz vorlag, der für die Produktion von Sch53823 in Frage kommen würde, wurde wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.10., beschrieben aus der Droge DNA isoliert, die dann mit pilzspezifischen Primern mittels PCR amplifiziert und anschliessend gereinigt und sequenziert wurde. Dabei konnte aus der Rinde von *Alstonia scholaris* die DNA von drei verschiedenen Pilzen isoliert und die DNA von zwei von diesen Pilzen mittels PCR amplifiziert und anschliessend sequenziert werden. Die jeweiligen Basensequenzen der isolierten DNA sind im Anhang aufgeführt. Die DNA einer dieser Pilze zeigte beim Vergleich mit GenBank 99% Übereinstimmung mit der des Endophyten *Botryosphaeria rhodina* (Eintragsnummer gi 47679600 gb AY612337.1). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei diesem Pilz um *Botryosphaeria rhodina* handelte.

Das Vorliegen von pilzlicher DNA im Pflanzenmaterial von *Alstonia scholaris* deutete darauf hin, dass Sch53823 möglicherweise nicht von der Pflanze selbst, sondern vermutlich von einem der drei nachgewiesenen Pilze synthetisiert wurde.

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden von Ine Dewi Indriani im Arbeitskreis von Juniorprofessor Dr. Rainer Ebel durchgeführt.

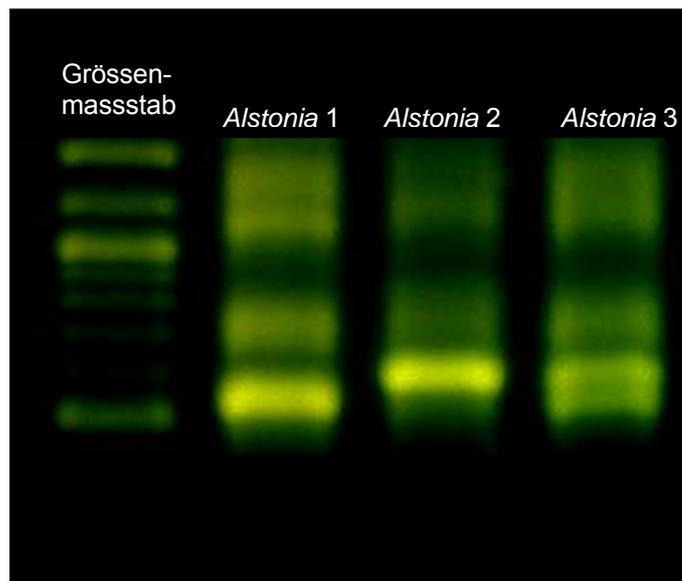


Abb. E18: Ergebnis der PCR mit der aus der Rinde von *Alstonia scholaris* isolierten Pilz-DNA. Die drei Banden zeigen, dass in der Pflanze DNA von drei verschiedenen Pilzen vorlag.

3.4. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften von den isolierten Inhaltsstoffen *in vitro* mittels DPPH-Assay

Bei diesem *in vitro*-Assay wurden quantitativ die antioxidativen bzw. Radikalfänger-Eigenschaften der isolierten Inhaltsstoffe in bezug auf die Positivkontrolle Propylgallat bestimmt. Dabei wurde wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.5. beschrieben die abnehmende Absorption einer DPPH-Lösung photometrisch vermessen. Die gemessene Absorption nach zwei min wurde der Berechnung der prozentualen antioxidativen Aktivität zugrunde gelegt.

In Tabelle **E21** sind die prozentualen Werte der antioxidativen Aktivität der jeweiligen Reinsubstanzen angegeben. In Abbildung **E19** sind die gleichen Ergebnisse nocheinmal in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

Tab. E21: Antioxidative Aktivität [\pm SD] der untersuchten Reinsubstanzen (76 μ M) bezogen auf Propylgallat (n=3, *= P <0.05)

Substanz	Aktivität in %
1 Methanol = Lösungsmittelkontrolle	0.0
2 Propylgallat = Referenzsubstanz	100.0
3 Cumarin	7.6 \pm 5
4 8-Hydroxycumarin	7.5 \pm 8
5 5-Hydroxycumarin	8.9 \pm 7
6 Pinoresinol	19.0 \pm 3*
7 9 α -Hydroxypinoresinol	10.7 \pm 4*
8 Salicifoliol	3.1 \pm 2
9 Apigenin	0.3 \pm 4
10 Luteolin	81.8 \pm 5*
11 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol	-0.2 \pm 1
12 Kämpferol	85.9 \pm 8*
13 (-)-Catechin	75.7 \pm 2*
14 (-)-Epicatechin	72.0 \pm 4*
15 (+)-Catechin	86.1 \pm 2*
16 Acteosid	98.6 \pm 0*
17 Isoacteosid	98.2 \pm 0*
18 Vanillin	3.2 \pm 0*
19 Sch53823	4.7 \pm 2*

Zusätzlich zu den isolierten Pflanzeninhaltsstoffen wurden für einen Vergleich mit 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol das Aglykon Kämpferol und für den Vergleich mit (-)-Catechin dessen Enantiomer (+)-Catechin getestet. Das aus der Rinde von *Guazuma ulmifolia* isolierte Procyanidin B2 (oder Procyanidin B5) konnte hier nicht mehr getestet werden, da es sich im Rahmen der Strukturaufklärung beim Erhitzen während der NMR-Experimente zersetzt hatte (3.3.1.2.). Die aus der gleichen Droge isolierten Stoffe (+)-Abscisinsäure und 7-Hydroxy-6-methoxycumarin wurden ebenfalls nicht getestet, da die isolierte Substanzmenge jeweils zu gering war.

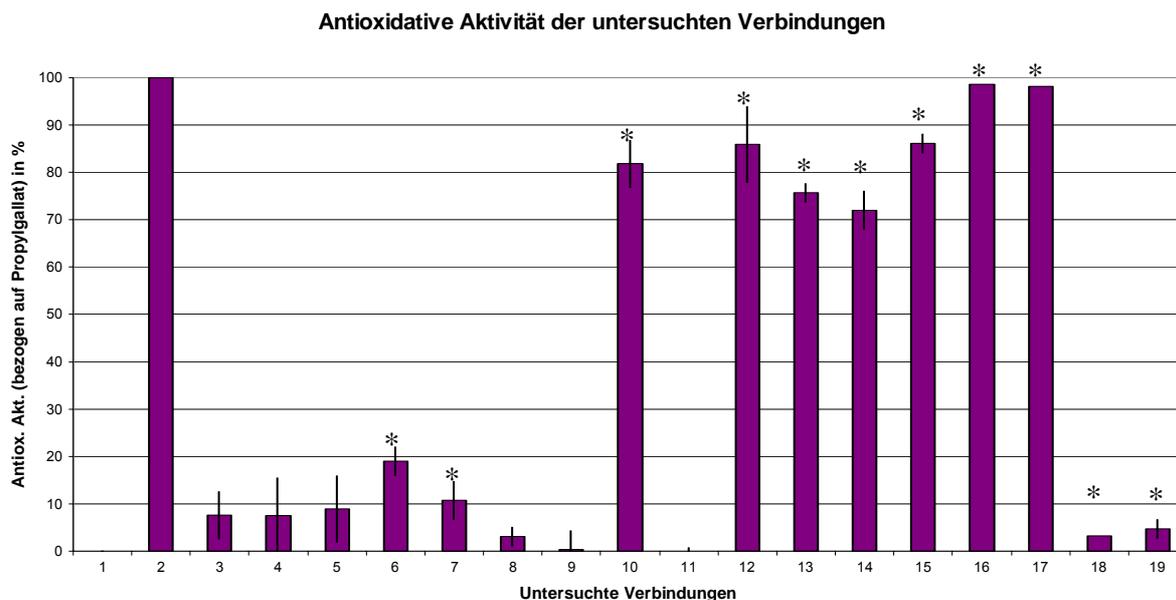


Abb. E19: Antioxidative Aktivität der untersuchten Reinsubstanzen in Prozent [\pm SD], bezogen auf Propylgallat

Die Lignane Pinoresinol (6) und 9α -Hydroxypinoresinol (7) zeigten nur geringe antioxidative Effekte. Die Flavonoide Luteolin (10) und Kämpferol (12), das Aglykon von 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol (11), sowie Acteosid (16), Isoacteosid (17), (-)-Catechin (13), (+)-Catechin (15) und (-)-Epicatechin (14) fielen durch starke antioxidative Aktivität auf, die hinsichtlich der Höhe der des Propylgallats (2) vergleichbar war. 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol selbst (11) sowie Apigenin (9), Salicifoliol (8), Sch53823 (19), Vanillin (18) und die isolierten Cumarine (3-5) zeigten dagegen keine antioxidative Aktivität (**Tab. E21** und **Abb. E19**).

Die am stärksten aktiven Verbindungen Pinoresinol (6), Luteolin (10), Kämpferol (12), Acteosid (16), Isoacteosid (17), (-)-Catechin (13), (+)-Catechin (15) und (-)-Epicatechin (14) wurden an H4IIE- und C6-Zellen in verschiedenen Assays weiter untersucht, um ihre antioxidativen Eigenschaften in zellulären Systemen charakterisieren zu können (3.5.). Desweiteren wurden mit Pinoresinol, Luteolin, Kämpferol, (+)-Catechin, Acteosid und Isoacteosid Aufnahmestudien an H4IIE-Zellen durchgeführt (3.5.3.).

(+)-Catechin war zuvor am Institut für Toxikologie in verschiedenen Assays untersucht worden und hatte dabei weder eine signifikante Zytotoxizität noch

protektive Eigenschaften im Hinblick auf oxidativen Stress gezeigt (Wätjen et al. 2005). Ausserdem war mit (+)-Catechin keine apoptotische DNA-Leiter-Bildung, keine Caspase-3-Aktivierung und keine Induktion von DNA-Strangbrüchen aufgetreten.

Bei den Aufnahmestudien konnte dann nachgewiesen werden, dass (+)-Catechin weder von H4IIE- noch von C6-Zellen aufgenommen wurde (3.5.3., **Tab. E22**). Da (-)-Catechin und (-)-Epicatechin ebenso wie (+)-Catechin im Neutralrotassay keinerlei Zytotoxizität zeigten (3.5.1.), wurde angenommen, dass diese Verbindungen sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften und in der Aufnahme in Zellen nicht vom (+)-Catechin unterscheiden. Daher wurde bei (-)-Catechin und (-)-Epicatechin auf weitere Assays sowie auf Aufnahmestudien verzichtet.

3.5. Charakterisierung der zellulären Eigenschaften der isolierten Inhaltsstoffe (H4IIE- und C6-Zellen)

3.5.1. Bestimmung der Zytotoxizität

3.5.1.1. Neutralrotassay

I.) Flavonoide und Pinoresinol

Für die Untersuchung der Zytotoxizität von Kämpferol, Luteolin oder Pinoresinol wurden H4IIE-Zellen 24 Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen inkubiert und nach dreistündiger Inkubation mit dem Farbstoff die Neutralrotakkumulation gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen **E20** bis **E22** dargestellt.

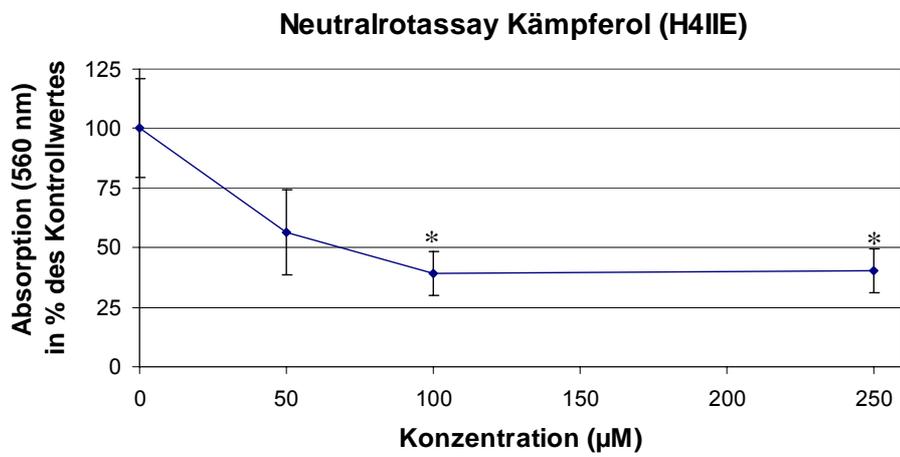


Abb. E20: Zytotoxizität von Kämpferol in H4IIE-Zellen (n=4, \pm SEM)

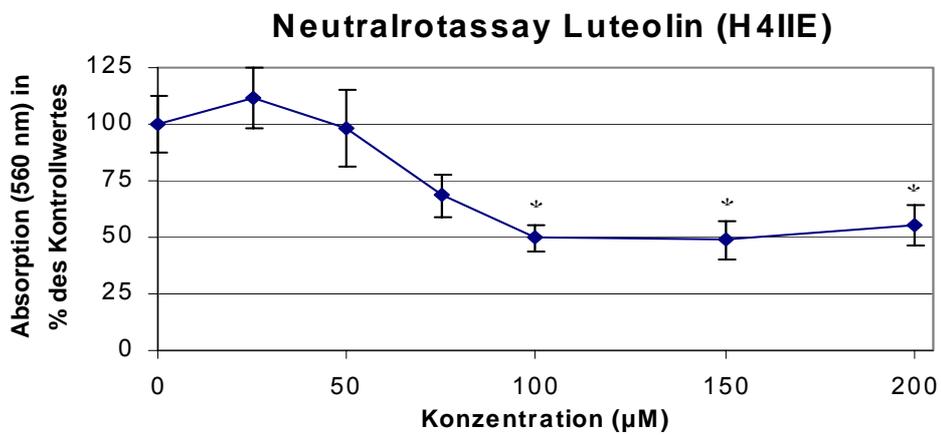


Abb. E21: Zytotoxizität von Luteolin in H4IIE-Zellen (n=3, \pm SEM)

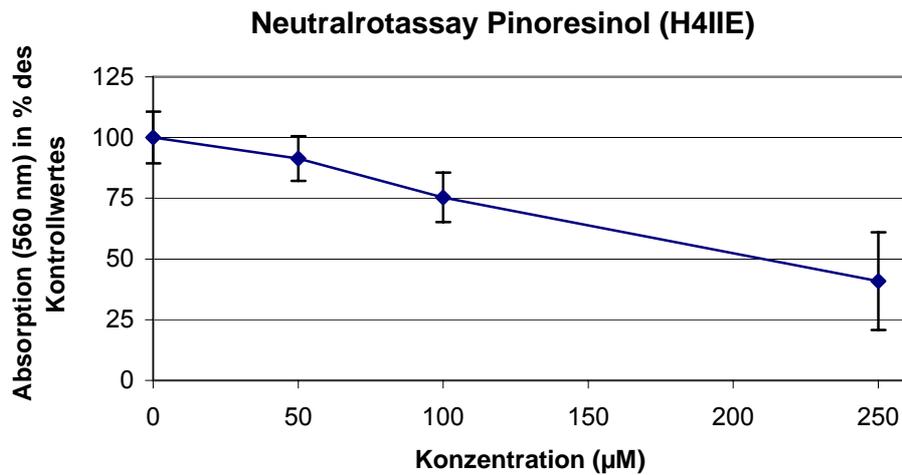


Abb. E22: Zytotoxizität von Pinoresinol in H4IIE-Zellen (n=3, \pm SEM)

In Abbildung **E23** sind noch einmal die prozentualen Werte für die lebensfähigen Zellen (in Prozent des Kontrollwertes) nach Inkubation mit jeweils 100 µM Luteolin, Kämpferol und Pinoresinol einander gegenübergestellt, um die Zytotoxizitäten dieser drei Substanzen direkt vergleichen zu können.

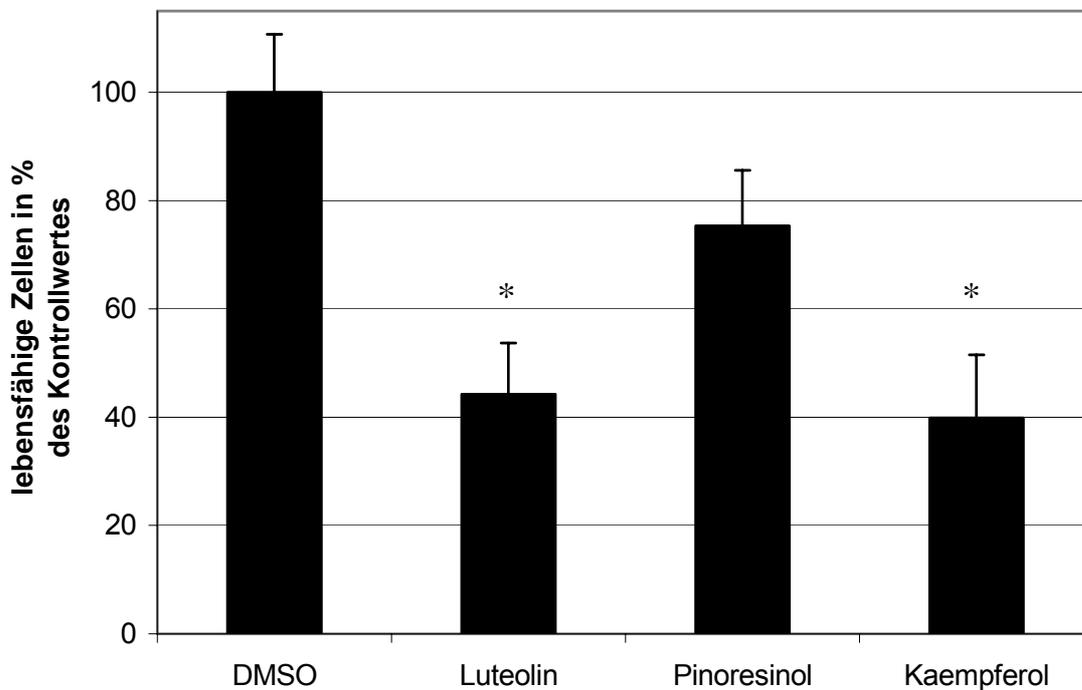


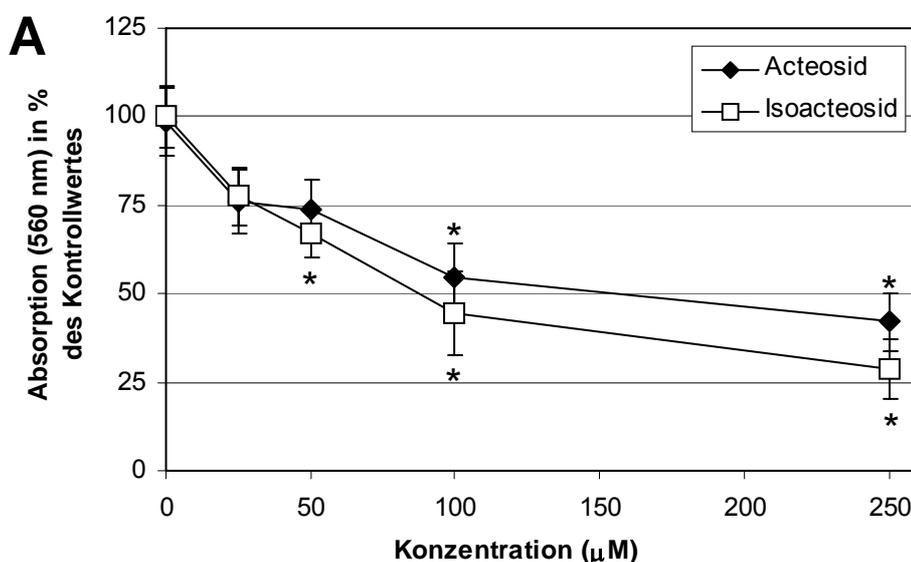
Abb. E23: Lebensfähige Zellen nach Inkubation mit jeweils 100 µM Kämpferol, Luteolin und Pinoresinol in H4IIE-Zellen in Prozent des Kontrollwertes (\pm SEM, n=4, $P < 0.05$)

Die Inkubation der H4IIE-Zellen mit Kämpferol, Luteolin oder Pinoresinol (100 μM) wirkte sich negativ auf die Lebensfähigkeit der Zellen aus. Dabei führte die Inkubation mit Kämpferol oder Luteolin zu einer Abnahme der Neutralrot-Aufnahme auf etwa 40% des Kontrollwertes, während Pinoresinol im Vergleich dazu einen geringeren Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte und zu einer Abnahme der Neutralrot-Aufnahme auf nur ca. 75% des Kontrollwertes führte (**Abb. E23**). Die EC_{50} -Werte von Kämpferol, Luteolin und Pinoresinol betragen jeweils 70, 100 und 215 μM .

Apigenin zeigte nur einen sehr schwachen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen; sein EC_{50} -Wert war grösser als 250 μM . Da 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol im DPPH-Assay inaktiv war (3.4.), schien diese Verbindung nicht vielversprechend genug, um sie weiter zu untersuchen, und wurde deshalb auch nicht auf ihre Zytotoxizität hin getestet.

II.) Acteoside und Catechine

Für die Untersuchung der Zytotoxizität von Acteosid, Isoacteosid, (+)-Catechin, (-)-Catechin und (-)-Epicatechin wurden H4IIE- bzw. C6-Zellen 24 Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen inkubiert, und nach dreistündiger Inkubation mit dem Farbstoff wurde die Neutralrotakkumulation gemessen.



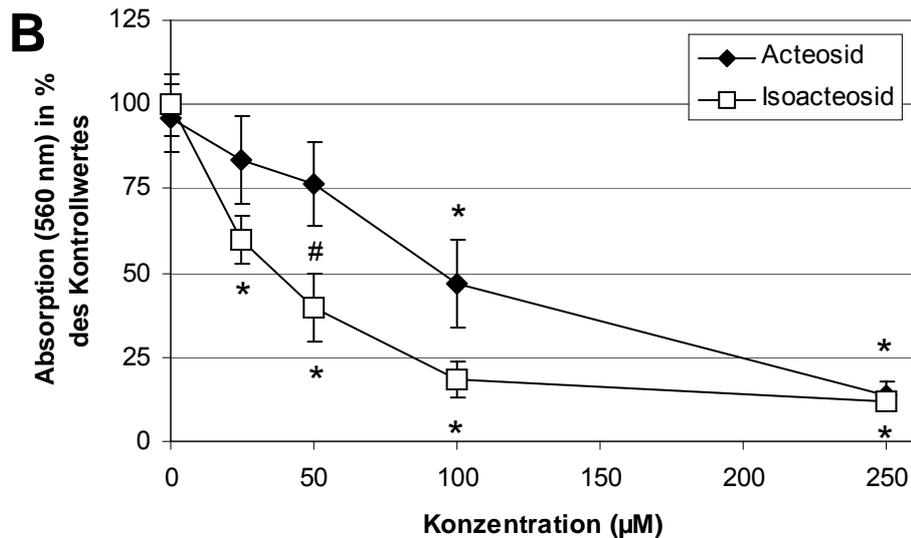


Abb. E24: Vergleich der Zytotoxizitäten von Acteosid und Isoacteosid in H4IIE-Zellen (A) und C6-Zellen (B) ($n=6$, \pm SEM, * = $P < 0.05$, # = Signifikanter Unterschied zwischen Acteosid und Isoacteosid)

Im Neutralrottest zeigte Acteosid in H4IIE-Zellen gegenüber Isoacteosid keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich seines Einflusses auf die Neutralrot-Aufnahme (**Abb. E24 A**). In den C6-Zellen führte jedoch Isoacteosid mit einem EC_{50} -Wert von $41 \mu\text{M}$ zu einer signifikant stärkeren Abnahme der lebensfähigen Zellen als Acteosid, dessen EC_{50} -Wert $100 \mu\text{M}$ betrug (**Abb. E24 B**).

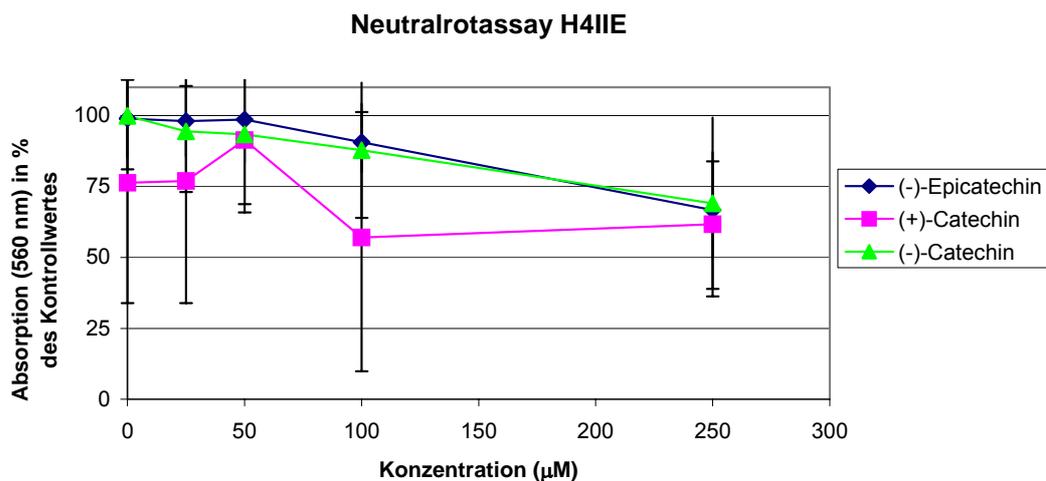


Abb. E25: Zytotoxizität von (+)-Catechin, (-)-Catechin und (-)-Epicatechin in H4IIE- Zellen ($n=2$, \pm SEM)

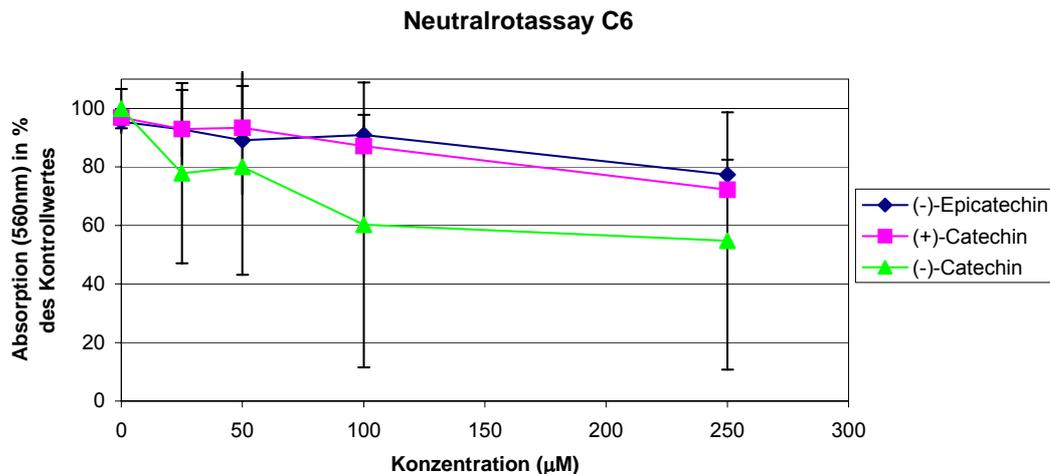


Abb. E26: Zytotoxizität von (+)-Catechin, (-)-Catechin und (-)-Epicatechin in C6-Zellen (n=2, ± SEM)

Die Abbildungen **E25** und **E26** zeigen, dass (+)-Catechin, (-)-Catechin und (-)-Epicatechin sowohl in H4IIE- als auch in C6-Zellen nicht signifikant zytotoxisch sind (EC_{50} -Werte > 250 µM).

3.5.1.2. Apoptosenachweis: Nachweis von DNA-Leiter-Bildung

Weder Acteosid noch Isoacteosid führten zur Bildung einer DNA-Leiter (Ergebnisse nicht abgebildet). Sie induzierten also keine Apoptose.

3.5.2. Bestimmung der protektiven Effekte

3.5.2.1. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies: DCF-Assay

I.) Luteolin, Kämpferol und Pinoresinol

Um die protektiven Effekte der zu testenden Substanzen gegenüber H_2O_2 -vermittelter DCF-Bildung zu untersuchen, wurden H4IIE-Zellen wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.6.3.1. beschrieben eine Stunde lang mit 10 µM Kämpferol, Luteolin oder Pinoresinol vorinkubiert. Nach Zugabe der Fluoreszenzsonde H_2DCF/DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, 50 µM) wurde nach einer halben Stunde die ROS-Bildung mit einem Fluorimeter gemessen. Nach einer

Stunde wurden die Zellen mit 1 mM H_2O_2 inkubiert, und die protektiven Effekte von Kämpferol, Luteolin und Pinoresinol gegenüber H_2O_2 -vermittelter DCF-Bildung wurden analysiert.

Die Fluoreszenzsonde $\text{H}_2\text{DCF/DA}$ kann über die Zellmembran diffundieren und wird in der Zelle enzymatisch von Esterasen zu 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein gespalten. H_2DCF ist hydrophil, kann daher nicht über die Zellmembran zurückdiffundieren, und wird somit in den Zellen angereichert. Die Fluoreszenzsonde liegt also nur intrazellulär vor, und es ist somit sichergestellt, dass nur intrazellulär DCF gebildet werden kann.

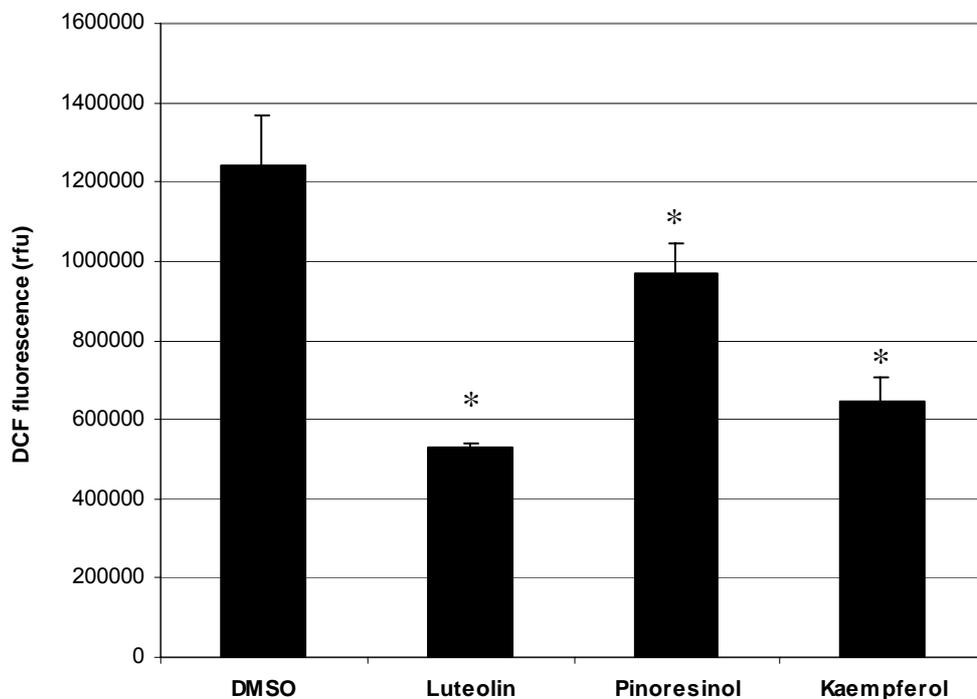


Abb. E27: Protektive Effekte von Kämpferol, Luteolin und Pinoresinol gegenüber H_2O_2 -vermittelter DCF-Bildung in H4IIE-Zellen (DCF-Fluoreszenz nach 60 min \pm SEM, $n=3$, $P<0.05$)

Die Inkubation mit H_2O_2 führte zu einem intrazellulären Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies, die in Form der Oxidation des intrazellulär vorliegenden nichtfluoreszierenden H_2DCF zum stark fluoreszierenden DCF gemessen wurde. Wurden die Zellen eine Stunde lang mit 10 μM Kämpferol oder Luteolin vorinkubiert, wurde der Anstieg der H_2O_2 -vermittelten intrazellulären DCF-Bildung stark inhibiert,

während der antioxidative Effekt von Pinoresinol im Vergleich dazu weniger ausgeprägt war (**Abb. E27**).

II.) Acteoside

Die Zellen wurden hier eine Stunde lang mit 10 μM Acteosid bzw. Isoacteosid vorinkubiert, dann die Fluoreszenzsonde hinzugegeben und nach einer halben Stunde fluorimetrisch die ROS-Bildung gemessen. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 (100, 250, 500 und 1000 μM) inkubiert, und dann wurden die protektiven Effekte von Acteosid und Isoacteosid gegenüber H_2O_2 -vermittelter DCF-Bildung analysiert.

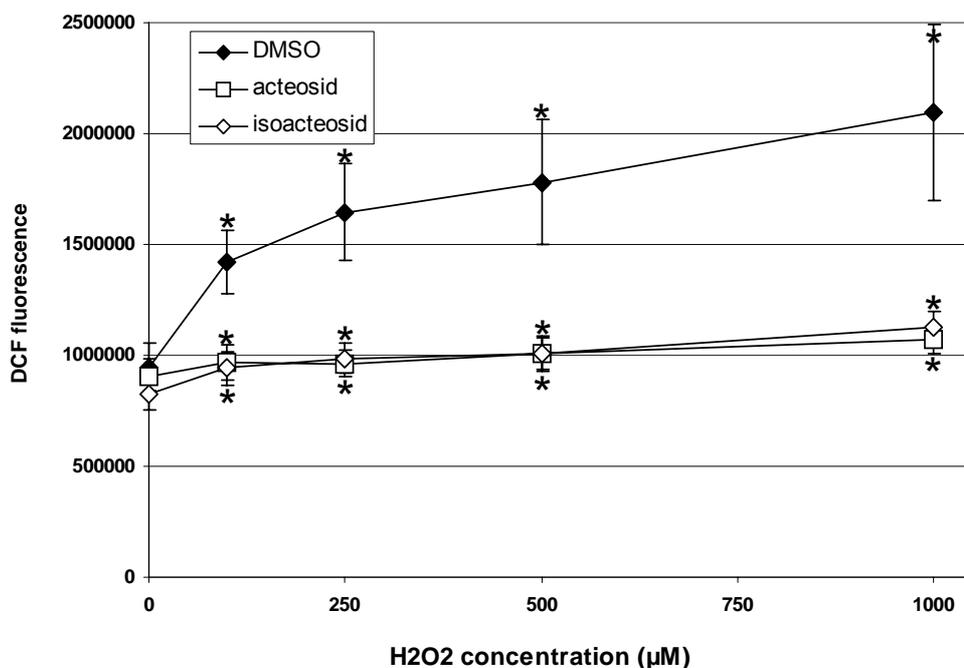


Abb. E28: Protektive Effekte von Acteosid und Isoacteosid gegenüber H_2O_2 -vermittelter DCF-Bildung in H4IIE-Zellen

Auch Acteosid und Isoacteosid zeigten eine deutliche Abnahme der H_2O_2 -vermittelten DCF-Bildung und damit einen protektiven Effekt gegenüber oxidativem Stress. Dabei war das Ausmass der protektiven Wirkung für beide Substanzen im wesentlichen gleich.

3.5.2.2. Nachweis von DNA-Strangbrüchen: Comet-Assay

Um die protektiven Effekte von Kämpferol, Luteolin und Pinoresinol gegenüber H_2O_2 -vermittelter Entstehung von DNA-Strangbrüchen zu analysieren, wurden H4IIE-Zellen zunächst eine Stunde lang mit diesen Substanzen ($50 \mu M$) vorinkubiert. Dann erfolgte eine zweistündige Inkubation mit $500 \mu M H_2O_2$. Entstandene DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) detektiert. In Abbildung **E29** ist die durchschnittliche Länge der jeweiligen Kometen (Zellkern plus Kometenschweif) im Elektrophoresegel in μm angegeben, die das Ausmass der H_2O_2 -vermittelten DNA-Strangbrüche mit und ohne die getesteten Substanzen repräsentiert. In Abbildung **E30** sind repräsentative Bilder der Abnahme der H_2O_2 -vermittelten Entstehung von DNA-Strangbrüchen gezeigt.

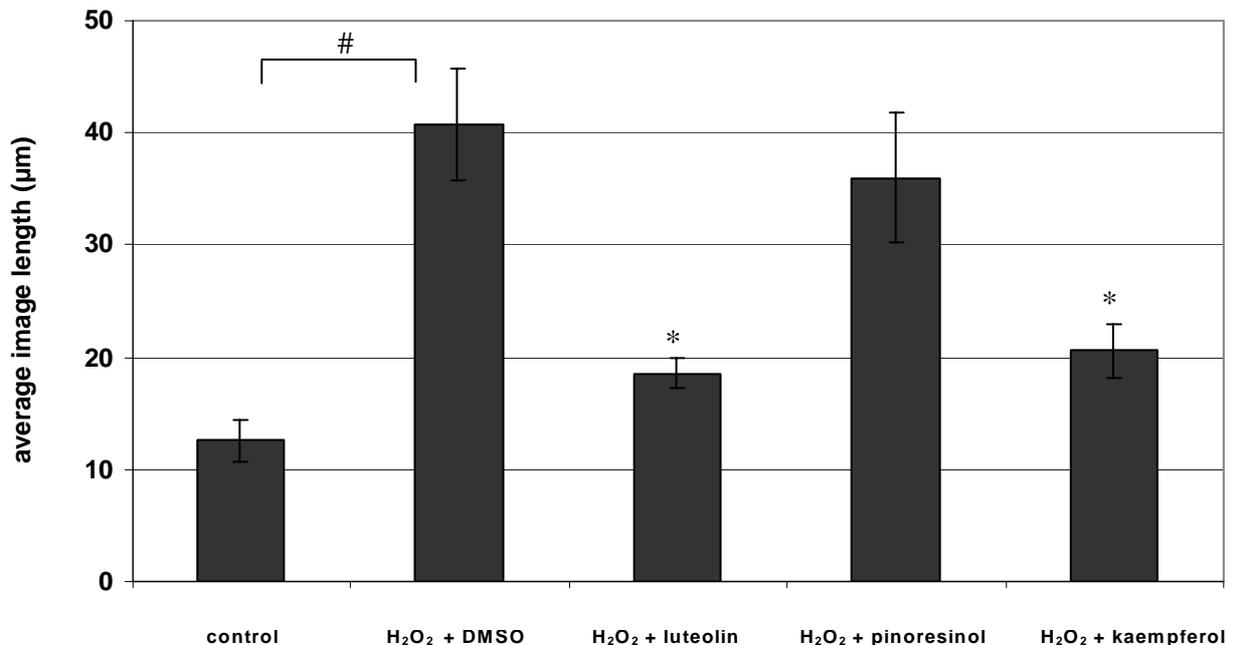


Abb. E29: Comet-Assay mit Luteolin, Pinoresinol und Kämpferol in H4IIE-Zellen-
Durchschnittliche ‚Image Length‘ [\pm SD, $n=3$, $P<0.05$]

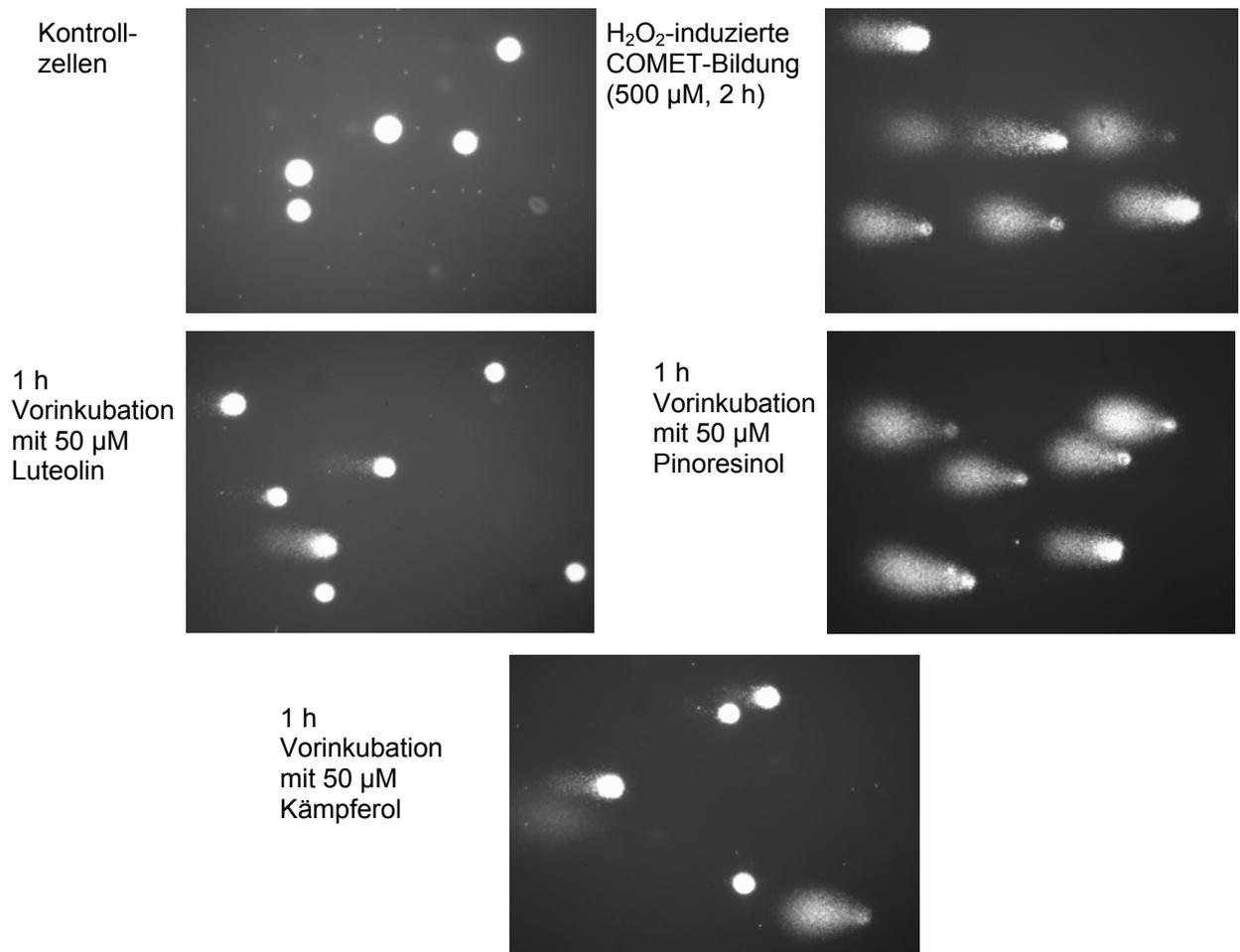


Abb. E30: Comet-Assay (repräsentative Bilder): Protektive Effekte von Kämpferol, Luteolin und Pinoresinol gegenüber H₂O₂-vermittelter Entstehung von DNA-Strangbrüchen

Der oxidative Stress führte in den H4IIE-Zellen zu einem dosisabhängigen Anstieg von DNA-Strangbrüchen. Im Comet-Assay wurde ein Anstieg der durchschnittlichen Kometenlänge (Zellkern plus Kometenschweif) von $12.56 \pm 1.8 \mu\text{m}$ (Kontrolle) auf $40.8 \pm 4.9 \mu\text{m}$ ($500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 2 h) gemessen. Die Vorinkubation der Zellen mit $50 \mu\text{M}$ Luteolin oder Kämpferol (1 h) verminderte die H₂O₂-vermittelte Entstehung von DNA-Strangbrüchen um 70 bis 80 %, während die Inkubation mit Pinoresinol keine signifikante Reduktion bewirkte (**Abb. E29** und **E30**).

3.5.2.3. Nachweis von Apoptosehemmung: Caspase-Assay

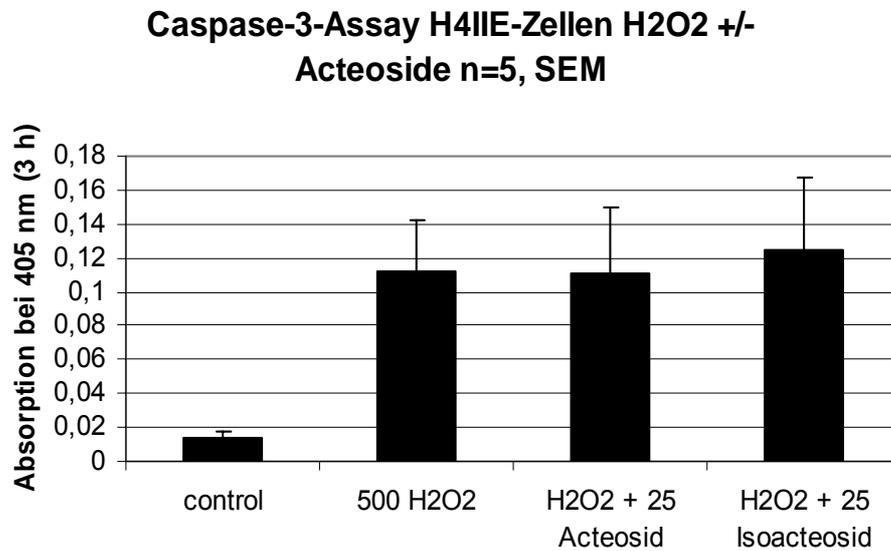


Abb. E31: Caspase-Assay: Absorption mit und ohne einstündige Vorinkubation mit Acteosid bzw. Isoacteosid (\pm SEM, n = 5)

Weder Acteosid noch Isoacteosid zeigte eine signifikante Caspase-3-Hemmung. Das heisst, dass beide Substanzen nicht in der Lage sind, H4IIE-Zellen vor H₂O₂-induzierter Apoptose zu schützen.

3.5.3. Ergebnisse der Aufnahmestudien

I.) Aufnahmestudien mit Quercetin

Die Aufnahmestudien wurden zunächst wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.6.3.6. beschrieben mit Quercetin (Fa. Sigma) an H4IIE-Zellen etabliert. Dazu wurde eine Quercetinkonzentration von 500 μM im Zellkulturmedium eingesetzt.

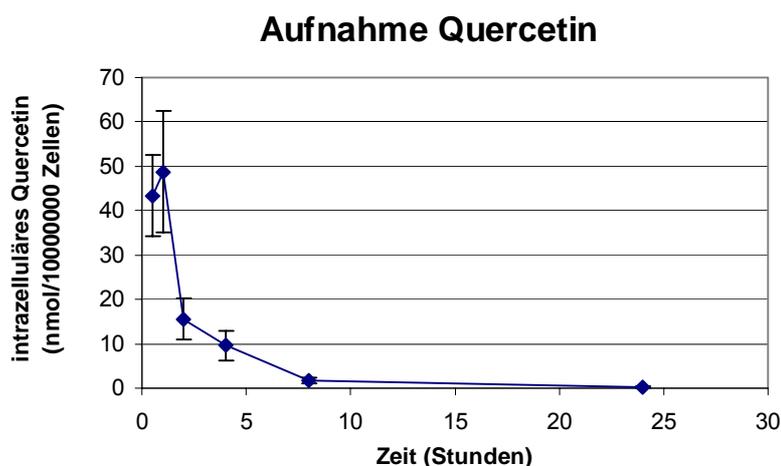


Abb. E32: Zeitabhängige Quercetinaufnahme in H4IIE-Zellen (n=4, \pm SEM)

Nach 30 min konnten schon 43.38 ± 9.23 nmol/ 10^6 Zellen Quercetin in den Zellen nachgewiesen werden. Nach 60 min erreichte die intrazelluläre Quercetinkonzentration ihr Maximum von 48.75 ± 13.67 nmol/ 10^6 Zellen und sank dann innerhalb der folgenden 23 Stunden auf 0.18 ± 0.16 nmol/ 10^6 Zellen ab. Bereits nach 60 min begann die Quercetinkonzentration in den Zellen zu sinken (**Abb. E32**), was vermuten liess, dass das Flavonoid metabolisiert und dann aus den Zellen eliminiert wurde. Da bei der Probe, die vier Stunden mit Quercetin inkubiert worden war, im HPLC-Chromatogramm zusätzliche Peaks nach 13.53, 13.78 und 15.61 min mit UV-Spektren auftraten, die denen von Quercetins ähnlich waren (**Abb. E33**), wurde die Probe zusätzlich per LC-MS untersucht. Dabei wurde für jeden dieser drei zusätzlichen Peaks ein Molekulargewicht m/z des [M-H]-Ions von 477 ermittelt, das zu [M-H]-Ionen mit m/z von 301 fragmentierte. Das Molekulargewicht von 478 entspricht dem eines Quercetinglucuronids, das Molekulargewicht von 302 dem Quercetinaglykon. Da diese Peaks zu verschiedenen Retentionszeiten auftraten, ist

es offensichtlich, dass Quercetin in den Zellen an verschiedenen Positionen des Moleküls glucuronidiert wurde.

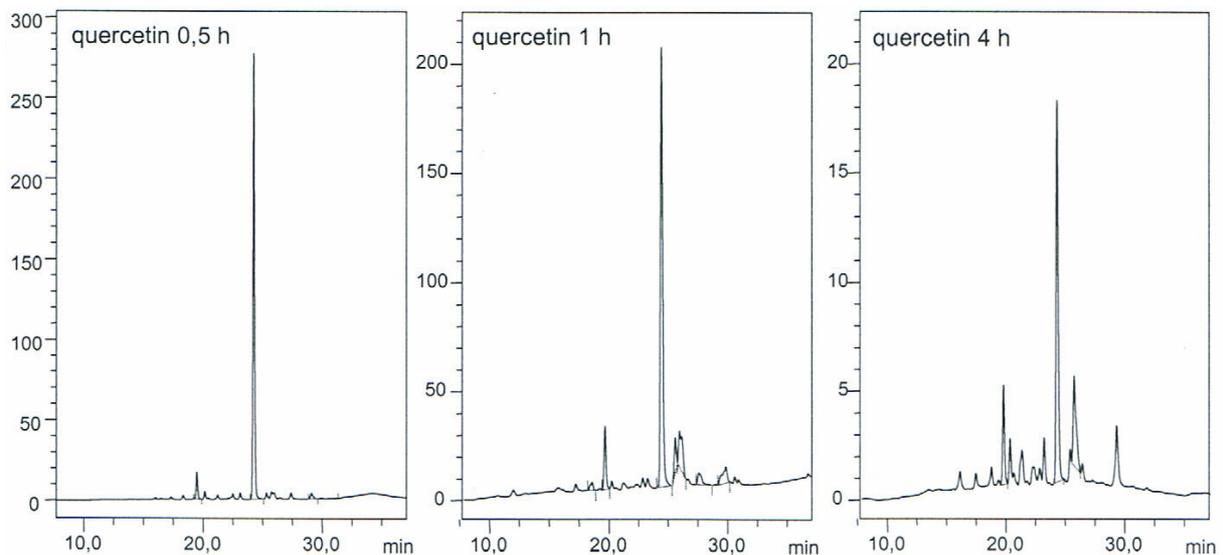


Abb. E33: HPLC-Chromatogramme der Zellextrakte mit Quercetin nach 0.5, 1 und 4 Stunden (H4IIE-Zellen)

Nachweis von Quercetin im überstehenden Zellkulturmedium

Um die Menge von aufgenommenem und im Medium verbliebenem Quercetin zu bilanzieren, sollte die Konzentration von Quercetin im überstehenden Medium bestimmt werden. Dazu wurden jeweils 100 μl des Mediums (Anfangskonzentration an Quercetin: 500 μM), mit dem die H4IIE-Zellen eine Stunde lang inkubiert worden waren, mit 400 μl MeOH versetzt, um Medium- und Zellproteine auszufällen. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm wurde der Überstand in der HPLC untersucht und die Substanz wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.6.3.6. beschrieben quantifiziert. Dabei fiel auf, dass im untersuchten Medium nur noch eine Konzentration von 264 μM Quercetin wiedergefunden wurde, obwohl eine Konzentration von 500 μM eingestellt worden war und die Zellen nach einer Stunde nur 48.7 nmol Quercetin/ 10^6 Zellen aufgenommen hatten. Es wurde angenommen, dass die H4IIE-Zellen als Zellen mit hoher metabolischer Aktivität Enzyme in das Medium sezernieren, die Quercetin abbauen. Deshalb wurde der gleiche Versuch mit Medium, das zuvor nicht mit den Zellen in Berührung gekommen war, durchgeführt. Dazu wurden wie in ‚Material und Methoden‘ Abschnitt 2.6.3.6. beschrieben 7.55 mg

Quercetin in 100 μl DMSO als Lösungsvermittler gelöst, und 5 ml des Mediums wurden mit 10 μl dieser Lösung versetzt, so dass sich für Quercetin eine Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ ergab. 100 μl dieser Lösung wurden mit 400 μl MeOH versetzt, und anschliessend wurde weiter verfahren wie bei den Medien aus der Zellkultur. Dabei stellte sich heraus, dass die geringe Quercetinkonzentration im Medium keine Folge des Abbaus durch in das Medium sezernierte Enzyme sein konnte, denn im Medium, das nicht mit den Zellen in Berührung gekommen war, wurde sogar nur eine Quercetinkonzentration von $77.20 \pm 0.96 \mu\text{M}$ wiedergefunden.

In der Annahme, dass sich im Medium noch Proteine befinden, die mit den Flavonoiden kovalente Bindungen oder Komplexe eingehen können und so die Detektion in der HPLC verhindern, wurde dieser Versuch mit Medium wiederholt, das zuvor autoklaviert worden war, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren und so eine unspezifische Reaktion der Flavonoide mit Proteinen bzw. einen enzymatischen Abbau der Flavonoide (z.B. durch Peroxidasen) auszuschliessen. Der gleiche Versuch wurde parallel mit Medium durchgeführt, das bereits mit der Zellkultur in Kontakt gekommen war.

Auch hier konnten jedoch nur sehr niedrige Quercetinkonzentrationen nachgewiesen werden. Sie betragen für das frische, autoklavierte Medium $54.18 \pm 1.32 \mu\text{M}$, für das autoklavierte Medium, das bereits mit der Zellkultur in Kontakt gewesen war, $29,62 \pm 2,92 \mu\text{M}$ und für das nicht autoklavierte Zellkulturmedium sogar noch $77.82 \pm 11.31 \mu\text{M}$.

Da bei keinem der vier Versuchsansätze die Anfangskonzentration von 500 μM Quercetin wiedergefunden wurde, liegt der Schluss nahe, dass die Proteine bei der Abnahme der Quercetinkonzentration keine signifikante Rolle spielen. Vielmehr fällt auf, dass in den Ansätzen, in denen die höchsten Proteinkonzentrationen zu erwarten sind, nämlich in den nicht autoklavierten Medien, höhere Quercetinkonzentration gemessen wurden als in den autoklavierten Medien, die keine intakten Proteine mehr enthalten. So wurde in dem nicht-autoklavierten Medium, das schon Kontakt mit den Zellen hatte und damit der Ansatz mit der höchsten Protein- und Enzymkonzentration sein müsste, eine Quercetinkonzentration gefunden, die der in nicht-autoklaviertem reinen Medium entspricht (ca. 77 μM). Diese Konzentration ist signifikant höher als die in den beiden Ansätzen mit autoklavierten Medium.

Konzentrationsabhängige Aufnahme von Quercetin in H4IIE- und C6-Zellen

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Quercetinaufnahme zu untersuchen und um die Aufnahme in H4IIE- sowie C6-Zellen zu vergleichen, wurden beide Zelllinien mit verschiedenen Quercetinkonzentrationen (50, 100, 250 und 500 μM) jeweils 1h Stunden inkubiert und dann die Aufnahme in die Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung **E34** dargestellt.

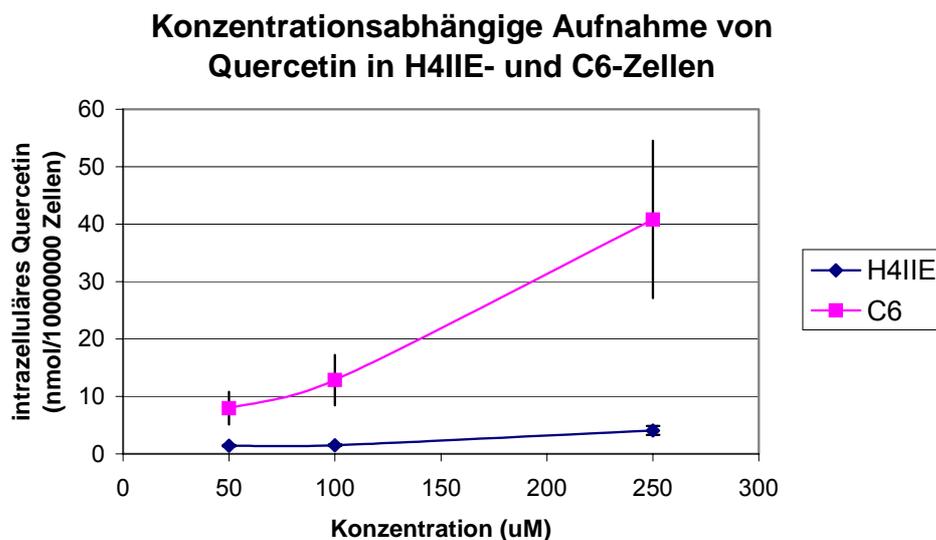


Abb. E34: Konzentrationsabhängige Quercetinaufnahme
Vergleich zwischen H4IIE- und C6-Zellen

Abbildung **E34** zeigt, dass in C6-Zellen grössere Mengen Quercetin nachweisbar waren als in H4IIE-Zellen. Dies ist damit zu erklären, dass die letzteren Quercetin in höherem Masse abbauen als die metabolisch inaktiven C6-Zellen.

Einfluss verschiedener Transportinhibitoren auf die Quercetinaufnahme in H4IIE-Zellen

Um herauszufinden, auf welchem Weg Quercetin in die Zellen gelangt, wurde der Einfluss verschiedener Transportinhibitoren auf die Quercetinaufnahme in H4IIE-Zellen untersucht. Dabei zeigten Phloridzin (Glucosetransport-Inhibitor), ZnCl_2 , CdCl_2 , Verapamil und Nifedipin (Ca^{2+} -Kanal-Blocker) keinen Einfluss auf die Quercetinaufnahme. Vanadat, ein ATPase-Hemmstoff, inhibierte in einer Konzentration von 100 μM die Aufnahme in die Zellen zu 100 % (500 μM Quercetin

im Medium). Allerdings führte Vanadat auch zu einer Ausflockung von Quercetin im Medium, so dass eine fehlende Aufnahme durch die Zellen auch auf die daraus resultierende fehlende Löslichkeit zurückzuführen sein kann. Deshalb gibt dieses Experiment lediglich einen Hinweis darauf, dass das Quercetin aktiv in die Zellen aufgenommen werden könnte.

II.) Untersuchung der Aufnahme weiterer Flavonoide in H4IIE-Zellen

Analog den Quercetinaufnahmestudien wurde weitere Aufnahmestudien mit Rutin als 3-Rhamnoglucosid des Quercetins, Morin, Myricetin, Taxifolin, (+)-Catechin und Fisetin an H4IIE- und C6-Zellen durchgeführt. Hier wurde jeweils nur untersucht, ob das jeweilige Flavonoid nach einer Stunde Inkubation mit 500 μM von der jeweiligen Zelllinie aufgenommen wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle E 22 zusammengefasst.

Tab. E22: Aufnahme von Flavonoiden in H4IIE-Zellen nach einer Stunde Inkubation mit dem jeweiligen Flavonoid (Flavonoidkonzentration im Medium 500 μM , n.d. = nicht detektierbar)

getestete Flavonoide	intrazelluläre Flavonoide [nmol/10 ⁶ Zellen]
Rutin	n.d.
Morin	2.35 \pm 0.38
Myricetin	0.22 \pm 0.22
Taxifolin	0.2 \pm 0.2
(+)-Catechin	n.d.
Fisetin	12.67 \pm 2.65

III.) Aufnahmestudien mit den Reinsubstanzen aus den indonesischen Heilpflanzen

Nachdem die Aufnahmestudien mit gekauften Substanzen etabliert worden waren, wurden nun Aufnahmestudien in H4IIE-Zellen mit den aus den indonesischen Pflanzen isolierten Inhaltsstoffen Luteolin, Kämpferol und Pinoresinol sowie mit Acteosid und Isoacteosid durchgeführt. Da die Substanzen nur in begrenzter Menge

vorhanden waren, wurden die Zellen hier nur mit 100 μM der jeweiligen Substanz inkubiert und dann zeitabhängig die Aufnahme gemessen (**Abb. E35 bis E37**).

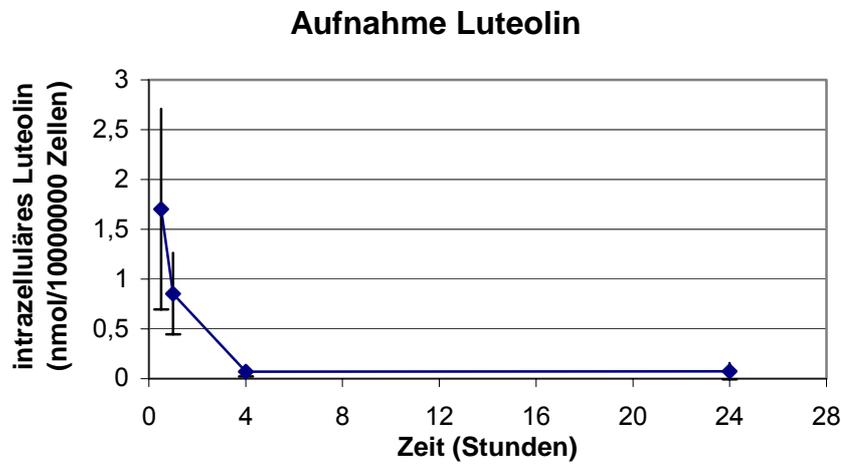


Abb. E35: Zeitabhängige Aufnahme von Luteolin in H4IIE-Zellen (n=4, \pm SEM)

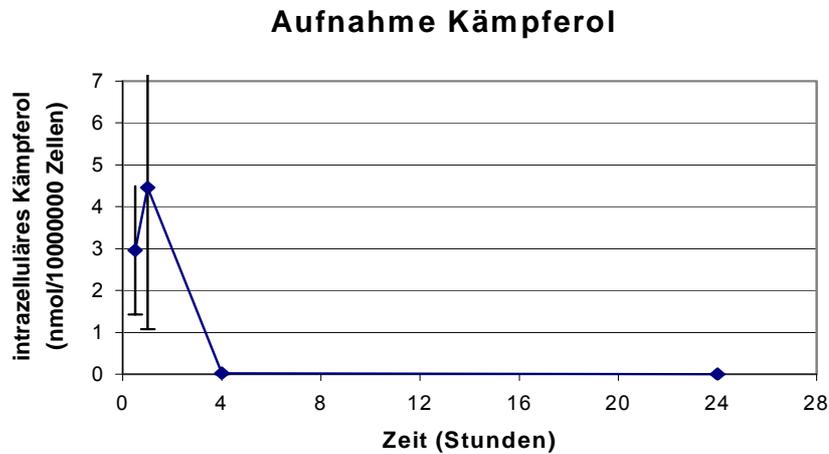


Abb. E36: Zeitabhängige Aufnahme von Kämpferol in H4IIE-Zellen (n=4, \pm SEM)

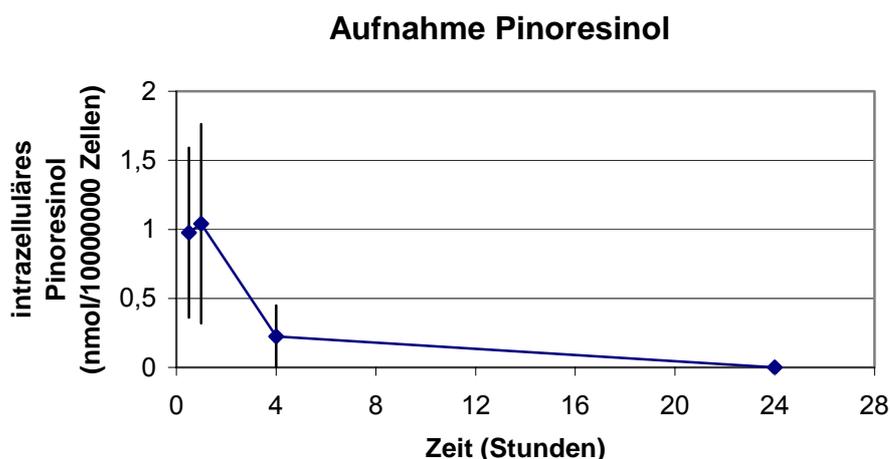


Abb. E37: Zeitabhängige Aufnahme von Pinoresinol in H4IIE-Zellen (n=3, \pm SEM)

Luteolin und Kämpferol wurden in einer Konzentration von 100 μ M im Medium ähnlich schnell wie Quercetin innerhalb der ersten 30 min von den H4IIE-Zellen aufgenommen. Dabei erreichten sie nach 30 bzw. 60 min ihre jeweilige maximale intrazelluläre Konzentration, die für Luteolin 1.70 ± 1.0 und für Kämpferol 4.46 ± 3.4 nmol/ 10^6 Zellen betrug. Die intrazelluläre Flavonoidkonzentration sank dann innerhalb der folgenden drei Stunden auf 0.07 ± 0.05 nmol/ 10^6 Zellen für Luteolin und auf 0.03 ± 0.02 nmol/ 10^6 Zellen für Kämpferol.

Auch hier wurde vermutet, dass die Abnahme der intrazellulären Flavonoidkonzentration auf metabolischen Abbau zurückzuführen ist, da die HPLC-Chromatogramme der Zellextrakte beider Flavonoide analog zu Quercetin zusätzliche Peaks mit dem jeweiligen Flavonoid ähnlichen UV-Spektren aufwiesen (Luteolin nach 21.3 und 24.1 min, Kämpferol nach 22.0 und 22.9 min).

Deshalb wurden ebenso wie zuvor bei Quercetin sowohl die Zellextrakte mit Luteolin als auch die mit Kämpferol per LC-MS untersucht. Dabei wurde bei Kämpferol für die beiden Peaks nach 22.0 (**Abb. E38**, Peak a) und 22.9 min (**Abb. E38**, Peak b) jeweils ein $[M+H]$ -Ion mit m/z von 463 per LC-MS nachgewiesen, das zu einem $[M+H]$ -Ion mit m/z von 287 fragmentierte. Auch für Luteolin (**Abb. E39**, Peak c, 25.6 min) konnte für beide zusätzlichen Peaks (**Abb. E39**, Peak a: 21.3 min, Peak b: 24.1 min) ein Molekulargewicht von jeweils 462 nachgewiesen werden.

Das Molekulargewicht von 462 entsprach dem jeweiligen Flavonoidglucuronid, das gebildete Ionen-Fragment dem Molekulargewicht des jeweiligen Aglykons (286).

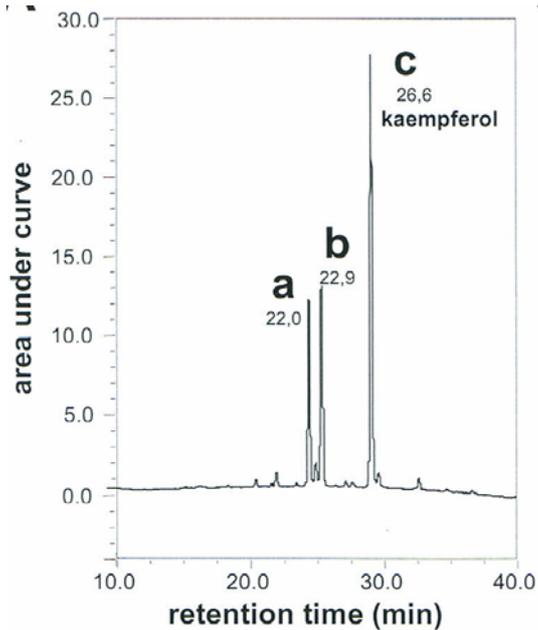


Abb. E38: HPLC-Chromatogramm eines Zellextraktes mit Kämpferol

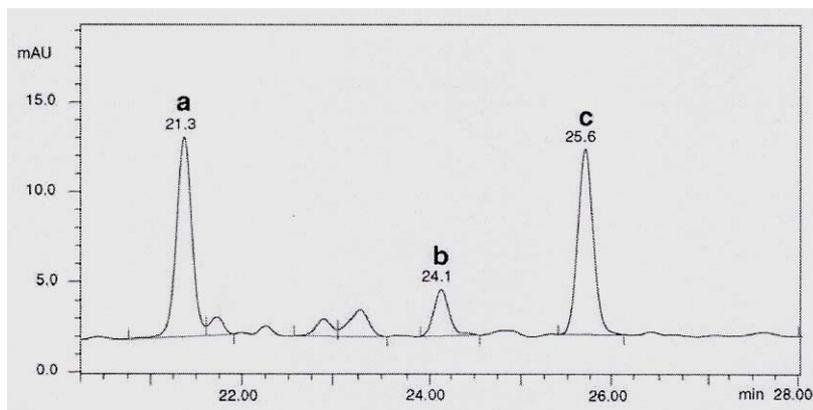


Abb. E39: HPLC-Chromatogramm eines Zellextraktes mit Luteolin

Da auch bei Luteolin und Kämpferol jeweils zwei Peaks zu unterschiedlichen Retentionszeiten mit den Molekulargewichten des jeweiligen Glucuronids auftraten, wurde auch hier der Schluss gezogen, dass es sich jeweils um Luteolin bzw. Kämpferol handelt, die in verschiedenen Positionen des Moleküls glucuronidiert wurden.

Pinoresinol wurde in geringerem Masse aufgenommen und erreichte nach einer Stunde nur eine maximale intrazelluläre Konzentration von $1.04 \pm 0.72 \text{ nmol}/10^6$

Zellen. Nach vier Stunden sank auch seine Konzentration auf $0.22 \pm 0.22 \text{ nmol}/10^6$ Zellen.

Bei Pinoresinol konnten per HPLC keine Metaboliten nachgewiesen werden.

3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol wurde von den Zellen nicht aufgenommen.

Bei Acteosid und Isoacteosid konnte ebenfalls keine Aufnahme in H4IIE-Zellen gemessen werden.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit und des unter 1.2.4. vorgestellten BMBF-Verbundprojektes 0312615 „Pharmakologische Eigenschaften und Kultivierungstechniken von Medizinpflanzen der indonesischen Volksmedizin (JAMU)“ sollten wenig untersuchte indonesische Heilpflanzen, die in ihrer Heimat traditionell zur Heilung oder Prävention von Krankheiten eingesetzt werden, phytochemisch analysiert und auf biologische Aktivität hin untersucht werden.

Zum einen wurden Extrakte von 39 indonesischen Pflanzen jeweils mit Ethylacetat und Methanol hergestellt und bei der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel in verschiedenen Testsystemen untersucht. Dabei fielen Ethylacetat- und Methanolextrakt von *Cyperus rotundus* und der Ethylacetatextrakt von *Centella asiatica* im Antidiabetes-Screen (α -Glucosidase- und PTP-1B-Assay), der Ethylacetat- und Methanolextrakt von *Curcuma domestica* im Lymphozyten-Transformationstest und der Ethylacetatextrakt von *Curcuma xanthorrhiza* im IOS-Ileum-Assay auf. Durch Fraktionierung mittels Vakuum-Flüssig-Chromatographie konnte die biologische Aktivität jedoch nur im Ethylacetatextrakt von *Curcuma domestica* weiterverfolgt und einem Gemisch aus Curcumin und Bidesmethoxycurcumin zugeschrieben werden. Da diese beiden Verbindungen im HPLC-Chromatogramm aber nahezu die gleiche Retentionszeit aufwiesen, war es nicht möglich, diese zu trennen und festzustellen, welche der beiden Verbindungen für die Aktivität verantwortlich war oder ob beide zur Aktivität beitrugen. Beim Lymphozyten-Transformationstest wird die Aktivierung und anschließende Vermehrung von Lymphozyten gemessen. Curcumin und/oder Bidesmethoxycurcumin zeigten hier also eine immunstimulierende Wirkung. Diese Wirkung wurde für die Droge bereits beschrieben (Wichtl et al. 2002). Für Curcumin selbst wurde darüberhinaus gezeigt, dass es die phagozytische Aktivität von Makrophagen erhöht (Anthony et al. 1999).

Traditionell wird das Rhizom von *Curcuma domestica* (*Curcumae longae rhizoma*) in Indonesien als Chologogum, als Leberprotektivum und als entzündungshemmendes Mittel eingesetzt, und auch in Europa haben sich standardisierte Präparate aus

Curcumawurzelstock gegen dyspeptische Beschwerden etabliert. Für seine Extrakte wurden darüberhinaus antibakterielle und antivirale sowie antioxidative und antiinflammatorische Effekte nachgewiesen.

Die VLC-Fractionen der Extrakte von *Cyperus rotundus*, *Centella asiatica* und *Curcuma xanthorrhiza* waren in den jeweiligen Testsystemen nicht mehr aktiv. Vermutlich waren in diesen Extrakten verschiedene Verbindungen für die Aktivität verantwortlich, die alle in geringen Mengen vorlagen und für sich alleine keine Aktivität mehr zeigten (synergistischer bzw. additiver Effekt).

Über die biologische Testung bei der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel hinaus, war es das primäre Ziel dieser Arbeit, Extrakte von indonesischen Heilpflanzen mit antioxidativer Aktivität zu finden und die für die Aktivität verantwortlichen Inhaltsstoffe zu isolieren, zu identifizieren und deren antioxidative Aktivität zu charakterisieren.

Dabei fielen im antioxidativen Screening mittels DPPH-Assay die Methanolextrakte der Blätter von *Guazuma ulmifolia*, der Rinde von *Alyxia reinwardtii* und der Rinde von *Alstonia scholaris* auf. Der Methanolextrakt der Blätter von *Sauropus androgynus* zeigte dabei nur eine schwach aktive Bande an der Startzone der DC-Platte.

Diese vier Pflanzen wurden daraufhin in grösserem Massstab extrahiert, chromatographisch aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen mit DC-Platten-DPPH-Assay weiterhin auf antioxidative Aktivität hin untersucht. So konnten verschiedene Inhaltsstoffe isoliert, identifiziert und deren Aktivität quantifiziert und charakterisiert werden.

4.1. Inhaltsstoffe aus den antioxidativ aktiven Pflanzen

4.1.1. Inhaltsstoffe aus *Guazuma ulmifolia*

Bei *Guazuma ulmifolia* handelt es sich um einen tropischen Baum aus der Familie der Sterculiaceae, der 20 bis 30 Meter hoch wird und weltweit in tropischen Regionen zu finden ist, unter anderem im Amazonasgebiet und in tropischen Wäldern Indonesiens. *Guazuma ulmifolia* hat gelbe duftende Blüten und trägt essbare Früchte. Im Deutschen wird dieser Baum unter anderem als ‚Indische Ulme‘ bezeichnet. Zu dem lateinischen Artnamen existieren diverse Synonyme, unter

anderem *Guazuma tomentosa* H.B.K., *Guazuma polybotrya* Cav. und *Theobroma guazuma*. Wie das Gattungssynonym „Theobroma“ anzeigt, gehört die Pflanze also der gleichen Gattung an wie *Theobroma cacao*, der bekannte Kakaobaum, dessen Produkte sich weltweit grosser Beliebtheit erfreuen. Für diese Gattung wurden insgesamt 20 Verbindungen beschrieben, unter anderem die Alkaloide Coffein, Theobromin und Theacrin (1,3,7,9-Tetramethylharnsäure) aus Kakaobohnen sowie verschiedene Proanthocyanidine wie Proanthocyanidin B5, Proanthocyanidin A7 und glycosidierte Derivate von Cinnatannin B1, Proanthocyanidin A5' und Pavetannin A2 (Dictionary of Natural Products 2004). Auch 8-Hydroxyapigenin-8-O- β -D-Glucuronopyranosid (aus *Theobroma grandiflorum*), 8-Galactopyranosyl(-)-epicatechin und (2*R*,2'*R*,3*S*,3'*S*)-8,8'-Methylenbiscatechin (beide aus Kakao) wurden bereits aus Pflanzen der Gattung *Theobroma* isoliert (Dictionary of Natural Products 2004).

Rinde, Blätter und Wurzeln von *Guazuma ulmifolia* werden von zahlreichen Völkern traditionell gegen verschiedene Beschwerden eingesetzt. So wird beispielsweise in Brasilien einem Tee aus der Rinde von *Guazuma ulmifolia* eine diaphoretische Wirkung zugeschrieben, und er wird gegen Fieber und Atemwegserkrankungen eingesetzt, während ein Tee aus den Früchten (Heinrich 2001) oder der Rinde (Heinrich et al. 1992) von *Guazuma ulmifolia* von den Mixe-Indianern in Mexiko gegen Durchfallerkrankungen Anwendung findet. Auch gegen Diabetes mellitus wird *Guazuma ulmifolia* traditionell angewendet. Eine antihyperglykämische Wirkung wurde für die traditionelle Zubereitung der Pflanze in Kaninchen nachgewiesen (Alarcon-Aguilara et al. 1998), konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht belegt werden, da die getesteten *Guazuma ulmifolia*-Extrakte weder im α -Glucosidase noch im PTB-1B-Assay bei der Firma Schwabe aufgefallen waren. In Indonesien werden die Blätter von *Guazuma ulmifolia* als ‚Daun Jati Belanda‘ bezeichnet, und man schreibt ihnen eine den Fettabbau steigernde Wirkung zu. Deshalb finden sie in Schlankheitstees Verwendung. Die Rinde von *Guazuma ulmifolia* wird in Indonesien als Adstringens eingesetzt.

4.1.1.1. Inhaltsstoffe aus den Blättern von *Guazuma ulmifolia* - Vergleichende Untersuchung von Indonesischer Droge und Gewächshauspflanze

Die Blätter von *Guazuma ulmifolia* sind offenbar bisher noch nicht phytochemisch untersucht worden. Jedenfalls blieb eine Suche in den einschlägigen Substanzdatenbanken (u.a. Dictionary of Natural Products 2004) nach aus *Guazuma ulmifolia* bekannten Inhaltsstoffen ohne Ergebnis.

Aus dem Methanolextrakt der indonesischen Blattdroge wurden die Flavone Apigenin und Luteolin isoliert. Der Extrakt war nicht besonders komplex, und es konnten nur diese beiden Inhaltsstoffe in ausreichender Menge isoliert und identifiziert werden. Der Luteolingehalt in den getrockneten Blättern betrug 0.0040 (\pm 0.0002)% und 0.24 (\pm 0.04)% im getrockneten Methanolextrakt. Apigenin wurde nicht quantifiziert, da es keine Aktivität gezeigt hatte.

Apigenin und Luteolin sind wie die meisten Flavonoide im Pflanzenreich weit verbreitet, wurden bisher allerdings noch nicht aus den Blättern von *Guazuma ulmifolia* isoliert. Für Luteolin konnte eine starke antioxidative Aktivität sowohl *in vitro* als auch im Zellkultursystem nachgewiesen werden (siehe Abschnitte 4.2. und 4.3.). Allerdings lässt sich hier kein Zusammenhang mit dem Einsatz der Blattdroge als Schlankheitsmittel erkennen. Allenfalls kann man einen eventuellen Gewichtsverlust mit der verstärkten Diurese erklären, die allgemein in Verbindung mit starkem Teekonsum auftritt.

Bei der phytochemischen Untersuchung der Blätter von der im Gewächshaus angezogenen Pflanze fiel auf, dass hier der Methanolextrakt ein deutlich anderes Inhaltsstoffspektrum aufwies als der Extrakt der indonesischen Blattdroge. Um sicherzustellen, dass es sich bei beiden Pflanzen um die gleiche Art handelte, wurden die beiden Blattdrogen lichtmikroskopisch bei 50-facher Vergrößerung miteinander verglichen. Da beide Drogen die unter anderem für *Guazuma ulmifolia* charakteristischen Büschelhaare zeigten, konnte eine Verwechslung ausgeschlossen werden.

In den Blättern der Gewächshauspflanze waren keine Flavonoide zu finden, dafür aber die Phenylethanoide Acteosid und Isoacteosid. Dabei lag Acteosid in den getrockneten Blättern zu 0.18 (\pm 0.06)% und zu 2.87 (\pm 0.14)% im getrockneten Methanolextrakt vor, während der Isoacteosidgehalt mit 0.07 (\pm 0.01)% in den

getrockneten Blättern und mit 1.13 (\pm 0.22)% im getrockneten Methanolextrakt weniger als die Hälfte des Acteosidgehaltes betrug. Acteosid und Isoacteosid konnten wiederum nicht im Methanolextrakt der indonesischen Droge detektiert werden.

In der Annahme, dass die Flavonoidbildung häufig durch Sonneneinstrahlung (UV) induziert wird, wurde die Gewächshauspflanze für vier Wochen ins Freiland an einen Ort mit intensiver Sonneneinstrahlung transferiert. Tatsächlich hatte die Pflanze bereits nach zwei Wochen Glucuronide oder Galacturonide von Apigenin und Luteolin sowie ein Diglycosid des Quercetins produziert. Flavonoidaglyka wurden im Methanolextrakt der im Freiland gehaltenen Pflanze nicht gefunden, während die Blattdroge aus Indonesien nur Aglyka enthielt. Dieses Phänomen kann damit erklärt werden, dass die in Deutschland angezogene Pflanze auf eine andere Weise getrocknet wurde als die indonesische. In Indonesien wird das Pflanzenmaterial an der Luft getrocknet, so dass sich der Trocknungsprozess langsam abspielt und die Flavonoidglykoside nach dem allmählichen Zersetzen der Zellwände mit Glycosidasen in Kontakt kommen, die die Zucker von den Aglyka abspalten. Die in Deutschland geernteten Blätter wurden dagegen sofort nach der Ernte gefriergetrocknet, so dass sich das Pflanzenmaterial nicht zersetzen konnte und damit auch keine Reaktion von Glycosidasen mit den Flavonoidglycosiden möglich war. Deshalb blieben die Flavonoide hier als Glycoside erhalten. Ein sehr ähnliches Phänomen wurde für getrocknete im Unterschied zu frischen Kamillenblüten beschrieben (Schreiber et al. 1990).

Die aus den Blättern der Gewächshauspflanze isolierten Phenylethanoide Acteosid und Isoacteosid wurden erstmals aus *Verbascum sinuatum* L. (Scarpati und Monache 1963) isoliert und werden daher auch als Verbascosid und Isoverbascosid bezeichnet. Mittlerweile sind diese Verbindungen auch aus anderen Pflanzen bekannt wie zum Beispiel aus *Leucoseptrum japonicum* (Toshio et al. 1982) und aus *Paulownia tomentosa* Steud. (Schilling et al. 1982). Aus *Guazuma ulmifolia* wurden sie hier zum ersten Mal isoliert.

4.1.1.2. Inhaltsstoffe aus der Rinde von *Guazuma ulmifolia*

Anders als die Blätter von *Guazuma ulmifolia* wurde die Rinde dieser Pflanze bereits phytochemisch untersucht. So wurden aus der Rindendroge polymere und oligomere

Procyanidine isoliert. Für die polymeren Procyanidine, die grösstenteils aus (-)-Epicatechineinheiten bestanden, konnte eine Hemmung der Choleratoxin-induzierten intestinalen Chloridsekretion durch spezifische Interaktion der Polyphenole mit der A-Untereinheit des Toxins nachgewiesen werden (Hör et al. 1995 und 1996). Hör et al. postulierten, dass die in Abschnitt 4.1.1. erwähnte volksmedizinische Anwendung der Droge als Antidiarrhoikum auf diesem Wirkmechanismus beruhe. Dagegen geht eine verbreitete Theorie davon aus, dass Tanningerbstoffe Proteine im Darmepithel ausfällen und so eine Schutzschicht bilden, die das Epithel abdichtet und weitere Wassersekretion verhindert.

Die Extrakte der Rinde von *Guazuma ulmifolia* aus dem Gewächshaus wurden im Rahmen dieser Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt als die übrigen Pflanzenextrakte mittels DC-Platten-DPPH-Assay auf antioxidative Aktivität hin untersucht. Da auch der Methanolextrakt dieser Pflanze mehrere stark aktive Banden zeigte, wurde auch dieser in grösserem Massstab extrahiert und chromatographisch aufgetrennt. Dabei wurden (+)-Abscisinsäure, (-)-Catechin, (-)-Epicatechin, Procyanidin B2 (oder Procyanidin B5) sowie Scopoletin isoliert. Dabei waren (-)-Epicatechin und Procyanidin B5 bereits aus der Rindendroge der Pflanze bekannt (Hör et al. 1996). Im Falle des im Rahmen dieser Arbeit isolierten Procyanidins konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um Procyanidin B2 oder B5 handelte.

(-)-Catechin war dagegen als Monomer für *Guazuma ulmifolia* bisher noch nicht beschrieben worden.

Als stark antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe wurden (-)-Catechin und (-)-Epicatechin sowohl in der Droge als auch im Methanolextrakt quantifiziert. Dabei lagen (-)-Catechin zu 0.22 (\pm 0.07)% und (-)-Epicatechin zu 0.54 (\pm 0.19)% in der getrockneten Droge und zu 4.64 (\pm 0.29)% bzw. 11.07 (\pm 1.10)% im getrockneten Methanolextrakt vor. Sowohl Catechin als auch Epicatechin sind im Pflanzenreich stark verbreitet, wie beispielsweise im Grünen Tee (Davis et al. 1996), wo sie neben anderen Catechinderivaten wie Epigallocatechingallat die phenolischen Hauptkomponenten darstellen, denen die antioxidativen Eigenschaften des Grünen Tees zugeschrieben werden (Harbowy und Balentine 1997). Auch im Rotwein kommen Catechine neben Procyanidinen und Resveratrol vor und sind auch hier an den gesundheitsfördernden Eigenschaften beteiligt (Nigdikar 1998).

Abscisinsäure ist ein Pflanzenhormon mit spezifischer wachstumshemmender Aktivität (Oritani und Yamashita 1987). Man findet sie aber nicht nur im Pflanzenreich, sondern auch in Sporophyten von Makroalgen der Gattung *Laminaria* (Schaffelke 1995) und in Pilzen (Oritani und Yamashita 1987).

Scopoletin (6-Methoxy-7-hydroxycumarin) ist bereits aus verschiedenen Solanaceen bekannt wie aus *Scopolia carniolica*. Auch in der Noni-Frucht (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) und in Umckaloabo (*Pelargonium sidoides* und *Pelargonium reniforme*) ist Scopoletin enthalten. Der Substanz werden unter anderem leberprotektive (Sung et al. 1998) sowie antibakterielle (Kayser und Kolodziej 1997) und fiebersenkende (Obidoa und Obasi 1991) Eigenschaften zugeschrieben. Damit könnte Scopoletin an der oben beschriebenen Wirkung der Rinde von *Guazuma ulmifolia* gegen Atemwegserkrankungen und Fieber beteiligt sein.

(+)-Abscisinsäure und Scopoletin wurden nicht auf ihre antioxidative Aktivität hin getestet, da die isolierten Substanzmengen hier zu gering waren. Auch Procyanidin B2 (oder B5) konnte nicht im photometrischen DPPH-Assay untersucht werden, da es sich im Rahmen der Strukturaufklärung zersetzt hatte.

4.1.2. Inhaltsstoffe aus der Rinde von *Alyxia reinwardtii*

Die Rinde der südostasiatischen Liane *Alyxia reinwardtii* Bl. wird in der traditionellen indonesischen Heilkunde als ‚Pulosari‘ bezeichnet und gegen Fieber und Erkältungskrankheiten eingesetzt. Eine Varietät dieser Pflanze, *Alyxia reinwardtii* Bl. var. *lucida*, wird auch in der traditionellen thailändischen Medizin verwendet und dient in Thailand darüberhinaus auch zur Herstellung von Parfüm und Tabakprodukten (Lin et al. 1993). Aus der luftgetrockneten Rinde von *Alyxia reinwardtii* waren schon das bittere trimere Iridoiddiglucosid Pulosariosid bekannt (Kitagawa et al. 1988). Dieses konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch in keiner der Fraktionen detektiert werden. Des Weiteren wurden für die Blätter von *Alyxia reinwardtii* Bl. var. *lucida* die Iridolactone Alyxialacton und 4-Epialyxialacton beschrieben (Topcu et al. 1990). Aus dem Stamm von *Alyxia reinwardtii* Bl. var. *lucida* wurden bereits die 3-Hydroxycumaringlycoside 3-Hydroxycumarin-O-[5-O-(4-Hydroxy-3-methoxycinnamoyl)- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] und 3-

Hydroxycumarin-O-[5-O-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxycinnamoyl)- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid] isoliert (Lin et al. 1993).

Für die Gattung *Alyxia* sind noch zwei weitere Verbindungen bekannt. So wurde 3-Hydroxycumarin aus *Alyxia lucida* isoliert (Sadavongvivad und Supavilai 1977) und 7-O-Methylcatechin (Mailein) aus *Alyxia olivaeformis* (Dictionary of Natural Products 2004).

Die Gattung *Alyxia* gehört zur Familie der Apocynaceae. Obwohl für diese Pflanzenfamilie Alkaloide typisch sind, sind für die Gattung *Alyxia* in der Literatur keine Alkaloide beschrieben, und in dieser Arbeit wurden im Ethylacetat- und Methanolextrakt von *Alyxia reinwardtii* auch keine Alkaloide nachgewiesen. Dafür konnten aus der Pflanze Cumarin, 5-Hydroxycumarin und 8-Hydroxycumarin isoliert und identifiziert werden. Diese drei Cumarine waren schon zuvor aus *Alyxia lucida* bekannt (Sadavongvivad und Supavilai 1977), die sehr nah mit *Alyxia reinwardtii* verwandt ist.

Cumarine riechen sehr aromatisch und sind möglicherweise der Grund für die Verarbeitung dieser Pflanze zu Parfüm und Tabakprodukten in Thailand.

Die antioxidative Aktivität des Methanolextraktes wurde auf die isolierten Lignane Pinoresinol, 9 α -Hydroxypinoresinol und Salicifoliol zurückgeführt. Diese waren jedes für sich alleine zwar nicht so stark aktiv wie beispielsweise die Flavonoide und die Acteoside (siehe Abschnitt 4.2.), aber aus der synergistischen Wirkung aller drei Lignane zusammen resultierte eine deutliche antioxidative Aktivität des Rohextraktes im DC-Platten-DPPH-Assay. Das (+)-Enantiomer des symmetrischen Tetrahydrofurofuran-Lignans Pinoresinol war bereits aus *Alyxia reinwardtii* bekannt (Kitagawa et al. 1988), während im Rahmen dieser Arbeit durch Analyse der Substanz auf einer chiralen HPLC-Säule gezeigt werden konnte, dass hier ein Gemisch aus (+)- und (-)- Enantiomer in einem Mischungsverhältnis von 9:1 vorlag.

Des weiteren konnte das im Rahmen dieser Arbeit isolierte Pinoresinol der Eudesmin-Form zugeordnet werden, während Kitagawa die Verbindung stereochemisch nicht genauer charakterisiert hatte. Die *dia*-Eudesmin-Form, bei der beide Aromaten axial stehen würden, wurde bisher noch nicht für Pinoresinol beschrieben. Pinoresinol war das aktivste der drei isolierten Lignane und lag zu 0.160 (\pm 0.009)% in der getrockneten Droge, zu 1.86 (\pm 0.20)% im getrockneten Ethylacetat- und zu 5.78 (\pm 0.35)% im getrockneten Methanolextrakt vor.

9 α -Hydroxypinoresinol, ebenfalls ein Furofuran-Lignan, und das Furoolacton-Lignan Salicifoliol wurden im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal für *Alyxia reinwardtii* beschrieben. 9 α -Hydroxypinoresinol wurde jedoch zuvor bereits aus der Apocynacee *Allamanda neriifolia* (Abe und Yamauchi 1988) isoliert, und Salicifoliol ist bekannt aus der Apiacee *Bupleurum salicifolium* (Gonzalez et al. 1989). Ähnlich wie bei Pinoresinol konnte auch für 9 α -Hydroxypinoresinol gezeigt werden, dass es sich um ein Enantiomeregemisch handelte. Allerdings konnte in diesem Fall keine Aussage zu dem Verhältnis der beiden Enantiomere zueinander getroffen werden, da sie auf der chiralen Säule nicht sauber voneinander getrennt werden konnten.

Die strukturelle Besonderheit des Salicifoliols besteht in dem Fehlen des zweiten Aromaten. An der Stelle, an der in Pinoresinol und 9 α -Hydroxypinoresinol der Aromat gebunden ist, befindet sich im Salicifoliol eine Ketogruppe. Möglicherweise ist diese Verbindung biosynthetisch aus Pinoresinol durch oxidative Abspaltung eines Aromaten hervorgegangen.

4.1.3. 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol aus den Blättern von *Sauropus androgynus*

Die Blätter der Euphorbiacee *Sauropus androgynus* werden im Indonesischen als ‚Daun Katuk‘ bezeichnet und stellen in Indonesien und auch in Malaysia ein populäres Gemüse dar, das beispielsweise in Suppen und Eintöpfen Verwendung findet. Volksmedizinisch werden die Blätter der Pflanze zur Milchbildung bei stillenden Müttern, aber auch in der Landwirtschaft zur Steigerung der Milchproduktion von Schafen eingesetzt.

Die aus *Sauropus androgynus* isolierte Verbindung 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol ist bereits aus dieser Pflanze isoliert worden (Wang und Lee 1997). Dass dieses Flavonol trotz der langsamen Lufttrocknung der Blätter in Indonesien als Glykosid erhalten geblieben ist und nicht wie die Flavonoidglykoside aus *Guazuma ulmifolia* von Glycosidasen gespalten wurde, könnte man mit der 1,6-glykosidischen Bindung zwischen den beiden Hexosen erklären, die den Angriff von Glycosidasen möglicherweise behindert.

Wang und Lee führen unter anderem den Gehalt an 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol als möglichen Grund für die in Abschnitt 1 (Einleitung)

beschriebenen Vergiftungen mit *Sauropus androgynus* an. Im Rahmen einer Diät hatten sich Mitte der 90er Jahre vor allem Frauen durch den Verzehr der rohen Blätter von *Sauropus androgynus* über 20 Tage in Mengen von 150 g bis zu 200 g pro Tag schwere Intoxikationen zugezogen, die mit Herzrhythmusstörungen und schweren Lungenschädigungen in Form einer Bronchiolitis obliterans einhergingen (Lin et al. 1996, Chang et al. 2000). Es wäre denkbar, dass 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol an diesen Vergiftungen beteiligt ist, da es mit einem Gehalt von 0.12 (\pm 0.02)% in den getrockneten Blättern und von 1.14 (\pm 0.15)% im getrockneten Methanolextrakt eine Hauptkomponente darstellt (siehe Anhang, HPLC-Chromatogramm des Methanolextraktes) und für das Aglykon Kämpferol, das im Dünndarm durch die Glycosidase-Aktivität intestinaler Bakterien aus 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol entsteht (Hollman und Katan 1998), mutagene Eigenschaften, eine Hemmung der Myosin-Leichtkettenkinase sowie Induktion von DNA-Schäden und Lipidperoxidation beschrieben wurden (Rogers und Williams 1989). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kämpferol in hohen Dosen, ab ca.70 μ M, zytotoxisch ist (siehe auch Abschnitt 4.3.).

Aus *Sauropus androgynus* sind des weiteren die Nukleoside Adenosin, 5'-Deoxy-5'-methylsulphinyladenosin und Uridin sowie die Flavonole 3-O- β -D-Glucopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranosylkämpferol und 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranosylkämpferol (Wang und Lee 1997) bekannt. Für die Gattung *Sauropus* sind noch sieben weitere Verbindungen beschrieben. Dabei handelt es sich um verschiedene Diphyllinderivate aus *Sauropus quadrangularis*.

4.1.4. Inhaltsstoffe aus der Rinde von *Alstonia scholaris*

Die Rinde der Apocynacee *Alstonia scholaris* L. wird in Indonesien als ‚Pule‘ bezeichnet und traditionell gegen Fieber, Malaria, Diabetes mellitus und Cholera sowie gegen Magenschmerzen eingesetzt. Ausserdem werden der Pflanze fungizide und antibakterielle Eigenschaften zugeschrieben. Auch die ayurvedische Medizin kennt *Alstonia scholaris* als Mittel gegen Malaria und Hautkrankheiten. Die Samen dienen in tantrischen Ritualen als Aphrodisiakum. Diese vielfältigen Wirkungen sind

grösstenteils auf diverse in der Pflanze enthaltene Alkaloide zurückzuführen. So sind alleine für die Art 32 Alkaloide, meist Indolalkaloide, beschrieben worden (Dictionary of Natural Products 2004). Dabei handelt es sich um fünf Derivate des Akuammicins, um vier Derivate des Narelins, um drei Derivate des Echitamins und vier des Echitamidins, um drei Derivate des Losbanins, zwei des Angustilobins B und zwei des Vallesamins. Des weiteren sind aus *Alstonia scholaris* die Indolalkaloide Picralinal, N^{β} -Methylburnamin, Lagunamin, (+)-Lochneridin, Strictamin, Picrinin, Alschomin und Isoalschomin sowie das Chinolinalkaloid Akuammin und ein Flavonoid, das Isookanin-7-O- α -L-Rhamnopyranosid, bekannt. Für die Gattung *Alstonia* sind insgesamt 321 Verbindungen beschrieben, bei denen es sich fast ausschliesslich um Alkaloide handelt wie zum Beispiel Reserpin und Yohimbin. Die Alkaloide wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht untersucht, da der Schwerpunkt der Arbeit auf antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe gesetzt wurde.

Die antidiabetische Wirkung der Pflanze konnte nicht belegt werden, da die Extrakte von *Alstonia scholaris* im Antidiabetes-Screening bei der Firma Schwabe weder im α -Glucosidase- noch im PTP-1B-Assay aufgefallen war.

Im Laufe der chromatographischen Aufarbeitung ging die im antioxidativen Screening aufgefallene Aktivität des Methanolextraktes verloren, so dass hier keine aktiven Inhaltsstoffe isoliert werden konnten. Vermutlich waren auch hier synergistische Effekte für die starke Aktivität des Methanolextraktes im DC-Platten-DPPH-Assay verantwortlich.

Unter anderem wurde im Rahmen dieser Arbeit aus der Rinde von *Alstonia scholaris* das Benzaldehydderivat Vanillin isoliert. Vanillin ist die Hauptkomponente natürlicher Vanille, die aus der Frucht des Orchideengewächses *Vanilla planifolia* gewonnen wird (Walton et al. 2003). Vanillin wurde 1858 erstmals isoliert und identifiziert (Hocking 1997). Mittlerweile wurde es auch aus diversen anderen Pflanzen wie aus Perubalsam, dem Harz von *Myroxylon balsamum*, isoliert (Dictionary of Natural Products 2004). Es wird heute hauptsächlich synthetisch hergestellt und wird in der Lebensmittelindustrie als Geschmacks- und Aromastoff verwendet. Vanillin wurde bisher noch nicht für Pflanzen der Gattung *Alstonia* beschrieben.

Darüberhinaus wurde aus *Alstonia scholaris* eine sehr interessante Verbindung, das Spiroacetal Sch53823, isoliert. Diese Verbindung ist ein Vertreter der Substanzklasse der Palmarumycine, die aus dem Pilz *Coniothyrium palmarum* bekannt sind (Krohn et al. 1994). Sch53823 selbst wurde erstmals aus einer Pflanze,

nämlich aus der Rinde des afrikanischen Baumes *Afzelia bipendensis* (Connolly 1990) isoliert. Zunächst hatte man vermutet, dass dieser Baum die für Pflanzen strukturell äusserst ungewöhnliche Verbindung selbst synthetisiert. Spätere Publikationen gehen aber davon aus, dass diese Substanz von einem in der Pflanze lebenden Endophyten gebildet wurde (Krohn et al. 1994). Um zu klären, ob in der Rinde von *Alstonia scholaris* ein endophytischer Pilz vorlag, der für die Produktion von Sch53823 in Frage kommen würde, wurde aus der Droge DNA isoliert, die dann mit pilzspezifischen Primern mittels PCR amplifiziert und anschliessend gereinigt und sequenziert wurde. Dabei konnte aus der Rinde von *Alstonia scholaris* die DNA von drei verschiedenen Pilzen isoliert und die DNA von zwei dieser Pilze mittels PCR amplifiziert und anschliessend sequenziert werden. Die DNA eines Pilzes zeigte beim Vergleich mit GenBank 99% Übereinstimmung mit der des Endophyten *Botryosphaeria rhodina*, und es ist daher anzunehmen, dass es sich bei diesem Pilz um *Botryosphaeria rhodina* handelt.

Das Vorliegen von pilzlicher DNA im Pflanzenmaterial von *Alstonia scholaris* deutete darauf hin, dass Sch53823 möglicherweise nicht von der Pflanze selbst, sondern eventuell von einem der drei nachgewiesenen Pilze synthetisiert wurde. Ob diese Pilze tatsächlich Endophyten sind oder ob es sich eventuell um Epiphyten oder parasitische Pilze handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Auch bleibt offen, ob und welcher dieser drei Pilze für die Bildung von Sch53823 verantwortlich war. Dazu müssten die Pilze aus frischem Pflanzenmaterial lebend isoliert und kultiviert werden, um dann ihr Inhaltsstoffspektrum auf eventuell vorhandene Palmarumycine zu untersuchen. Entsprechende Arbeiten werden in der Arbeitsgruppe von Herrn Juniorprofessor Dr. Rainer Ebel derzeit durchgeführt.

Da der Drehwert auch bei Sch53823 nicht mit den Literaturwerten übereinstimmte, wurde auch diese Verbindung per HPLC mit chiraler Säule analysiert, um herauszufinden, ob es sich um ein reines Enantiomer, um ein Gemisch aus beiden Enantiomeren oder um ein Razemat handelte. Da das Chromatogramm nur einen Peak zeigte, könnte es sich um ein reines Enantiomer handeln. Allerdings ist nicht auszuschliessen, dass zwar beide Enantiomere vorlagen, diese sich aber auf der chiralen Säule nicht trennen liessen.

Hinsichtlich der Wachstumshemmung auf verschiedene Krebszelllinien wurden für Sch53823 mit Hilfe des MTT-Assays sowohl in L-Zellen, in Hela-Zellen als auch in PC12-Zellen jeweils ED₅₀-Werte ermittelt, die grösser als 10 µg/ml waren. Die

Verbindung zeigte also keine nennenswerte Wachstumshemmung auf die getesteten Krebszelllinien. Für andere Palmarumycinderivate wie Sch50673 und Sch50676 aus dem Pilz *Natrassia mangiferae* wurde eine starke Wachstumshemmung auf die humane Fibrosarkomzelllinie HT 1080 beschrieben (Chu et al. 1995). Die Struktur von Sch50676 unterscheidet sich von der von Sch53823 nur hinsichtlich der β -Stellung der Epoxidgruppe in Position 3 und 4, die auch in Sch50673 β -ständig ist (**Abb. D1**). Damit liegt die Vermutung nahe, dass dieses Strukturelement an der wachstumshemmenden Wirkung beteiligt sein könnte.

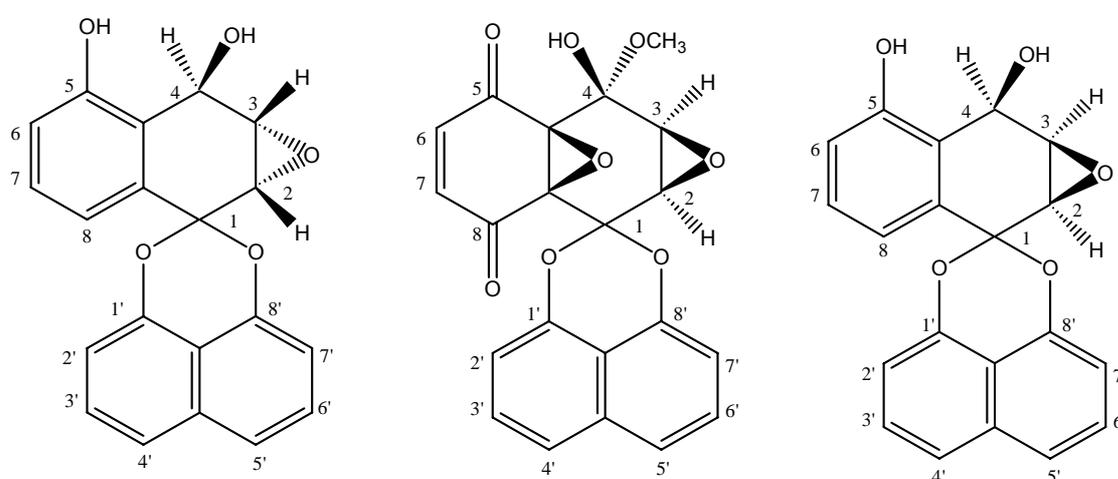


Abb. D1: Vergleich der Strukturen von Sch53823, Sch50673 und Sch50676

Da Palmarumycine aus *Coniothyrium*-Arten bekannt sind, deren Extrakte teilweise eine hemmende Wirkung auf *Cladosporium cucumerinum* zeigen (Krohn et al. 1994), wurde die Verbindung auf ihre Hemmwirkung gegenüber diesem Pilz getestet. Dabei war allerdings keine hemmende Wirkung von Sch53823 auf diesen pflanzenpathogenen Pilz zu beobachten. Es ist anzunehmen, dass andere von *Coniothyrium*-Arten gebildete Palmarumycine oder Sekundärmetabolite, die nicht der Substanzklasse der Palmarumycine angehören, für die Hemmwirkung der Extrakte gegenüber *Cladosporium cucumerinum* verantwortlich sind.

4.2. Antioxidative Aktivität der isolierten Inhaltsstoffe im DPPH-Assay

Die antioxidative Aktivität der in Abschnitt 4.1. beschriebenen isolierten Inhaltsstoffe wurde mit einem photometrischen DPPH-Assay quantifiziert. Bei diesem *in vitro*-Assay wurden quantitativ die antioxidativen bzw. Radikalfänger-Eigenschaften der isolierten Inhaltsstoffe in bezug auf die Positivkontrolle Propylgallat bestimmt.

Dabei zeigten Acteosid mit $98.6 \pm 0\%$ und Isoacteosid mit $98.2 \pm 0\%$ die stärkste antioxidative Aktivität. Auch Kämpferol mit $85.9 \pm 8\%$ und Luteolin mit $81.8 \pm 5\%$ sowie (+)-Catechin mit $86.1 \pm 2\%$, (-)-Catechin mit $75.7 \pm 2\%$ und (-)-Epicatechin mit $72.0 \pm 4\%$ waren stark aktiv. Die Aktivität von Pinoresinol war mit $19.0 \pm 3\%$ deutlich schwächer als die der Acteoside, Flavonoide und Catechine. Diese acht Verbindungen wurden zur weiteren Charakterisierung im Zellkultursystem ausgewählt, da sie von den 17 getesteten Verbindungen die stärksten Aktivitäten im *in vitro*-Assay zeigten.

Die sehr starke Aktivität der Acteoside ist darauf zurückzuführen, dass die Strukturen dieser beiden Verbindungen jeweils zwei aromatische Ringsysteme mit *ortho*-ständigen Hydroxygruppen aufweisen. Zum einen ist in 4''-(Acteosid) bzw. in 6''-(Isoacteosid) Position der Glucose jeweils ein Kaffeesäurerest gebunden, zum anderen tragen beide Strukturen in 1''-Position der Glucose einen 3,4-Dihydroxyphenylethanolrest. Für Hydroxyflavone wurde beschrieben, dass solche Catechol-Reste essentiell für antioxidative Aktivität sind (Cotelle et al. 1996). Aufgrund der starken Aktivität der Acteoside ist anzunehmen, dass diese Theorie auch für andere Substanzklassen zutrifft. Da sich die beiden Strukturen nur hinsichtlich der Position des Kaffeesäurerestes an der Glucose unterscheiden und ihre Aktivitäten nahezu gleich sind, scheint die Position des Kaffeesäurerestes keinen Einfluss auf die Aktivität zu haben.

Luteolin, das über zwei *ortho*-ständige Hydroxygruppen im B-Ring verfügt, zeigte ebenfalls starke Aktivität. Diese war etwas schwächer als die der Acteoside, da das Luteolin im Gegensatz zu den Acteosiden nur über einen Catechol-Rest verfügt. Apigenin, das nur eine Hydroxygruppe im B-Ring trägt, zeigte keine antioxidative Aktivität. Damit stimmt auch dieses Ergebnis mit den in der Literatur postulierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen überein (Cotelle et al. 1996).

Cotelle hatte ebenfalls gezeigt, dass für die antioxidative Aktivität von Flavonoiden eine Hydroxygruppe in 3-Position des C-Rings notwendig ist, wenn im B-Ring nur eine Hydroxygruppe vorhanden ist. Dies trifft zu für das Flavonol Kämpferol. Dieses wurde hier zusätzlich getestet, da es im menschlichen Dünndarm durch die Glycosidaseaktivität intestinaler Bakterien aus dem aus *Sauropus androgynus* isolierten 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol entsteht (Hollman und Katan 1998). Das Aglykon zeigte mit $85.9 \pm 8\%$ eine sehr starke Aktivität, während 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol gar nicht aktiv war. Bei dieser Verbindung führte der Zuckerrest an der Hydroxygruppe in 3-Position des C-Rings, die, wie bereits erwähnt, für die Aktivität essentiell ist, zu einem Aktivitätsverlust.

Die Aktivitäten von (+)-Catechin, (-)-Catechin und (-)-Epicatechin unterschieden sich nur leicht voneinander und lagen zwischen 72 und 86%. (+)-Catechin wurde hier zusätzlich getestet, um das (+)- mit dem (-)-Enantiomer hinsichtlich seiner Aktivität zu vergleichen. Dabei unterschieden sich ihre Aktivitäten kaum voneinander. Auch zwischen (-)-Catechin und seinem 3-Epimer (-)-Epicatechin war kein signifikanter Aktivitätsunterschied festzustellen. Die drei untersuchten Catechine lagen im Aktivitätsbereich von Luteolin und Kämpferol. Auch hier kann die starke Aktivität auf die Anwesenheit des Catechol-Restes im B-Ring der Flavanstrukturen zurückgeführt werden.

Pinoresinol war mit $19.0 \pm 3\%$ deutlich weniger antioxidativ aktiv als die Acteoside, Flavonoide und Catechine. Dieser Aktivitätsverlust kann damit erklärt werden, dass sich in dieser Struktur an beiden Aromaten nur in 3- bzw. 3'-Position eine Hydroxygruppe, dafür aber in 4- bzw. 4'-Position eine Methoxygruppe befindetet, die offensichtlich einen Aktivitätsverlust bewirkt. Auch für 9 α -Hydroxypinoresinol trifft dies zu. Diese Verbindung zeigte jedoch eine noch schwächere Aktivität ($10.7 \pm 4\%$) als Pinoresinol. Möglicherweise war hier die Hydroxygruppe in 9-Position für den Aktivitätsverlust verantwortlich, denn diese stellte den einzigen Unterschied zwischen den beiden Strukturen dar. Salicifoliol war mit $3.1 \pm 2\%$ wiederum noch schwächer aktiv, wobei dieses Ergebnis nicht signifikant war. In diesem Fall könnte der weitere Wirkungsverlust mit dem Fehlen des Aromaten in Position 7 erklärbar sein.

Die drei untersuchten Cumarine zeigten keine signifikante Aktivität, da auch ihnen ein Catechol-Strukturelement fehlt. Aus dem gleichen Grund waren Vanillin ($3.2 \pm$

0*) und Sch53823 ($4.7 \pm 2\%$) nur schwach aktiv. Die fehlende antioxidative Aktivität des Vanillins steht im Gegensatz zu früheren Publikationen, in denen Vanillin als potentes Antioxidans beschrieben wurde. Experimente hatten gezeigt, dass Vanillin in einer Konzentration von 0.01-0.05% signifikant die Haltbarkeit von Lebensmitteln verbesserte, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten, indem es deren Autooxidation verminderte (Burri et al. 1989). Bei den von der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführten ESR (electron spin resonance spectroscopy) - Messungen konnte allerdings kein stabiles Vanillin-Radikal nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht wiederum der in dieser Arbeit nachgewiesenen eher schwachen antioxidativen Aktivität von Vanillin.

4.3. Aktivität ausgewählter Inhaltsstoffe im Zellkultur-System

Die isolierten Inhaltsstoffe, die in dem *in-vitro*-Test die stärkste Aktivität gezeigt hatten, wurden im Hinblick auf ihre antioxidativen Eigenschaften in der Zellkultur charakterisiert. Darüberhinaus wurde Apigenin trotz seiner fehlenden Aktivität im DPPH-Assay im Neutralrotassay auf Zytotoxizität hin getestet, um einen weiteren Vergleich zu den beiden anderen Flavonoiden Luteolin und Kämpferol anzustellen. Dabei hatte Apigenin mit einem EC_{50} -Wert, der grösser als 250 μ M war, nur einen sehr schwachen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen und wurde daher in den anderen Zellkulturassays nicht weiter getestet. Da 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol im DPPH-Assay inaktiv war (3.4.), schien diese Verbindung nicht vielversprechend genug, um sie weiter zu untersuchen, und wurde deshalb auch nicht auf ihre Zytotoxizität hin getestet.

Die 24-stündige Inkubation der H4IIE-Zellen mit Kämpferol, Luteolin oder Pinoresinol (100 μ M) wirkte sich negativ auf die Lebensfähigkeit der Zellen aus. Dabei führte die Inkubation mit Kämpferol oder Luteolin zu einer Abnahme der Neutralrot-Aufnahme auf etwa 40% des Kontrollwertes, während Pinoresinol im Vergleich dazu einen geringeren Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte und zu einer Abnahme der Neutralrot-Aufnahme auf nur ca. 75% des Kontrollwertes führte. Die EC_{50} -Werte von Kämpferol, Luteolin und Pinoresinol betragen jeweils 70, 100 und 215 μ M. Damit

zeigte Kämpferol die stärkste Zytotoxizität. Kämpferol und Luteolin sind also in Konzentrationen, die 70 bzw. 100 μM überschreiten, als zytotoxisch einzustufen. In der Kolonkrebzelllinie HT-29 wurde mit einem EC_{50} -Wert von 136 μM eine schwächere Zytotoxizität für das Kämpferol beschrieben (Kuntz et al. 1999). Die Toxizität von Luteolin in H4IIE-Zellen lag in der gleichen Grössenordnung wie in MiaPaCa-2 Krebszellen (Lee et al. 2002). Pinoresinol war dagegen nur schwach zytotoxisch.

Im Neutralrottest mit den Acteosiden fiel auf, dass sich Acteosid in H4IIE-Zellen von Isoacteosid nicht signifikant hinsichtlich seines Einflusses auf die Neutralrot-Aufnahme unterschied. In C6-Zellen führte jedoch Isoacteosid mit einem EC_{50} -Wert von 41 μM zu einer signifikant stärkeren Abnahme der lebensfähigen Zellen als Acteosid, dessen EC_{50} -Wert 100 μM betrug. Die Bildung einer DNA-Leiter infolge von Apoptose konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Dass die Acteoside eine den Flavonoiden vergleichbare Zytotoxizität zeigten, überraschte zunächst, da die beiden Verbindungen weder in H4IIE- noch in C6-Zellen aufgenommen wurden (siehe Abschnitt 4.4). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre die Existenz eines Zytotoxizitäts-vermittelnden Rezeptors, an den die Acteoside, möglicherweise aufgrund ihres Zuckeranteils, spezifisch binden. Ein vergleichbarer Rezeptor, der metastasenassoziierte 67-kDa-Laminin-Rezeptor, wurde für Epigallocatechingallat aus Grünem Tee beschrieben. Dieser Rezeptor soll die proliferationshemmende Wirkung von EGCG auf Krebszellen vermitteln (Tachibana et al. 2004). Zytotoxische Eigenschaften wurden für Acteosid bereits beschrieben. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass es in promyelozytischen Leukämie-HL-60-Zellen Apoptose induziert und mit einem IC_{50} -Wert von 26.7 mM zum Zelltod führt (Inoue et al. 1998). Sowohl (+)-Catechin als auch (-)-Catechin und (-)-Epicatechin waren weder in H4IIE- noch in C6-Zellen signifikant zytotoxisch. Die ermittelten EC_{50} -Werte waren grösser als 250 μM . Dieses Ergebnis korrelierte mit der fehlenden Aufnahme in H4IIE- und C6-Zellen.

Sowohl für Luteolin als auch für Kämpferol konnten im Rahmen dieser Arbeit protektive Effekte gegenüber H_2O_2 -vermittelter DCF-Bildung in H4IIE-Zellen nachgewiesen werden. Nach einstündiger Vorinkubation mit 10 μM Kämpferol bzw. Luteolin, wurde der Anstieg der H_2O_2 -vermittelten intrazellulären DCF-Bildung stark

inhibiert. Auch im COMET-Assay zeigten beide Flavonoide protektive Eigenschaften. So verminderte die einstündige Vorinkubation der Zellen mit 50 μM Luteolin oder Kämpferol die H_2O_2 -vermittelte Entstehung von DNA-Strangbrüchen um 70 bis 80%. Für Luteolin sind bereits protektive Effekte gegenüber H_2O_2 -induzierten DNA-Strangbrüchen in menschlichen Lymphozyten beschrieben worden (Noroozi et al. 1998), während Kämpferol, im Gegensatz zu seinen protektiven Effekten in H4IIE-Zellen, in früheren Untersuchungen nicht in der Lage gewesen war, Caco-2-Zellen gegenüber oxidativer DNA-Schädigung zu schützen (Duthie und Dobson 1999). Für Luteolin wurde in früheren Untersuchungen des weiteren gezeigt, dass es zu der antioxidativen Aktivität von Artischockenblätterextrakten gegenüber ROS in menschlichen Leukozyten beiträgt (Brown und Rice-Evans 1998), und ein antioxidativer Effekt des Luteolins wurde auch in einer Retina-Zellkultur anhand der abnehmenden Malondialdehyd- und DCF-Bildung nachgewiesen (Areias et al. 2001). Zusammenfassend kann man sagen, dass Kämpferol und Luteolin in Konzentrationen bis zu 50 μM H4IIE-Zellen vor oxidativem Stress schützen, während Konzentrationen über 70 μM (Kämpferol) bzw. 100 μM (Luteolin) toxisch sind und zum Zelltod führen können. Werden Kämpferol und Luteolin in solch hohen Dosen inkorporiert, dass der Blutspiegel die oben genannten Konzentrationen erreicht, kann es eventuell zu Zellschädigungen kommen. Für Kämpferol wurde beschrieben, dass es in einer Konzentration von 50 μM H4IIE-Zellen vor H_2O_2 -induziertem oxidativen Stress schützt, aber in Abwesenheit von H_2O_2 in der gleichen Konzentration zur Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen um 50% und zu vermehrtem Auftreten von DNA-Strangbrüchen führt (Niering et al. 2005). Auch für Luteolin wurde in einer Konzentration von 100 μM das vermehrte Auftreten von DNA-Strangbrüchen sowie proapoptotische Effekte nachgewiesen (Michels et al. 2005).

Wie oben bereits erwähnt, enthalten die Blätter von *Sauropus androgynus* 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol als Hauptkomponente. Dieses wird im menschlichen Dünndarm zu Kämpferol gespalten. Werden die rohen Blätter von *Sauropus androgynus* oder der Presssaft aus diesen über längere Zeit täglich aufgenommen, ist es durchaus denkbar, dass das Kämpferol an den in Abschnitt 4.1.3. beschriebenen Vergiftungssymptomen wie der Bronchiolitis obliterans wenigstens beteiligt ist. Um dies endgültig zu klären, bedarf es allerdings noch weiterer Untersuchungen.

Bei der Bronchiolitis obliterans handelt es sich um eine obstruktive Atemwegserkrankung, bei der es zu Nekrosen des Epithels in den Bronchiolen kommt. Unter Beteiligung von T-Zellen und anderen Faktoren des Immunsystems kommt es dann zu einer Entzündungsreaktion und schliesslich zu einer Fibrose. Aber der präzise Mechanismus dieser pathologischen Veränderungen der Bronchiolen nach chronischem Konsum des Presssaftes von *Sauropus androgynus*-Blättern in hohen Dosen ist noch immer unbekannt (Chang et al. 2000). Dieser Mechanismus müsste aber zunächst geklärt werden, um herauszufinden, ob ein Molekül wie Kämpferol mechanistisch daran beteiligt sein könnte. Des weiteren bedarf es hier *in vivo*-Studien hinsichtlich der Resorption und Bioverfügbarkeit von Kämpferol, das in Form von *Sauropus androgynus*-Blättern aufgenommen wird.

Bei dem in Indonesien gebräuchlichen Konsum der *Sauropus androgynus*-Blätter als Gemüse oder in Jamu-Zubereitungen werden derartig hohe Blutspiegelkonzentrationen an Kämpferol und/oder anderen toxischen Verbindungen offensichtlich nicht erreicht, denn hier wurden noch keine Vergiftungsfälle beschrieben.

Die starke Aktivität von Kämpferol und Luteolin in der Zellkultur entsprach ihrer schnellen Aufnahme in H4IIE-Zellen (siehe Abschnitt 4.4).

Der antioxidative Effekt von Pinoresinol war im DCF-Assay im Vergleich zu den Flavonoiden weniger ausgeprägt, und auch im COMET-Assay führte die Inkubation mit Pinoresinol zu keiner signifikanten Reduktion der H₂O₂-induzierten DNA-Strangbrüche. Diese Ergebnisse korrelierten mit der schwachen antioxidativen Aktivität *in vitro* (siehe Abschnitt 4.2.) sowie mit der gegenüber Kämpferol und Luteolin geringeren Aufnahme von Pinoresinol in H4IIE-Zellen (siehe Abschnitt 4.4.). Hierzu ist anzumerken, dass die Bioaktivität von Lignanen in der Literatur kontrovers diskutiert wird, da die Strukturen der Lignane chemisch heterogen sind. Beispielsweise konnte für die Säugetierlignane Enterolacton und Enterodiol kein protektiver Effekt gegenüber H₂O₂-induzierter DNA-Schädigung in HT-29-Zellen gezeigt werden (Pool-Zobel et al. 2000), während das pflanzliche Lignan Nordihydroguaiarsäure im Gegensatz zu Enterolacton und Enterodiol in HepG2-Zellen im DCF-Assay starke antioxidative Aktivität gezeigt hatte (Harper et al. 1999). Pinoresinol ist neben verschiedenen anderen antioxidativ wirkenden Polyphenolen Bestandteil von Olivenöl und soll unter anderem an dessen Schutzwirkung vor Brust-

und Kolonkrebs beteiligt sein (Owen et al. 2000). Für aus Sesamkörnern isoliertes Pinoresinol wurde eine Schutzwirkung auf Membranlipide gegenüber oxidativer Schädigung gezeigt (Katsuzaki et al. 1994). Schliesslich wurde für Pinoresinol eine Hemmung von Cu^{2+} -induzierter LDL-Oxidation beschrieben (Chen et al. 1999). Diese Ergebnisse korrelieren mit den in dieser Arbeit nachgewiesenen leichten antioxidativen Eigenschaften des Pinoresinols sowohl im DPPH- als auch im DCF-Assay. Hier konnte allerdings erstmals die Aufnahme dieses Tetrahydrofuranlignans sowie dessen protektive Effekte gegenüber H_2O_2 -induzierter DCF-Bildung in H4IIE-Zellen nachgewiesen werden.

Acteosid und Isoacteosid zeigten eine deutliche Abnahme der H_2O_2 -vermittelten DCF-Bildung und damit einen protektiven Effekt gegenüber oxidativem Stress. Dabei war das Ausmass der protektiven Wirkung für beide Substanzen im wesentlichen gleich. Für Acteosid wurden bereits antioxidative Eigenschaften beschrieben (Chiou et al. 2004). So hatte die Verbindung im DPPH-Assay in einer Konzentration von 50 μM eine Aktivität von $91.4 \pm 1.1\%$, die mit der in dieser Arbeit ermittelten Aktivität von $98.6 \pm 0\%$ bei einer Acteosidkonzentration von 76 μM vergleichbar ist. Damit war Acteosid stärker aktiv als die von Chiou ebenfalls getesteten starken Antioxidantien Resveratrol, α -Tocopherol, ProbucoI und Vitamin C. Des weiteren waren für Acteosid protektive Effekte gegenüber der Oxidation von Membranlipiden sowie gegenüber Fenton's-Reagenz-vermittelter Schädigung von Endothelzellen gezeigt worden (Chiou et al. 2004). Für Tubulosid B, ein in 2-Position der Glucose acetyliertes Acteosidderivat aus *Cistanche salsa*, wurden in der Neuronenzelllinie PC12 ebenfalls starke antioxidative Eigenschaften sowie ein protektiver Effekt gegenüber oxidativem Stress und MPP^+ -induzierter DNA-Leiter-Bildung und Apoptose beschrieben (Sheng et al. 2002). Sheng und seine Mitarbeiter schlagen diese Verbindung als mögliches Antiparkinsonmittel vor, da bei dieser neurodegenerativen Erkrankung oxidativer Stress und ein niedriger Spiegel an Antioxidantien Apoptose induzieren und so zum Absterben der dopaminergen Neurone führen. Auch für Acteosid selbst wurde gezeigt, dass es bei aus Kleinhirn isolierten Körnerzellen MPP^+ -induzierte Apoptose verhindert, unter anderem durch Caspase-3-Hemmung (Pu et al. 2003). Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit für Acteosid und Isoacteosid keine Caspase-Hemmung in H4IIE-Zellen und damit auch keine protektiven Effekte gegenüber H_2O_2 -vermittelter Apoptose nachgewiesen werden. In den oben

beschriebenen Publikationen wurde nicht untersucht, ob Acteoside in die entsprechenden Zellen aufgenommen werden. Dagegen wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen, dass Acteoside weder von H4IIE- noch von C6-Zellen aufgenommen werden. Daher ist anzunehmen, dass die in diesen beiden Zelllinien gezeigte Verminderung der H₂O₂-induzierten DCF-Bildung nur auf den starken Radikalfängereigenschaften der Acteoside aufgrund ihrer beiden Catechol-Strukturelemente beruht. Offensichtlich fangen die Acteoside die freien Radikale schon ausserhalb der Zellen ab und verhindern so die Schädigung von Membranen.

4.4. Aufnahmestudien

Aufnahme von Quercetin

Die Aufnahmestudien wurden zunächst mit dem Flavonol Quercetin in H4IIE-Zellen (500 µM Quercetin im Zellkulturmedium) etabliert.

Dabei wurde Quercetin schnell in die Zellen aufgenommen, und die intrazelluläre Quercetinkonzentration erreichte nach 60 min ihr Maximum von 48.75 ± 13.67 nmol/10⁶ Zellen. Bereits nach 60 min begann die Quercetinkonzentration in den Zellen zu sinken, was vermuten liess, dass das Flavonoid metabolisiert und dann aus den Zellen eliminiert wurde. Bei der Probe, die vier Stunden mit Quercetin inkubiert worden war, traten im HPLC-Chromatogramm drei zusätzliche Peaks mit UV-Spektren auf, die denen von Quercetin ähnlich waren. Per LC-MS wurde nachgewiesen, dass es sich um Quercetinglucuronide handelte. Da diese Peaks zu verschiedenen Retentionszeiten auftraten, ist es offensichtlich, dass Quercetin in den Zellen an verschiedenen Positionen des Moleküls glucuronidiert wurde. Dies entsprach den Erwartungen, da es sich bei den H4IIE-Zellen um Leberzellen mit hoher metabolischer Aktivität handelt. Im lebenden Organismus dient die Glucuronidierung dazu, Fremdstoffen hydrophiler zu machen, um sie dann über die Galle besser aus dem Körper eliminieren zu können. Am isolierten Rattendünndarm wurden vor allem Quercetin-3- und -7-glucuronide beschrieben (Gee et al. 2000).

Nachweis von Quercetin im überstehenden Zellkulturmedium

Um die Menge von aufgenommenem und im Medium verbliebenem Quercetin zu bilanzieren, sollte die Konzentration von Quercetin im überstehenden Medium bestimmt werden. Dabei fiel auf, dass im untersuchten Medium nur noch eine Konzentration von 264 μM Quercetin wiedergefunden wurde, obwohl eine Konzentration von 500 μM eingestellt worden war und die Zellen nach einer Stunde nur 48.7 nmol Quercetin/ 10^6 Zellen aufgenommen hatten. Es wurde angenommen, dass die H4IIE-Zellen als Zellen mit hoher metabolischer Aktivität Enzyme in das Medium sezernieren, die Quercetin abbauen. Deshalb wurde der gleiche Versuch mit Medium, das zuvor nicht mit den Zellen in Berührung gekommen war, durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die geringe Quercetinkonzentration im Medium keine Folge des Abbaus durch in das Medium sezernierte Enzyme sein konnte, denn in Medium ohne Zellen wurde sogar nur eine Quercetinkonzentration von 77.20 ± 0.96 μM wiedergefunden.

In der Annahme, dass sich im Medium noch Proteine befinden, die mit den Flavonoiden kovalente Bindungen oder Komplexe eingehen können und so die Detektion in der HPLC verhindern, wurde dieser Versuch mit Medium wiederholt, das zuvor autoklaviert worden war, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren und so eine Reaktion der Flavonoide mit Proteinen bzw. einen enzymatischen Abbau der Flavonoide auszuschliessen. Der gleiche Versuch wurde parallel mit Medium durchgeführt, das bereits mit der Zellkultur in Kontakt gekommen war.

Auch hier konnten jedoch nur sehr niedrige Quercetinkonzentrationen nachgewiesen werden. Sie betragen für das frische, autoklavierte Medium 54.18 ± 1.32 μM , für das autoklavierte Medium, das bereits mit der Zellkultur in Kontakt gewesen war, 29.62 ± 2.92 μM und für das nicht autoklavierte Zellkulturmedium sogar noch 77.82 ± 11.31 μM .

Da bei keinem der vier Versuchsansätze die Anfangskonzentration von 500 μM Quercetin wiedergefunden wurde, liegt der Schluss nahe, dass die Proteine bei der Abnahme der Quercetinkonzentration keine signifikante Rolle spielen. Vielmehr fällt auf, dass in den Ansätzen, in denen die höchsten Proteinkonzentrationen zu erwarten sind, nämlich in den nicht autoklavierten Medien, höhere Quercetinkonzentration gemessen wurden als in den autoklavierten Medien, die keine intakten Proteine mehr enthielten. So wurde in dem nicht-autoklavierten

Medium, das schon Kontakt mit den Zellen hatte und damit der Ansatz mit der höchsten Protein- und Enzymkonzentration sein müsste, eine Quercetinkonzentration gefunden, die der in nicht-autoklaviertem reinem Medium entspricht (ca. 77 μM). Diese Konzentration ist signifikant höher als die in den beiden Ansätzen mit autoklavierten Medium. Dieses Phänomen könnte man zum einen erklären, indem man annimmt, dass im Medium enthaltene zweiwertige Ionen wie Calcium und Magnesium Chelatkomplexe mit Quercetin eingehen und so die Detektion in der HPLC verhindern. Im Medium vorhandene Proteine, die ebenso wie Quercetin Komplexe mit zweiwertigen Ionen eingehen können, erniedrigen die Konzentration freier Ionen wie Calcium und Magnesium. Deshalb stehen in diesen Ansätzen weniger freie Ionen zur Verfügung, die mit Quercetin Komplexe eingehen können, und damit ist die nachgewiesene Quercetinkonzentration in diesen Ansätzen noch geringfügig höher als in denen mit autoklavierten Medium.

Zum anderen besitzen die in den nicht-autoklavierten Medien noch vorhandenen intakten Proteine als amphiphile Moleküle lösungsvermittelnde Eigenschaften und können so das Löslichkeitsprodukt von Quercetins in dem wässrigen Medium erhöhen und auch auf diese Weise zu einer höheren nachgewiesenen Quercetinkonzentration im Medium führen. Werden diese Proteine durch Hitze denaturiert, fällt Quercetin teilweise aus und kann nicht mehr in der HPLC detektiert werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass hier verschiedene Effekte nebeneinander auftreten, die eine bilanzierende Quantifizierung schwer machen.

Konzentrationsabhängige Aufnahme von Quercetin in H4IIE- und C6-Zellen

Beim Vergleich der konzentrationsabhängigen Aufnahme von Quercetin in H4IIE- und in C6-Zellen fiel auf, dass in den C6-Zellen deutlich höhere Quercetinkonzentrationen nachgewiesen werden konnten als in H4IIE-Zellen. Zum einen wäre es möglich, dass C6-Zellen mehr Quercetin aufnehmen als H4IIE-Zellen, zum anderen liegt aber der Schluss nahe, dass die letzteren Quercetin in höherer Masse abbauen als C6-Zellen, die als Gliomzellen metabolisch inaktiv sind.

Einfluss verschiedener Transportinhibitoren auf die Quercetinaufnahme in H4IIE-Zellen

Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Transportinhibitoren auf die Quercetinaufnahme in H4IIE-Zellen inhibierte von allen eingesetzten Transportinhibitoren nur Vanadat, ein ATPase-Hemmstoff, in einer Konzentration von 100 μM die Aufnahme in die Zellen zu 100% (500 μM Quercetin im Medium), was ein Hinweis auf einen aktiven Transport sein könnte. Allerdings führte Vanadat auch zu einer Ausflockung des Quercetins im Medium, so dass eine fehlende Aufnahme durch die Zellen auch auf die daraus resultierende fehlende Löslichkeit zurückzuführen sein könnte. Die Klärung dieser Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, da die Fragestellung nicht zum Schwerpunkt der Arbeit gehörte.

Untersuchung der Aufnahme weiterer Flavonoide in H4IIE-Zellen

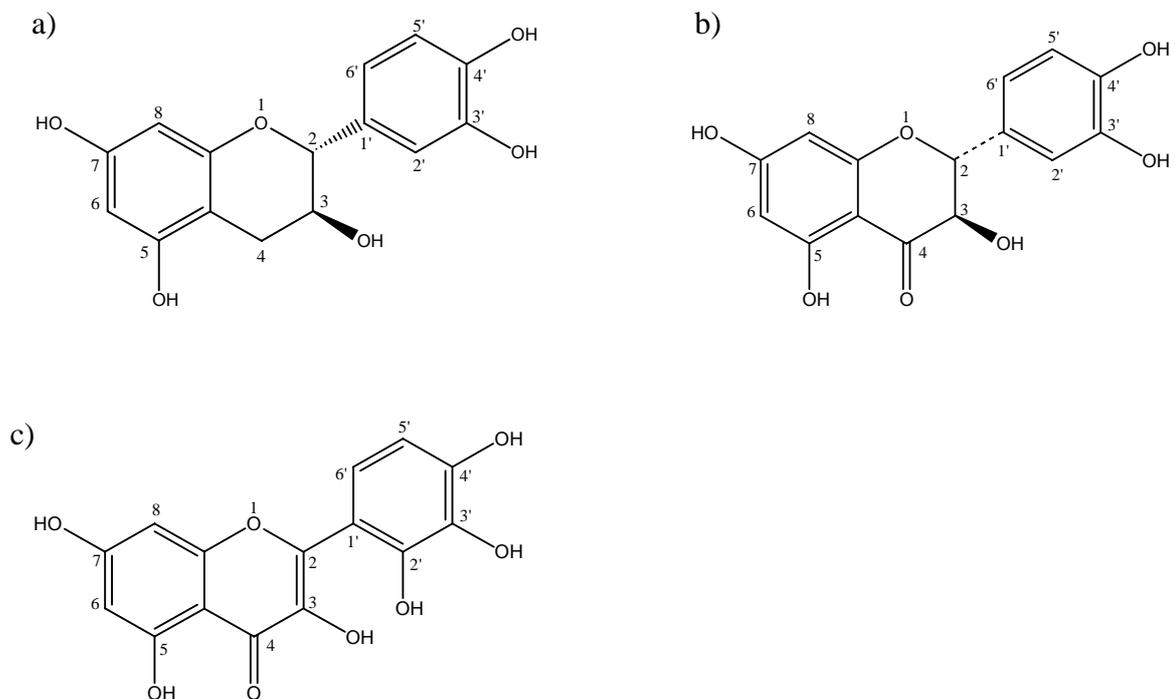
Neben den Versuchen mit Quercetin wurde auch die Aufnahme weiterer Flavonoide in H4IIE-Zellen untersucht. Dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Verbindungen festgestellt. So wurde beispielsweise Rutin, das 3-O-Rhamno(1→6)-glucosid des Quercetins, im Gegensatz zu seinem Aglykon nicht in die Zellen aufgenommen, was den Schluss zulässt, dass der Zuckerrest in Position 3 hier die Aufnahme verhindert. Für Quercetin-3-Glucosid wurde gezeigt, dass es im Dünndarm von Ratten von einem Glucose Carrier (SGLT1) über die Brush-Border-Membran transportiert wird (Wolffram et al. 2002). Geht man auch im Falle der H4IIE-Zellen von einem aktiven Transport des Quercetins in die Zelle aus, so wäre es möglich, dass Rutin aufgrund der Zuckerreste nicht mit dem Transporter interagieren kann, aber auch eine Aufnahme des Quercetins durch Diffusion wäre denkbar. Hier könnte die fehlende Aufnahme des Rutins mit dem hydrophilen Zuckerrest des Rutins erklärt werden, der den Durchtritt durch die Membran verhindert (Scalbert und Williamson 2000). Auch beim Vergleich der Aufnahme der anderen Flavonoide fielen signifikante Unterschiede auf. So wird Fisetin nach einer Stunde in einer Konzentration von $12.67 \pm 2.65 \text{ nmol}/10^6$ Zellen in die Zellen aufgenommen, während die intrazelluläre Morinkonzentration nach einer Stunde nur $2.35 \pm 0.38 \text{ nmol}/10^6$ Zellen betrug und Myricetin mit $0.22 \pm 0.22 \text{ nmol}/10^6$ Zellen und

Taxifolin mit $0.2 \pm 0.2 \text{ nmol}/10^6$ Zellen in noch viel kleineren Konzentrationen und (+)-Catechin gar nicht in die Zellen aufgenommen wurden.

Sowohl das Flavanonol Taxifolin als auch das Flavanol Catechin besitzen im Gegensatz zu den anderen getesteten Flanonoiden keine Doppelbindung im C-Ring (**Abb. D2**), wodurch es zu einer Faltung des Rings kommt. Möglicherweise ist hier die geringe bzw. fehlende Aufnahme sterisch begründet, und eine Doppelbindung im C-Ring und die damit verbundene Planarität des Rings fördert die Aufnahme in H4IIE-Zellen (Wätjen et al. 2005). Um dies endgültig zu klären, müssten noch weitere Aufnahme-Experimente mit verschiedenen Flavanolen, Flavanonolen, Flavonolen und Flavonen durchgeführt werden.

Für die gegenüber der Quercetinaufnahme stark verminderte Myricetinaufnahme könnte die zusätzliche *ortho*-Hydroxygruppe im B-Ring des Myricetins und die damit verbundene erhöhte Hydrophilie der Verbindung verantwortlich sein.

Die Ursache für die gegenüber der Morinaufnahme viel stärkere Fisetinaufnahme könnte entweder an der fehlenden Hydroxygruppe in 5-Position des Fisetins oder an der gegenüber dem Morin von 2' nach 3' verschobenen Hydroxygruppe im B-Ring liegen (**Abb.D2**).



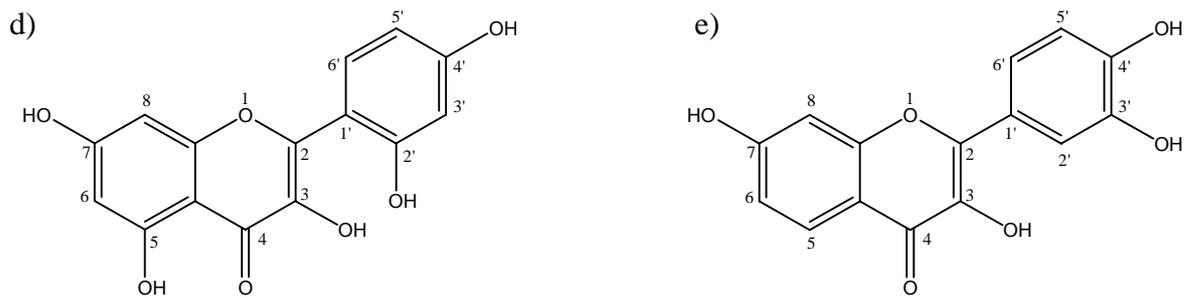


Abb. D2: Strukturen von Catechin (a), Taxifolin (b), Myricetin (c), Morin (d) und Fisetin (e)

Aufnahme der isolierten Reinsubstanzen aus den indonesischen Heilpflanzen

Nachdem die Aufnahmestudien mit gekauften Referenzsubstanzen etabliert worden waren, wurden nun Aufnahmestudien in H4IIE-Zellen mit den aus den indonesischen Pflanzen isolierten Inhaltsstoffen Luteolin, Kämpferol und Pinoresinol sowie mit Acteosid und Isoacteosid durchgeführt. Da die Substanzen nur in begrenzter Menge vorhanden waren, wurden die Zellen hier nur mit 100 μM der jeweiligen Substanz inkubiert.

Luteolin und Kämpferol wurden in einer Konzentration von 100 μM im Medium ähnlich schnell wie Quercetin innerhalb der ersten 30 min von den H4IIE-Zellen aufgenommen. Dabei erreichten sie nach 30 bzw. 60 min ihre jeweilige maximale intrazelluläre Konzentration, die für Luteolin 1.70 ± 1.0 und für Kämpferol 4.46 ± 3.4 $\text{nmol}/10^6$ Zellen betrug. Die intrazelluläre Flavonoidkonzentration sank dann innerhalb der folgenden drei Stunden auf 0.07 ± 0.05 $\text{nmol}/10^6$ Zellen für Luteolin und auf 0.03 ± 0.02 $\text{nmol}/10^6$ Zellen für Kämpferol.

Auch hier kann angenommen werden, dass die Abnahme der intrazellulären Flavonoidkonzentration auf metabolischen Abbau zurückzuführen ist, da die HPLC-Chromatogramme der Zellextrakte beider Flavonoide analog zu Quercetin zusätzliche Peaks mit dem jeweiligen Flavonoid ähnlichen UV-Spektren aufwiesen. Deshalb wurden ebenso wie zuvor bei Quercetin sowohl die Zellextrakte mit Luteolin als auch die mit Kämpferol per LC-MS untersucht. Dabei konnten für beide Flavonoide jeweils zwei Glucuronide nachgewiesen werden. Da auch bei Luteolin

und Kämpferol jeweils zwei Peaks zu unterschiedlichen Retentionszeiten mit den Molekulargewichten des jeweiligen Glucuronids auftraten, wurde auch hier der Schluss gezogen, dass die Verbindungen jeweils in verschiedenen Positionen des Moleküls glucuronidiert wurden.

Auch hier war eine Metabolisierung der Flavonoide zu erwarten gewesen, da die H4IIE-Zellen als Leberzellen stark metabolisch aktiv sind.

Die Aufnahme von Lutelin und Kämpferol korrelierte mit der starken Aktivität dieser Flavonoide in den im Zellkultursystem durchgeführten Assays (siehe Abschnitt 4.3.).

Pinoresinol wurde in geringerer Masse aufgenommen und erreichte nach einer Stunde nur eine maximale intrazelluläre Konzentration von $1.04 \pm 0.72 \text{ nmol}/10^6$ Zellen. Nach vier Stunden sank auch seine Konzentration auf $0.22 \pm 0.22 \text{ nmol}/10^6$ Zellen.

Bei Pinoresinol konnten per HPLC keine Metaboliten nachgewiesen werden. Entweder wird diese Verbindung unverändert aus den Zellen eliminiert, oder die Metaboliten wurden aufgrund der geringen Pinoresinolkonzentration in den Zellen in so geringer Konzentration gebildet, dass sie per HPLC nicht detektiert werden konnten.

Die gegenüber Luteolin und Kämpferol schwächere Aufnahme von Pinoresinol in H4IIE-Zellen korrelierte mit dessen ebenfalls schwächerer Aktivität in den Zellkulturassays (Abschnitt 4.3.).

3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol wurde von den Zellen nicht aufgenommen. Auch hier liegt ebenso wie bei Rutin der Schluss nahe, dass der Zuckerrest in 3-Position die Aufnahme verhindert, sei es durch die damit verbundene erhöhte Hydrophilie oder durch sterische Hinderung.

Bei Acteosid und Isoacteosid konnte ebenfalls keine Aufnahme in H4IIE-Zellen gemessen werden, was bemerkenswert war, da diese beiden Verbindungen sowohl in H4IIE- als auch in C6-Zellen starke zytotoxische Eigenschaften aufgewiesen und auch protektive Eigenschaften gegenüber H_2O_2 -induzierter DCF-Bildung gezeigt hatten. Möglicherweise heften sich Acteosid und Isoacteosid mit Hilfe ihrer Zuckereinheiten Glucose und Rhamnose an die Zelloberflächen an oder interagieren mit Rezeptoren und lösen auf diese Weise die Zytotoxizität aus.

Bei (-)-Catechin und(-)-Epicatechin wurde auf Aufnahmestudien verzichtet, da (+)-Catechin nicht von den H4IIE-Zellen aufgenommen wurde und (-)-Catechin und (-)-Epicatechin sich in ihrer Zytotoxizität nicht von (+)-Catechin unterschieden (Abschnitt 4.3.). Daraus wurde geschlossen, dass auch hinsichtlich der Aufnahme keine Unterschiede dieser beiden Verbindungen zu (+)-Catechin bestehen.

4.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in drei der untersuchten indonesischen Pflanzen strukturell verschiedene antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe enthalten sind. Diese wurden in dem jeweiligen Pflanzenteil quantifiziert, und ihre antioxidative Aktivität auf zellulärer Ebene sowie die Aufnahme in H4IIE-Zellen wurde untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine protektive Wirkung gegenüber oxidativem Stress sowie Zytotoxizität nicht immer mit der Aufnahme in Zellen korrelieren und somit auch eine antioxidative und protektive Wirkung ausserhalb der Zellen erreicht werden kann. Damit konnte für die jeweiligen Jamu-Pflanzen nachgewiesen werden, dass der regelmässige Konsum einen gesundheitsfördernden Effekt hat. Allerdings können anhand der in den jeweiligen Pflanzen vorhandenen Mengen an aktiven Inhaltsstoffen keine Aussagen hinsichtlich des für eine gesundheitsfördernde Wirkung notwendigen Verzehrs bestimmter Mengen der jeweiligen Pflanze getroffen werden. Um hier Dosierungsempfehlungen festzulegen, bedarf es *in vivo*-Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der jeweiligen Inhaltsstoffe, die Studien zur Resorption und zum Metabolismus einschliessen.

In Pflanzen liegen Flavonoide und andere Polyphenole meist als Glykoside vor. Dabei spielt der Zuckerrest eine grosse Rolle für ihre Resorption und Bioverfügbarkeit. Zur Resorption und Bioverfügbarkeit von Flavonoidglykosiden und Flavonoidaglyka wurden bereits vielfältige Untersuchungen durchgeführt, die je nach Art des Aglykons, der Zucker und der Position der Zucker am Aglykon zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führten. So wurde gezeigt, dass Rutin in Ratten langsamer resorbiert wird als Quercetin, da es zunächst von der Darmflora hydrolysiert werden muss, während das Aglykon bereits im Dünndarm resorbiert wird (Manach et al. 1997). *In vivo*-Untersuchungen in Ratten zur Resorption von Quercetin, Rutin und Isoquercitrin (Quercetin-3-O-glucosid) haben gezeigt, dass

Quercetin im Magen schnell resorbiert wurde, während Rutin und Isoquercitrin weder hydrolysiert noch resorbiert wurden (Crespy et al. 2002). Im Gegensatz dazu werden im Dünndarm auch Quercetinglycoside resorbiert. In Fütterungsexperimenten mit Ratten wurde gezeigt, dass mit Quercetin-3-glucosid dreimal höhere Blutspiegel erreicht werden als mit dem Aglykon (Morand et al. 2000). Der Grund dafür könnte der von Wolfram et al. 2002 beschriebene SGLT1-Glucose-Carrier sein, der von Quercetin-3-glucosid benutzt wird, um die Brush-Border-Membran im Rattendünndarm zu überwinden. Dagegen wurden mit Rutin nur geringe Mengen und mit Quercetin-3-rhamnosid gar keine Quercetin-Metaboliten im Blut der Versuchstiere nachgewiesen (Morand et al. 2000).

Die Art des Zuckers in 3-Position scheint hier also eine entscheidende Rolle zu spielen. Des Weiteren erhöht die Hydrolyse von Glykosiden die intestinale Resorption. Dabei spielen sowohl die Position und die Anzahl der Zucker (Murota et al. 2000) als auch individuelle Einflüsse wie das Geschlecht sowie die Einnahme von oralen Kontrazeptiva eine Rolle (Erlund et al. 2000). Quercetin wird während dem Durchtritt durch das Darmepithel glucuronidiert (Gee et al. 2000), kann aber *in situ*, beispielsweise durch Glucuronidaseaktivität des Venenepithels, wieder deglucuronidiert werden und als Aglykon in das Epithel aufgenommen werden, wo es dann seine Wirkung entfalten kann (Wittig 2001). Für Quercetin und Rutin wurde gezeigt, dass eine regelmässige Aufnahme mit der Nahrung genügt, um einen ausreichend hohen Blutspiegel aufrecht zu erhalten (Manach et al. 1997). Auch Luteolin-7-O- β -Glucosid wird im Dünndarm gespalten und dann resorbiert und in der Dünndarmmucosa glucuronidiert (Shimoi et al. 1998).

Da, wie oben am Beispiel von Quercetin und seinen Glycosiden gezeigt, die Resorption und Bioverfügbarkeit von Polyphenolen von verschiedenen Faktoren wie der Art und der Position des Zuckers abhängt, und, wie anhand der Blätter von *Guazuma ulmifolia* gezeigt wurde, je nach Art der Trocknung der Droge ein unterschiedliches Muster an Glycosiden und Aglyka des jeweiligen Flavonoids vorliegt, müsste für jeden der in dieser Arbeit isolierten aktiven Inhaltsstoffe untersucht werden, welche Blutspiegel bei welchen aufgenommen Pflanzenmengen jeweils erreicht werden, um die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten auf H4IIE-Zellen protektiv wirkenden Konzentrationen mit einer gesundheitsfördernden Dosis des jeweiligen Inhaltsstoffes *in vivo* zu korrelieren.

5. Zusammenfassung

Die traditionelle Heilkunde Indonesiens wird als Jamu bezeichnet. Verwendet werden aus Pflanzenteilen wie Rinde, Wurzeln, Blättern oder Blüten gewonnene Tees, Extrakte oder aus diesen Extrakten hergestellte Arzneiformen. Heute gibt es mehrere hundert kleine bis grosse industrielle Jamu-Hersteller, die mit ihren Produkten ca. 30% des Arzneimittelmarktes in Indonesien kontrollieren. Da für grosse Teile der indonesischen Bevölkerung westliche Arzneimittel unerschwinglich sind, spielt für sie Jamu eine bedeutende Rolle. Allerdings wird Jamu von der westlich geprägten Schulmedizin Indonesiens kaum akzeptiert, weil es bis heute nur wenig Untersuchungen zu Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der verschiedenen Jamu-Präparate gibt. Um dies zu ändern, ist ein wissenschaftlicher Nachweis zur Qualität der Produkte nötig.

Freie Radikale tragen zur Entstehung diverser Krankheiten wie Krebserkrankungen, Arthrose etc. bei, da sie Schäden an Membranen, Erbgut und anderen zellulären Strukturen verursachen können. Deshalb spielen Antioxidantien bzw. Radikalfänger gerade im Hinblick auf die Prävention von Krankheiten eine bedeutende Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es, Extrakte von traditionell angewendeten indonesischen Heilpflanzen mit antioxidativer Aktivität zu finden und die für die Aktivität verantwortlichen Inhaltsstoffe zu isolieren, zu identifizieren und deren antioxidative Aktivität in einem Zellkultursystem zu charakterisieren.

In einem antioxidativen Screening mittels DC-Platten-DPPH-Assay fielen die Methanolextrakte der Blätter von *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae („Daun Jati Belanda“), der Rinde von *Alyxia reinwardtii* Bl., Apocynaceae („Pulosari“) und der Rinde von *Alstonia scholaris* L., („Pule“) auf. Der Methanolextrakt der Blätter von *Sauropus androgynus* zeigte dabei nur eine schwach aktive Bande an der Startzone der DC-Platte. Des weiteren wurde *Guazuma ulmifolia* im Gewächshaus der HHU Düsseldorf angezogen und der Methanolextrakt aus den getrockneten Blättern und der Rinde dieser Pflanze ebenfalls untersucht, unter anderem, um das Inhaltsstoffspektrum der Blätter der Gewächshauspflanze mit dem der Droge aus

Indonesien zu vergleichen. Dabei fiel sowohl der Methanolextrakt der Blätter als auch der der Rinde durch starke antioxidative Aktivität auf.

Aus diesen Extrakten wurden jeweils die antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe isoliert und identifiziert und ihre antioxidative Aktivität in bezug auf die Positivkontrolle Propylgallat mit Hilfe eines photometrischen DPPH-Assays quantifiziert. Die am stärksten antioxidativ aktiven Substanzen wurden dann in der jeweiligen Droge quantifiziert sowie in H4IIE-Zellen im Hinblick auf Zytotoxizität (Neutralrotassay, DNA-Leiter-Bildung) und auf protektive Effekte gegenüber H₂O₂-induzierter DCF-Bildung, H₂O₂-induzierter Bildung von DNA-Strangbrüchen (Comet-Assay) sowie gegenüber H₂O₂-induzierter Apoptose (Caspase-Assay) analysiert. Des Weiteren wurde die Aufnahme der getesteten Substanzen in H4IIE-Zellen untersucht.

Aus *Alyxia reinwardtii* wurden Cumarin (1), 5-Hydroxycumarin (2) und 8-Hydroxycumarin (3) sowie die Lignane Pinoresinol (4), 9 α -Hydroxypinoresinol (5) und Salicifoliol (6) isoliert. Dabei wurden 9 α -Hydroxypinoresinol und Salicifoliol im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal für *Alyxia reinwardtii* beschrieben, während (+)-Pinoresinol bereits zuvor aus dieser Pflanze bekannt war. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Analyse der Substanz mittels chiraler HPLC gezeigt werden, dass hier ein Gemisch aus (+)- und (-)- Enantiomer in einem Mischungsverhältnis von 9:1 vorlag. Des Weiteren konnte das im Rahmen dieser Arbeit isolierte Pinoresinol der Eudesmin-Form zugeordnet werden, während die Verbindung zuvor stereochemisch nicht genauer charakterisiert worden war.

Im DPPH-Assay zeigten die Cumarine keine und 9 α -Hydroxypinoresinol sowie Salicifoliol schwache Aktivität, während Pinoresinol das aktivste der drei isolierten Lignane war. Sein Gehalt war im getrockneten Methanolextrakt deutlich höher als in der Droge und im Ethylacetatextrakt. Pinoresinol war nur schwach zytotoxisch, und im COMET-Assay führte die Inkubation mit Pinoresinol zu keiner signifikanten Reduktion der H₂O₂-induzierten DNA-Strangbrüche. Aber es konnte erstmals der protektive Effekt von Pinoresinol gegenüber H₂O₂-induzierter DCF-Bildung sowie die Aufnahme dieses Lignans in H4IIE-Zellen nachgewiesen werden, wobei sowohl die protektiven Effekte gegenüber oxidativem Stress als auch die Aufnahme in die Zellen deutlich schwächer waren als bei ebenfalls untersuchten Flavonoiden. Bei der Aufnahme von Pinoresinol in H4IIE-Zellen wurde die maximale intrazelluläre

Konzentration nach einer Stunde erreicht und sank danach rasch wieder ab. Für Pinoresinol konnten im Gegensatz zu den Flavonoiden per HPLC keine Metaboliten in H4IIE-Zellen nachgewiesen werden.

In dem Methanolextrakt von *Alstonia scholaris* ging die antioxidative Aktivität im Laufe der Aufarbeitung verloren. Aus dieser Pflanze wurde hier erstmals Vanillin (7) isoliert sowie das Palmarumycin-Derivat Sch53823 (8). Da diese Substanzklasse bis jetzt hauptsächlich für Pilze beschrieben wurde, wurde aus der Droge DNA isoliert, die dann mit pilzspezifischen Primern mittels PCR amplifiziert und sequenziert wurde. Dabei konnte die DNA von drei verschiedenen Pilzen nachgewiesen werden, von denen einer nach Vergleich mit GenBank als der Endophyt *Botryoshaeria rhodina* identifiziert wurde. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass Sch53823 nicht von der Pflanze selbst, sondern von einem dieser drei Pilze produziert wurde. Sch53823 war nur schwach antioxidativ aktiv. Es zeigte ausserdem keine Wachstumshemmung auf L-, Hela- und PC 12-Zellen und keine Hemmwirkung gegenüber *Cladosporium cucumerinum*.

Aus den Blättern von *Guazuma ulmifolia* aus Indonesien, die offenbar bisher noch nicht phytochemisch untersucht worden sind, wurden erstmals die Flavonoide Apigenin (9) und Luteolin (10) isoliert. Luteolin zeigte im DPPH-Assay sehr starke antioxidative Aktivität, während Apigenin aufgrund des Fehlens einer zweiten Hydroxygruppe in *ortho*-Stellung am B-Ring nahezu inaktiv war. Der Luteolingehalt war im getrockneten Methanolextrakt deutlich höher als in der Droge. Im Neutralrotassay betrug der EC₅₀-Wert des Luteolins 100 µM. Des weiteren wurden protektive Effekte gegenüber H₂O₂-vermittelter DCF-Bildung in H4IIE-Zellen nachgewiesen, und im COMET-Assay verminderte die einstündige Vorinkubation von H4IIE Zellen mit 50 µM Luteolin die H₂O₂-vermittelte Entstehung von DNA-Strangbrüchen um 70 bis 80%. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass Luteolin in Konzentrationen unter 50 µM die Zellen vor oxidativem Stress schützt, in Konzentrationen über 100 µM aber selbst toxisch ist und die Zellen schädigt. Luteolin wurde innerhalb der ersten 30 min von H4IIE-Zellen aufgenommen. Dann sank die intrazelluläre Luteolinkonzentration schnell wieder ab. Mit Hilfe von HPLC-MS-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Absinken der intrazellulären

Flavonoidkonzentration auf die Glucuronidierung des Moleküls an zwei verschiedenen Stellen zurückzuführen war.

Im Gegensatz zu der indonesischen Blattdroge enthielten die Blätter der Gewächshauspflanze keine Flavonoide, sondern die Phenylethanoide Acteosid (11) und Isoacteosid (12), die wiederum nicht in den Blättern der indonesischen Pflanze enthalten waren. Acteosid und Isoacteosid wurden hier zum ersten Mal aus *Guazuma ulmifolia* isoliert. Sie waren *in vitro* stark antioxidativ aktiv. Der Acteosidgehalt war im getrockneten Methanolextrakt besonders hoch, während der Isoacteosidgehalt hier weniger als die Hälfte des Acteosidgehaltes betrug. Die Acteoside zeigten beide den Flavoniden vergleichbare Zytotoxizitäten, wobei Isoacteosid in C6-Zellen, an denen die beiden Phenylethanoide zusätzlich getestet wurden, zu einer signifikant stärkeren Abnahme der lebensfähigen Zellen führte als Acteosid, während in H4IIE-Zellen beide Substanzen nahezu gleich zytotoxisch waren. Die Bildung einer DNA-Leiter infolge von Apoptose konnte dagegen für keine der beiden Verbindungen nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten die Acteoside protektive Effekte gegenüber H₂O₂-induzierter DCF-Bildung, aber keine antiapoptotische Wirkung. Da im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass Acteoside weder in H4IIE- noch in C6-Zellen aufgenommen werden, ist anzunehmen, dass sowohl ihre Zytotoxizität als auch ihre protektive Wirkung gegenüber H₂O₂-induzierter DCF-Bildung nicht von einer Aufnahme in das jeweilige zelluläre System abhängig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Gewächshauspflanze durch Transfair ins Freiland aufgrund der damit verbundenen UV-Strahlung zur Produktion von Flavonoidglykosiden bzw. -glucuroniden oder -galacturoniden angeregt werden kann.

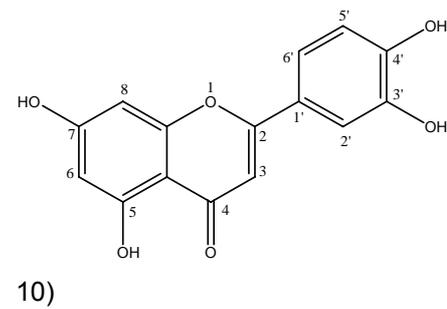
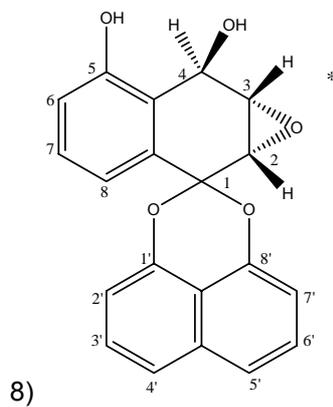
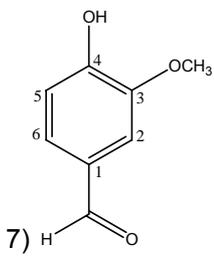
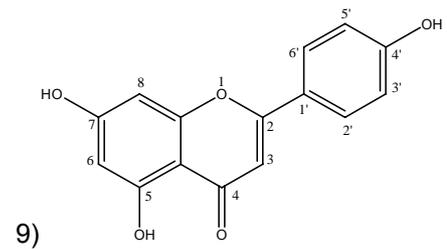
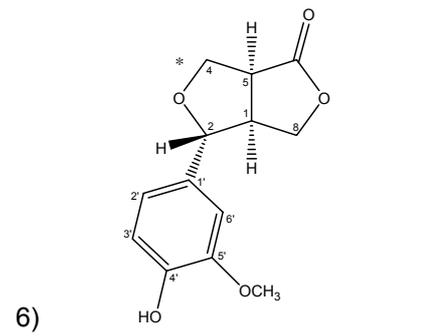
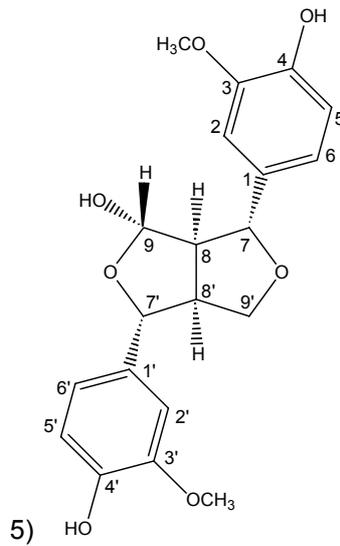
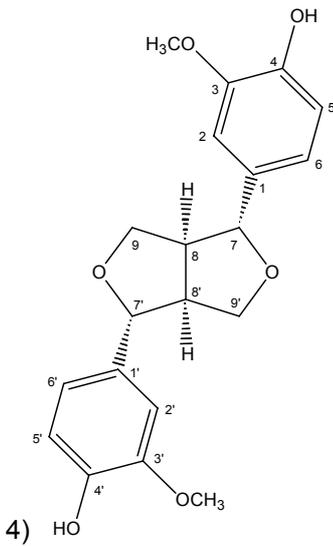
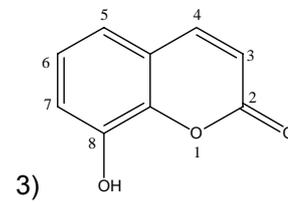
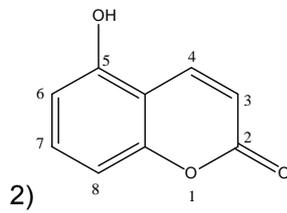
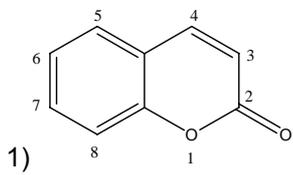
Aus der Rinde von *Guazuma ulmifolia* wurden (+)-Abscisinsäure (13), Scopoletin (14), (-)-Catechin (15), (-)-Epicatechin (16) sowie Procyanidin B2 (17a) oder B5 (17b) isoliert. Hier konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um Procyanidin B2 oder um Procyanidin B5 handelte. Dabei waren (-)-Catechin und (-)-Epicatechin stark antioxidativ aktiv und lagen vor allem im Methanolextrakt in grosser Menge vor. Weder (-)-Catechin noch (-)-Epicatechin waren in H4IIE-Zellen zytotoxisch. Deshalb wurde hier auf weitere Versuche im zellulären System sowie auf Aufnahmestudien verzichtet.

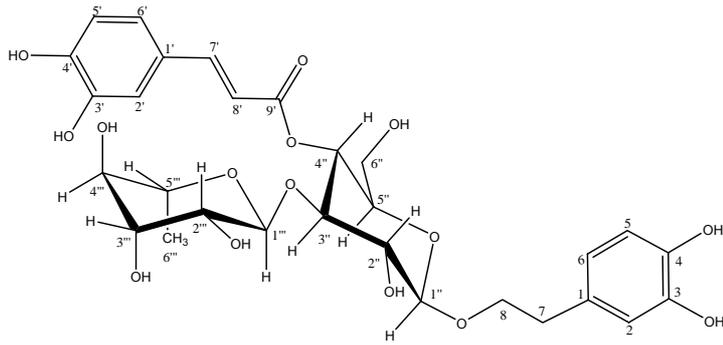
Aus den Blättern von *Sauropus androgynus* wurde 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol (18) isoliert, welches im Methanolextrakt die Hauptkomponente darstellte. Im DPPH-Assay war diese Verbindung inaktiv. Sein Aglykon Kämpferol, welches im Dünndarm durch die Glycosidase-Aktivität intestinaler Bakterien aus dem Diglucosid entsteht, zeigte dagegen starke antioxidative Aktivität. Im Neutralrotassay betrug der EC₅₀-Wert des Kämpferols 70 μ M, und es wurden ebenso wie bei Luteolin protektive Effekte gegenüber H₂O₂-vermittelter DCF-Bildung in H4IIE-Zellen nachgewiesen. Im COMET-Assay verminderte die einstündige Vorinkubation der Zellen mit 50 μ M Kämpferol die H₂O₂-vermittelte Entstehung von DNA-Strangbrüchen ebenfalls um 70 bis 80%. Kämpferol scheint also ebenso wie Luteolin H4IIE-Zellen in Konzentrationen bis zu 50 μ M vor oxidativem Stress zu schützen, während Konzentrationen über 70 μ M toxisch sind und zum Zelltod führen können. Kämpferol wurde ähnlich schnell wie Luteolin innerhalb der ersten 60 min von den H4IIE-Zellen aufgenommen. Die intrazelluläre Kämpferolkonzentration sank dann, ebenso wie bei Luteolin nachgewiesen, infolge von Glucuronidierung des Flavonoids an zwei verschiedenen Stellen. Im Gegensatz dazu wurde 3-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosylkämpferol, wahrscheinlich aufgrund des Zuckerrestes in 3-Position, nicht in H4IIE-Zellen aufgenommen.

Aus den untersuchten Jamu-Pflanzen wurden acht stark antioxidativ aktive Inhaltsstoffe isoliert, identifiziert, in der jeweiligen Droge quantifiziert und die antioxidativen Eigenschaften charakterisiert. Dabei zeigten Acteosid und Isoacteosid *in vitro* die stärkste antioxidative Aktivität und waren auch in der Lage, H4IIE-Zellen vor oxidativem Stress zu schützen, wurden aber nicht von diesen aufgenommen. Auch Kämpferol und Luteolin sowie (+)-Catechin, (-)-Catechin und (-)-Epicatechin waren *in vitro* stark aktiv. Für Luteolin und Kämpferol konnte ebenso wie für Pinoresinol die Aufnahme in H4IIE-Zellen gezeigt werden. Während Luteolin und Kämpferol starke protektive Eigenschaften gegenüber H₂O₂-vermittelter DCF-Bildung und H₂O₂-vermittelten DNA-Strangbrüchen in H4IIE-Zellen zeigten, war die Aktivität von Pinoresinol deutlich schwächer.

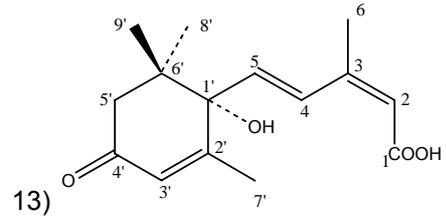
Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus den untersuchten traditionell angewendeten indonesischen Heilpflanzen erstmals stark antioxidativ aktive Inhaltsstoffe isoliert und deren Aktivität in einem zellulären System belegt. Damit konnte ein

naturwissenschaftlicher Nachweis für den volksmedizinisch-empirisch ermittelten gesundheitsfördernden Effekt des regelmässigen Konsums dieser Heilpflanzen erbracht werden.

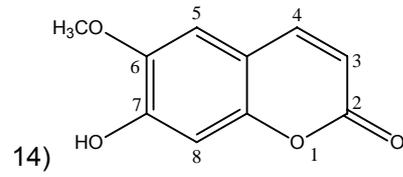




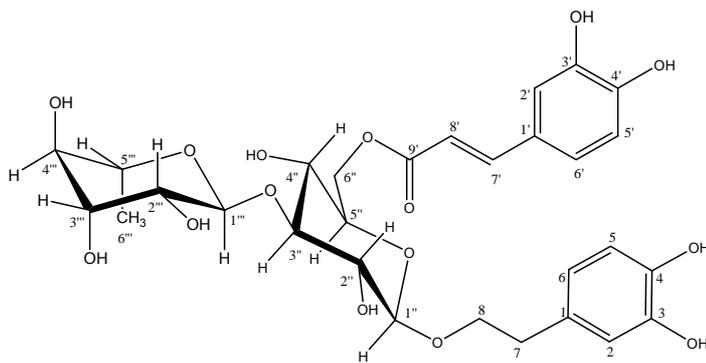
11)



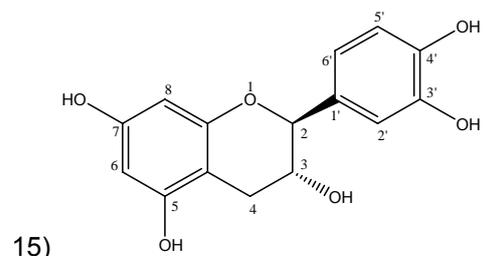
13)



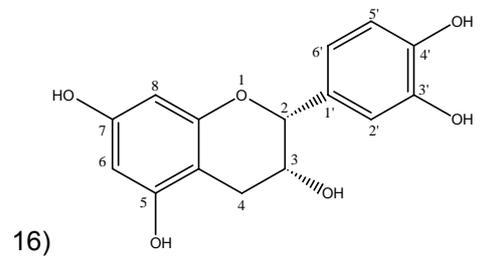
14)



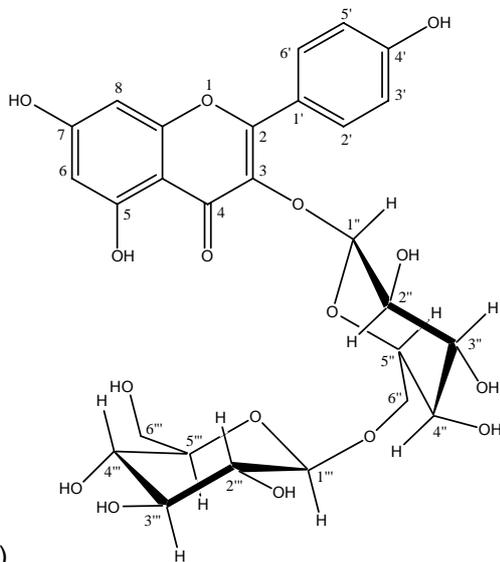
12)



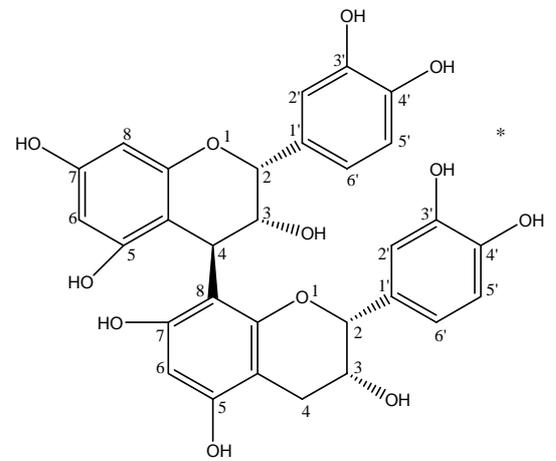
15)



16)

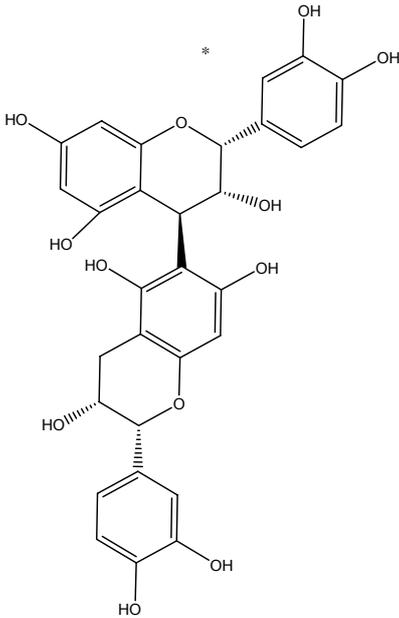


18)



17a)

17b)



6. Literaturverzeichnis

Abe F. und Yamauchi T. (1988) 9α -hydroxypinorsinol, 9α -hydroxymedioresinol and related lignans from *Allamanda neriifolia*. *Phytochem* **27**: 575-577

Afdhal, A.F. und Welsch, R.L. (1991) The rise of the modern Jamu. In: Van der Geest, S. and White, S.R. (eds.): *The Context of Medicines in Developing Countries*. Het Spinhuis, Amsterdam: 149-172

Alarcon-Aguilara, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguila-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., Flores-Saenz, J.L. (1998) Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology* **61**:101-110

Ammon, H.P.T. (1987) Ayurveda - 3000 Jahre indische traditionelle Medizin. *Z. Phytother.* **8**: 189-194

Anthony, S., Kuttan, R., Kuttan, G. (1999) *Immunol. Invest.* **28**: 291-303

Areias, F.M., Rego, A.C., Oliveira, C.R., Seabra, R.M. (2001) Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe(2+)-induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochem. Pharmacol.* **62**:111-118

Assante, G., Merlini, L., Nasini, G. (1977) (+)-Abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*, *Experientia* **33**: 1556-1557

Babich, H., Shopsis, C., Borenfreund, E. (1986) In vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines. *Ecotox. Environ. Safety* **11**: 91-99

Batterham, T.J. und Highet, R.J. (1964) Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Flavonoids. *Aust. J. Chem.* **17**: 428-439

Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. und Sweet, W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**: 370-371

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **175**: 7931-7937

Brown, J.E. und Rice-Evans, C.A. (1998) Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. *Free Radic. Res.* **29**: 247-255

Burri, J., Graf, M., Lambelet, P., Löliger, J. (1989) Vanillin: more than a flavouring agent-a potent antioxidant. *J. Sci. Food Agric.* **48**: 49-56

Chang, Y.-L., Chen, J.-S., Wu, H.-D., Lee, Y.-C. (2000) Retransplantation of Contralateral Lung in a Patient With *Sauropus androgynus*-Induced Bronchobronchiolitis obliterans. *Transplantation Proceedings* **32**: 2432-2434

Chen, C.-C., Chen, H.-Y., Shiao, M.-S., Lin, Y.-L., Kuo, Y.-H., Ou, J.-C. (1999) Inhibition of Low Density Lipoprotein Oxidation by Tetrahydrofurofuran Lignans from *Forsythia suspensa* and *Magnolia coco*. *Planta Medica* **65**: 709-711

Chiou, W.F., Lin, L.C., Chen, C.F. (2004) Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **56**: 743-748

Chu, M., Truumees, I., Patel, M., Blood, C., Das, P.R., Puar, M.S. (1995) Sch 50673 and Sch 50676, Two Novel Antitumor Fungal Metabolites. *The Journal of Antibiotics* **48(4)**: 329-331

Coll, J.C. und Bowden, B.F. (1986) *J. Nat. Prod.* **49**: 934

Connolly, J.D. (1990) Structural Elucidation of Some Natural Products. In: Atta-ur-Rahman (ed) *Frontiers in Natural Product Chemistry*, Elsevier, Amsterdam Oxford New York Tokyo: 524-539

Constantino, M.G., Donate, P.M., Petraghani, N. (1986) An Efficient Synthesis of (\pm)-Abscisic Acid. *J. Org. Chem.* **51**:254-256

Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C., Gaydou E.M. (1996) Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* **20**: 35-43

Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. (2002) Quercetin, but not Its Glycosides, Is Absorbed from the Rat Stomach. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 618-621

Cui, C.-B., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Nakano, H., Tamaoki, T., Park, J.-H. (1992) Constituents of a Fern, *Davallia mariesii* MOORE. II.¹⁾ Identification and ¹H- and ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Procyanidin B-5, Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →6)-epicatechin, and Epicatechin-(4 β →6)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →6)-epicatechin. *Chem.Pharm.Bull.* **40 (4)**: 889-898

Davis, A.L., Cai, Y., Davies, A.P., Lewis, J.R. (1996) ¹H and ¹³C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, Vol. **34**: 887-890

De Bruyne, T., Pieters, L.A.C., Dommisse, R.A., Kolodziej, H., Wray, V., Domke, T., Vlietinck, A.J. (1996) Unambiguous Assignments For Free Dimeric Proanthocyanidin Phenols From 2D NMR. *Phytochemistry* **43(1)**: 265-272

Derijke, Y.B., Demacker, P.N.M., Assen, N.A., Sloots, L.M., Katan, M.B., Stalenhoef, A.F.H. (1996) Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am J Clin Nutr* **63**: 329-334

Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Version 13.2, December 2004, *Chapman and Hall/CRC*, London

Duthie, S.J. und Dobson, V.L. (1999) Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur. J. Nutr.* **38**: 28-34

Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Mäenpää, J., Perttunen, K., Kenraali, J., Parantainen, J., Aro, A. (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **56**: 545-553

Ferroluzzi, A. und Serafini, M. (1995) Polyphenols in our diet: Do they matter? *Nutrition* **11**: 399-400

Fonseca, S.F., Nielsen, L.T., Rúveda, E.A. (1979) Lignans of *Araucaria angustifolia* and ¹³C NMR Analysis of some Phenyltetralin Lignans. *Phytochemistry* **18**: 1703-1708

Frohne, D. und Jensen, U. (1998) Systematik des Pflanzenreichs, 5. Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*, Stuttgart

Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G., Johnson, I.T. (2000) Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway. *J. Nutr.* **130**: 2765-2771

Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. (1977) Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary G.L.C. *Carbohydr. Res.* **62**: 349-357

Gonzalez, A.G., Estevez-Reyes R., Mato C. (1989) Salicifoliol, a new furo lactone-type lignan from *Bupleurum salicifolium*. *J Nat Prod* **52**: 1139-1142

Hänsel, R. und Sticher, O. (2004) Pharmakognosie-Phytopharmazie, 7. Auflage. *Springer-Verlag*, Heidelberg

Hamid, A. und Sitepu, D. (1990) An understanding of native herbal medicine in Indonesia. *Indust. Crops. Res.* **3**: 11-17

Harbowy, M.E. und Balentine, D.A. (1997) Tea chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences* **16**: 415-480

Harper, A., Kerr, D.J., Gescher, A., Chipman, J.K. (1999) Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation. *Free Radic. Res.* **31**: 149-160

Heinrich, M., Rimpler, H., Barrera, N.A. (1992) Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. *J Ethnopharmacol.* **36(1)**: 63-80

Heinrich, M. (2001) Ethnopharmazie und Ethnobotanik - Eine Einführung. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*, Stuttgart

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (1991) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, *Georg-Thieme-Verlag*, Stuttgart

Hocking, M.B. (1997) Vanillin: Synthetic Flavoring from Spent Sulfite Liquor. *Journal of Chemical Education* **74(9)**: 1055-1059

Hör, M., Rimpler, H., Heinrich, M. (1995) Inhibition of Intestinal Chloride Secretion by Proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia*. *Planta Med.* **61(3)**: 208-212

Hör, M., Heinrich, M., Rimpler, H. (1996) Proanthocyanidin Polymers with Antisecretory Activity and Proanthocyanidin Oligomers from *Guazuma ulmifolia* Bark. *Phytochemistry* **42 (1)**:109-119

Hollman, P.C.H. und Katan, M.B. (1998) Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol. Suppl.* **20**: 237-248

Hollman, P.C. und Katan, M.B. (1999) Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic. Res.* **31**: S75-80

Hunnius, C., Burger, A., Wachter, H. (1993) Hunnius' pharmazeutisches Wörterbuch, 7.Auflage. *de Gruyter*, Berlin

Inoue, M., Ueda, M., Ogihara, Y., Saracoglu, I. (1998) Induction of cytokines by a phenylpropanoid glycoside acteoside. *Biol. Pharm. Bull.* **21(12)**: 1394-1395

Jadulco, R.C. (2002) Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Marine Sponges and Sponge-derived Fungi. Dissertation Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Kasai, R., Ogawa, K., Ohtani, K., Ding, J.-K., Chen, P.-Q., Fei, C.-J., Tanaka, O. (1991) Phenolic Glycosides from Nuo-Mi-Xang-Cao, a Chinese Acanthaceous Herb. *Chem. Pharm. Bull.* **39 (4)**: 927-929

Katsuzaki, H., Osawa, T., Kawakishi, S. (1994) Chemistry and antioxidative activity of lignan glucosides in sesame seed. *ACS Symposium Series* **547** (Food Phytochemicals for Cancer Prevention II): 275-280

Kayser, O. und Kolodziej, H. (1997) Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, *Planta Med.* **63(6)**: 508-510

Khan, K.A. und Shoeb, A. (1985) A Lignan from *Lonicera hypoleuca*. *Phytochemistry* **24(3)**: 628-630

Khan, M.L., Haslam, E., Williamson, M.P. (1997) Structure and Conformation of the Procyanidin B-2 Dimer. *Magn. Reson. Chem.* **35**: 854-858

Kirby, A.J., Schmidt, R.J. (1997) The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs. *J. Ethnopharmacol.* **2**: 103-108

Kitagawa, I., Shibuya, H., Baek, N.I., Yokokawa, Y., Nitta, A., Wiriadinata, H., Yoshikawa, M. (1988) Pulosarioside, a new bitter trimeric-iridoid diglucoside from an Indonesian Jamu, the bark of *Alyxia reinwardtii* BL. (Apocynaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **36 (10)**: 4232-4235

Kizu, H., Habe, S., Ishida, M., Tomimori, T. (1994) Studies on the Nepalese Crude Drugs XVII. On the Naphthalene Related Compounds from the Root Bark of *Oroxylum indicum* VENT. *Yakugaku Zasshi* **114 (7)**: 492-513

Krohn, K., Michel, A., Flörke, U., Aust, H.-J., Draeger, S., Schulz, B. (1994) Palmaromycins C₁-C₁₆ from *Coniothyrium* sp.: Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity. *Liebigs Ann. Chem.* 1099-1108

Krohn, K. (2003) Natural Products Derived from Naphthalenoid Precursors by Oxidative Dimerization. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.* **85**: 1-49

Kuntz, S., Wendel, U., Daniel, H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.* **38**:133-142

Lee, L.T., Huang, Y.T., Lee, P.P., Ke, F.C., Nair, M.P., Kanadaswam, C., Lee, M.T. (2002) Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res.* **22**: 1615-1627

Li, P., Anu, H., Jari, S., Teijo, Y., Heikki, V. (1999) TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology. Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress. Canberra. Australia (<http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/551.htm>)

Lin, L.-J., Lin, L.-Z., Ruangrunsi, N., Cordell, G.A. (1993) 3-Hydroxycumarin Glycosides from *Alyxia reinwardtii* var. *lucida*. *Phytochemistry* **34(3)**: 825-830

Lin, T.-J., Lu, C.-C., Chen, K.-W., Yueh, W.-C., Deng, J.-F. (1996) How do we sense about the *Sauropus androgynus* poisonings from the Poison Control Center? *Chin Med J (Taipei)* **57**: 246

Manach, C., Morand, C., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F., Remesy, C. (1997) Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* **409(1)**:12-16

Marston, A. und Hostettmann, K. (1991) *Natural Product Reports* **2**: 391

McLafferty, F.W. und Turecek, F. (1993) Interpretation of Mass Spectra, *University Science Books*, Sausalito, California

Michels, G., Wätjen, W., Niering, P., Steffan, B., Tran-Thi, Q.-H., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Bast, A., Proksch, P., Kahl, R. (2005) Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology* **206**: 337-348

Morand, C., Manach, C., Crespy, V., Remesy, C. (2000) Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors* **12(1-4)**: 169-174

Murota, K., Shimizu, S., Chujo, H., Moon, J.H., Terao, J. (2000) Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. *Arch. Biochem. Biophys.* **384(2)**: 391-397

Neumann, A.K. und Lauro, P. (1982) Ethnomedicine and biomedicine linking. *Soc. Sci. Med.* **16**: 1817-1824

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2000) The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **17**: 215-234

Niering, P., Michels, G., Wätjen, W., Ohler, S., Steffan, B., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Proksch, P., Kahl, R. (2005) Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: Implication of oxidative stress and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. in Druck

Nigdikar, S.V., Williams, N.R., Griffin, B.A., Howard, A.N. (1998) Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* **68**: 258-265

Noroozi, M., Angerson, W.J., Lean, M.E.J. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**: 1210-1218

Obidoa, O. und Obasi, S.C. (1991) Coumarin compounds in cassava diets: two health implications of scopoletin in gari. *Plant Foods Hum. Nutr.* **41(3)**: 283-289

Ohkuma K. und Addicott F.T. (1965), *Tetrahedron Lett* **29**: 2529-2535

Oritani, T. und Yamashita, K. (1987) Isolation and Structure of 4'-Hydroxy- γ -ionylideneacetic Acids from *Cercospora cruenta*, a Fungus Producing (+)-Abscisic Acid. *Agric. Biol. Chem.* **51(1)**: 275-78

Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer* **36**: 1235-1247

Oyama, Y., Hayashi, A., Ueha, T., Maekawa, K. (1994) Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res.* **635**: 113-117

Pool-Zobel, B.L., Adlercreutz, H., Gleis, M., Liegibel, U.M., Sittlington, J., Rowland, I., Wahala, K., Rechkemmer, G. (2000) Isoflavonoids and lignans have different

potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* **21**: 1247-1252

Porter, L.J. (1988) In: Harborne, J.B. (ed) *The Flavonoids: 21-62, Chapman and Hall, London*

Pouchert, C.J. und Behnke, J. (1993) *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra, Edition I, Volume 2: 919B (Apigenin), 959 A (Vanillin), 1311 B (Cumarin), 1314 B (7-Hydroxy-6-methoxycumarin)*

Proksch P. (1997) Jamu - traditionelle Heilkunde Indonesiens. *Z Phytother* **18**: 232-240

Pu, X., Song, Z., Li, Y., Tu, P., Li, H. (2003) Acteoside from *Cistanche salsa* inhibits apoptosis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in cerebellar granule neurons. *Planta Med.* **69(1)**: 65-66

Renaud, S. und Ruf, J.-C. (1994) The French paradox: vegetable or wine. *Circulation* **90**: 3118

Rogers, J.C. und Williams, D.L. Jr. (1989) Kaempferol inhibits myosin light chain kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 419-425

Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.G. (1992) *Instrumentelle pharmazeutische Analytik - Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*

Sadavongvivad C. und Supavilai P. (1977) Three monohydroxycoumarins from *Alyxia lucida*. *Phytochem* **16**: 1451

Scalbert, A. und Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**: 2073S-2085S

Scarpati, M.L. und Monache, D. (1963) *Ann. Chim.* **53**: 356

Schaffelke, B. (1995) Abscisic Acid in Sporophytes of Three *Laminaria* Species (Phaeophyta). *J. Plant Physiol.* **146**: 453-458

Schilling, G., Hügel, M., Mayer, W. (1982) Verbascosid und Isoverbascosid aus *Paulownia tomentosa* Steud. *Z. Naturforsch.* **37 b**: 1633-1635

Schmidt, T.J. (1994) Sesquiterpenlactone, Diterpene, Flavonoidaglyka und weitere Inhaltsstoffe der Blütenkörbchen von *Arnica angustifolia* Vahl und ihren Unterarten. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Schreiber, A., Carle, R., Reinhard, E. (1990) On the accumulation of apigenin in chamomile flowers. *Planta Med.* **56**:179-181

Sheng, G., Pu, X., Lei, L., Tu, P. Li, C. (2002) Tubuloside B from *Cistanche salsa* Recues the PC12 Neuronal Cells from 1-Methyl-4-phenylpyridinium Ion-Induced Apoptosis and Oxidative Stress. *Planta Med* **68**: 966-970

Shimoi, K., Okada, H., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, H., Kinae, N. (1998) Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glycoside in rats and humans. *FEBS Lett.* **438**: 220-224

Sidik (1994) The current status of jamu, and suggestions for further research and development. *Indigenous Knowledge & Development Monitor* **2**: 13-15

Soedigyo, M. (1990) Javanese traditional medicine. Paper presented at the International Congress on Traditional Medicine and Medicinal Plants, Denpasar, Bali, Indonesia

Steffan, B., Wätjen, W., Michels, G., Niering, P., Wray, V., Ebel R., Edrada, R., Kahl, R., Proksch, P. (2005) Polyphenols from plants used in traditional Indonesian

medicine (Jamu): uptake and antioxidative effects in rat H4IIE hepatoma cells. *J Pharm Pharmacol.* **57(2)**: 233-240

Sung, S.H., Park, J.H., Kim, Y.C. (1998) Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum lyartum*. *Archives of Pharmacological Research* **21(6)**: 718-722

Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., Yamada, K. (2004) A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Structural & Molecular Biology* **11(4)**: 380-381

Topcu, G., Che, C.-T., Cordell, G.A., Ruangrunsi, N. (1990) Iridolactones from *Alyxia reinwardtii*. *Phytochemistry* **29**: 3197-3199

Toshio M., Akira, K., Akira, U., Tadataka, N., Masanori, K., Seigo, F., Yoshihiko, A., Tsunematsu, T. (1982) Studies on the Acyl Glycosides from *Leucoseptrum japonicum* (MIQ.) KITAMURA et MURATA. *Chem.Pharm. Bull.* **30(3)**: 2732-2737

Wätjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Tran-Thi, Q.-H., Proksch, P., Kahl, R. (2005) Low Concentrations of Flavonoids Are Protective in Rat H4IIE Cells Whereas High Concentrations Cause DNA Damage and Apoptosis. *J Nutr.* **135(3)**: 525-531

Walton, N. J., Mayer, M. J., Narbad, A. (2003) Vanillin. *Phytochemistry* **63**: 505-515

Wang, J.F., Schramm, D.D., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Fraga, C.G., Schmitz H.H. et al. (2000) A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr.* **130**: 2115S-2119S

Wang P.-H. und Lee S. (1997) Active chemical constituents from *Sauropus androgynus*. *J Chinese Chem Soc* **44**: 145-149

Wichtl, M., Czygan, F.-C., Frohne, D., Hiller, K., Hölzel, C., Nagel, A., Pachaly, P., Pfänder, H.J., Willuhn, G., Buff, W. (2002) Teedrogen und Phytopharmaka. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*, Stuttgart

Wittig, J. (2001) Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Flavonoiden - analytische und biochemische Untersuchungen. Dissertation Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Wolffram, S., Blöck, M., Ader, P. (2002) Quercetin-3-Glucoside Is Transported by the Glucose Carrier SGLT1 across the Brush Border Membrane of Rat Small Intestine: *J. Nutr.* **132**: 630-635

Youssef, D. und Frahm, A.W. (1995) Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; III. Phenolic Constituents of the Aerial Parts. *Planta Med.* **61**:570-573

Zeller, A.P. (1985) Das neue große Länder-Lexikon in Farbe. *Zweiburgen Verlag GmbH*, Weinheim

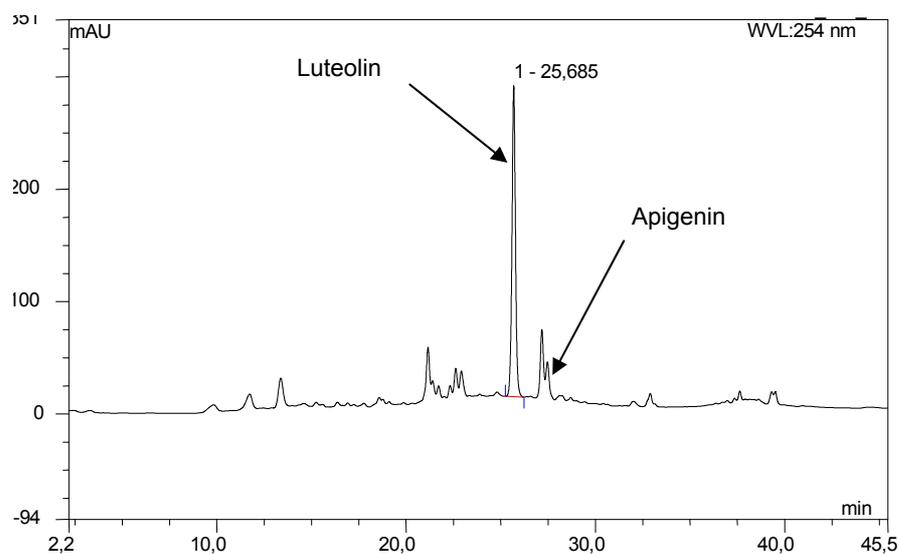
Zhu, H., Bannenberg, G.L., Moldeus, P., Shertzer, H.G. (1994) Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlororfluorescein. *Arch. Toxicol.* **68**: 582-587

7. Anhang

7.1. HPLC-Chromatogramme der Extrakte und Fraktionen

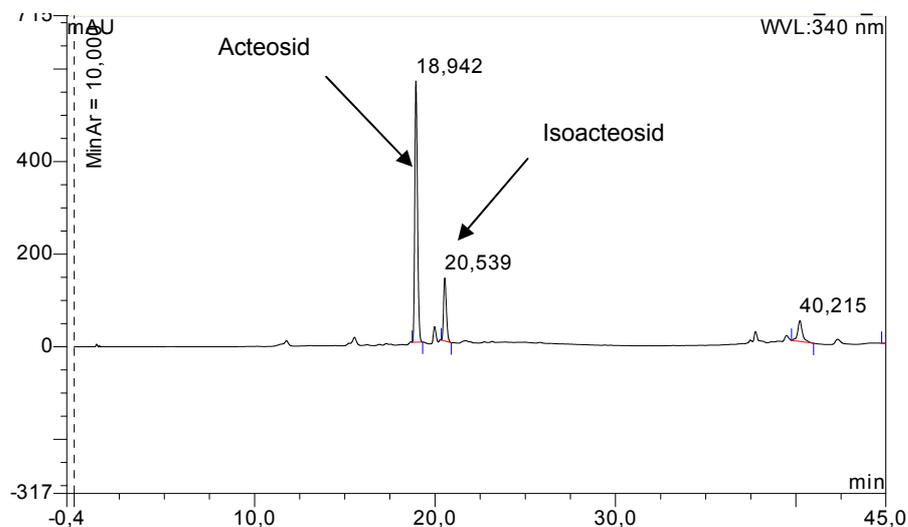
Guazuma ulmifolia (Blätter aus Indonesien): MeOH-Extrakt

Rohextrakt



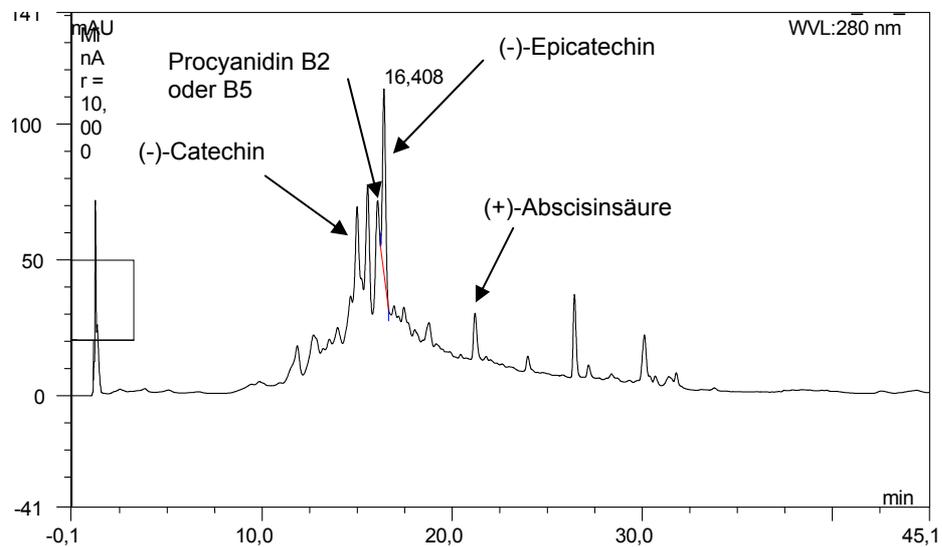
Guazuma ulmifolia (Blätter, Gewächshaus): MeOH-Extrakt

Rohextrakt

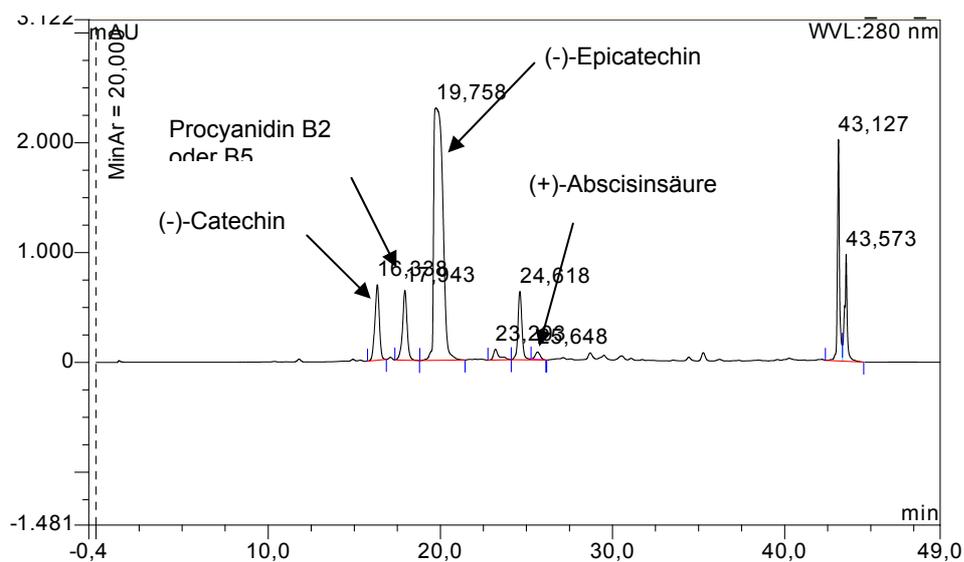


Guazuma ulmifolia (Rinde, Gewächshaus): MeOH-Extrakt

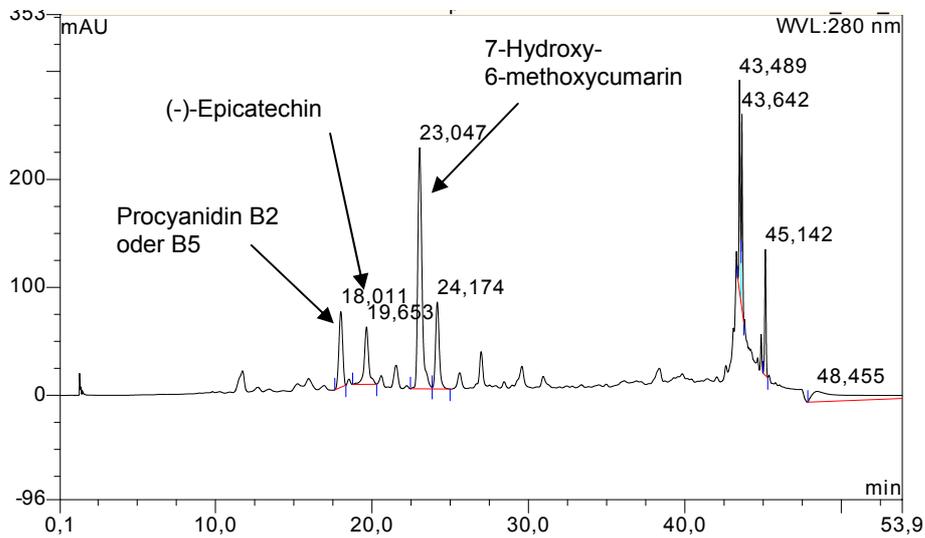
Rohextrakt



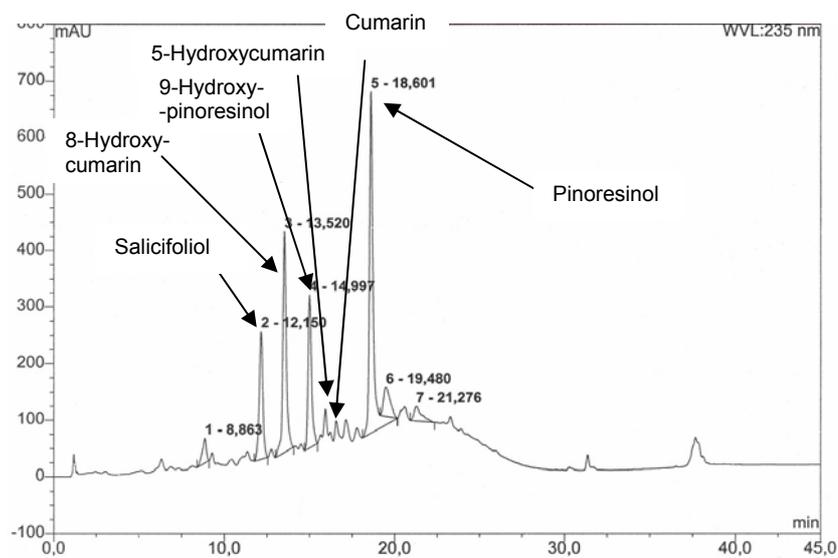
EtOAc-Fraktion-VLC100%EtOAc



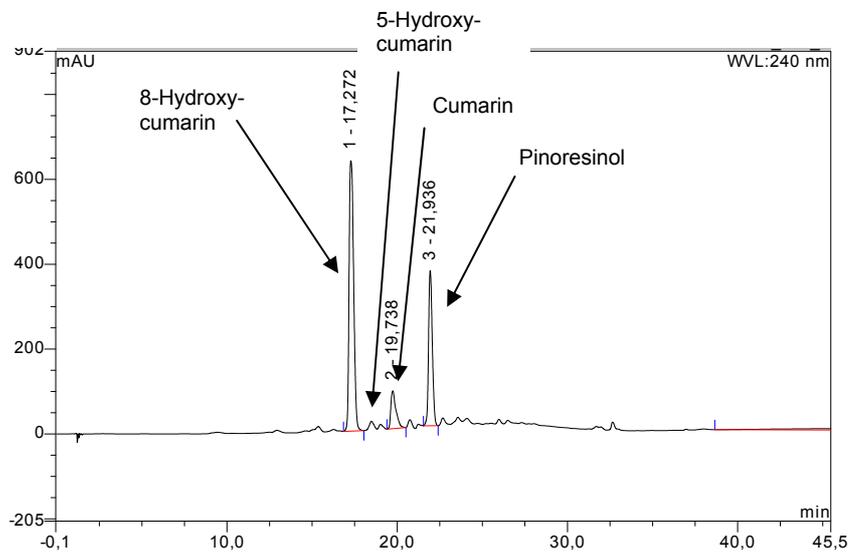
Sephadexsäule62-80

***Alyxia reinwardtii* (Rinde): MeOH-Extrakt**

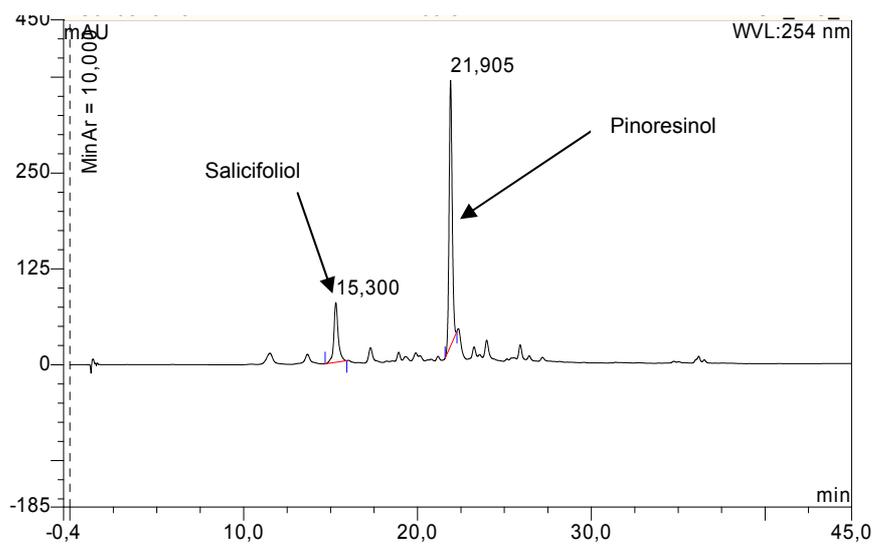
Rohextrakt



MeOH-Fraktion

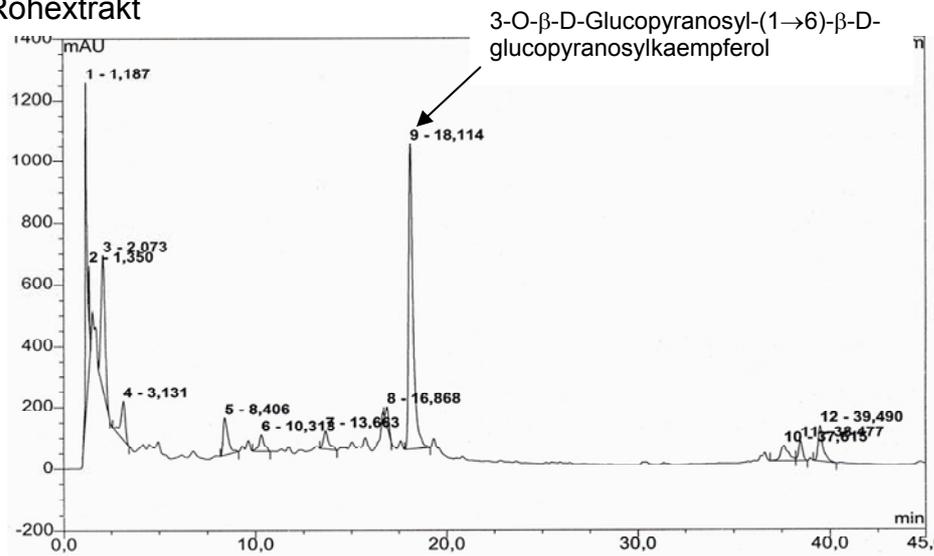


50%Wasser-Kieselgelsäule69-81M

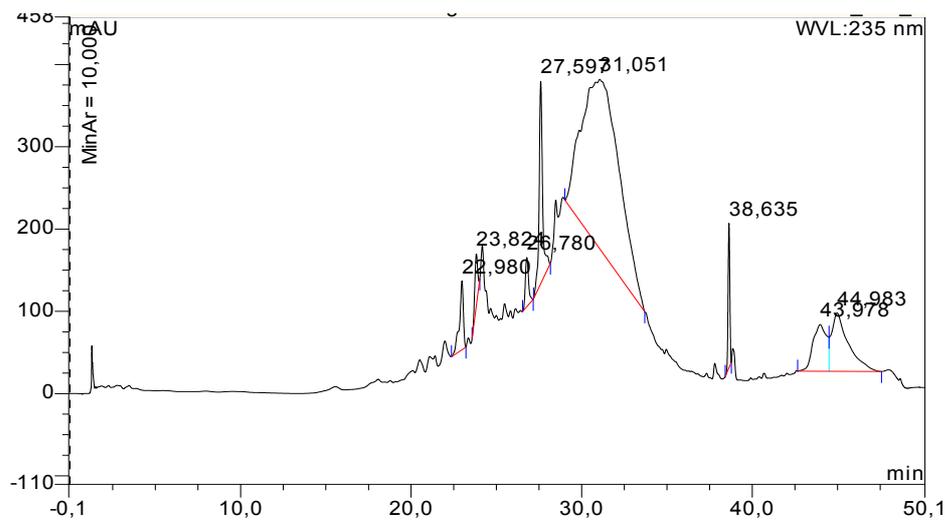


***Sauropus androgynus* (Blätter): MeOH-Extrakt**

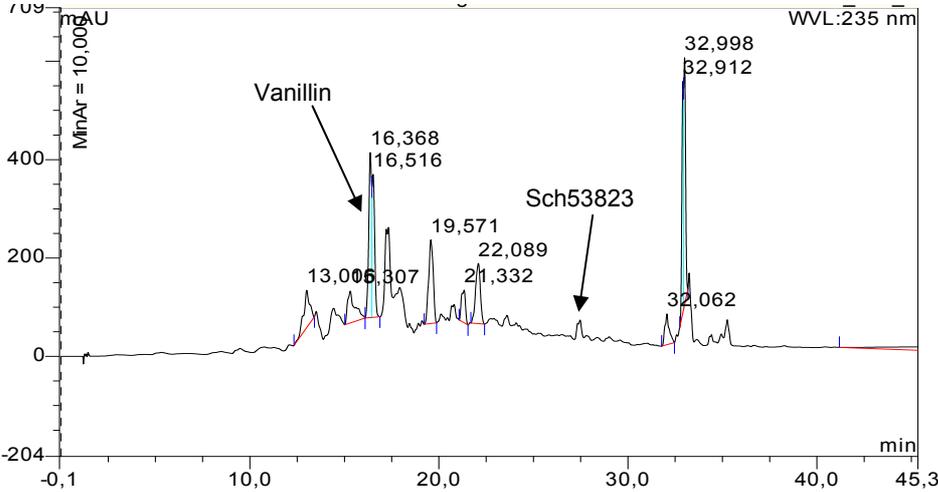
Rohextrakt

***Alstonia scholaris* (Rinde): MeOH-Extrakt**

Rohextrakt

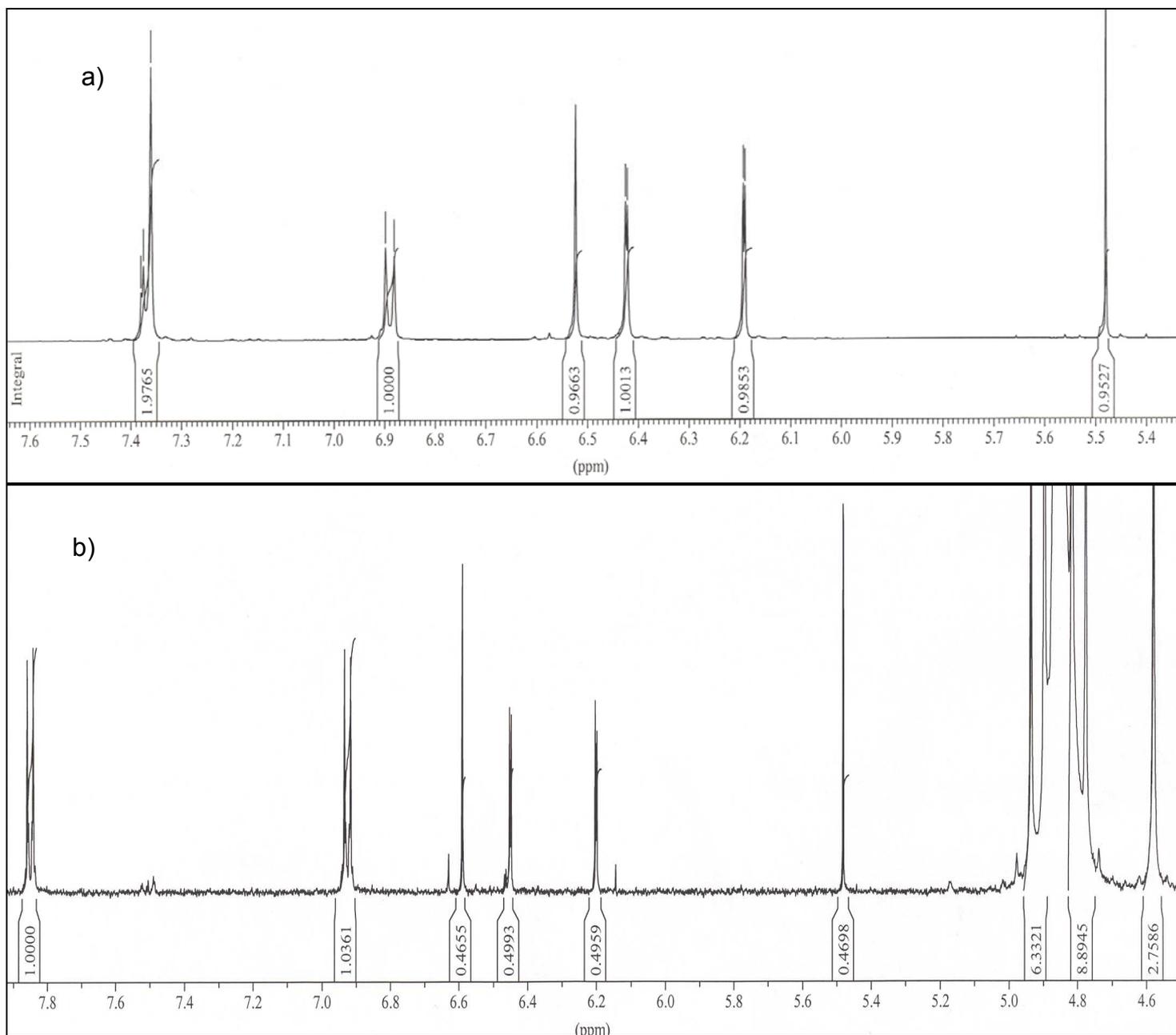


EtOAc-Fraktion-VLC10

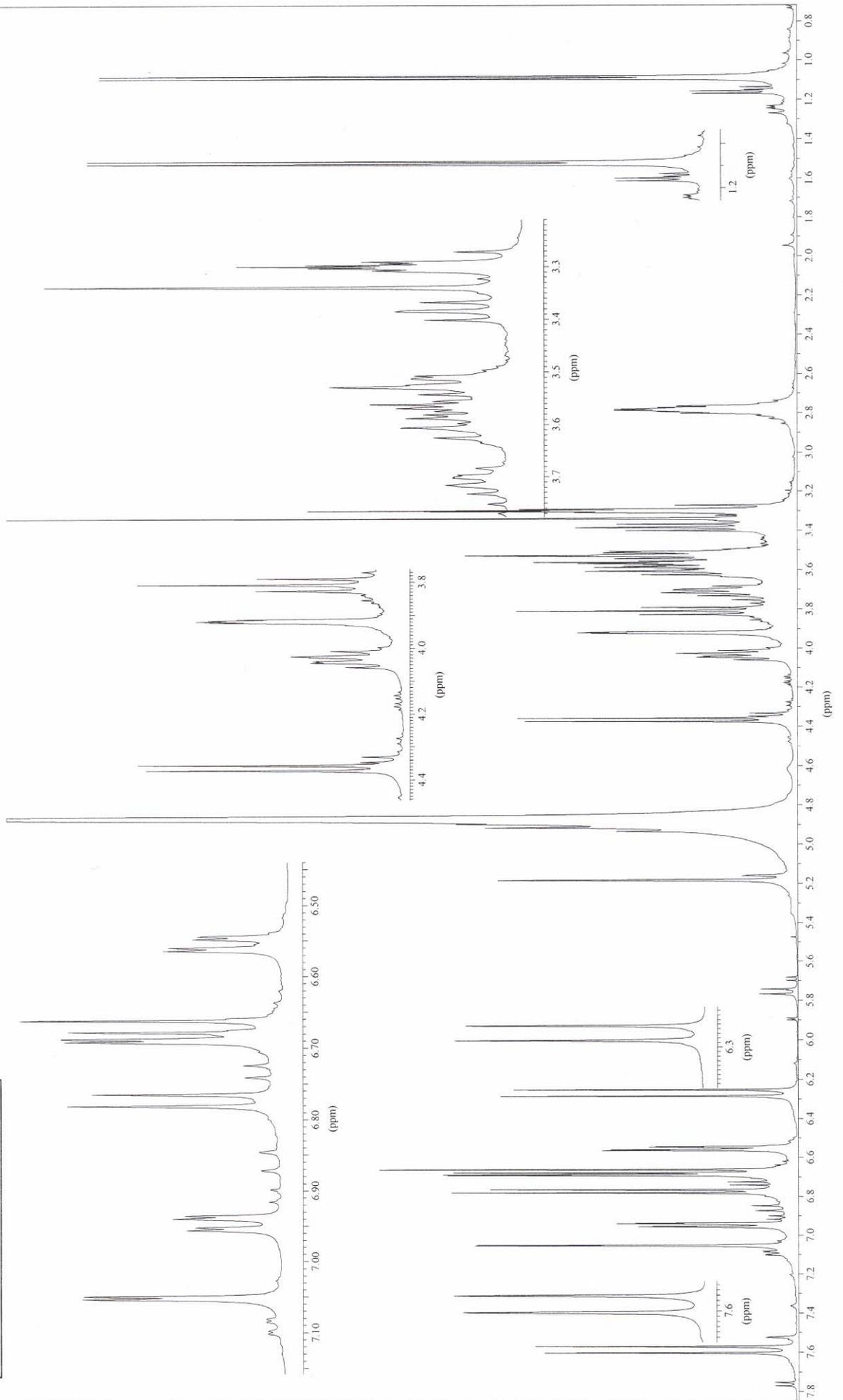


7.2. NMR-Spektren der isolierten Inhaltsstoffe

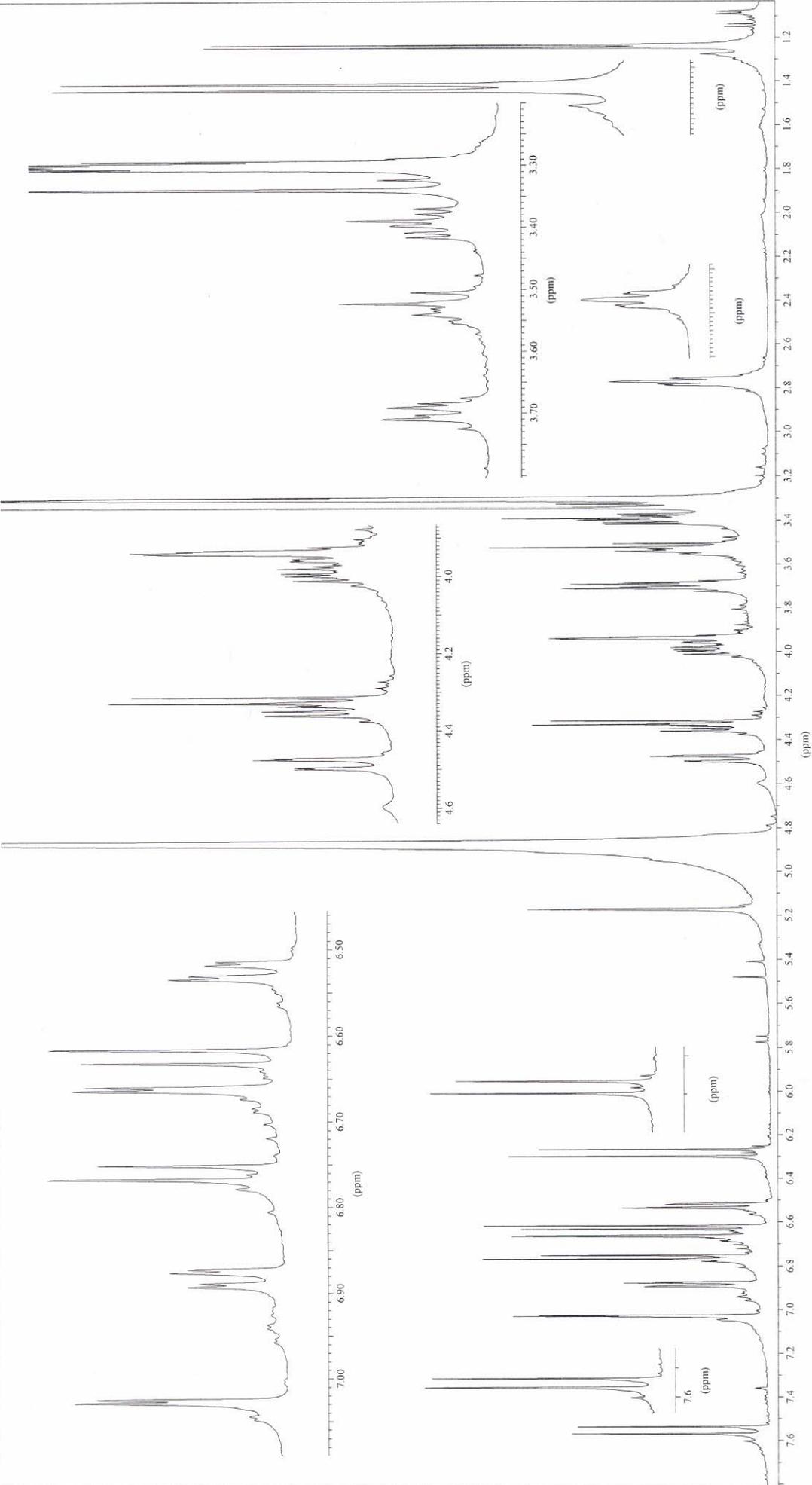
¹H-Spektren von Luteolin (a) und Apigenin (b)

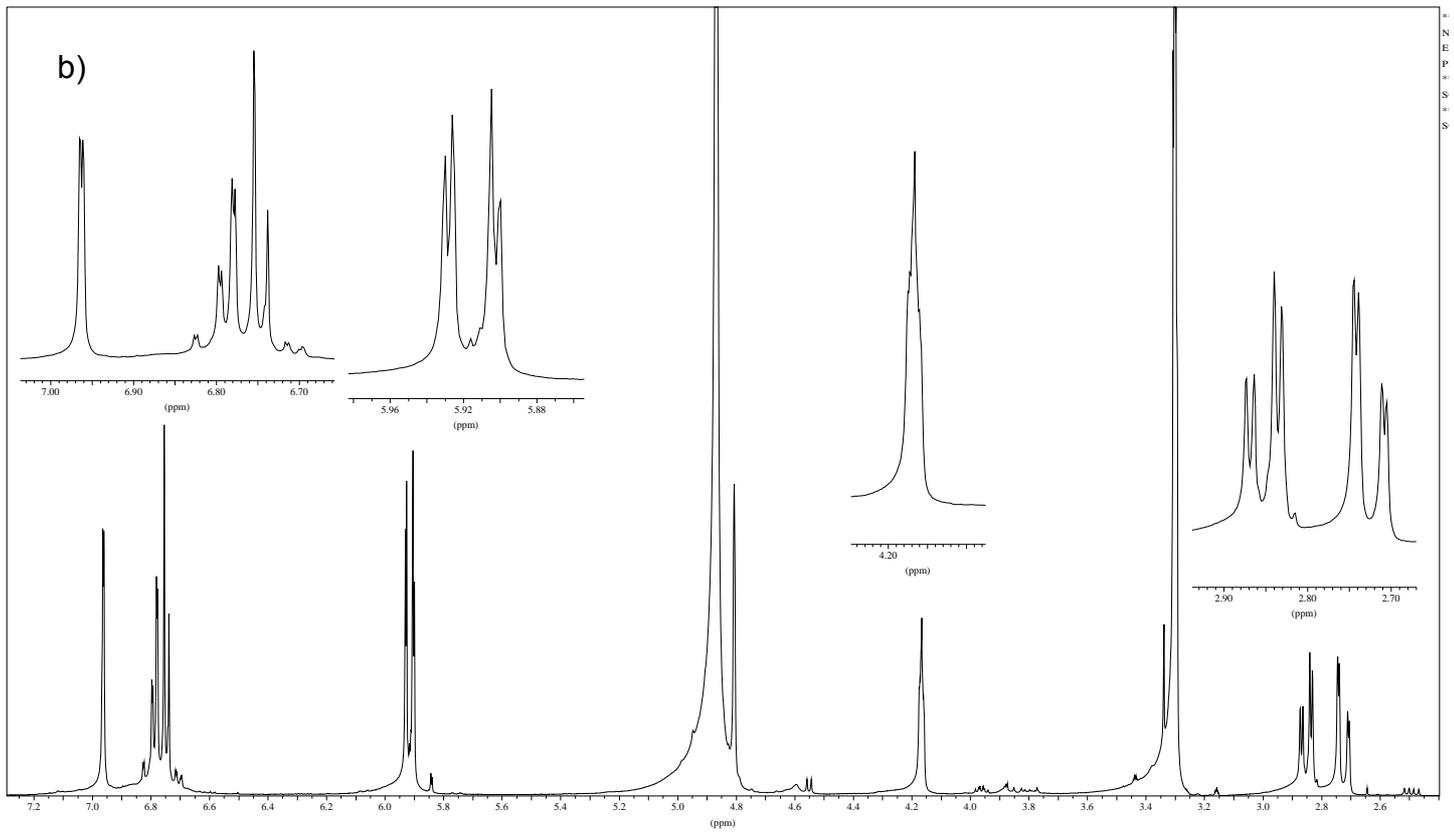
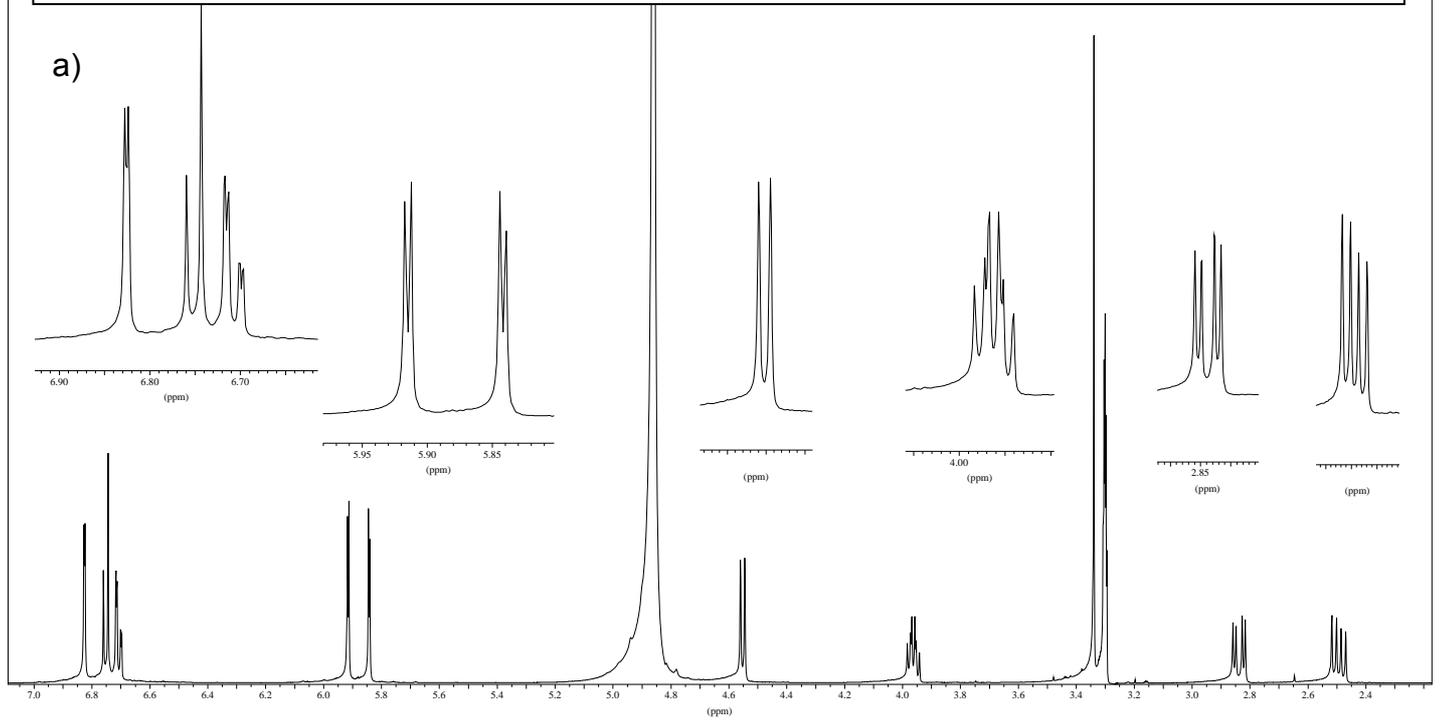


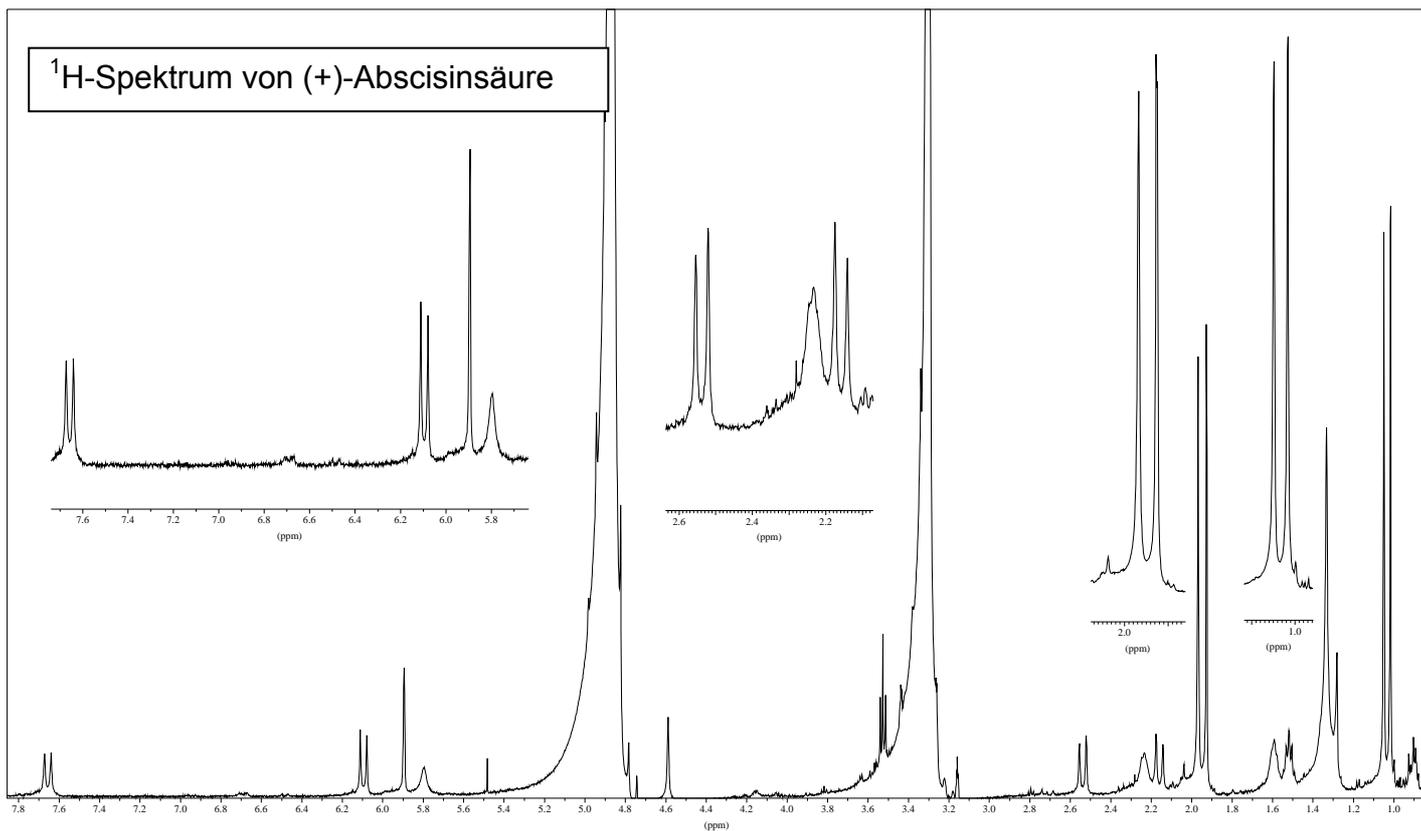
¹H-Spektrum von Acteosid

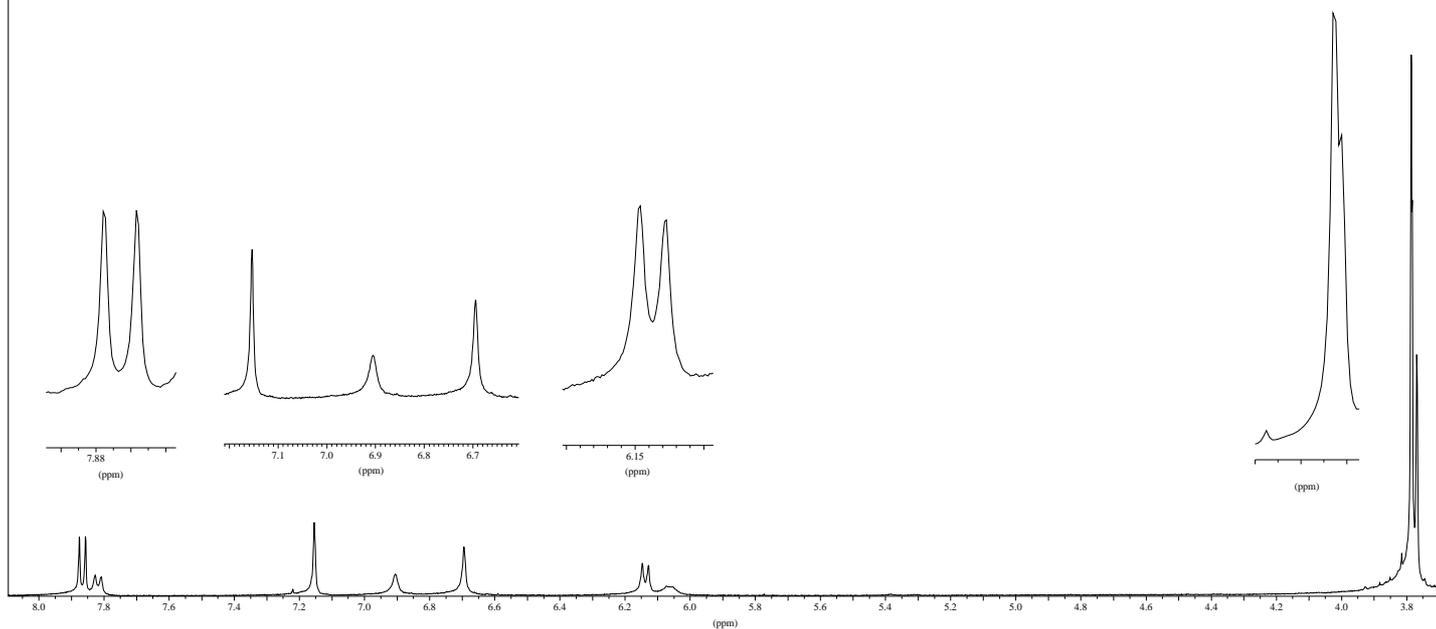


¹H-Spektrum von Isoacteosid



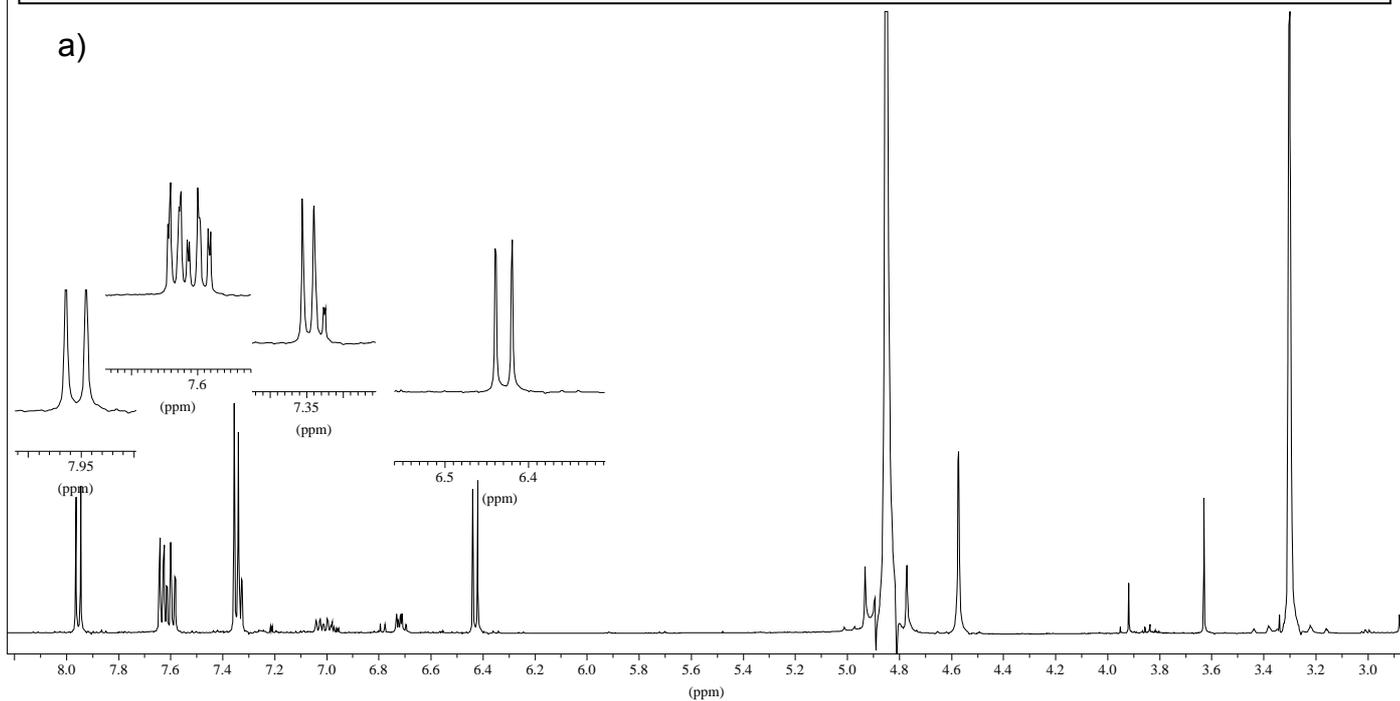
^1H -Spektren von (-)-Epicatechin (a) und (-)-Catechin (b)



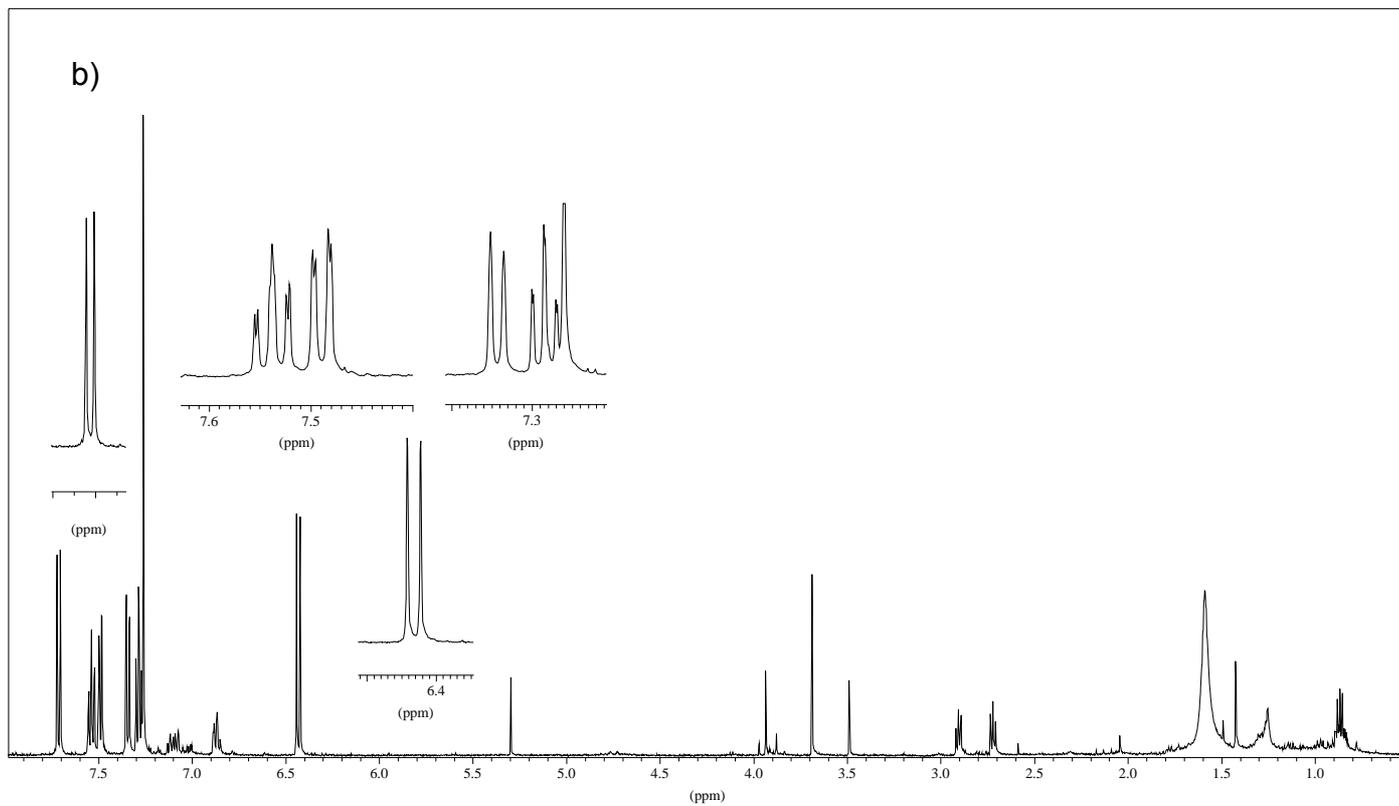
^1H -Spektrum von Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycumarin)

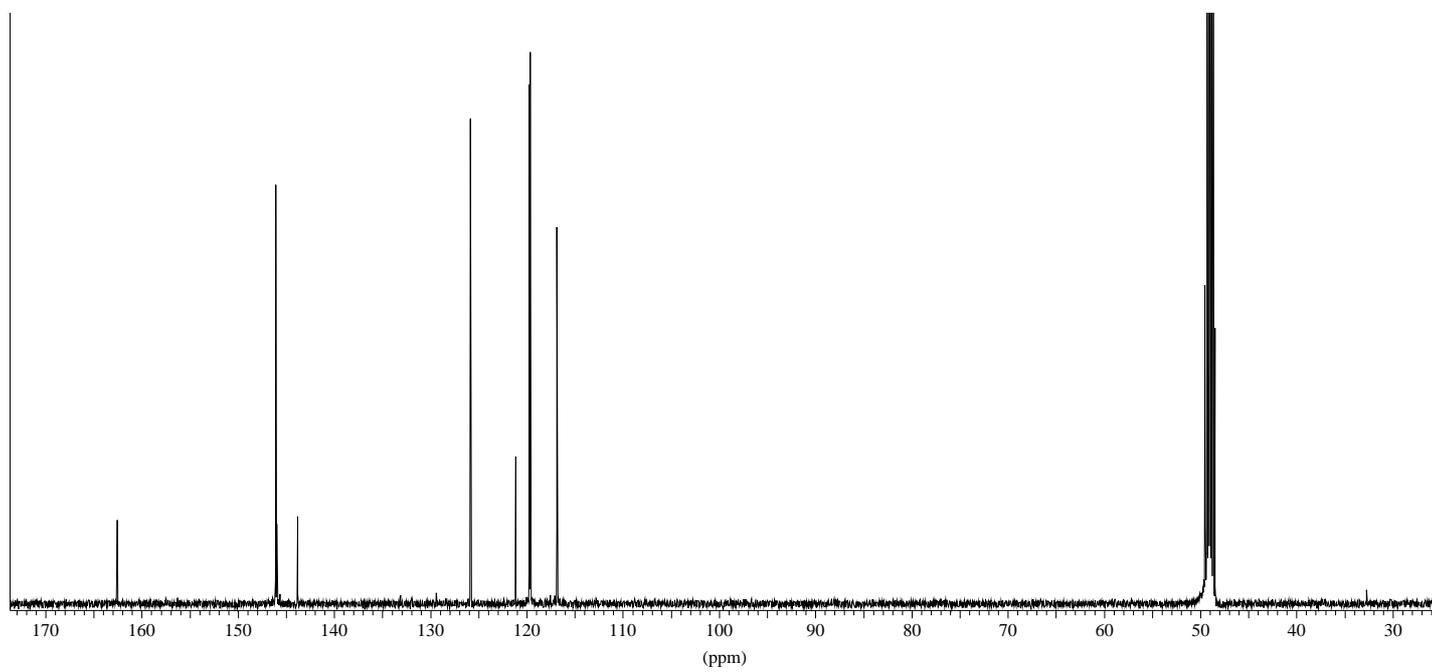
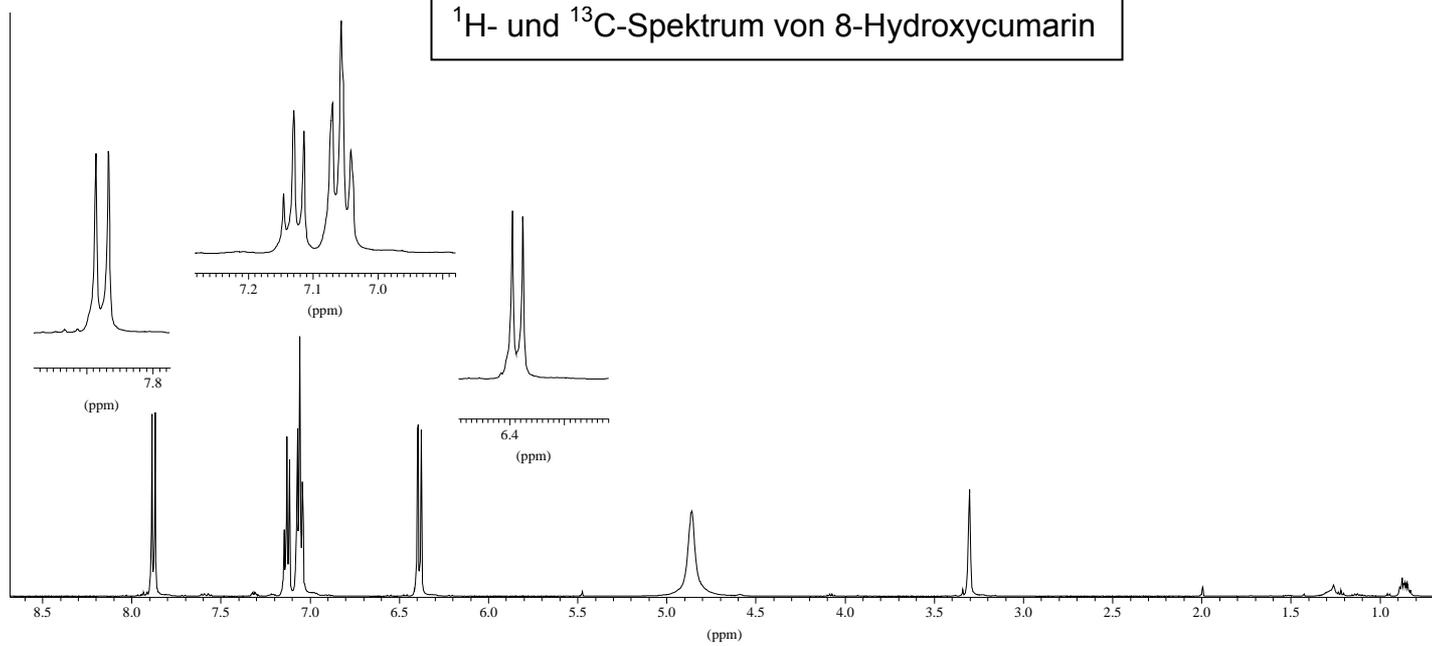
^1H -Spektren von Cumarin, gemessen in CD_3OD (a) und in CDCl_3 (b)

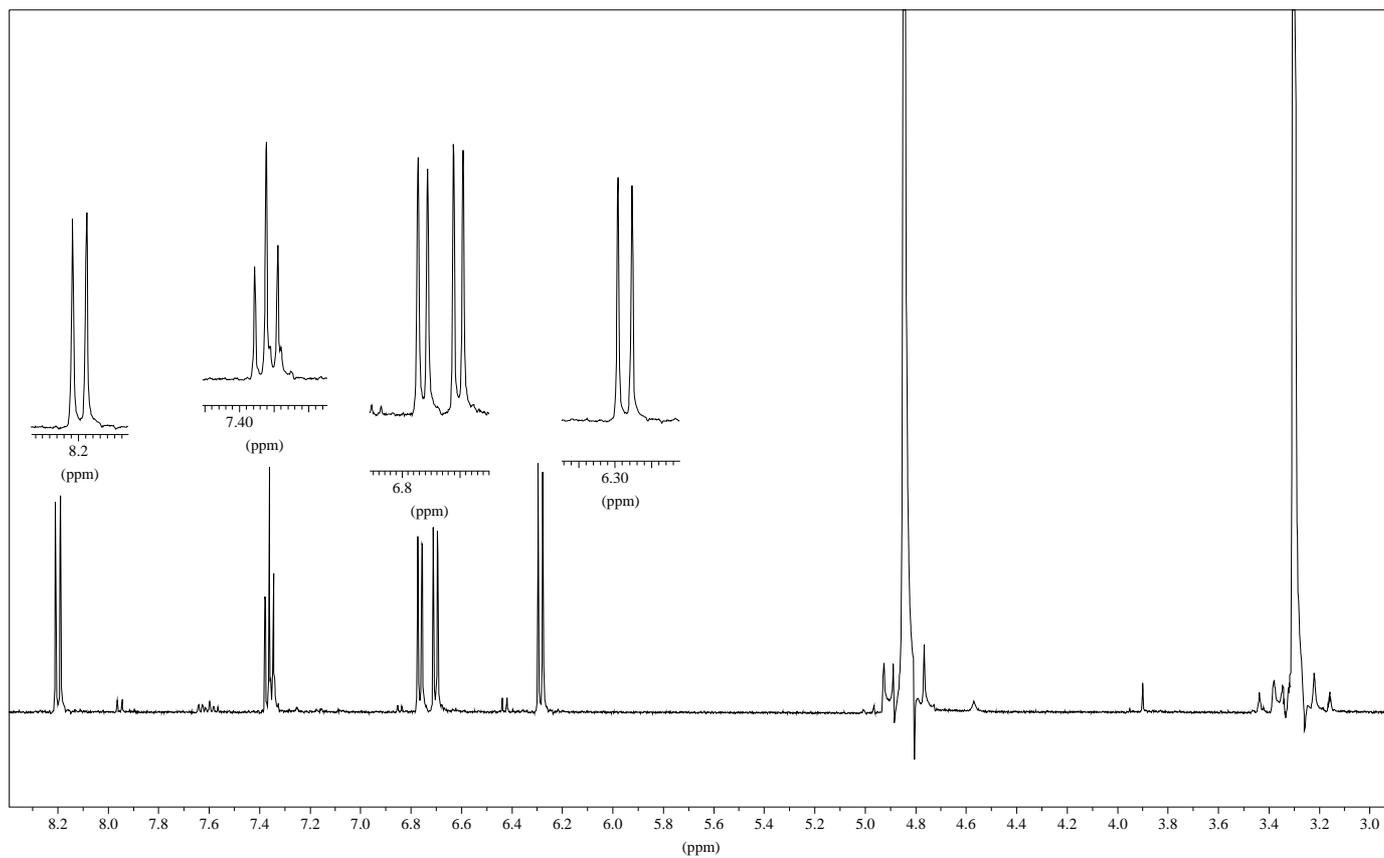
a)

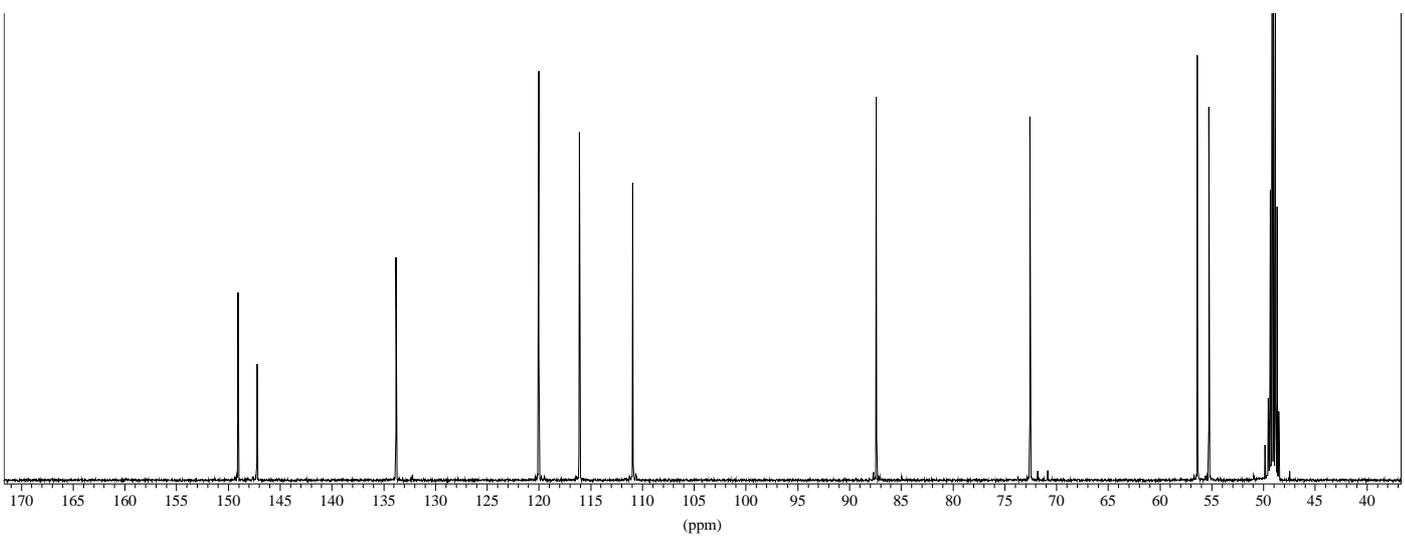
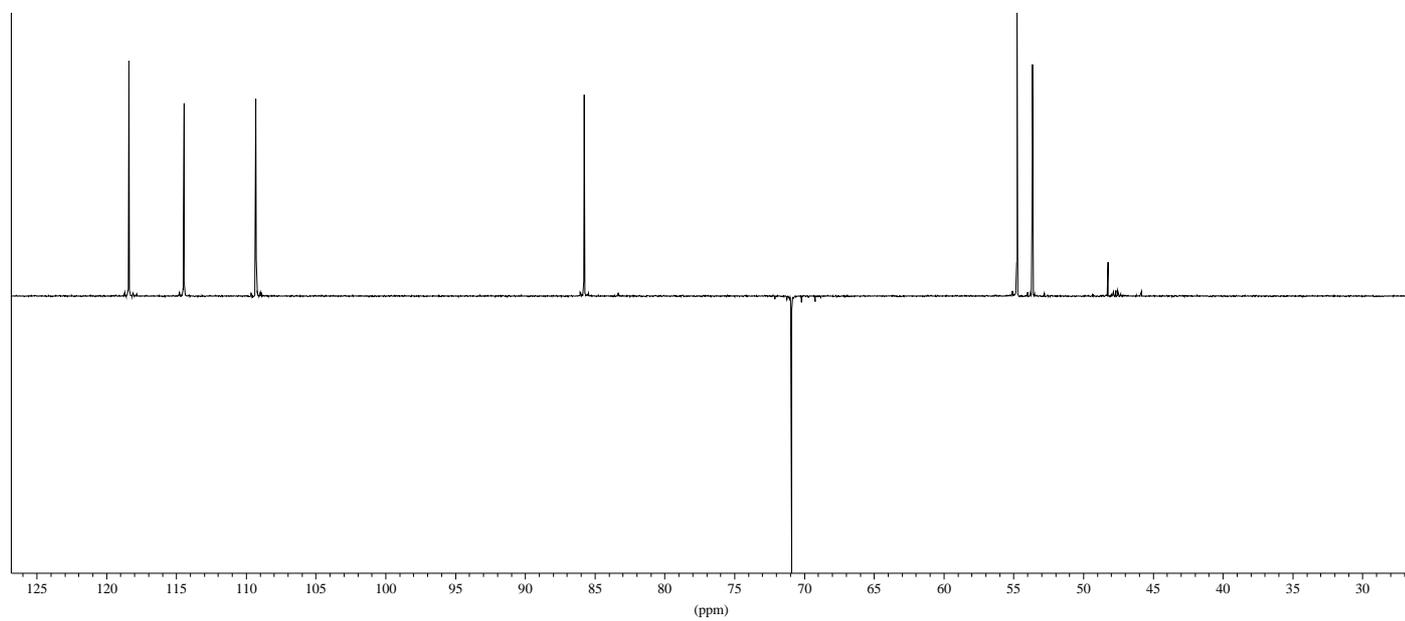
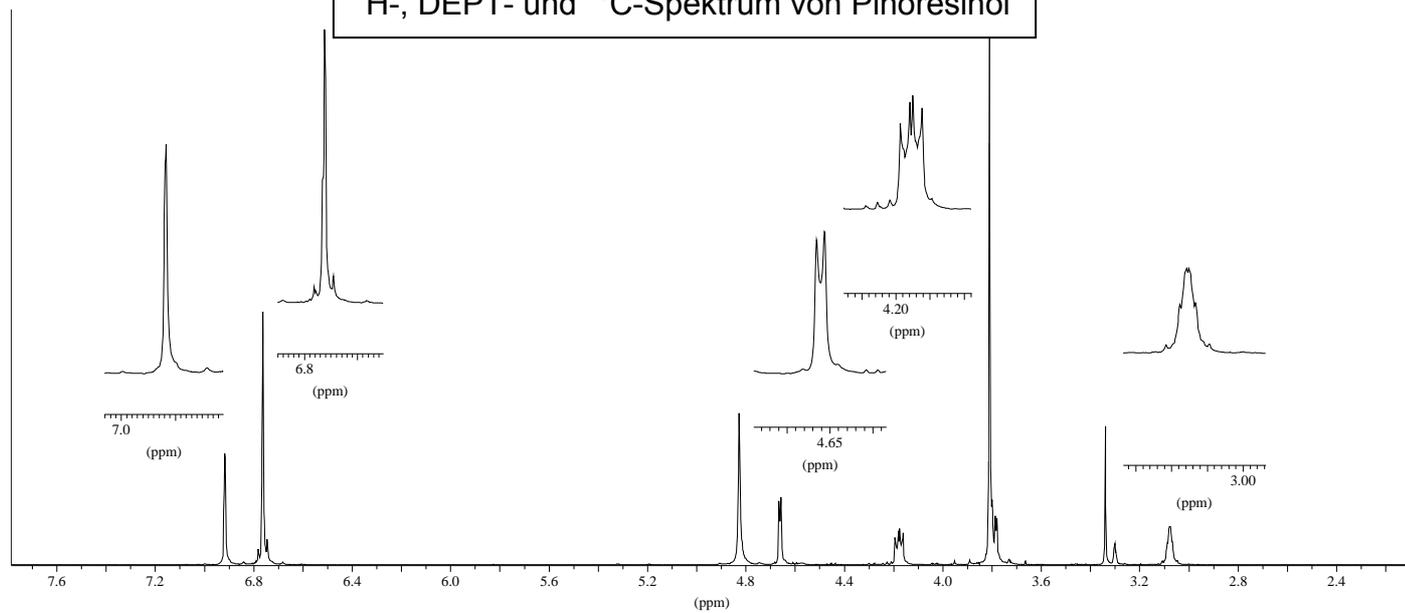


b)

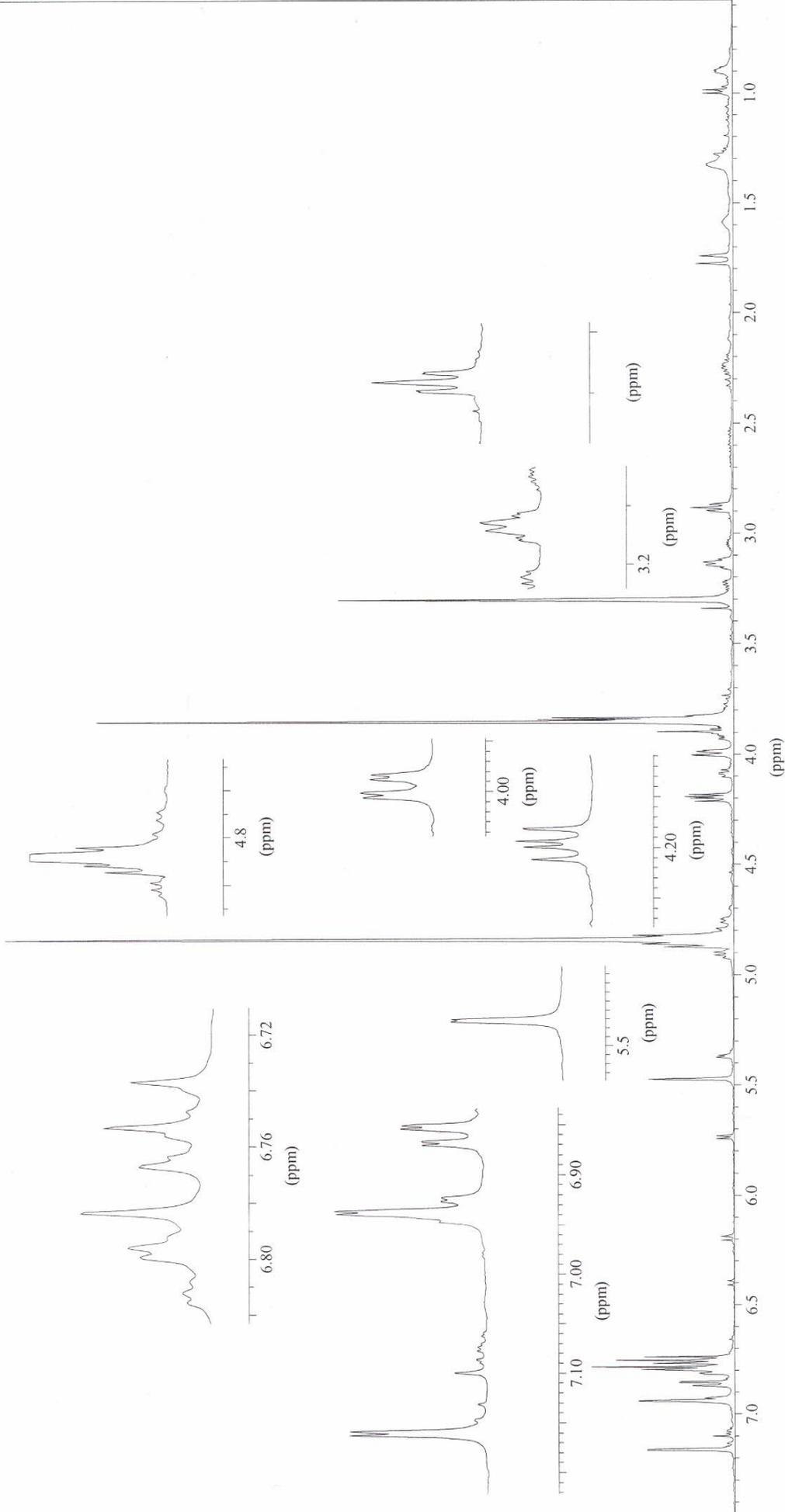


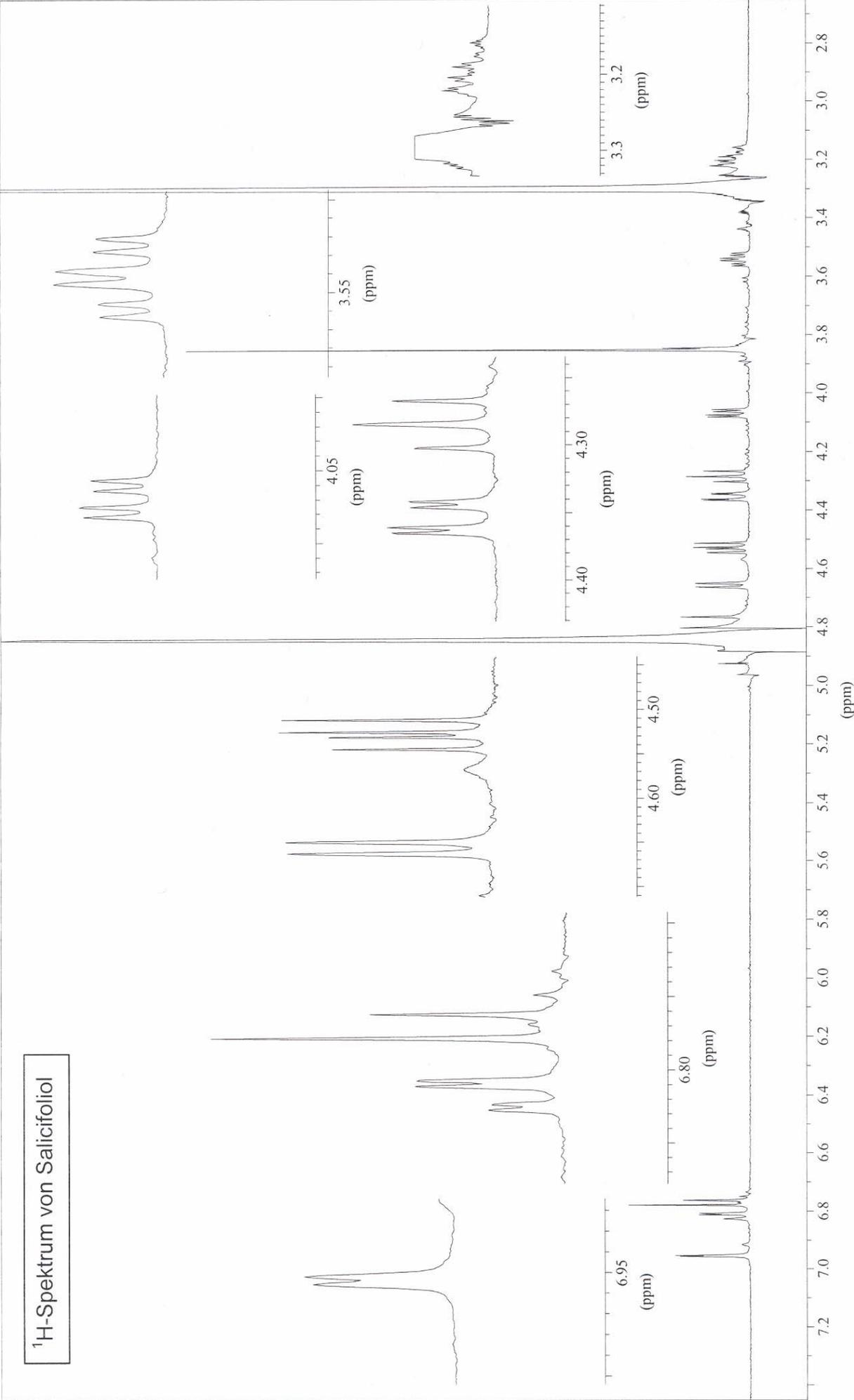
^1H - und ^{13}C -Spektrum von 8-Hydroxycumarin

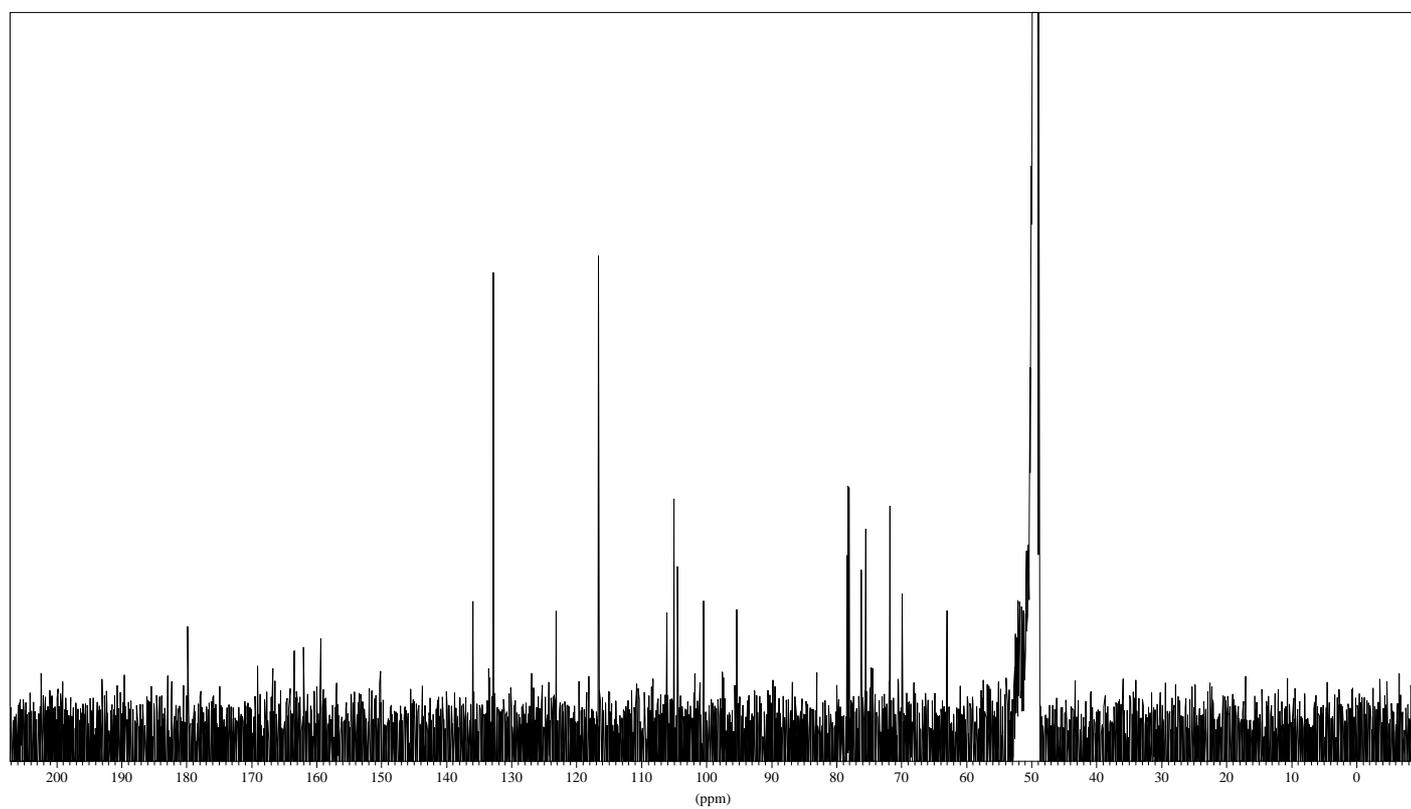
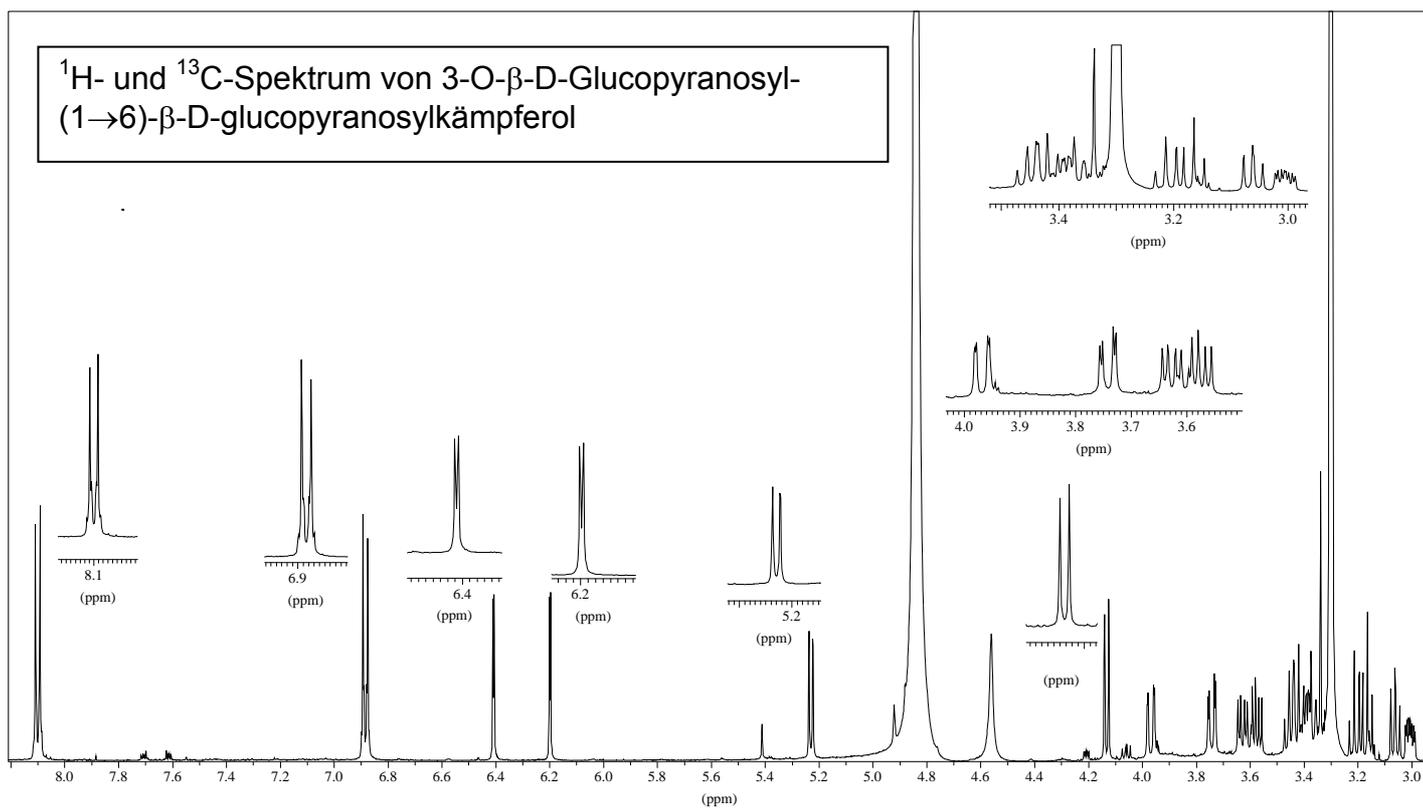
^1H -Spektrum von 5-Hydroxycumarin

^1H -, DEPT- und ^{13}C -Spektrum von Pinoresinol

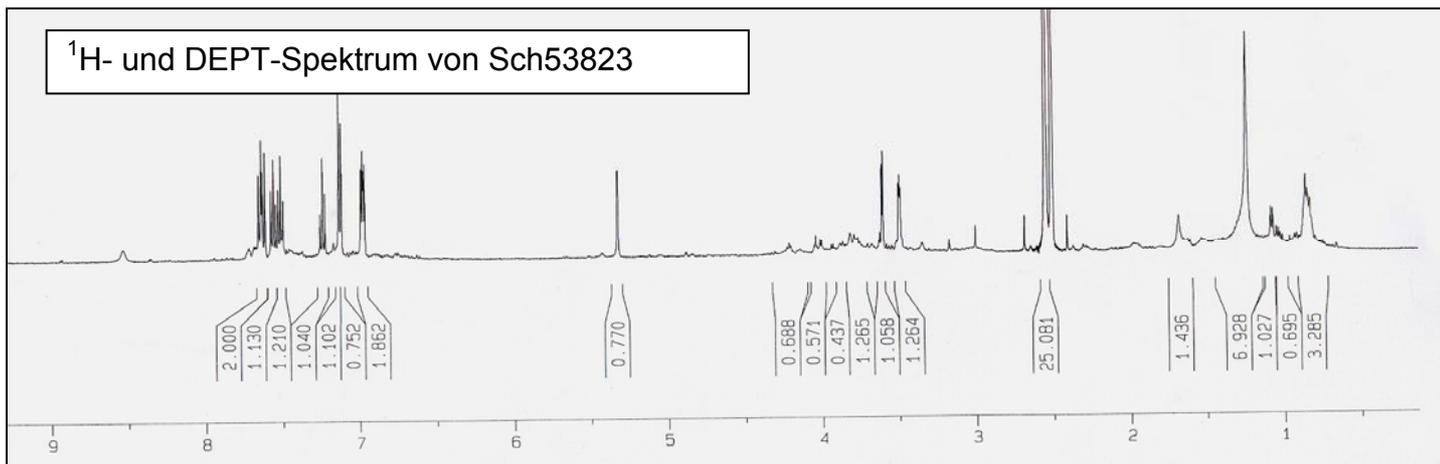
¹H-Spektrum von 9 α -Hydroxypinoresinol



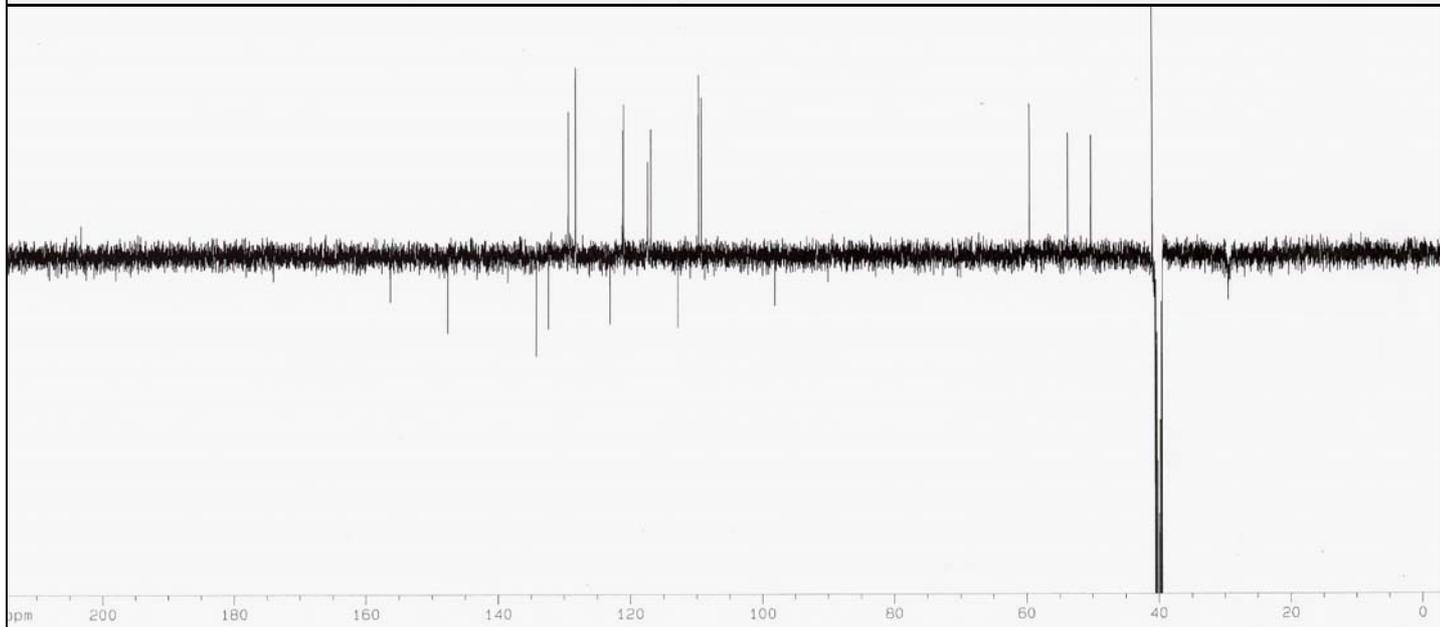
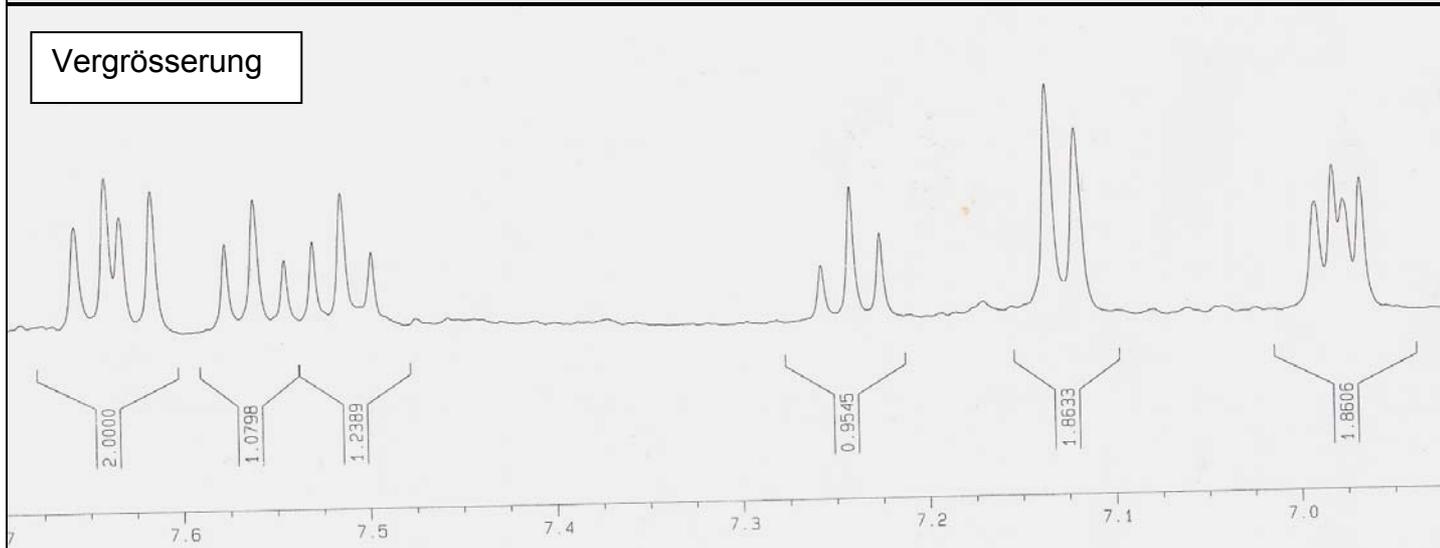




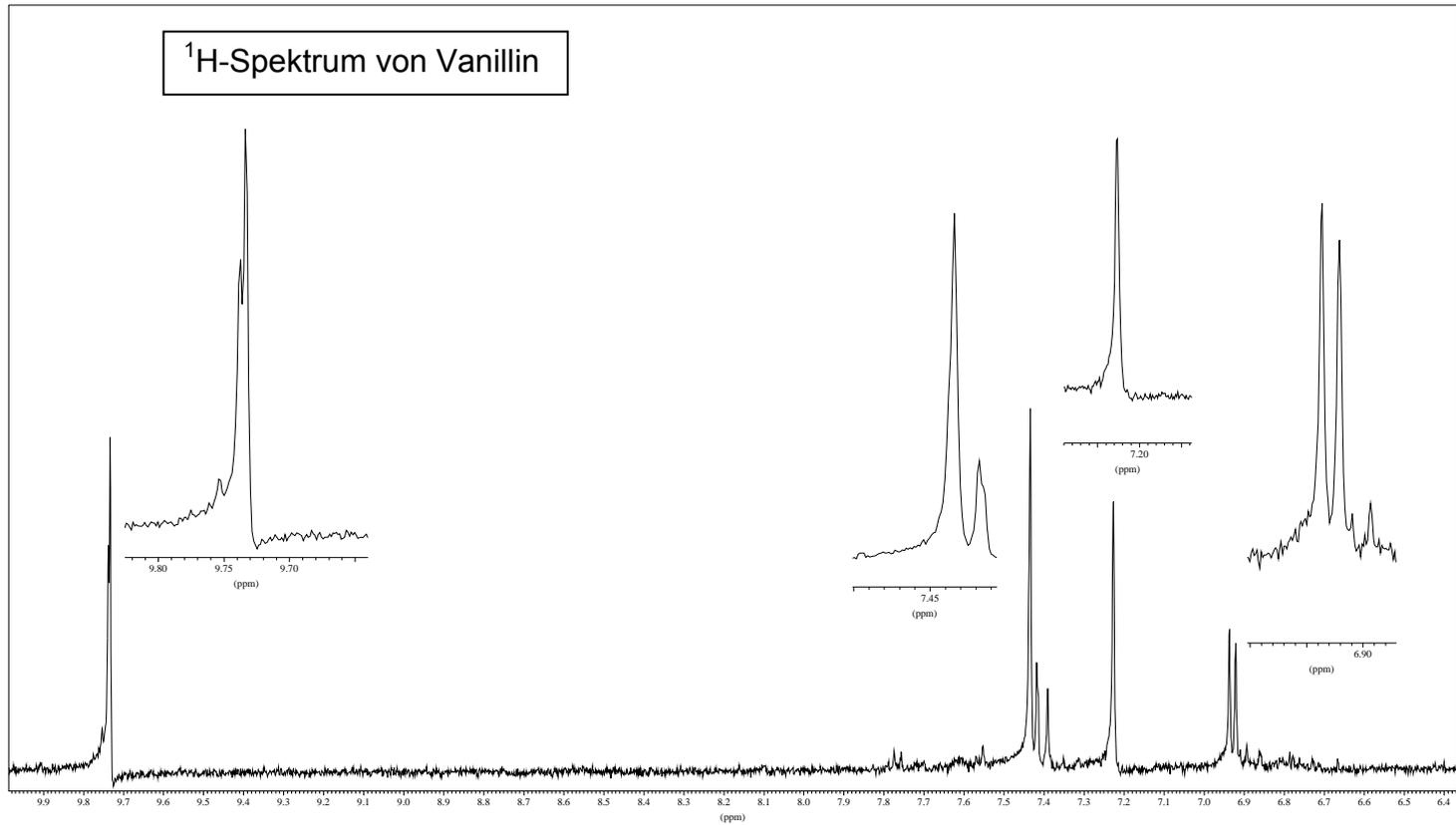
¹H- und DEPT-Spektrum von Sch53823



Vergrößerung

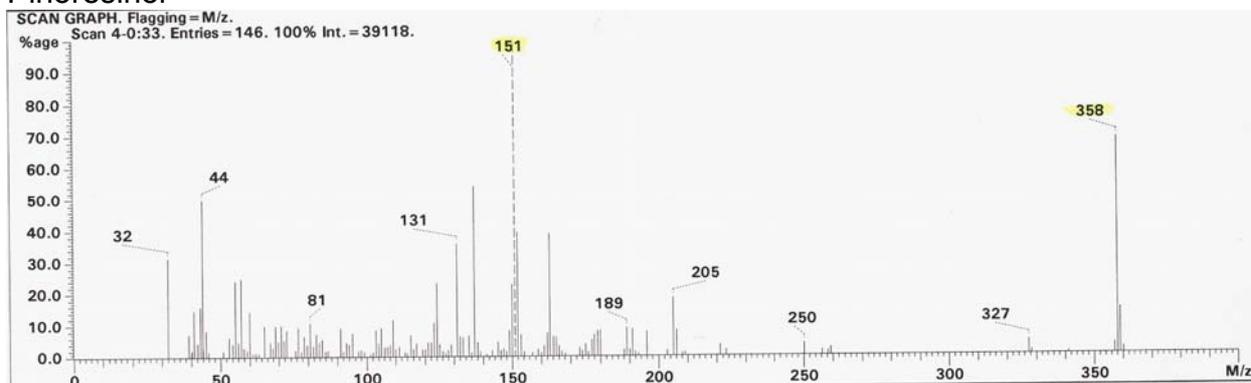


¹H-Spektrum von Vanillin

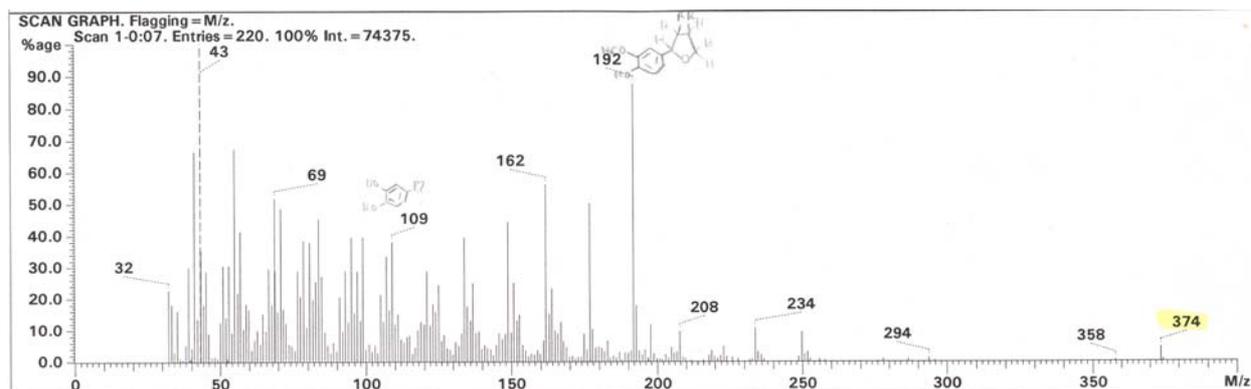


7.3. EI-Spektren von Pinoresinol, 9 α -Hydroxypinoresinol und Sch53823

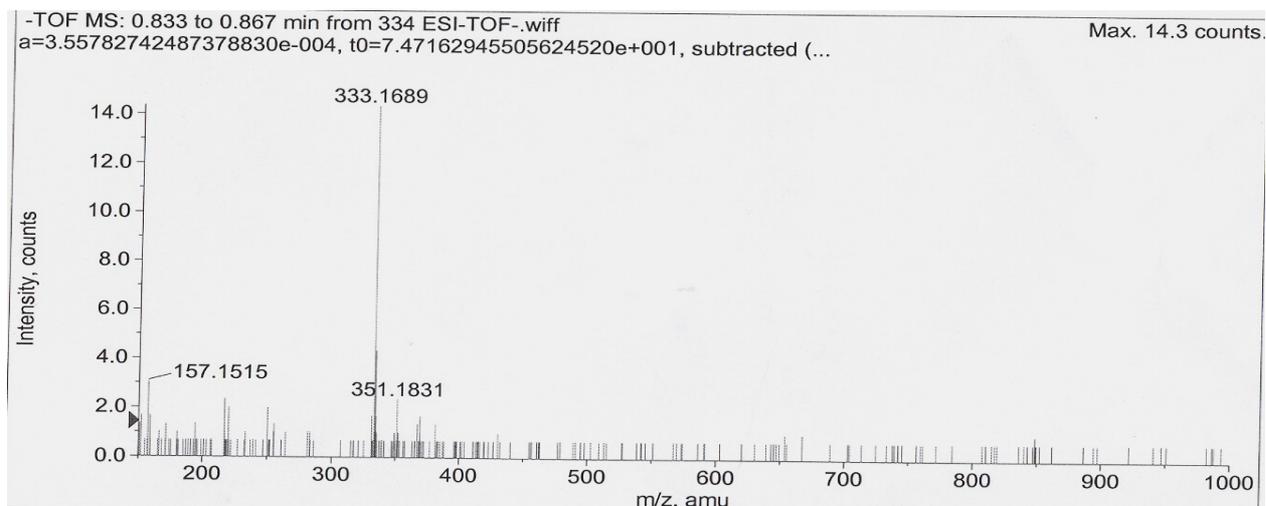
Pinoresinol

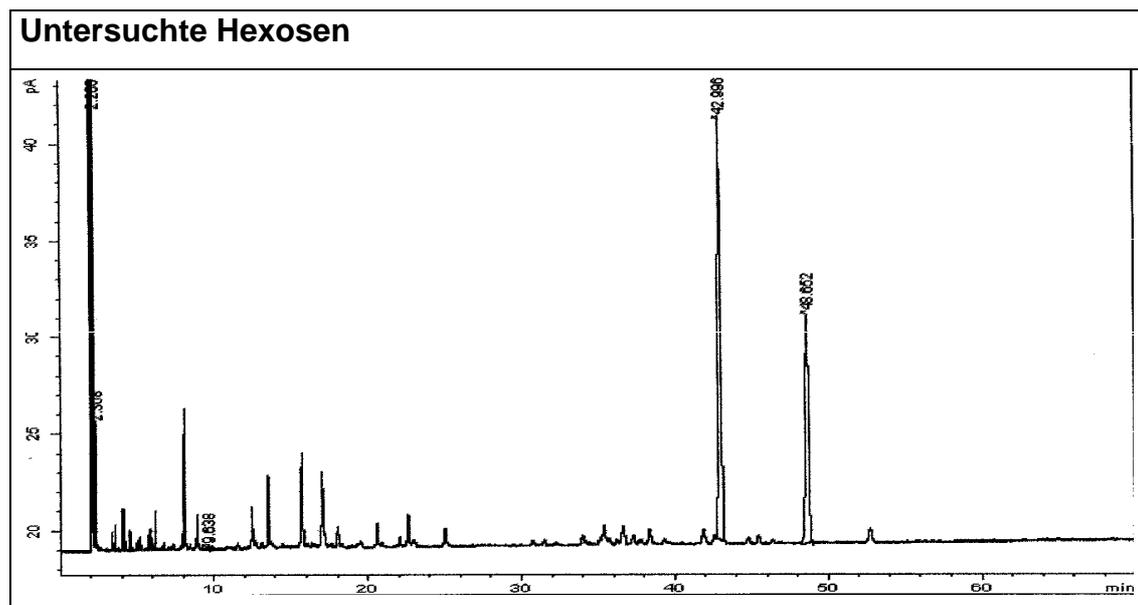


9 α -Hydroxypinoresinol



Sch53823





7.5. DNA-Sequenzen der aus *Alstonia scholaris* isolierten Pilz-DNA

7.5.1. DNA-Sequenz des als *Botryosphaeria rhodina* identifizierten Pilzes

TNACCGAAGTTTTCGGGCTNCGGCTCGACTCTCCCACCCTTTGTGAACGTACCT
 CTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTCCAGTCAGTAA
 CGCAGACGTCTGATAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT
 GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA
 GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCG
 GGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACNACCCTCAAGCTCTGCTTGGAATTG
 GGNACCGTCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTGAG
 CCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCC
 GGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAA_gGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC
 CGCTGAACTTAAGCATATCAATANAGCGGNAGGAAN

7.5.2. DNA-Sequenz des unbekanntes Pilzes

ANTTACCGAGTGCGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCATCCGTGTCTATCTGTAC
 CCTGTTGCTTCGGCGTGGCTACGGCCCGCCGAAGACTAACATTTGAACACTGTC
 TGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTTGTAAACAATAATAAAACCTTTCAACAACGGA
 TCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCCGAAATGCGATAATTAATGTG
 AATTGCAGAATNCACTGAATCATCGGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTT
 GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGNGTCATTNCTGCCCTCAAGCNCNGC

TTGNNNGTGGGGNCCCCGNCCCTNNANANGGTTNNCNGNACTGANTTNNNNTN
GNTGGTNAATNCATCTNNNATTGTGATNNNANTNNANNTTANCTTTTNCAGNTNA
TCNATCGGCGCCCCGCANATNNNTNTNTTNTNCNTNNTTTNTCCANNNCNTTTT
NTNACCCTCTNTCCT

8. Abkürzungen

ANOVA = analysis of variance

Abb. = Abbildung

b = breites Signal

BMBF = Bundesministerium für Bildung und Forschung

CDCl_3 = deuteriertes Chloroform

CHAPS = 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat

CHCl_3 = Chloroform

COSY = correlation spectroscopy

d = Dublett

DC = Dünnschichtchromatographie

DCF = Dichlorofluorescein

DEPT = distortionless enhancement by polarization transfers

dNTPs = Desoxyribonukleinsäuretriphosphate

DGGE = denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO = Dimethylsulfoxid

DMSO-d_6 = deuteriertes Dimethylsulfoxid

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DNP = Dictionary of Natural Products

DPPH = Diphenylpicrylhydrazyl

DTT = Dithiothreitol (threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

EGCG = Epigallocatechingallat

EI = electron impact ionisation

ELISA = enzyme linked immuno sorbent assay

ESI = electrospray ionisation

et al. = et altera (und andere)

EtOAc = Ethylacetat

eV = Elektronenvolt

Fa. = Firma

FBS = fetal bovine serum, fötales Kälberserum

FCPC = fast centrifugal partition chromatography

FCS = fetal calf serum, fötales Kälberserum

HCl = Salzsäure

H₂DCF = 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein

H₂DCF-DA = 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat

HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure

HHU = Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

H₂O₂ = Wasserstoffperoxid

HPLC = high performance liquid chromatography,
Hochleistungsflüssigchromatographie

HPLC-DAD = HPLC mit Diodenarray-Detektor

HMBC = hetero multinuclear bond coherence

HMQC = hetero multinuclear quantum coherence

H₂SO₄ = Schwefelsäure

Hz = Hertz

IC = inhibitory concentration

KCl = Kaliumchlorid

KH₂PO₄ = Kaliumdihydrogenphosphat

LC-MS = HPLC mit Massendetektor

LMP-Agarose = low melting point-Agarose

m = Multiplett

M = molar

mA = Milliampère

MeOH = Methanol

min = Minute

Mio. = Million

MS = Massenspektrometrie

MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid

m/z = Masse pro Ladung

N = normal

NaCl = Kochsalz

Na₂HPO₄ = Natriumhydrogenphosphat

NaOH = Natriumhydroxid

NEEO = niedrige Elektroendoosmose (Standardagarose zur Nukleinsäuretrennung)

nm = Nanometer

nmol = Nanomol

NMR = nuclear magnetic resonance spectroscopy, Kernresonanzspektrometrie

nOe = nuclear Overhauser effect/enhancement

NOESY = nuclear Overhauser and exchange spectroscopy

NR = Neutralrot

OD = optische Dichte

PBS = phosphate buffered saline

PCR = polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion

pH = Wasserstoffionen-Exponent

ppm = parts per million

PTFE = Polytetrafluorethylen, Teflon

q = Quartett

RNA = Ribonukleinsäure

ROESY = rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy

ROS = reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies

RP = reversed phase

rpm = rotation per minute, Umdrehungen pro Minute

s = Singulett

SC = Säulenchromatographie

SD = standard deviation, Standardabweichung

SEM = standard error of the mean, Standardabweichung geteilt durch die Wurzel der Anzahl der Versuche

t = Triplett

Tab. = Tabelle

TAE = Tris-Acetat-EDTat

Taq-Polymerase = Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*

TBE = Tris-Borat-EDTat

TE = Tris-EDTA

TFA = Trifluoressigsäure

TMS = Tetramethylsilan

UV = ultraviolett

vgl. = vergleiche

V = Volt

VLC = Vakuumliquidchromatographie

μg = Mikrogramm

μl = Mikroliter

μm = Mikrometer

μM = mikromolar

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle recht herzlich danken.

Insbesondere möchte ich mich bedanken bei:

Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel GmbH, Karlsruhe, für das Screening der Extrakte und für die Kooperation.

PT Indopharma, Jakarta, Indonesien, für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (0312615) für die finanzielle Unterstützung.

Dr. RuAngelie Edrada-Ebel und Juniorprofessor Dr. Rainer Ebel für ihre Hilfe bei der Interpretation der NMR-Spektren und für ihre engagierte wissenschaftliche und persönliche Unterstützung. Desweiteren bin ich Rainer wegen meiner grammatikalischen Fortschritte während der letzten vier Jahre zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. W. Peters und seinen Mitarbeitern, Institut für Anorganische und Strukturchemie I der Universität Düsseldorf, für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren.

Herrn Dr. Victor Wray, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, für seine qualifizierte und engagierte Hilfe bei der Strukturaufklärung.

Dr. Elisabeth Fuß und Cosima von Heimendahl aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Alfermann, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, für die chirale Analyse von Pinoresinol, 9 α -Hydroxypinoresinol und Sch53823.

Herrn Rogmann und seinen Mitarbeitern für die Anzucht und die sorgfältige Pflege von *Guazuma ulmifolia* im Gewächshaus der HHU Düsseldorf.

Herrn Prof. Dr. Deng, A&T Center, Beijing Normal University, Peking, China, für die Aufnahme der NMR-Spektren von Sch53823.

Herrn Prof. Dr. Wenhan Lin für seine grenzenlose Gastfreundschaft während meiner Zeit in Peking und für seine fachliche Unterstützung bei der Strukturaufklärung.

Herrn Prof. Dr. W.E.G. Müller und seinen Mitarbeitern, Institut für Physiologische Chemie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, für die biologische Testung von Sch53823.

Meinen Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit während der letzten vier Jahre und für die vielen lustigen gemeinsamen Stunden.

Meiner „Lieblingslaborkollegin“ und Freundin Sofia Lindgren dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatte und mich in den stressigsten Situationen trotzdem noch zum

Lachen gebracht hat, für viele schöne gemeinsame Arbeitstage und Abende, interessante Gespräche und für ihre Freundschaft.

Meiner „Mitreiterin“ Franka Teuscher für die gemeinsamen Jahre und für die netten, kurzweiligen Stunden in unserer Lerngruppe.

Nadine Weber für ihre engagierte Hilfe beim Etablieren des DPPH-Assays.

Mareike Thiel für ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft in allen „Lebenslagen“, für die vielen netten Gespräche über unsere gemeinsame Leidenschaft, für die Schoki- und Eispausen und für ihre Freundschaft.

Frau Waltraud Schlag für ihre Hilfe bei der Fraktionierung der Extrakte.

Katja Friedrich, Katja Rähke, Sabine Borstel und Katrin Kohnert für die technische Unterstützung.

Prof. Dr. Thomas Schmidt, Juniorprofessor Dr. Rainer Ebel, Sofia Lindgren, Arnulf Diesel und Julia Jacob sowie Frau Eva Müller und Herrn Klaus Dieter Jansen für die nette Zusammenarbeit im Praktikum.

Frau Angelika Simons für ihre geduldige Hilfe bei der Erledigung der Formalia.

Meiner Freundin Pia Jochum dafür, dass sie mir „Mut zum Promovieren“ gemacht hat, schon im Studium immer für mich da war und für ihre Freundschaft.

Gabi Mohnes und Dirk Bäcker für ihre engagierte und grenzenlose „Starthilfe“, besonders in der ersten Zeit in Düsseldorf, für die vielen netten Abende und für ihre Freundschaft.

Meiner Oma fürs Zuhören und für die vielen guten Ratschläge.

Meinem Freund Jan für die vielen praktischen Tips rund ums Promovieren, das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit und seine geduldige und liebevolle Unterstützung während der letzten drei Jahre.

Meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums sowie für ihre liebevolle Unterstützung während meines gesamten Bildungsweges.

Lebenslauf

Name	Bärbel Steffan
Geburtsdatum	18.10.1975
Geburtsort	Völklingen
Adresse	Ulmenstrasse 46, 40882 Ratingen
Schule	
1982 - 1986	Grundschule, Bous / Saar
1986 - 1995	Robert-Schuman-Gymnasium, Saarlouis; Abitur
Berufsausbildung	
1995 - 2000	Studium der Pharmazie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken; Zweites Staatsexamen
Mai 2000 – Mai 2001	Pharmaziepraktikum in der Apotheke im Saarbasar, Saarbrücken
Mai 2001	Drittes Staatsexamen, Approbation als Apothekerin
2001 - 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, den

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation „Inhaltsstoffe aus Pflanzen der indonesischen Volksmedizin (Jamu): Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften“ selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Des weiteren erkläre ich, dass ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe.

Düsseldorf, den

Bärbel Steffan

Eingereicht am :

Vorsitzender :

Referent : Prof. Dr. Peter Proksch

Korreferent : Prof. Dr. Regine Kahl

Tag der mündlichen Prüfung :

Doktorurkunde ausgehändigt am: