

Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus *Volutaria boranensis* (Cufod.) Wagenitz sowie Untersuchungen zur Zytotoxizität ausgewählter pflanzlicher Sekundärstoffe

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Arta Kuci
aus Prishtina

Düsseldorf, 2022

aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Claus M. Paßreiter

2. Prof. Dr. Rainer Kalscheuer

Tag der mündlichen Prüfung: 11. August 2022

Die Vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr.C. M. Paßreiter

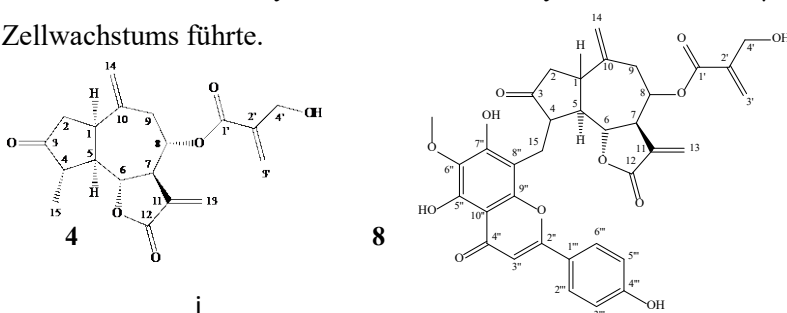
Am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf erstellt.

Meinen Eltern,
und meinem Bruder

Zusammenfassung

Aus der Gattung *Volutaria* (Asteraceae) waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit insgesamt nur vier Arten phytochemisch bzw. pharmakologisch untersucht. Die meisten Arbeiten sind dabei zu *V. lippi* erschienen, auch unter der alten Bezeichnung *Amberboa lippi*. Als typische Inhaltsstoffe wurden Sesquiterpenlactone sowie einige Flavonoide und weitere Inhaltsstoffe isoliert. Vor Beginn dieser Arbeit waren sechs Guaianolide bekannt, von denen vier eine für die Reaktivität wichtige Exomethylengruppe am γ -Lactonring besitzen. Vor dem Hintergrund der Bioaktivität dieser Verbindungen wurde die bisher noch nicht untersuchte *Volutaria boranensis* (Cufod.) Wagenitz untersucht. Nach Extraktion und Auftrennung interessanter Fraktionen wurden die Verbindungen mit Hilfe chromatographischer Verfahren isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte durch NMR (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, NOESY, HMQC und HMBC). So konnten insgesamt fünf Sesquiterpenlactone (**1** - **5**) isoliert werden, eines davon (4 α -Methylboranolacton (**4**)) war bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Die Guaianolide Cynaropikrin (**1**), Isolipidiol (**2**) und Lipidiol (**3**) waren bereits aus anderen *Volutaria*-Arten bekannt. Verbindung **5** (4 β -Methylboranolacton) wurde ohne Aufklärung der Stereochemie vermutlich bereits aus *V. lippii* isoliert. Daneben konnten vier Flavonoide (**6** - **10**), ein Lignan (**12**), Chlorogensäure (**11**), zwei Triterpene (**13**, **14**), zwei Phytosterole (**15**, **16**) und ein Alkaloid (**17**) isoliert werden. Eines der Flavonoide ist ein am C-8 mit einem Sesquiterpenlacton substituiertes Flavonoid. Obwohl mit Sesquiterpenen substituierte Flavonoide bereits in der Natur gefunden worden sind, ist eine Sesquiterpenlactonseitenkette bei Flavonoiden bisher nicht bekannt. Als Name für diese neue Substanz wird Boranensisflavon (**8**) vorgeschlagen. Alle 17 Verbindungen wurden zum ersten Mal aus *V. boranensis* isoliert. Die Flavanone **9** und **10** wurden in *Volutaria* bisher noch nicht gefunden, es ist somit der erste Fund in dieser Gattung. Alle Substanzen, deren Strukturaufklärung bei Durchführung der Zytotoxizitätstest bereits abgeschlossen war, wurden auf ihre Wirkung gegenüber Ovarialkarzinomzellen der Zelllinie A2780 sens überprüft. Bis auf Verbindung **7** und **14** zeigten alle Testsubstanzen eine gute Hemmwirkung bei einer Konzentration von 100 μM . Bei Verwendung von 10 μM erreichten nur noch **1**, **4** und **5** eine Hemmung von ca. 90 % . Die IC_{50} -Werte dieser Verbindungen liegen im Bereich von 3 μM .

Getestet wurden auch prenylierte Flavonoide aus *Erythrina burtii* (Fabaceae). Diese Verbindungen waren weniger stark wirksam als die Sesquiterpenlactone aus *V. boranensis*, zeigten aber auch zytotoxische Eigenschaften Am stärksten wirksam war Abyssinone IV 4'-O-methylether, das bei 10 μM zu einer 64 %-igen Hemmung des Zellwachstums führte.



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen	15
2.1. Extraktion und Fraktionierung	15
2.2. Isolierung und Identifizierung von Verbindungen aus <i>Volutaria boranensis</i>	17
2.2.1. Verbindung 1 (Cynaropikrin)	17
2.2.2. Verbindung 2 und 3 (Isolipidiol und Lipidiol)	35
2.2.3. Verbindung 4 (4α-Methylboranolacton)	67
2.2.4. Verbindung 5 (4β-Methylboranolacton)	101
2.2.5. Verbindung 6 (Hispidulin)	133
2.2.6. Verbindung 7 (Eupafolin)	150
2.2.7. Verbindung 8 (Boranensisflavon)	163
2.2.8. Verbindung 9 und 10 (2(S) und 2 (R)-Eriodictyol -7-O-glucoronid)	193
2.2.9. Verbindung 11 (Chlorogensäure)	214
2.2.10. Verbindung 12 (Arctiin)	226
2.2.11. Verbindung 13 (Taraxasterol)	245
2.2.12. Verbindung 14 (Pseudotaraxasterol-30-aldehyd)	275
2.2.13. Verbindung 15 (Stigmasterol)	290
2.2.14. Verbindung 16 (β-Sitosterol)	307
2.2.15. Verbindung 17 (Serotobenine)	308

3. Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen	318
4. Diskussion der Ergebnisse	328
5. Experimenteller Teil	349
5.1 Allgemeines.....	349
5.2. Chromatographische Verfahren	350
5.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	350
5.2.2. Präparative Dünnschichtchromatographie	353
5.2.3. Säulenchromatographie	353
5.2.4. Hochleistungssäulenchromatographie (HPLC).....	355
5.2.5. Semipräparative HPLC	358
5.3. Spektroskopische Verfahren	359
5.3.1. UV/VIS-Spektroskopie	359
5.3.2. Kernresonanz-Spektroskopie (NMR).....	359
5.3.3. Massenspektrometrie (MS)	359
5.3.4. Optische Drehung.....	360
5.4 Isolierung der Inhaltsstoffe aus dem Drogenmaterial von <i>Volutaria boranensis</i>.	360
5.4.1. Herkunft des Drogenmaterials.....	360
5.4.2. Extraktion des Drogenmaterials	360
5.4.3. Fraktionierung des Dichlormethanextraktes	361
5.4.4. Fraktionierung des Methanolextraktes	368
5.5. Analytische Daten der isolierten Verbindungen	371
5.5.1. Cynaropikrin.....	377
5.5.2. Isolipidiol und Lipidiol.....	371
5.5.3. 4α-Methylboranolacton	372

5.5.4. 4 β -Methylboranolacton	372
5.5.5. Hispidulin.....	373
5.5.6. Eupafolin	373
5.5.7. Boranensisflavon.....	374
5.5.8. 2(S) und 2 (R)-Eriodictyol -7-O-glucoronid	374
5.5.9. Chlorogensäure.....	375
5.5.10. Arctiin.....	375
5.5.11. Taraxasterol.....	376
5.5.12. Pseudotaraxasterol-30-aldehyd	376
5.5.13. Stigmasterol.....	377
5.5.14. β -Sitosterol	377
5.5.15. Serotobenine.....	378
5.6. Pharmakologische Arbeitsmethoden	379
5.6.1. Zelllinie: Ovarialkarzinomzelllinie	379
5.6.2. Bestimmung der Viabilität (MTT-Assay).....	379
5.6.3. Berechnung der IC50-Werte	380
6. Literaturverzeichnis.....	381
7. Anhang	396
7.1 Eidesstaatliche Erklärung.....	396
7.2 Danksagung	397

Abkürzungsverzeichnis

CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
COSY	Correlation Spectroscopy
d/dd	Dublett/ Dublett vom Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ESI	Elektro-Spray Ionisation
EXP. TEIL	Experimenteller Teil
EtOAc	Ethylacetat
HMBC	Hetero Multinuclear Bond Coherence
HMQC	Hetero Multinuclear Quantum Coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
J	Kopplungskonstante
LM	Lösungsmittel
m	Multiplett
MeOH	Methanol
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MS	Massenspektrometrie
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanzspektroskopie
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
t	Triplett
UV	Ultraviolett

Einleitung und Problemstellung

Die Verwendung von Arzneipflanzen in der Volksmedizin unterschiedlicher Kulturen hat weltweit eine große Bedeutung (Hofmann, 1954; Qedan, 1974). Auch bei uns in Europa und insbesondere in Deutschland kennt man viele Arzneipflanzen, die auch heute noch in ganz unterschiedlichen Indikationsgebieten eingesetzt werden (Blaschek, 2016).

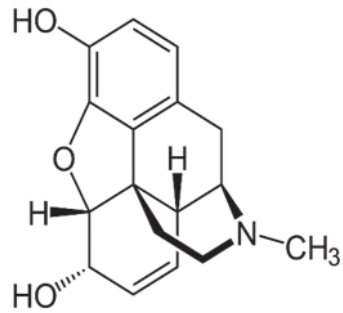
Während die naturwissenschaftlich geprägte Medizin unserer Zeit viele synthetische Arzneistoffe zur Behandlung von Krankheiten einsetzt, bleibt aber immer noch Raum für die Pflanzenheilkunde in Form moderner pflanzlicher Arzneimittel, von denen viele in randomisierten, doppelt verblindeten und placebokontrollierten Studien auch wissenschaftlich hinsichtlich ihrer Wirksamkeit überprüft wurden (Zündorf, I. & Fürst, R. 2020).

Man vergisst allzu leicht, dass die traditionelle Anwendung von Arzneipflanzen, deren Geschichte bis ins Altertum zurückreicht, der Ausgangspunkt für die Entwicklung vieler heute kaum mehr wegzudenkender Pharmaka war. Als prominente Beispiele lassen sich hier die Alkaloide des aus dem Schlafmohn (*Papaver somniferum*) gewonnenen Opiums nennen, insbesondere das Morphin und das Codein aber auch das Noscapin (siehe Abb. 1.1, S.3), die in der Therapie von Schmerz und Husten eine außerordentlich große Rolle spielen (Blaschek, 2016). Man kannte das aus dem Mohn gewonnene Opium schon seit Jahrtausenden und wusste um seine schmerzstillende Wirkung, aber erst die Erforschung der Zusammensetzung, heute würde man sagen die phytochemische Untersuchung der Inhaltsstoffe, lieferte die heute so wichtigen Arzneistoffe.

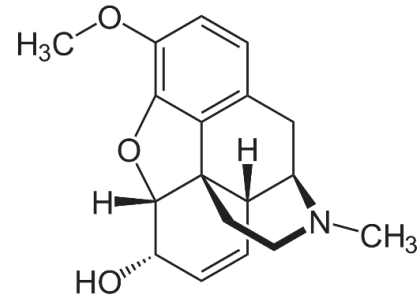
Dem deutschen Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner gelang es Anfang des 19. Jahrhunderts (1803/04) eine kristalline Substanz, die er unter dem Namen „Morphium“ beschrieb“ aus dem Opium zu isolieren (Klockgether-Radke, 2002). Etwa zeitgleich isolierte sein pharmazeutischer Berufskollege Derosne das Noscapin (Derosne, 1804), während das Codein erst etwa 30 Jahre später vom französischen Chemiker Pierre-Jean Robiquet entdeckt wurde (Wachs, 1868). Am Anfang der pharmazeutisch-biologischen Untersuchungen zu den Inhaltsstoffen waren es insbesondere die alkaloidführenden Pflanzen, die eine starke Wirkung auf das Zentralnervensystem haben, die im Mittelpunkt der Forschung standen. Auch die Tollkirsche (*Atropa belladonna*), das Bilsenkraut (*Hyoscyamus niger*) und der Stechapfel (*Datura stramonium*) waren seit dem Altertum bekannte Arznei- bzw. Giftpflanzen, die sich im Mittelalter auch als Zutaten in Hexensalben fanden (Müller, 1998).

Die in ihnen enthaltenen parasympholytischen Alkaloide Hyoscyamin und Scopolamin wurden gemeinsam mit Ludwig Hesse 1834 vom deutschen Apotheker Philipp Lorenz Geiger entdeckt, der ab 1816 Privatunterricht in Botanik, Pharmakognosie und pharmazeutischer Chemie in der von ihm betriebenen Heidelberger Universitätsapotheke gab und später außerordentlicher Professor für Chemie und Pharmazie an der Universität Heidelberg wurde (Thomas U., 1985). Die beiden entdeckten auch das Aconitin aus dem Eisenhut (*Aconitum napellus*) und das Colchicin aus der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), ein heute immer noch sporadisch eingesetzter Wirkstoff in der Akutbehandlung der Gicht (Mo & Melzig, 2021). Geiger allein wird die Isolierung des Coniins zugesprochen. Dabei handelt es sich um das Hauptalkaloid des gefleckten Schierlings (*Conium maculatum*), einer durch den Tod des Sokrates berühmt gewordenen Giftpflanze (Amberger-Lahrman et al, 2013). Etwas später wurde das Cocain aus den Blättern des Coca-Strauches (*Erythroxylum coca*) isoliert. Die Cocablätter kamen Mitte des 18. Jahrhunderts (ca. 1750) aus Südamerika nach Europa, wo der deutsche Botaniker und Forschungsreisende Eduard Friedrich Poeppig erstmals die bei Kauen der Blätter auftretenden Phänomene beschrieb (Poeppig, 1836). Erstmals rein dargestellt wurde das Cocain entweder 1860 vom Chemiker Albert Niemann, der auch seine betäubende (lokalanaästhetische) Wirkung auf der Zunge beschrieb (Niemann, 1860), oder bereits 5 Jahre früher vom Apotheker Friedrich Georg Carl Gaedcke, der möglicherweise eine identische Substanz unter dem Namen Erythroxylin isoliert haben könnte (Yentis, 1999).

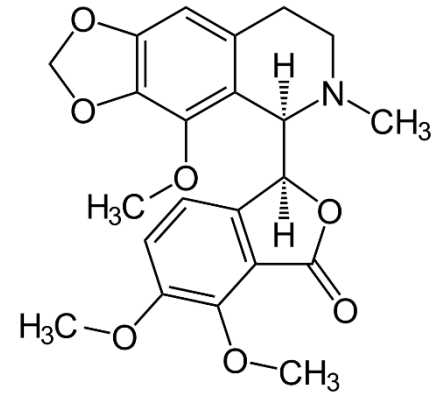
Dass die Isolierung der Alkaloide aus den genannten, stark wirksamen Pflanzen bereits ohne die heute zur Verfügung stehenden analytischen Methoden gelungen ist, lag sicher an der Basizität dieser Verbindungen, die eine Verteilung der Alkaloide als Base und als Salz, je nach pH-Wert der wässrigen Phase, zwischen organischer und wässriger Phase ermöglichten. Bereits bei der Extraktion konnte z.B. durch Verwendung von Ammoniak und nachfolgende Extraktion dafür gesorgt werden, dass die Alkaloidbasen aus ihren Salzen freigesetzt wurden und so der Extraktion mit lipophilen Lösungsmitteln zugänglich gemacht wurden. Saure, an sich lipophile Inhaltsstoffe wurden gleichzeitig in ihre Salze überführt und verblieben dadurch gemeinsam mit hydrophilen Stoffen im Pflanzenmaterial. Es wurden nur die Alkaloidbasen und lipophile Neutralstoffe in die Lösung extrahiert, aus der die Alkaloide durch Ausschütteln mit saurem Wasser sehr leicht in Form ihrer Salze in die Wasserphase ausgezogen werden konnten. Auf diese Weise erhielt man relativ einfach eine Rohfraktion z.B. der Alkaloidhydrochloride.



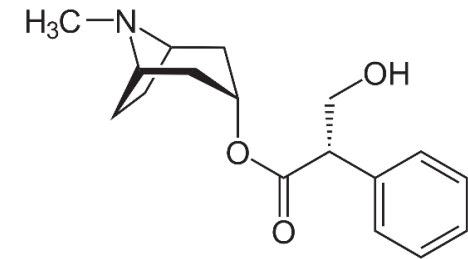
Morphin (1803/04)



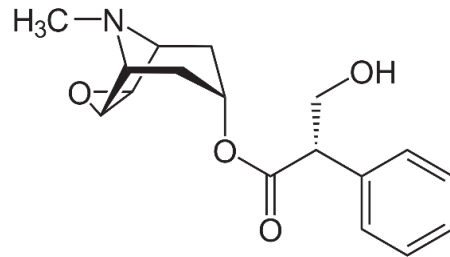
Codein (1805)



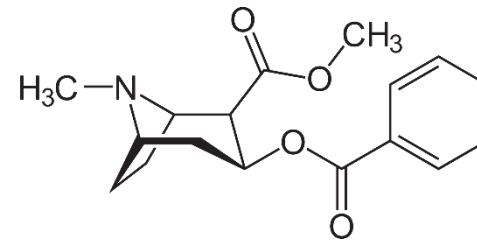
Noscapin (1804/05)



Hyoscyamin (1834)



Scopolamin



Cocain (1860)

Abbildung 1.1: Wichtige Alkaloide aus Pflanzen, die bereits Ende des 19., Anfang des 20. Jahrhunderts isoliert wurden.

Durch Extraktion mit verdünnter Säure, nachfolgender Alkalisierung und Ausschütteln mit einem lipophilen Lösungsmittel erhält man die entsprechenden Alkaloidbasen (Hänsel & Pertz, 2010).

Die Kenntnis zu den Inhaltsstoffen und deren Struktur ist nicht nur von akademischem Interesse, sondern bereits bei den genannten Alkaloiden, wurden ausgehend von den Naturstoffen, partialsynthetische Stoffe entwickelt, die in einigen Fällen zu einer Verbesserung der Eigenschaften führten. Beispielsweise wurde aus dem relativ toxischen Scopolamin, dessen Dosierung genau eingehalten werden muss und dass aufgrund der starken zentralen Wirkung verschreibungspflichtig ist, das Derivat n-Butyl-Scopolamin als quartäre Ammoniumverbindung entwickelt, die wegen der fehlenden zentralen Wirkung auch ohne ärztliche Verschreibung als peripher spasmolytisch wirksames Parasympatholytikum verwendet werden kann (Blaschek, 2016).

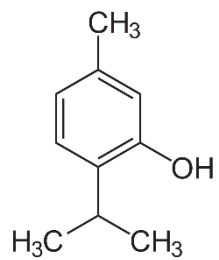
Andere Stoffe, wie beispielsweise das Cocain, dienten auch als Vorlage für die Entwicklung anderer Substanzen. Cocain ist ein optimales Lokalanästhetikum, da es neben der Hauptwirkung gefäßverengend wirkt und dadurch nach der Injektion lange am Wirkort verbleibt. Wegen der euphorisierenden Wirkung und der sich daraus entwickelnden Sucht, fällt Cocain unter die Vorschriften des Betäubungsmittelgesetzes, was die Verwendung der Substanz auf Operationen am Kopf einschränkt. Da Verletzungen am Kopf stark bluten und so die Sicht auf das Operationsfeld bei Eingriffen durch das Blut stark behindert wird, ist die Verwendung des Cocains dort von besonderer Bedeutung. In allen anderen Bereichen, wo die Blutungen nicht so stark sind, ist die Verwendung von Cocain nicht gestattet. Ausgehend vom Cocain als Leitstruktur wurden andere, synthetische Lokalanästhetika synthetisiert und in die Therapie eingeführt, wie z.B. das Procain, Benzocain oder Lidocain entwickelt. Die fehlenden gefäßverengenden Eigenschaften werden in den Präparaten durch den Zusatz von Vasokonstriktoren, wie z.B. Noradrenalin wiederhergestellt (Geisslinger et al 2020).

Neben den Alkaloiden wurden viele weitere Inhaltsstoffklassen aus Arzneipflanzen isoliert. Hier sind insbesondere, die Terpene (Mono-, Sesqui-, Di- und Triterpene), die Phenylpropane, die Flavonoide, die Anthranoide und Steroide zu erwähnen (Sticher, Heilmann, & Zündorf, 2015). Die Abbildungen 1.2 und 1.3 (siehe S. 7 und 8) zeigen einige wichtige Vertreter aus diesen Stoffgruppen. Mono- und Sesquiterpene, wie das Thymol aus dem Thymian (*Thymus vulgaris*, Lamiaceae) oder das Bisabolol aus der Kamille (*Matricaria recutita*, Asteraceae) sind

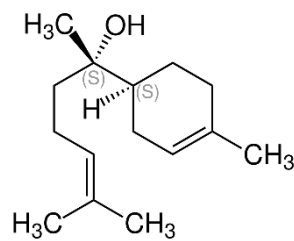
gemeinsam mit den Phenylpropanen (z.B. Anethol, Safrol) aus dem Anis (*Pimpinella anisum*, Apiaceae) bzw. aus dem Kampferbaum (*Cinnamomum camphora*, Lauraceae) wichtige Bestandteile des ätherischen Öls dieser Arzneipflanzen. Während das ätherische Öl des Thymians expectorierend und wegen der Phenole auch antibakteriell wirkt, hat das Kamillenöl hauptsächlich antiphlogistische Eigenschaften (Sticher, O., Heilmann, J., & Zündorf, I. 2015). Höhermolekulare Terpene, wie die Sesquiterpenlactone, die Diterpene - wie z.B. das Paclitaxel aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*, Taxaceae) – oder die Triterpene sind nicht verdampfbar und kommen daher nicht als Bestandteile ätherischer Öle vor, obwohl sie, wenn sie nicht wie das Glycyrrhizin aus der Süßholzwurzel (*Glycyrrhiza glabra*, Fabaceae) glykosidiert vorliegen, häufig im ätherischen Öl abgelagert werden (s. Abb. 1.2).

Während das Glycyrrhizin als Triterpensaponin indirekt expectorierend und aufgrund der Hemmung des Abbaus von Corticosteroiden indirekt antientzündlich wirkt, ist das Paclitaxel als Mitosehemmstoff zur Behandlung verschiedener bösartiger Tumore geeignet (Spencer & Faulds, 1994). Weitere Phenylpropanoide, die nicht als Komponenten ätherischer Öle vorkommen, sind die Cumarine, z.B. das Umbelliferon aus dem Liebstöckel (*Levisticum officinale*, Apiaceae), die innere Ester der ortho-Cumarsäure, einer Hydroxyzimtsäure darstellen (Späth, 1937). Von den Zimtsäuren, insbesondere der para-Cumarsäure leiten sich gemischte Polyketide, wie das Resveratrol, das in vielen Pflanzen und deren Früchten gefunden wurde (z.B. in der Weinbeere), und die große Gruppe der Flavonoide ab. Die Verbindungen besitzen einen Molekülteil, der auf dem für die Biosynthese der Phenylpropane verantwortlichen Shikimisäureweg gebildet wird und der zweite Teil des Moleküls wird durch Reaktion mit Malonyl-CoA gebildet. Dieser Stoffwechselweg führt ausgehend von Acetyl- und Malonyl-CoA zu Polyketosäuren, die nach Cyclisierung zu den Anthranoiden, zum Beispiel zum Aloin oder Hypericin führen. Bei gemischten Polyketiden wird das an das Coenzym A gebundene Acetat durch eine Zimtsäure ersetzt (Sticher, Heilmann, & Zündorf, 2015). Während Flavonoide als natürlicher UV-Schutz in allen landlebenden Pflanzen enthalten sind und aufgrund der Anordnung ihrer phenolischen Hydroxylgruppen auch ganz allgemein gute Antioxidantien darstellen, gibt es spezielle Flavonoide, wie das Vitexin aus dem Weißdorn (z.B. *Craetaegus monogyna*, *C. pentagyna* und andere Arten, Rosaceae) oder das Silybin aus der Mariendistel (*Silybum marianum*, Asteraceae) die ganz spezielle Wirkungen am Herzmuskel (Vitexin) oder an der Leberzelle (Silybin) besitzen (Blaschek, 2016).

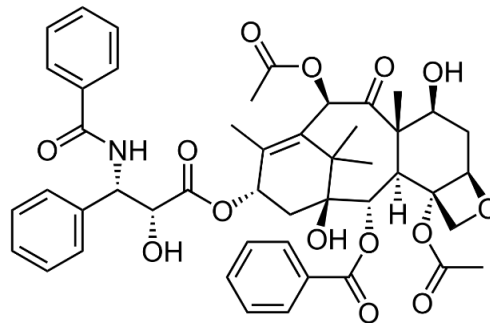
Terpene



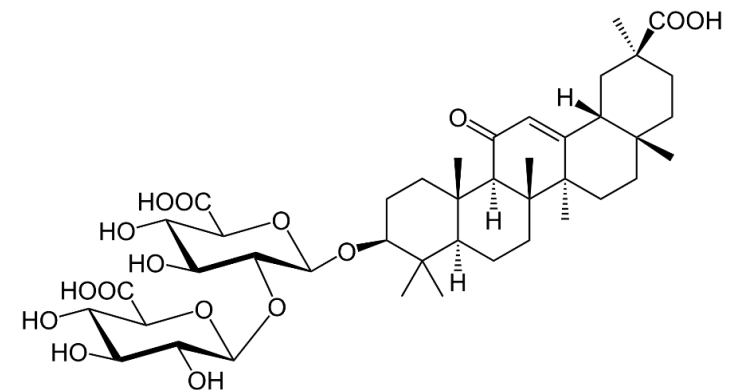
Thymol
(Monoterpen)



Bisabolol
(Sesquiterpen)

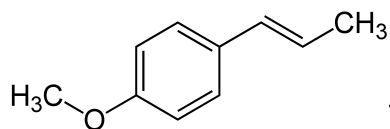


Paclitaxel
(Diterpen)

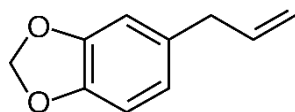


Glycyrrhizin
(Triterpen)

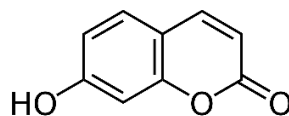
Phenylpropane



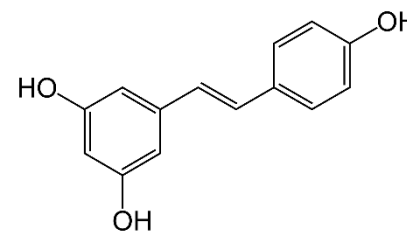
trans-Anethol



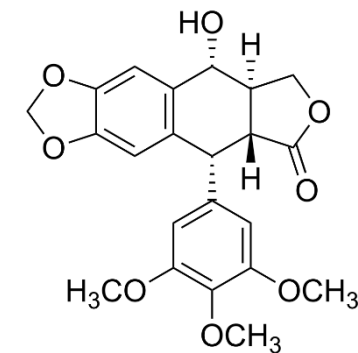
Safrol



Umbelliferon



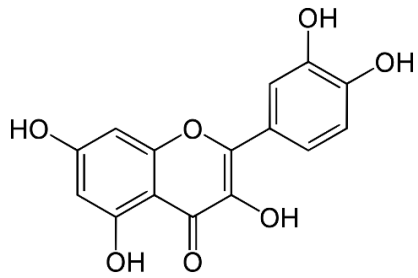
Resveratrol



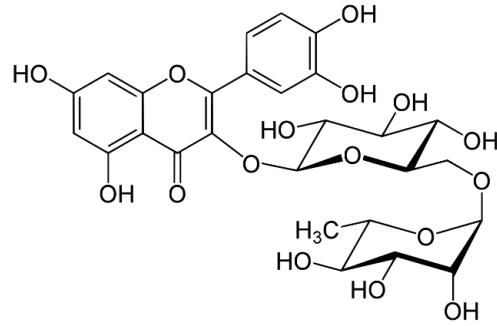
Podophyllotoxin

Abbildung. 1.2: Beispiele für wichtige Gruppen pflanzlicher Sekundärstoffe

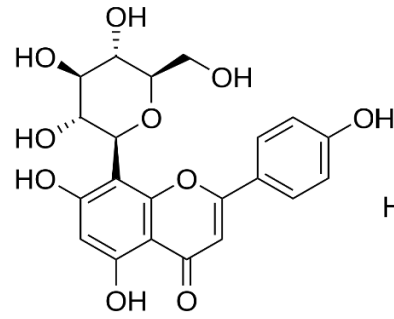
Flavonoide



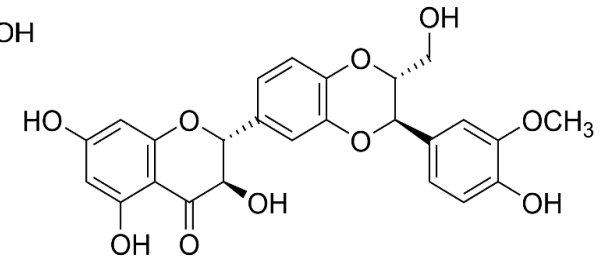
Quercetin



Rutin

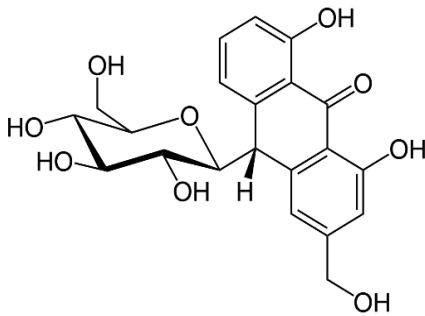


Vitexin

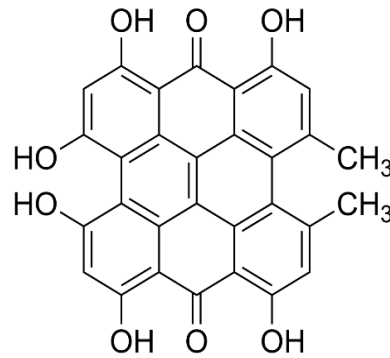


Silybin

Anthranoide

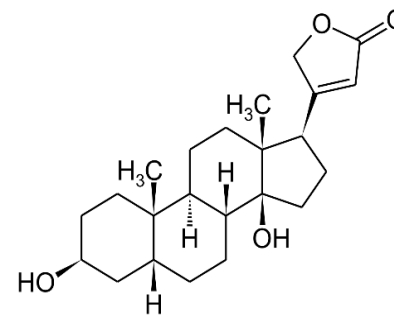


Aloin

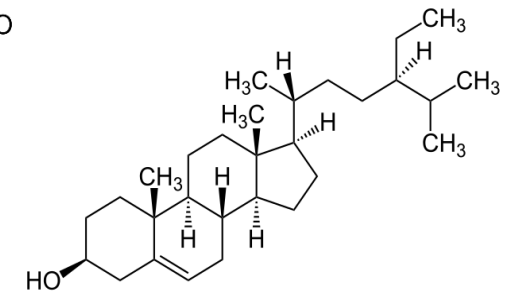


Hypericin

Steroide



Digitoxigenin



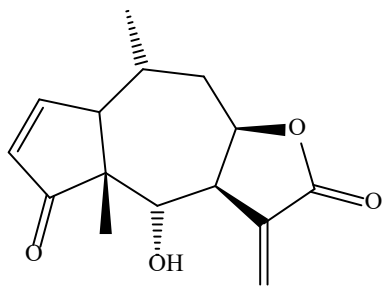
β -Sitosterin

Abbildung. 1.3: Beispiele für wichtige Gruppen pflanzlicher Sekundärstoffe

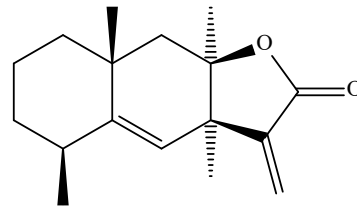
Aufgrund der großen Verbreitung im Pflanzenreich, sind Flavonoide gute chemotaxonomische Marker, mit deren Hilfe die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Arten, Gattung und Familien gut untersucht werden können (Hegnauer, 1959). Sie spielen aber auch in der Analytik eine bedeutende Rolle, da sie leicht detektiert und mengenmäßig erfasst werden können (Sticher et al, 2015). Bei einigen Arzneipflanzen, deren Wirkstoffe nicht bekannt sind, wird auf die enthaltenen Flavonoide standardisiert, um eine gleichbleibende Wirksamkeit des Produktes zu gewährleisten (Tittel G., 1982). Eine Gruppe von Phenylpropanen, die in der letzten Zeit mehr und mehr in den Mittelpunkt des Interesses gelangten, sind die Lignane. Bei diesen Stoffen handelt es sich um dimere Phenylpropane, die über das mittlere Kohlenstoffatom der Propyl-Seitenkette β,β' -verknüpft sind. Ein Beispiel für diese Verbindungsklasse ist das Podophyllotoxin aus dem Indischen Fußblatt (*Podophyllum peltatum*, Berberidaceae), das als Spindelgift zur Behandlung von Feigwarzen eingesetzt wird. Derivate des Podophyllotoxins (Etoposid und Teniposid) werden als Zytostatika eingesetzt (Schmoll et al, 1982). Pflanzliche Steroide, wie z.B. das β -Sitosterol, das Campesterol und Stigmasterol kommen ubiquitär als Bestandteile der Membranen in Pflanzen vor (Haller et al, 2013). Es gibt aber auch Steroide, die von pharmazeutischem Interesse sind, wie z.B. die herzwirksamen Glykoside des roten Fingerhuts (*Digitalis purpurea*, Plantaginaceae). Bei diesen Verbindungen, die eine starke Wirkung auf das Herz besitzen, in dem sie über die Hemmung der membranständigen Natrium-Kalium-ATPase, zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration in der Herzmuskelzelle führen, wodurch sich auch der intrazelluläre Calciumspiegel erhöht. Dadurch wird die Muskelkraft gesteigert (positiv inotrope Wirkung) und nachfolgend die Schlagfrequenz gesenkt (negativ chronotrop). Zusätzlich wird die Erregbarkeit der Muskelzellen erhöht (positiv bathmotrop) und die Erregungsweiterleitung verlangsamt (negativ dromotrop) (Mutschler et al, 2001). Beim hier dargestellten Ditoxigenin handelt es sich um das Aglykon des Digitoxins, das an der Hydroxylgruppe an C-3 eine lineare Zuckerkette mit 3 Digitoxosen (2,6-Di-desoxy-glucose) trägt, die jeweils 1,4- β -glykosidisch verknüpft sind. Bedingt durch die fehlenden Hydroxylgruppen der Desoxyzucker ist auch das Digitoxin ein eher lipophiler Stoff. In den Blättern des roten Fingerhuts werden diese Verbindungen mit einer weiteren Glucose versehen und dann im wässrigen Zellsaft der Vakuole abgelagert. Die Verbindung nennt man dann Purpureaglykosid A. Herzglykoside besitzen eine starke Wirkung, sie können aber bei Überdosierung leicht zu toxischen Symptomen führen (Mutschler et al, 2001). Da die Unterschiede zwischen wirksamer und toxischer Dosis nicht sehr groß sind, spricht man von einer geringen therapeutischen Breite (Mutschler et al, 2001).

Heute spielen diese Verbindungen nur noch eine untergeordnete Rolle in der Therapie der Herzinsuffizienz. Abgesehen von der Erforschung der Inhaltstoffe, traditioneller Arzneipflanzen, hat sich das Hauptaugenmerk in den letzten Jahren auf die Isolierung und Identifizierung neuer Pflanzeninhaltsstoffe mit möglichst neuartigen Strukturen, die zu innovativen Arzneistoffen führen könnten, gerichtet bzw. auf die Testung bekannter Substanzen hinsichtlich einer bisher noch nicht bekannten pharmakologischen Aktivität (Kannan et al., 2022; Malik et al., 2022).

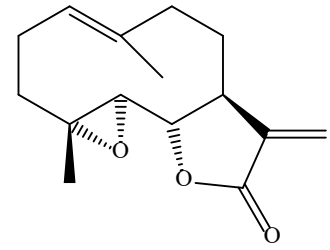
In unserer Arbeitsgruppe werden zu diesem Zweck unter anderem afrikanische Pflanzen hinsichtlich Ihrer Inhaltstoffe untersucht. In Bezug auf die Wirkung sind dabei Inhaltsstoffe mit cytotoxischen Eigenschaften besonders interessant, die dann in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen auf ihre *in vitro* Aktivität gegen verschiedene Tumorzelllinien geprüft werden sollen. In der Vergangenheit spielten dabei in unserem Labor Sesquiterpenlactone aus verschiedenen Asteraceen-Arten und die prenylierten Flavonoide aus der zur Familie der Fabaceae gehörenden Gattung *Erythrina* eine besondere Rolle (Passreiter & Isman, 1997; Passreiter et al, 2015). Die Abbildung 1.4 (siehe S.10) zeigt einige wichtige Sesquiterpenlactone und prenylierte Flavonoide mit cytotoxischer Wirkung, die in unserer Arbeitsgruppe untersucht wurde (Passreiter et al, 2015) bzw. die in den Übersichtsarbeiten zur Zytotoxizität von Sesquiterpenlactonen (Quintana und Estevez, 2018) und C-prenylierten Flavonoiden (Smejkal, 2014) aufgeführt wurden. Sesquiterpenlactone sind hinsichtlich ihrer Cytotoxizität und der daraus folgenden möglichen Anwendung gegen Krebs besonders interessante Naturstoffe (Dominguez et al, 1976; Röder et al, 1992). Sie kommen in der Natur sowohl bei den Angiospermen als auch außerhalb davon vor (Picman, 1986). Wenige Sesquiterpenlactone wurden bisher in Pilzen (Magnusson, 1973; Vidari, 1976, Ranieri, 1978) und neuerdings auch in endophytischen Pilzen (Wang et al., 2022), in Lebermoosen (Knoche et al., 1969, Benesowa et al., 1975, Asakawa et al, 1976,1979,1981) sowie in Cupressaceen (Seaman, 1982, Lee et al., 2015) gefunden. Bei den Angiospermen finden sich Sesquiterpenlactone bei den Acanthaceae, Amaranthaceae, Apiaceae, Aristolochiaceae, Burseraceae, Coriariaceae, Illiciaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Polygonaceae, Winteraceae (Yoshioko et al., 1973, Seaman, 1982) und Bombacaceae (Sood et al., 1982). Die meisten Sesquiterpenlactone sind aber in Asteraceen gefunden worden (Seaman, 1982, Herz, 1977).



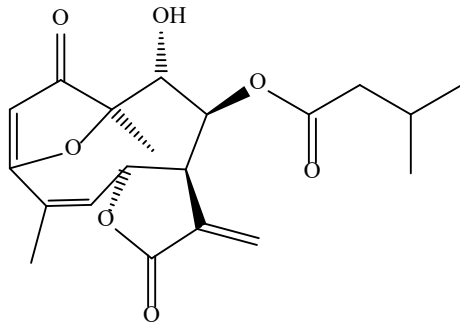
Helenalin



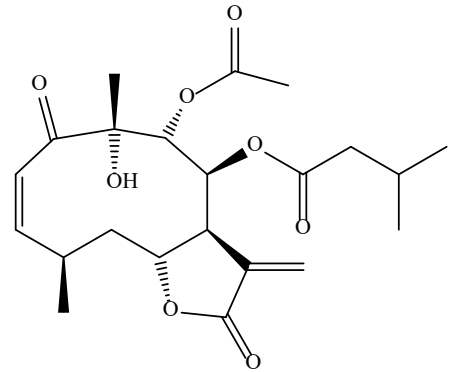
Alantolactone



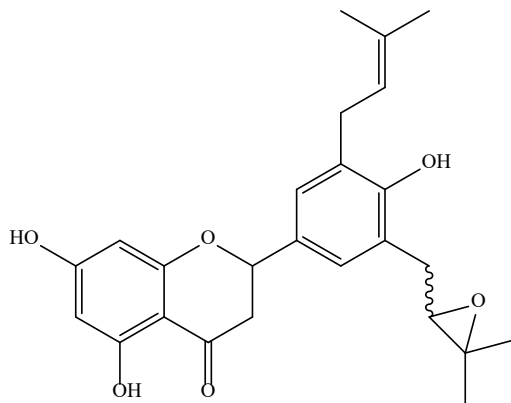
Parthenolid



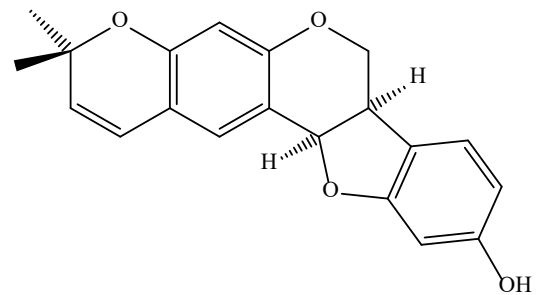
Lobatin B



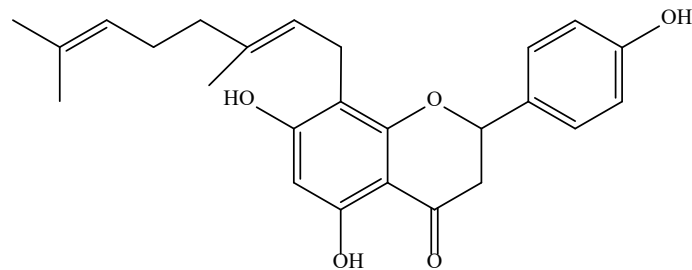
Neurolenin B



Addisoniaflavon I



Neorautenol



8-Geranylaringenin

Abbildung 1.4: Cytotoxische Sesquiterpenlactone und prenylierte Flavonoide

In Fortführung der Untersuchungen zur Inhaltstoffführung afrikanischer Pflanzen, sollten die Inhaltsstoffe der zur Familie der Asteraceae gehörenden, bisher phytochemisch noch nicht untersuchten *Volutaria boranensis* (Cufod.) Wagenitz untersucht werden. Das Pflanzenmaterial wurde von Patrick Mutiso, dem Kurator des Herbariums der Universität von Nairobi, in Kenia gesammelt (siehe Experimenteller Teil, Kapitel 5.4). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, daraus pflanzliche Sekundärstoffe zu isolieren und identifizieren sowie deren zytotoxische Aktivität auf verschiedene Krebszelllinien zu überprüfen. Die Gattung *Volutaria* umfasst circa 18 bis 20 Arten, von denen die meisten Species vom Iran im Osten über Nordafrika bis auf die Kanarischen Inseln verbreitet sind (Altinordu und Ferrer-Gallego, 2017). Nur wenige Vertreter der Gattung kommen in Ostafrika vor. Calleja et al. (2016) teilt die Gattung *Volutaria* aufgrund genetischer Merkmale in 14 phyllogenetische Kladen ein und gibt jeweils das Verbreitungsgebiet mit an. In Tabelle 1.1 sind die von Calleja et al. aufgeführten *Volutaria*-Arten nach ihrem Verbreitungsgebiet aufgelistet. Innerhalb der Asteraceae gehört die Gattung *Volutaria* zur Unterfamilie Carduoideae, zu der auch die Kratzdisteln und die Flockenblumen gehören (Hellwig, 2004).

Von den bisher beschriebenen Arten wurden bisher nur *Volutaria abyssinica*, *V. crupinoides*, *V. lippii*, *V. muricata*, *V. tubiflora* und *V. tubuliflora* phytochemisch untersucht (Mezache, 2010; Marzouk, 2015; Rafrafi, 2021; Zaabat et al. 2011; Gonzalez et al, 1970), wobei einige der Arbeiten zu den Sekundärstoffen von *V. lippii*, *V. muricata* und *V. tubuliflora* zu einer Zeit veröffentlicht wurden, als diese Arten noch zur Gattung *Amberboa* gehörten (Gonzalez et al, 1970). Von *Volutaria lippii* gab es außerdem noch zwei Unterarten *V. lippii* var. *lippii* und *V. lippii* var. *atlantica*, die aber heute als Synonyme für *V. lippii* verwendet werden (<http://www.theplantlist.org>). Eine Unterart von *Amberboa lippii*, heute *Volutaria lippii*, *Amberboa lippii* var. *subdiscolor* wurde zu *Volutaria tubuliflora* (<http://www.theplantlist.org>). Die Gattungen *Amberboa*, *Centaurea* und *Volutaria* ähneln sich relativ stark, so dass es nicht weiter verwundert, dass einige der Spezies mal der einen und mal der anderen Gattung zugeschlagen wurden (Susanna et al, 1995;). Dies trifft auch für *Volutaria boranensis* zu, die auch schon unter Bezeichnung *Centaurea hochstetteri* ssp. *boranensis* Cufod. geführt wurde (<http://www.theplantlist.org>).

Tab. 1.1: Verbreitungsgebiet der Volutaria-Arten nach Calleja et al. (2016)

Spanien	Kanarische Inseln	Nordafrika	Arabische Halbinsel	Horn von Afrika	Ostafrika	Socotra
<i>V. tubiflora</i>	<i>V. bollei</i> <i>V. canariensis</i> <i>V. tubiflora</i>	<i>V. belouini</i> <i>V. crupinoides</i> <i>V. lippii ssp. lippii</i> <i>V. lippii ssp. medians</i> <i>V. marroccana</i> <i>V. muricata</i> <i>V. saharae</i> <i>V. sinaica</i> <i>V. tubiflora</i> <i>V. tubuliflora</i>	<i>V. albicaulis</i> <i>V. dhofarica</i> <i>V. sinaica</i> <i>V. tubiflora</i>	<i>V. abyssinica</i> <i>V. boranensis</i> <i>V. djiboutensis</i> <i>V. somalensis</i>	<i>V. boranensis</i>	<i>V. socotrensis</i>

Die in den untersuchten Arten hauptsächlich gefundenen Sekundärstoffe gehören zu den Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden (Mezache, 2010; Marzouk, 2015; Rafrafi, 2021; Zaabat et al. 2011, Gonzalez et al, 1968,1970). In einer Untersuchung wässriger und mit Ethylacetat gewonnener Extrakte aus den oberirdischen Organen von *V. lippii* aus Tunesien, in der die antioxidativen, antidiabetischen und antibakteriellen Eigenschaften getestet wurden, konnten per LC-ESI-MS/MS auch einige Inhaltsstoffe aus anderen Gruppen identifiziert (Ben Salah, 2019). Es wurden verschiedene häufig vorkommende Flavonoide sowie Pflanzensäuren gefunden, Sesquiterpenlactone konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Ben Salah et al, 2019). Auch in einer weiteren, erst vor zwei Jahren erschienen Arbeit wurden Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von *Volutaria lippii* durchgeführt (Scrano et al, 2020) und Marzouk (2015) beschreibt *V. abyssinica* als eine mögliche Quelle für cytotoxische Sesquiterpenoide.

Die hier untersuchte *Volutaria boranensis* hat ihr zentrales Vorkommen in Kenia, sie kommt aber auch im Süden von Äthiopien und im Norden von Tansania vor (Calleja et al., 2016). Es handelt sich um eine ein- bis mehrjährige, krautige Pflanze, die zwischen 30 – 90 cm hoch wird und kommt häufig als Unkraut am Straßenrand und in der Graslandvegetation der Savanne vor (Calleja et al, 2016) Sie besitzt typische Blütenkörbchen mit vielen darin enthaltenen Röhrenblüten, bei den Carduoideae gibt es keine Zungenblüten. Die äußeren, etwas längeren Röhrenblüten sind steril, während die inneren kürzen Blüten zwittrig sind. Die Farbe der Kronblätter variiert von weißlich, über rosa bis hin zu lila (Beentje et al, 2005). Neben der Isolierung und Identifizierung von Sekundärstoffen aus *Volutaria boranensis* sollten die bereits von Kolb und Passreiter isolierten, aber bisher nicht veröffentlichten Flavonoide der ebenfalls in Kenia gesammelten Rinde von *Erythrina burtii* (Fabaceae) hinsichtlich ihrer cytotoxischen Eigenschaften überprüft werden.

Weltweit gibt es mehr als 100 verschiedene *Erythrina*-Arten, bei denen es sich um, zur Familie der Schmetterlingsblütler (Fabaceae) gehörenden, Bäume und Sträucher handelt, die auch als Korallenbäume bezeichnet werden. Sie sind dornenbewehrt und können bis zu 30 Meter hoch werden (Neill, 1988). Die Gattung ist in fünf Subgenera unterteilt, *Erythrina*, *Micropteryx*, *Chirocalyx*, *Erythraster* und *Tripterolobus*, dem nur eine Art zugeordnet wurde (Neill, 1988; Bruneau 1996). Die Gattung *Erythrina* wird bereits seit den Anfängen der Naturstoffforschung untersucht, hauptsächlich wegen der enthaltenen Alkaloide (Krukoff, Barneby, 1974).

Auch aus dem Bereich der Flavonoide konnten mehr als 200 verschiedene Verbindungen bereits isoliert werden, viele von ihnen liegen prenyliert vor, d.h. sie sind mit einem Hemiterpen am aromatischen A- und/oder B-Ring substituiert (Moriyasu et al, 1998; Promsatha, Tempesta 1998; Veitch 2007)

In unserer Arbeitsgruppe wurden mit *Erythrina addisoniae* und *E. melanacantha* bisher je eine Species aus dem Subgenus Chirocalyx und Erythraster untersucht (Passreiter et al, 2015; Koch et al, 2019). Die dort gefundenen, prenylierten Isoflavonoide und Pterocarpane zeigten *in vitro* recht gute Aktivitäten in verschiedenen Testmodellen (Passreiter et al, 2015; Koch et al, 2019). Besonders hohe Zytotoxizitäten wurden für die aus *E. addisoniae* isolierten Pterocarpane Neorautenol und Phaseollin gefunden (Wätjen et al., 2007). Aber auch die prenylierten Flavonanone wiesen teilweise recht gute Aktivitäten im unteren Mikromolaren Bereich auf (Passreiter et al, 2015)

Mit *E. burtii*, die wie *E. melanacantha* zum Subgenus Erythraster gehört (Neill, 1988), wurde die nunmehr dritte Species aus dieser Gattung in unserem Arbeitskreis untersucht. Anke Suckow-Schnitker hat aufgrund der Ergebnisse der von ihr durchgeführten Toxizitätstest mit den Flavonoiden von *E. addisoniae* gefolgert, dass die Prenylierung an bestimmten Positionen des A- und B-Rings zu einer Verstärkung der Zytotoxizität gegenüber H4IIE Hepatomzellen führt (Passreiter et al, 2015) Die hier aus *E. burtii* isolierten Verbindungen zeigen ganz ähnlichen Substitutionsmuster, so dass hier auch überprüft werden kann, inwieweit die von Suckow-Schnitker (2008) aufgestellten Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch für andere Substanzen und andere Tumorzelllinien Gültigkeit besitzen.

2. Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen

2.1. Extraktion und Fraktionierung

Die getrockneten und pulverisierten oberirdischen Pflanzenteile (917g) von *Volutaria boranensis* (Cufod.) Wagenitz wurden mit Dichlormethan in einer Soxhletapparatur erschöpfend extrahiert. Die in den Extraktionshülsen verbliebene und bereits trockene, pulverisierte Droge wurde mit dem gleichen Verfahren mit Methanol ebenfalls erschöpfend extrahiert. Nach Trocknung wurden 82 g Methanolextrakt erhalten. Nach Abtrennung des sich bildenden Niederschlags nach Auflösung in Methanol, ergaben sich 30 g Extrakt. Alle Folgefraktionen des Dichlormethanextraktes wurden mit dem Anfangsbuchstaben D und alle entsprechenden Fraktionen des Methanolextraktes erhielten zur Abgrenzung ein M.

Fraktionierung des Dichlormethanextraktes

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone lag, wurde nicht der gesamte Extrakt, sondern nur der methanollösliche Anteil verwendet. Der gesamte Dichlormethanextrakt (133,67 g) wurde daher mit Methanol mithilfe der Soxhlet-Apparatur ausgezogen, wobei 33g Methanol-löslicher Anteil des Dichlormethan-Extraktes erhalten wurden. Dieser Anteil des Dichlormethanextraktes wurde als Ausgangsmaterial der nachfolgende Trennmethoden zur Isolierung der Einzelverbindungen verwendet. 33 g des so erhaltenen Extraktteils wurden in 5 Portionen aufgetrennt (s. Exp. Teil, Kap. 5). Die in Reagenzgläsern aufgefangenen Fraktionen wurden aufgrund ihrer chromatographischen Ähnlichkeiten weiter zusammengefasst. Durch Vergleich der so gebildeten Fraktionen aus allen 5 Durchgängen wurden anschließend 13 Fraktionen gebildet.

Fraktion 6 lieferte nach weiteren Reinigungsschritten zwei Sterine (Verbindungen **15** und **16**) Fraktion 8 lieferte nach mehreren Reinigungsschritten fünf Sesquiterpenlactone (Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und **5**), ein Lignan (Verbindung **12**) sowie zwei Triterpene (Verbindung **13** und **14**). Des Weiteren lieferte Fraktion 10 nach weiteren Reinigungsschritten eine neue Verbindung (Verbindung **8**). Zwei Flavonoide lieferten die Fraktionen **12** (Verbindung **6**) und **13** (Verbindung **7**).

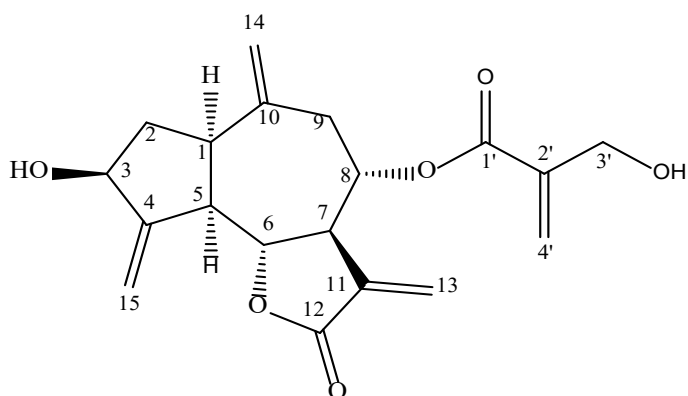
Fraktionierung des Methanolextraktes

Der Methanolextrakt (30g) wurde ebenfalls säulenchromatographisch aufgetrennt. (s. Exp. Teil, Kap. 5) Und lieferte 7 Fraktionen (M.1 – M.7). Nur die Fraktionen M.6 und M.7 erlaubten eine schnelle Isolierung von Substanzen, so dass diese beiden Fraktionen weiter aufgetrennt wurden.

Fraktion 6 lieferte nach weiteren Reinigungsschritten zwei weitere Verbindungen (Verbindung **11** und **17**). Fraktion 7 lieferte schließlich zwei Flavonoidglykoside (Verbindung **9** und **10**)

2.2 Isolierung und Identifizierung von Verbindungen aus *Volutaria boranensis*

2.2.1 Verbindung 1 (Cynaropikrin)



Verbindung **1** kristallisierte bei der Aufarbeitung von Fraktion V.b.D.8.16 des Dichlormethanextraktes aus der Lösung aus (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3) Nach weiterer Reinigung der erhaltenen Kristalle konnten 135 mg einer weißen, kristallinen Substanz gewonnen werden.

Im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittelsystem DC1, s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1, Tab. 5.1) zeigte die Substanz bei R_f 0.36 eine Löschung des Fluoreszenzindikators bei $\lambda=254$ nm. Nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz färbte sich die Substanz braun/violett. Bei der anschließend durchgeführten HPLC (siehe Exp. Teil, Kap.5.2.4) wurde die Substanz bei einer Retentionszeit von 25,99 Minuten registriert. Das bei der Detektion aufgenommene UV-Spektrum wies ein Maximum bei 216 nm auf.

Die Lage des Maximums und das Aussehen des Spektrums ließ bereits vermuten, dass es sich bei **1** um eine Substanz mit einer α,β -ungesättigten Carbonylstruktur handeln sollte, welche beispielsweise in den für Asteraceen typischen Sesquiterpenlactonen häufig vorkommt (Heywood et al, 1977). Das unter Elektronenimpakt-Bedingungen (EI) aufgenommene Massenspektrum von **1** (siehe Abb. 2.1, S.18) zeigte das Molekülion (M^+) bei $m/z = 346$. Aufgrund der Fragmente bei $m/z = 262$ ($M^+ - 84$) und des intensiven Fragmentes bei $m/z = 85$ (Basis-Ion, 100%) in Verbindung mit dem Fragment bei $m/z = 57$ ($85-CO$) lässt sich bei

Verbindung **1** vermuten, dass es sich um einen Ester eines Alkohols mit einer gesättigten C₅- oder einer ungesättigten hydroxylierten C₄-Säure handelt (Rücker et al, 1992). Das aus der Abspaltung der Acylgruppe resultierende Fragment bei $m/z = 262$ ist begleitet von zwei jeweils um 18 Masseneinheiten leichteren Fragmenten bei $m/z = 244$ ($262 - \text{H}_2\text{O}$) und $m/z = 226$ ($244 - \text{H}_2\text{O}$), so dass es sich bei **1** um einen acylierten Alkohol handeln sollte, der eine weitere Hydroxylgruppe besitzt. Sowohl die im Massenspektrum detektierte Molmasse als auch die Fragmentierung unterstützt die Annahme, dass es sich bei **1** um ein acyliertes Sesquiterpenlacton handeln könnte. Ein zusätzlich aufgenommenes Elektrospray-MS mit chemischer Ionisation (HRESI-MS) unterdrückte die Fragmentierung der Substanz und die Masse konnte auf vier Stellen hinter dem Komma genau bestimmt werden (s. Abb. 2.2, S.19). Die genaue Masse von **4** wurde im Spektrum bei $m/z = 347.1485$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) registriert, woraus sich die Summenformel C₁₉H₂₂O₆ ableiten lässt.

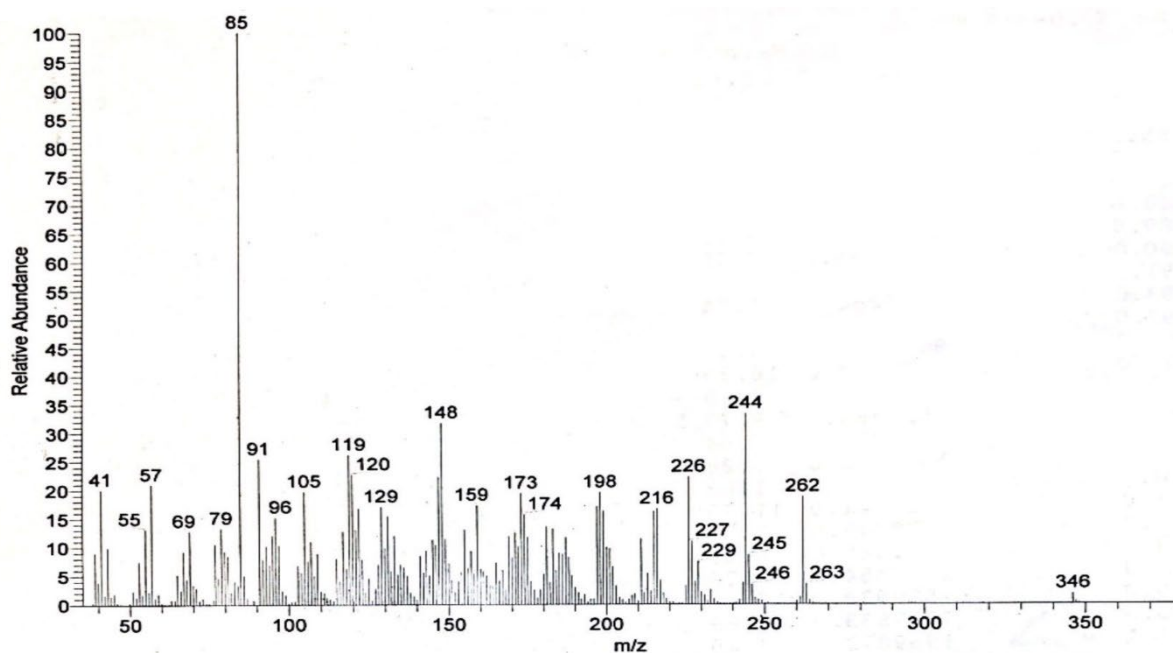


Abbildung. 2.1: Massenspektrum von Verbindung **1** (EI-MS)

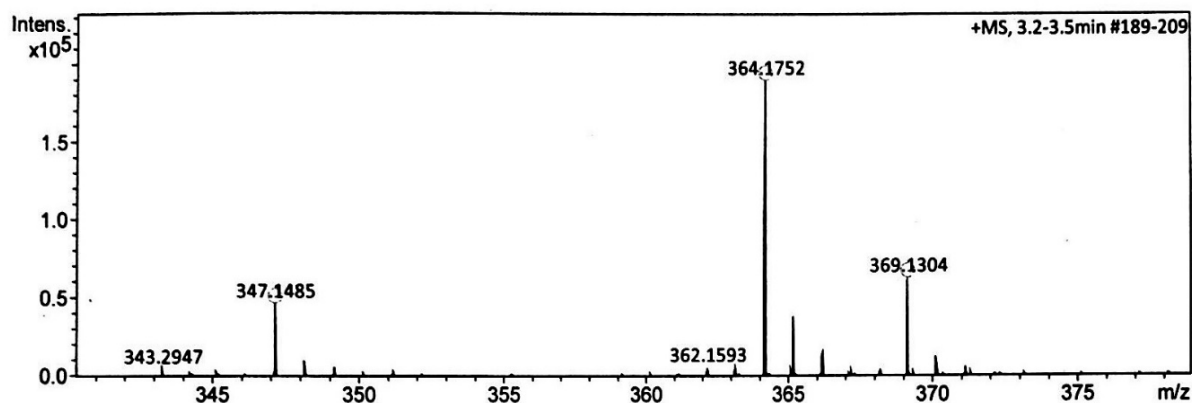


Abbildung 2.2: Massenspektrum von Verbindung **1** (HR-ESI-MS)

Zur vollständigen Aufklärung der Struktur von **1** wurden ein- und zweidimensionale NMR-Spektren in deuteriertem Methanol aufgenommen (s. Abb. 2.3 bis 2.8, S.24-29). Die Abb. 2.4 zeigt das bei einer Messfrequenz von 150 MHz aufgenommene, breitbandentkoppelte ^{13}C NMR Spektrum von Verbindung **1**, das die Signale für neunzehn Kohlenstoffe zeigt (siehe Abb. 2.4, S. 25 und Tab. 2.1, S.20/21). Dreizehn dieser Signale konnten aufgrund der Auswertung des zusätzlich aufgenommenen DEPT-135 Spektrums (s. Abb. 2.5, S. 26) protonierten Kohlenstoffen zugeordnet werden. Aufgrund der speziellen Aufnahmetechnik beim DEPT-135, zeigen Methyl- und Methinkohlenstoffe ein positives, nach oben gerichtetes und Methylenkohlenstoffe ein negatives, nach unten gerichtetes Signal. Quartäre Kohlenstoffe ergeben gar kein Signal, so dass sechs der im ^{13}C -NMR registrierten Signale aufgrund des Fehlens der entsprechenden Signale im DEPT-135 als quartäre Kohlenstoffe erkannt wurden (s. Abb. 2.5, S.26 und Tab. 2.1). Das DEPT-135 Spektrum von **1** zeigt sieben nach unten gerichtete Signale, die je einem CH_2 -Kohlenstoff entsprechen, sowie sechs nach oben gerichtete Signale für CH bzw. CH_3 Kohlenstoffe. Da die Integrale der zugehörigen Protonensignale im ^1H -NMR Spektrum (s. Abb. 2.3, S.24), die über die im zweidimensionalen Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektrum (HSQC) auftretenden „Cross-Peaks“ identifiziert wurden (s. Abb. 2.7, S.28), jeweils nur einem Proton entsprechen, handelte es sich bei diesen sechs C-Atomen ausnahmslos um Methinkohlenstoffe. Für die weitere Strukturaufklärung wurden neben den Korrelationen im HSQC-Spektrum (direkte C-H Korrelation) auch die Signale der im HMBC (Heteronukleares Multiple Bond Korrelationspektrum, s. Abb. 2.8, S.29) ausgewertet, bei dem die Protonen und Kohlenstoffe neben der ^1J -Kopplung auch so genannte long-range Kopplungen über zwei bis drei Bindungen (^2J , ^3J) zeigen. Weiterhin

wurden die Protonen-Spin-Systeme durch die Berechnung der Kopplungskonstanten (s. Tab. 2.1, S.20/21) und die Auswertung des 2D-COSY-Spektrums (s. Abb. 2.6, S.27), in dem die Protonen-Protonen-Korrelationen sichtbar werden, erkannt.

Zwei der Kohlenstoffsignale bei $\delta = 166.53$ und 171.20 ppm, die über die fehlende Korrelation mit einem Protonensignal als Signale für quartäre Kohlenstoffe erkannt wurden, lagen im Shiftbereich der Carbonyle von Estern bzw. Lactonen, die mit einer Doppelbindung konjugiert sind (Budesinsky und Saman, 1995). Es lag daher die Vermutung nahe, dass es sich bei **1** um ein, für Asteraceen typisches Sequiterpenlacton mit exocyclischer Doppelbindung am γ -Lactonring handeln könnte, welches zusätzlich mit einer ungesättigten Säure verestert ist. Dies bestätigte die nach Auswertung der UV- und MS-Daten getroffene Annahme.

Tabelle 2.1: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten von Verbindung **1** (δ in ppm, 600 bzw. 150 MHz in CD_3OD und DMSO-d_6)

	^1H (J in Hz)		^{13}C		
	CD_3OD	DMSO-d_6	CD_3OD	Dept-135	DMSO-d_6
1	3.02 ddd (11.8; 8.8; 6.8)	2.91 m	46.16	CH	44.02
2a	1.75 ddd (12.2; 9.0; 9.0)	1.63 ddd (12.7; 8.8; 6.8)	40.01	CH_2	38.68
2b	2.09 ddd (12.2; 7.1; 7.1)	1.91 ddd (12.6; 8.8; 6.8)			
3	4.51 ddd (9.0; 7.2; 2.2)	4.35 t (8.8)	74.14	CH	72.05
4	-	-	154.04	C	153.68
5	2.91 dd (8.9; 1.9)	2.88 m	52.01	CH	49.65
6	4.35 dd (10.8; 8.9)	4.38 dd (11.1; 8.7)	80.28	CH	78.17
7	3.29 dt (8.9, 3.0)	3.21 tt (9.2; 8.7; 3.0)	48.43	CH	46.29
8	5.15 m	5.11 ddd (9.2; 5.7; 3.5)	75.62	CH	73.67
9a	2.41 dd (14.6, 3.6)	2.25 dd (14.3; 3.6)	37.65	CH_2	36.36
9b	2.74 dd (14.6; 5.2)	2.65 dd (14.3; 5.7)			
10	-	-	144.03	C	143.00

11	-	-	139.70	C	138.37
12	-	-	171.20	C	168.84
13a	5.65 d (3.0)	5.51 d (3.0)	122.39	CH ₂	120.84
13b	6.13 d (3.0)	6.05 d (3.4)			
14a	4.92 s (br.)	4.83 d (2.1)	118.15	CH ₂	116.99
14b	5.16 s (br.)	5.09 d (2.1)			
15a	5.34 s (br.)	5.21 d (2.0)	112.73	CH ₂	110.38
15b	5.45 s (br.)	5.24 d (2.2)			
1'	-	-	166.53	C	164.89
2'	-	-	141.90	C	140.88
3'	4.32 s	4.17 s	61.62	CH ₂	59.59
4'a	5.98 d (1.61)	5.91 d (1.89)	125.96	CH ₂	124.23
4'b	6.31 d (1.61)	6.18 d (1.67)			

Das Signal des Carbonylkohlenstoffs bei $\delta = 166.53$ ppm (C-1') im HMBC-Spektrum zeigte Kreuzsignale mit den Protonensignalen bei $\delta = 6.31$ (Dublett), 5.98 (Dublett), 4.32 (Singulett) und 5.15 ppm (Multipllett). Bei dem Singulett bei $\delta = 4.32$ ppm handelte es sich um ein Signal für zwei äquivalente Protonen (H-3'), die aufgrund der Lage, einer endständigen CH₂OH-Gruppe zugeordnet werden konnte. Das Signal für den zugehörigen Kohlenstoff fand sich bei $\delta = 61.62$ (C-3') im ¹³C-NMR im typischen Bereich für hydroxylierte Kohlenstoffe. Die beiden Dubletts bei $\delta = 6.31$ und 5.98 ppm (H-4'a und H-4'b) zeigten beide eine Korrelation im HSQC Spektrum mit dem Kohlenstoff bei $\delta = 125.96$ (C-4'), woraus eindeutig abgeleitet werden konnte, dass es sich dabei um zwei endständige Protonen an einer Doppelbindung handelte (Budesinsky und Saman, 1995). Alle Protonensignale zeigten außerdem eine ²J-Korrelation zum Signal eines quartären Kohlenstoffs bei $\delta = 141.90$ ppm, der dadurch dem C-2' zugeordnet werden konnte. Bei Verbindung **1** handelte es sich demnach um den Ester der 2-Hydroxymethylacrylsäure (Budesinsky und Saman, 1995)

Der andere Carbonylkohlenstoff, dessen Signal bei $\delta = 171.20$ (C-12) gefunden wurde, koppelte ebenfalls mit zwei olefinischen Protonen bei $\delta = 6.13$ und 5.65 ppm (H-13a und H-13b) (s. Abb. 2.8, S.29). Dem in deuteriertem Methanol aufgenommen Spektrum fehlte allerdings die Korrelation mit dem Protonensignal bei $\delta = 3.29$ ppm (H-7), wie später durch die Auswertung des zusätzlich in deuteriertem Dimethylsulfoxid aufgenommenen Spektrums erkannt

werden konnte (s. Abb. 2.13, S.34 und Tab. 2.1, S.20/21). Dieses Proton zeigte aber auch in CD₃OD eine Korrelation mit dem quartären Kohlenstoff bei $\delta = 139.70$ (C-11), mit dem auch die Protonensignale für H-13a eine schwache und H-13b eine starke Korrelation zeigten. Das C-11 zeigte darüber hinaus eine weitere long-range Korrelation im HMBC Spektrum mit dem Proton bei $\delta = 5.15$ ppm. Aufgrund der Auswertung der Korrelationen im COSY Spektrum konnte dieses Signal dem H-8 zugeordnet werden. Der zugehörige Kohlenstoff fand sich bei $\delta = 75.62$ in einem Shiftbereich, der für einen acylierten, sekundären Alkohol charakteristisch ist. Wie oben bereits erwähnt zeigte das C=O (C-1') der hydroxylierten Methacrylsäure eine Korrelation zum Protonensignal bei $\delta = 5.15$ ppm, woraus gefolgert werden konnte, dass die Methacrylsäure an C-8 gebunden sein musste. Weitere im COSY Spektrum auftretende Korrelationen zwischen H-7 und dem Dublett von Dubletts bei $\delta = 4.35$ (H-6) sowie dessen zugehöriges Kohlenstoffsignal bei $\delta = 80.28$ ließen erkennen, dass es sich bei **1** um ein Sesquiterpen handeln musste, dessen γ -Lactonring mit exocyclischer Methylengruppe zwischen C-12 und der OH Gruppe an C-6 geschlossen wurde. Die Größe der Kopplung zwischen H-7 und H-6 ($J = 10.8$ Hz) identifizierte **1** als 6,7-trans-Lacton mit exocyclischer Methylengruppe an C-11, was durch die auftretende allylische Kopplung zwischen den Methylenprotonen an C-13 und H-7 zusätzlich bewiesen wurde (Bohlmann et al, 1983). Die relative Stereochemie der acylierten Hydroxylgruppe folgt abschließend aus der Größe der Kopplung zwischen den Protonen an den Kohlenstoffen C-7 und C-8, die ebenfalls „trans“ angeordnet sein müssen (s.Tab. 2.1), (Budesinsky & Saman, 1995). Weitere Kopplungen zwischen H-6 und dem Dublett von Dubletts für ein Proton bei $\delta = 2.91$ ppm (H-5, $J = 8.9$ Hz) und zwischen H-5 und dem Signal für ebenfalls ein Proton bei $\delta = 3.02$ (H-1, $J = 1.9$ Hz) zeigten, dass es sich bei **1** um ein 1,5-cis Guaianolid handelte (Budesinsky & Saman, 1995) Das Proton an C-1, dessen Kohlenstoffsignal sich bei $\delta = 46.16$ ppm findet, zeigt die Korrelationen mit vier weiteren Protonen bei $\delta = 1.75$ (ddd), 2.09 (ddd), 4.92 (s (br.)) und 5.16 (s (br.)) ppm im H,H-COSY-Spektrum (s. Abb. 2.6, S.27). Bei diesen 4 Protonen handelt es sich um Methylenprotonen, was durch die Korrelation der beiden Hochfeld-Protonen mit dem Kohlenstoffsignal bei $\delta = 40.01$ ppm und der der beiden im Tieffeld gefundenen Protonen mit dem Signal bei $\delta = 118.15$ gezeigt werden konnte (s. Abb. 2.7, S.28). Es handelte sich demnach um die Protonen H-2a und H-2b am sp³-hybridisierten C-2 des Cyclopentanrings und um die beiden Protonen H-14a und H-14b am sp²-hybridisierten Kohlenstoff der exocyclischen Methylengruppe an C-10 (s. Tab. 2.1). Das zugehörige quartäre C-10 konnte über die ³J-Kopplung mit H-1 und die Korrelation mit den beiden Protonen an C-9 im HMBC-Spektrum

identifiziert werden (s. Abb. 2.8, S. 29). Diese beiden Protonen zeigen neben der geminalen auch eine vicinale Kopplung mit H-8 bei $\delta = 5.15$ ppm, wodurch die Kopplungen des Cyloheptanrings des Guaianolids komplettiert wurden (s. Abb. 2.3, S.24 und 2.4, S.25). Die beiden Protonen an C-2 besitzen neben der geminalen Kopplung und der vicinalen Kopplung mit H-1 jeweils eine weitere vicinale Kopplung mit dem Signal bei $\delta = 4.51$ ppm (H-3). Die Lage dieses Signals und des zugehörigen Kohlenstoffs (C-3) bei $\delta = 74.14$ sprachen für das Vorliegen eines sekundären Alkohols an dieser Position (s. Abb. 2.7, S. 28 u. Tab 2.1, S. 20/21)) (Budesinsky & Saman, 1995)H-3 hatte zwei weitere Kopplungspartner im H,H-COSY-Spektrum, bei denen es sich um die zwei Protonen der ebenfalls exocyclischen Methylengruppe an C-4 (H-15a und H-15b) handeln musste (s. Abb 2.6, S.27 u. Tab 2.1). Da alle bisher in der Natur gefundenen Guaianolide ein α -ständiges Proton an C-7 besitzen, sind die Protonen an C-6 und C-8 aufgrund der Kopplungskonstanten $J_{6,7} = 10.8$ und $J_{7,8} = 9.3$ Hz jeweils trans zum H-7 angeordnet. Daraus folgt, dass die Estergruppen an C-8 α -ständig angeordnet sein muss.

Alle übrigen Spektren und die daraus zu entnehmenden Korrelationen ließen keinen Zweifel daran, dass es sich bei Verbindung **1** um das Perhydro-8-hydroxy-3,6,9-tri(methylidene)-2oxoazuleno[4,5b]furan-4-yl 2-(Hydroxymethyl)prop-2-enoat handelte. Zur Absicherung der Struktur und zur Vermeidung von Überlagerungen wurde ein zweiter Satz NMR-Spektren von Verbindung **1** im DMSO- d_6 aufgenommen (s. Abb. 2.9-2.13, S.30-34). Die Zuordnung der Signale ist in den Abbildungen dargestellt und findet sich auch in Tabelle 2.1. Dieses Sesquiterpenlacton vom Guaianolid-Typ, dass auch unter den Namen Cynaropikrin bekannt ist, wurde bereits in vielen Asteraceen gefunden (Bhattacharyya et al, 1995; Budesinsky & Saman, 1995) Die hier ermittelten analytischen und NMR-Daten befinden sich insgesamt in guter Übereinstimmung zu den in der Literatur gefundenen Daten in anderen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen (Budesinsky and Saman, 1995). Cynaropikrin wurde hier erstmals in *Volutaria boranensis* gefunden. Diese Verbindung wurde aber schon 1977 aus von den kanarischen Inseln stammenden Pflanzenmaterial von *Amberboa lippii* isoliert. Diese Species, die zuvor *Centaurea lippi* hieß (Dittrich, 1968), wurde dann später unter den Namen *Volutaria lippii* der Gattung *Volutaria* zugeordnet (Calleja et al, 2016).

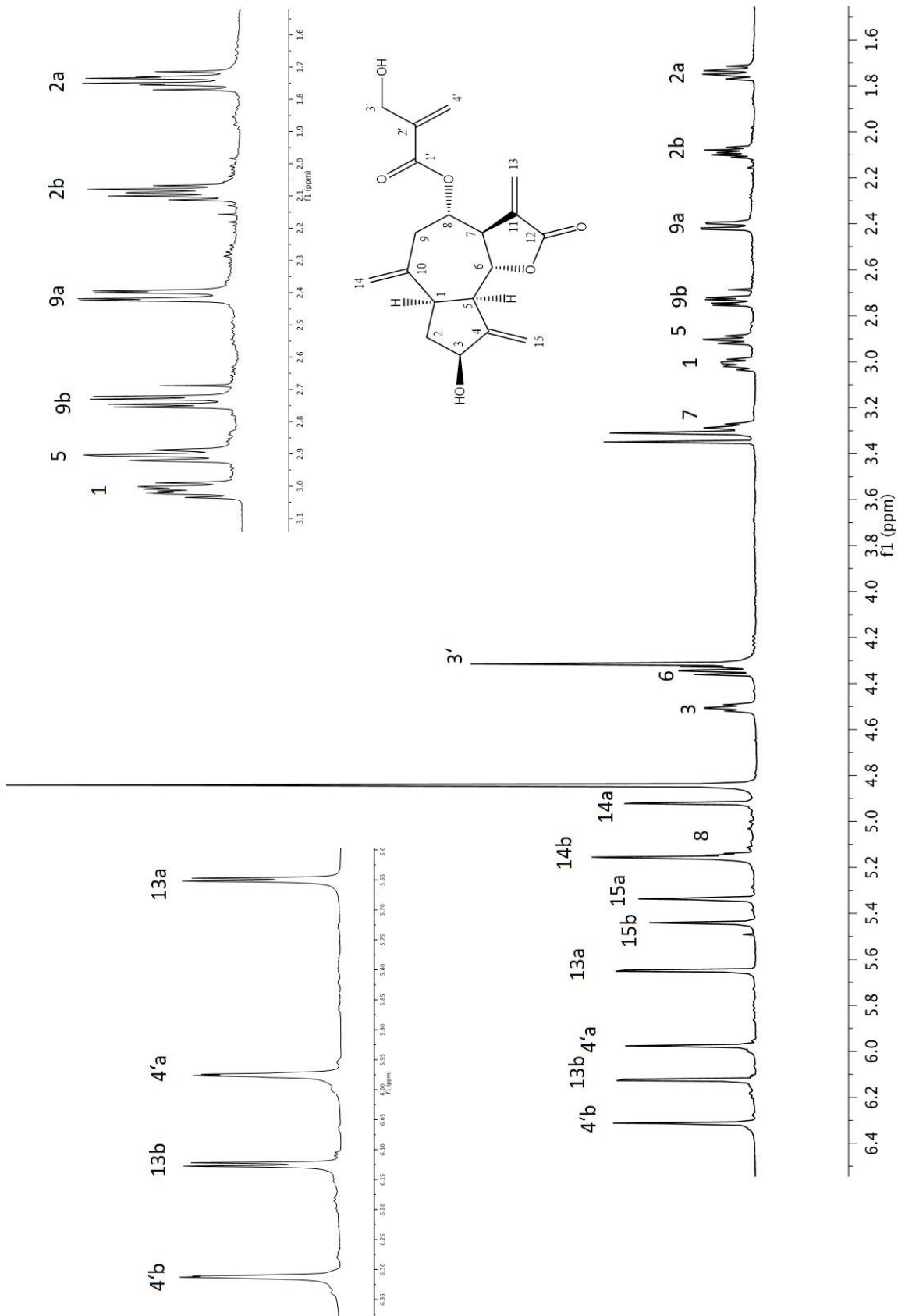


Abbildung 2.3: ^1H NMR Spektrum von Verbindung **1** (600 MHz in CD_3OD)

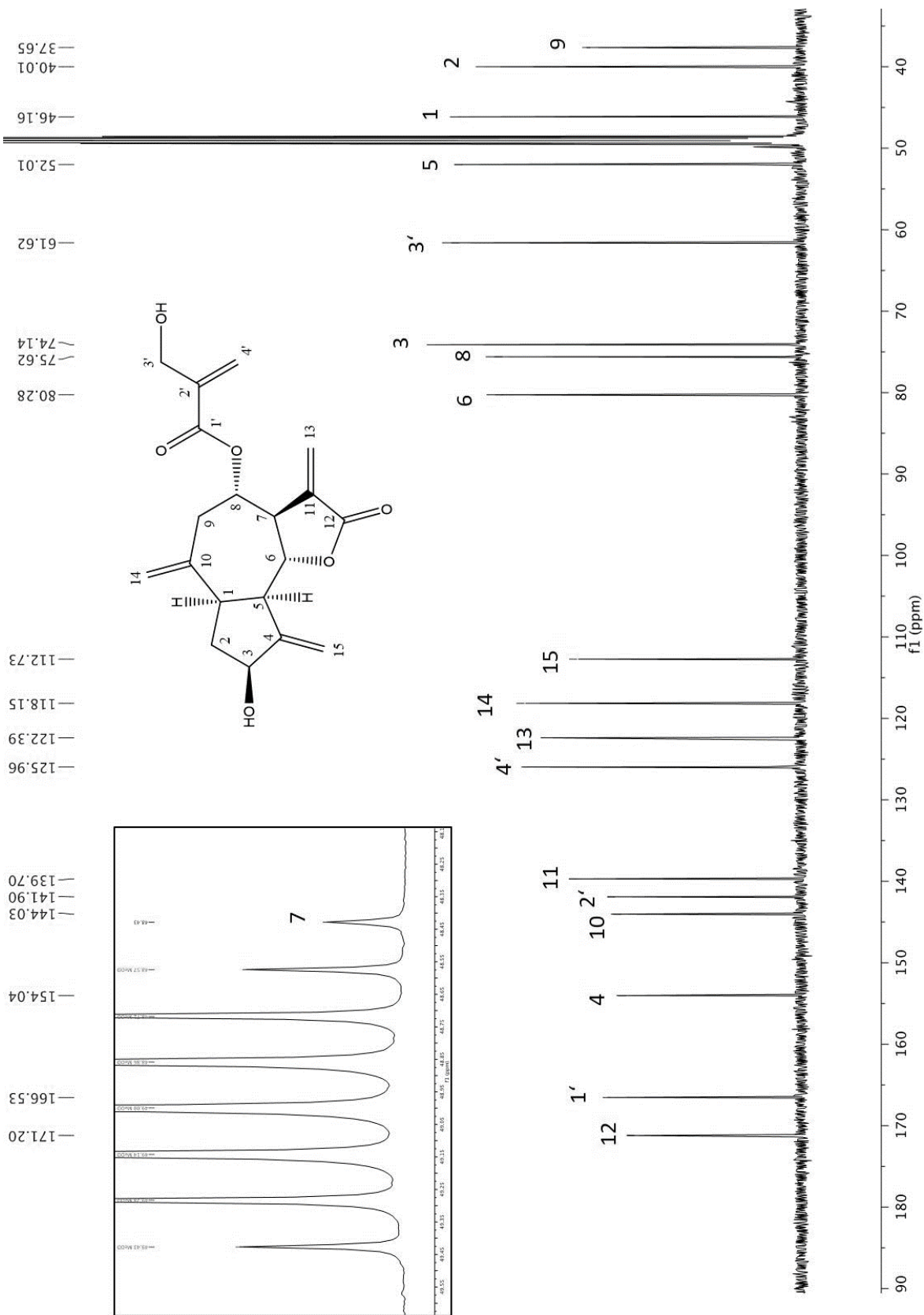


Abbildung 2.4: ^{13}C NMR-Spektrum von Verbindung 1 (150 MHz in CD_3OD)

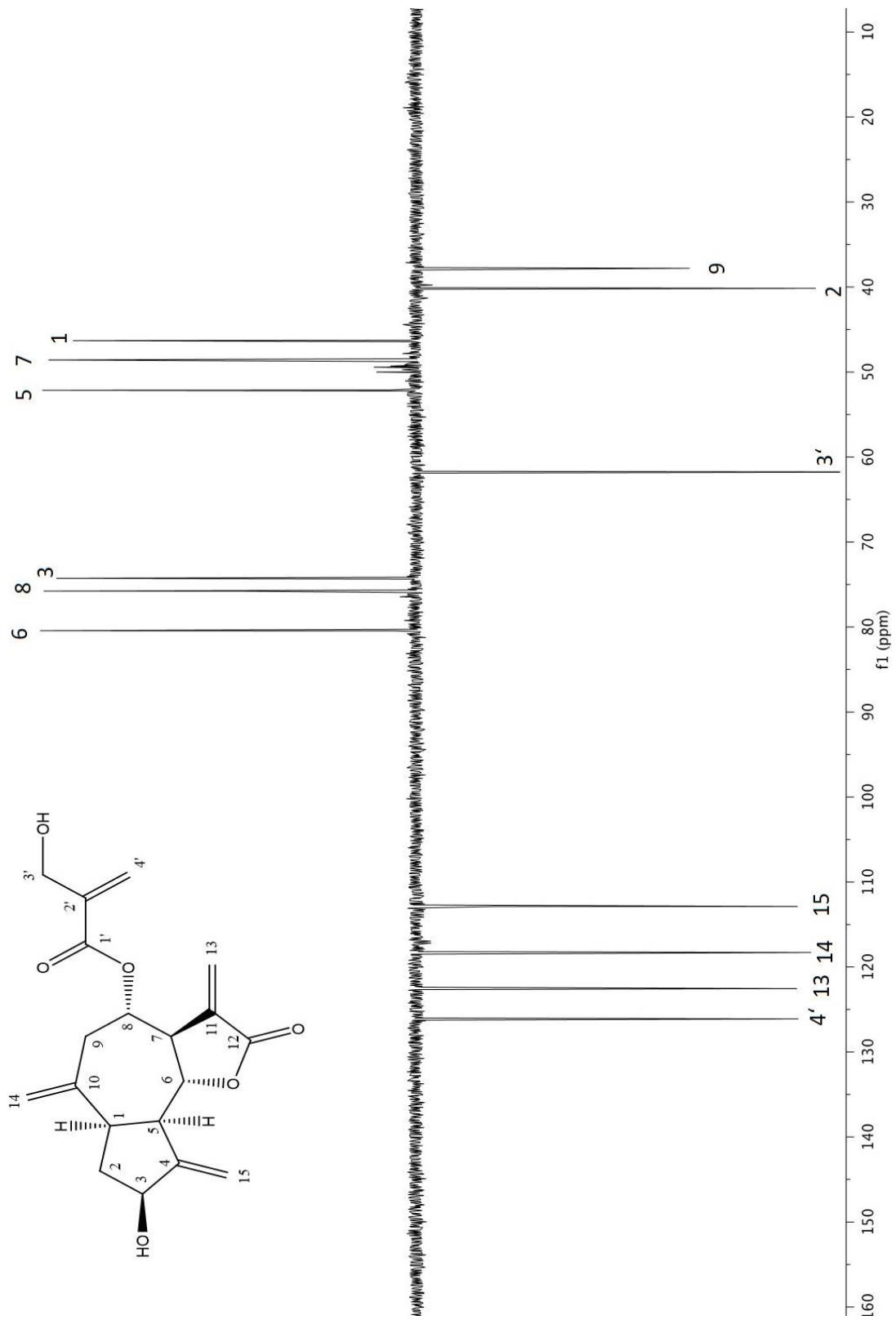


Abbildung 2.5 : DEPT-135 Spektrum von Verbindung 1 (150 MHz in CD₃OD)

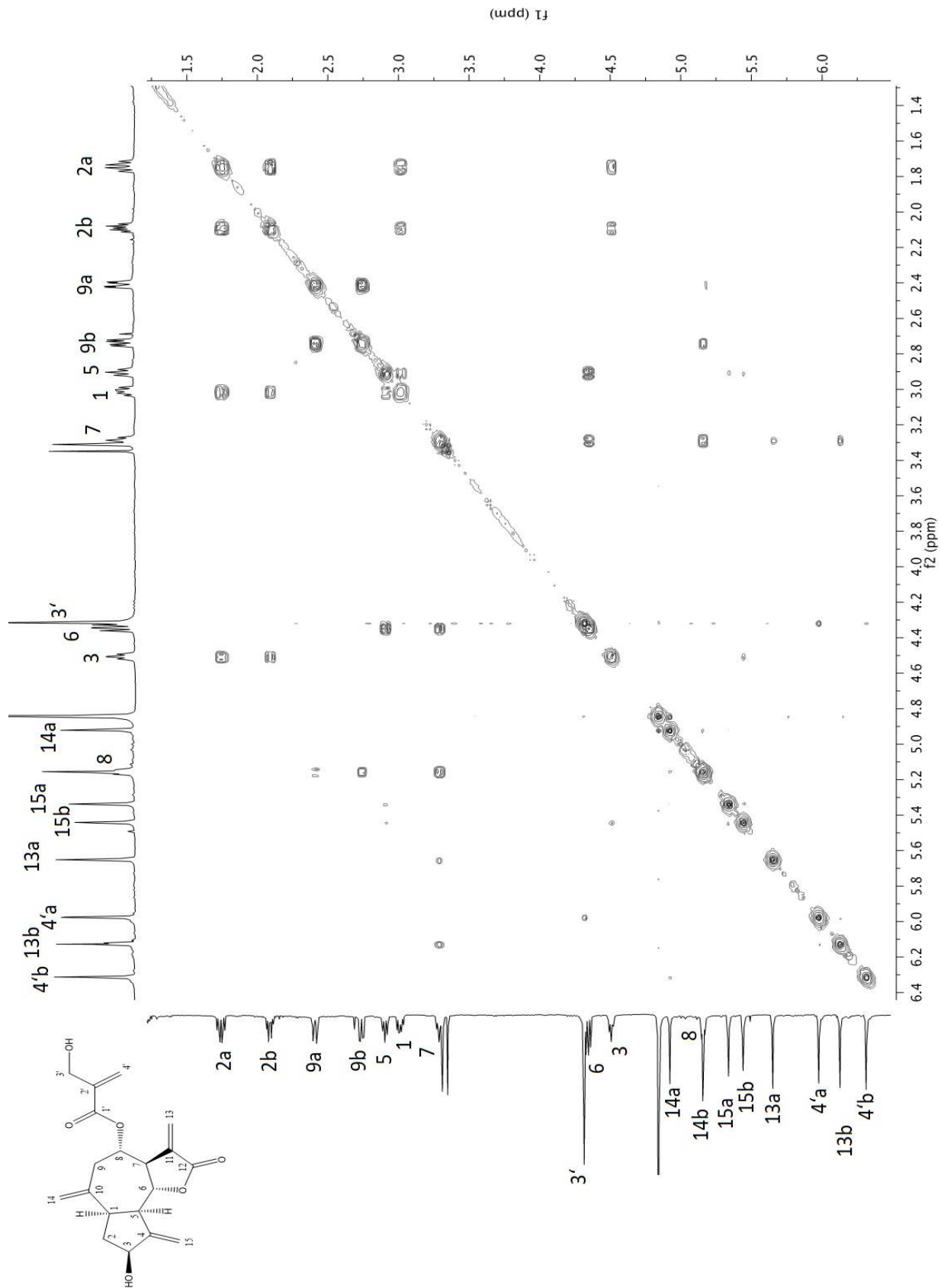


Abbildung 2.6: 2D-NMR-H,H-COSY-Spektrum der Verbindung 1 (CD₃OD)

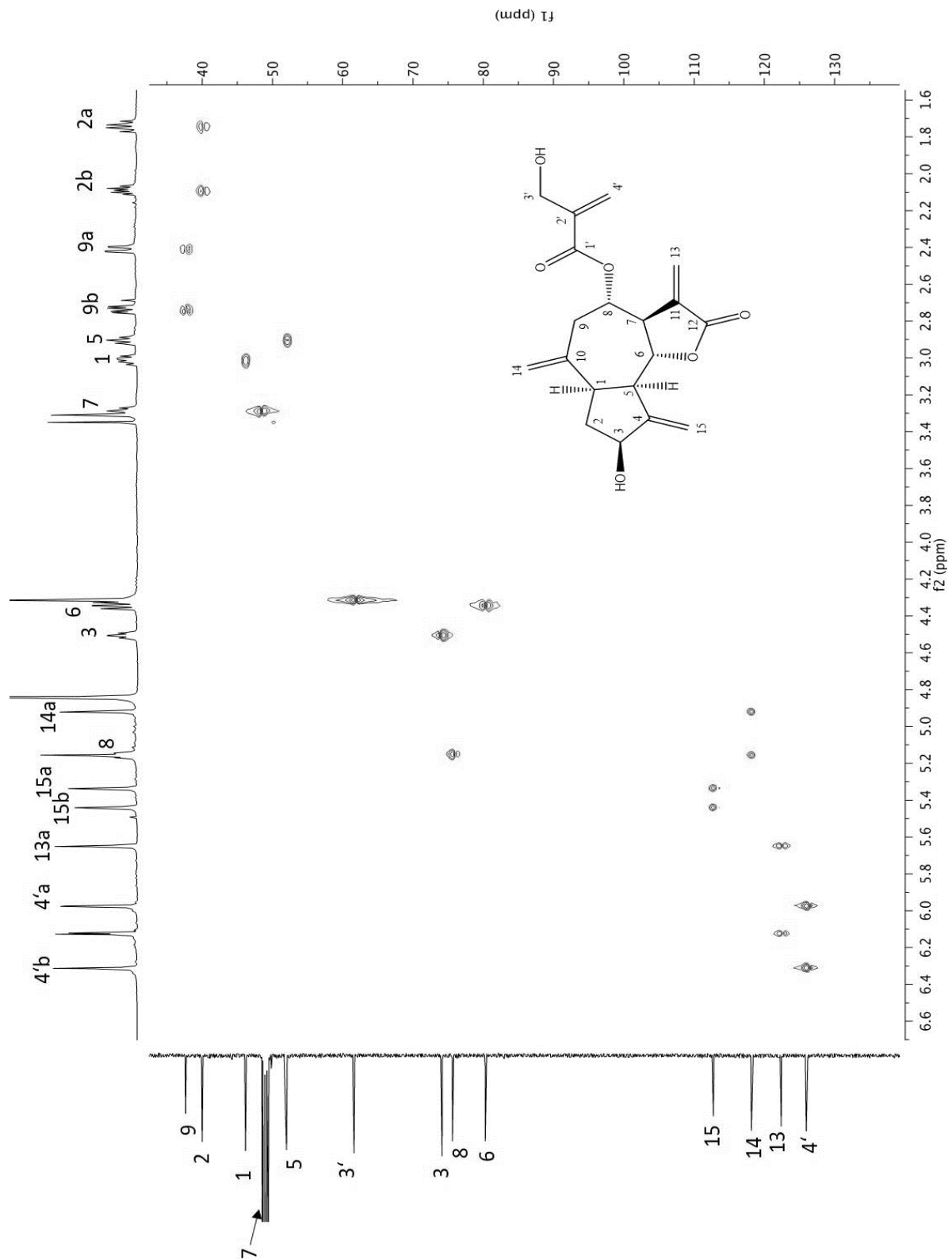


Abbildung 2.7: Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektrum (HSQC) von Verbindung 1 (CD₃OD)

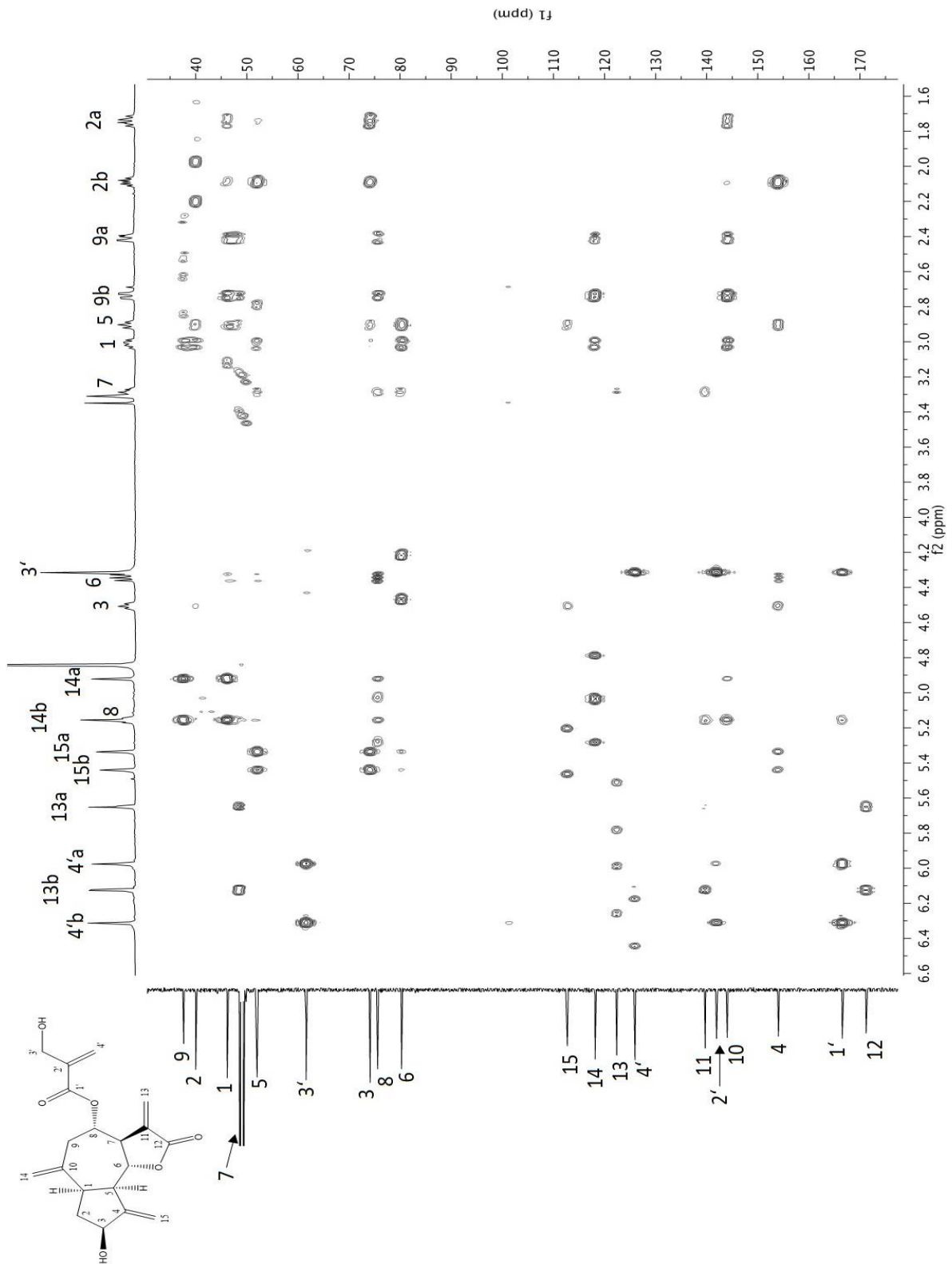


Abbildung 2.8: 2-D-Heteronukleares Multiple Bond Korrelationspektrum (HMBC) von Verbindung 1 (CD₃OD)

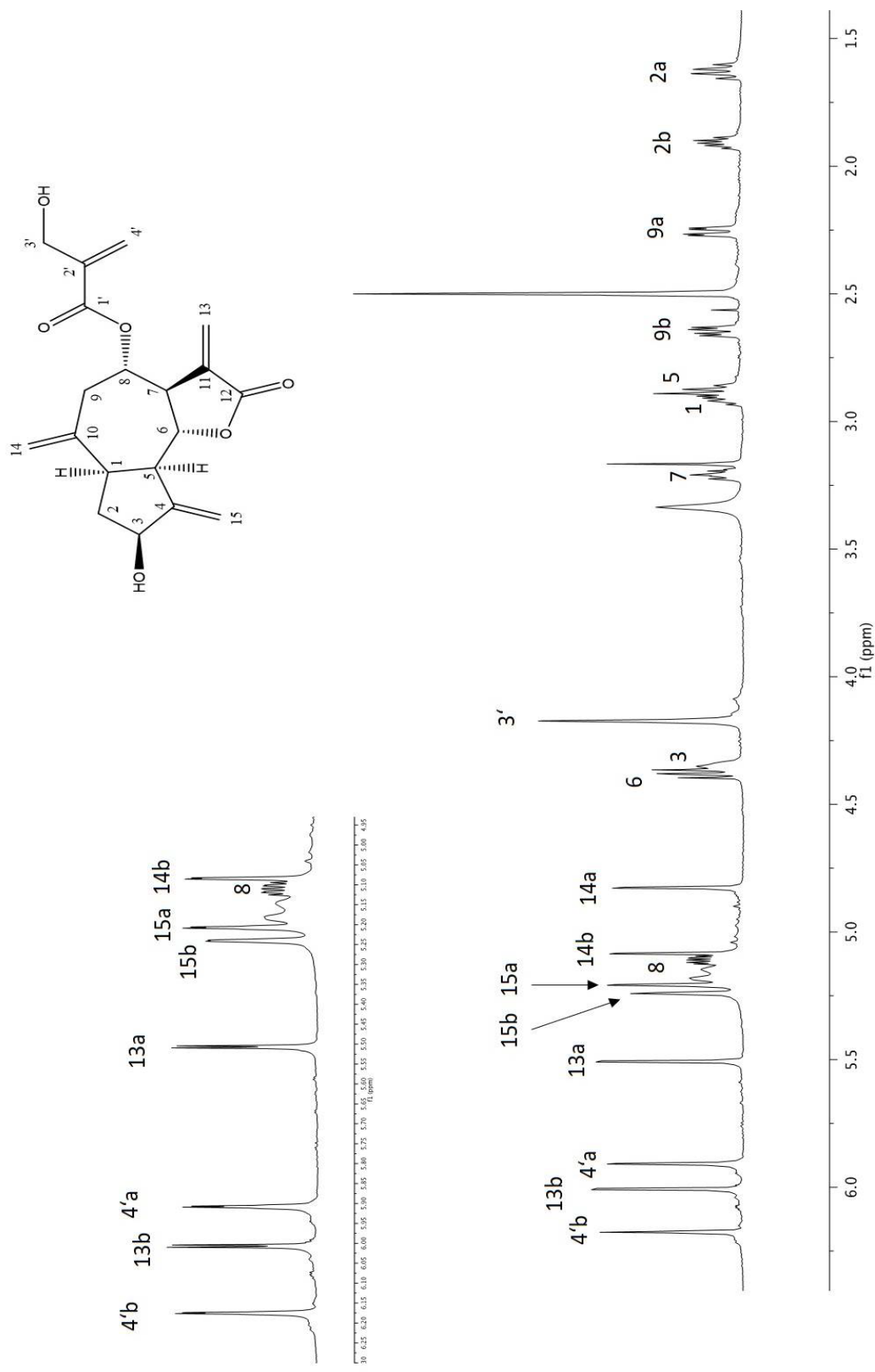


Abbildung 2.9: ^1H NMR Spektrum von Verbindung 1 (600 MHz in DMSO-d_6)

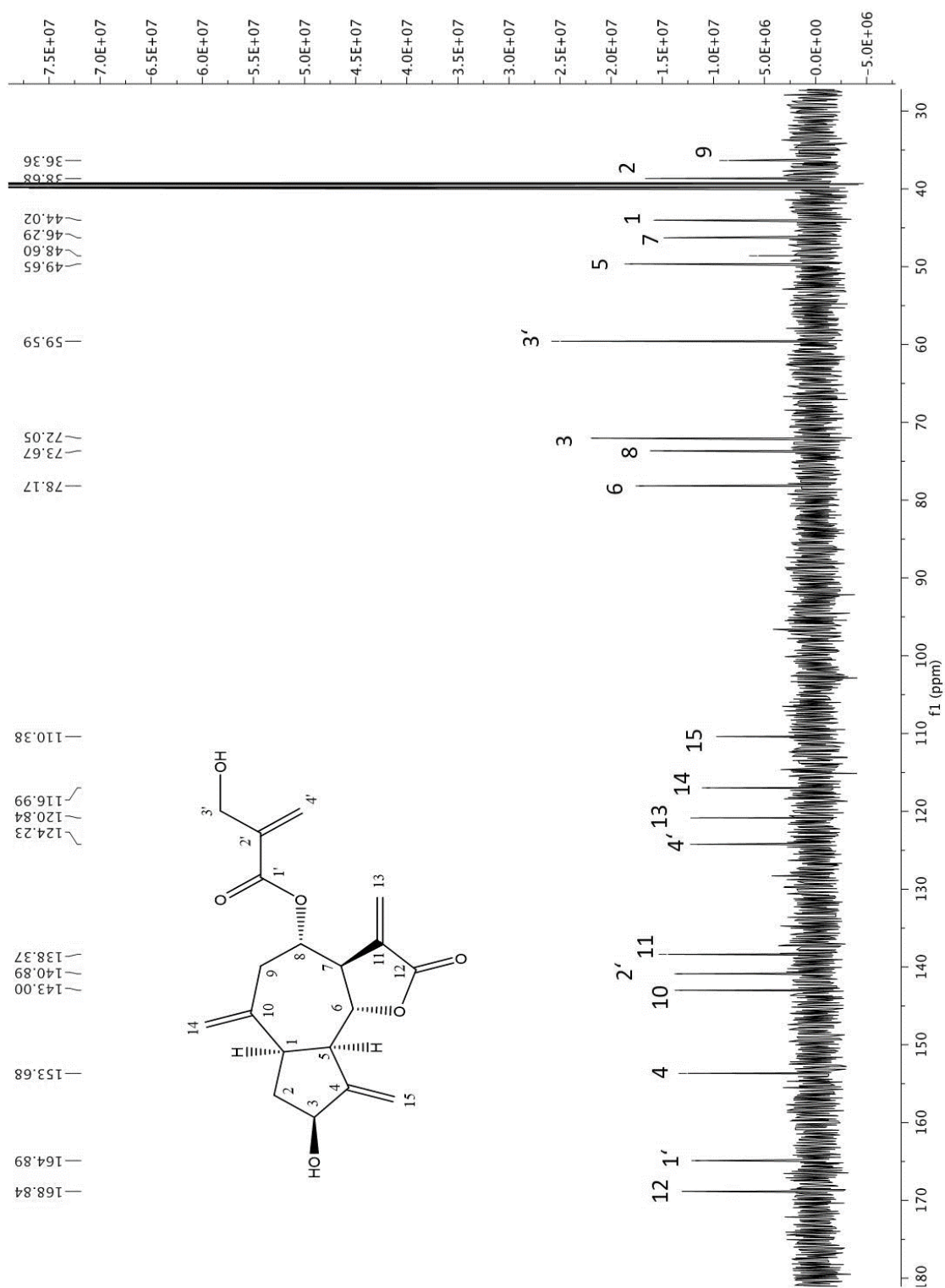


Abbildung 2.10: ^{13}C NMR-Spektrum von Verbindung **1** (150 MHz in DMSO-d_6)

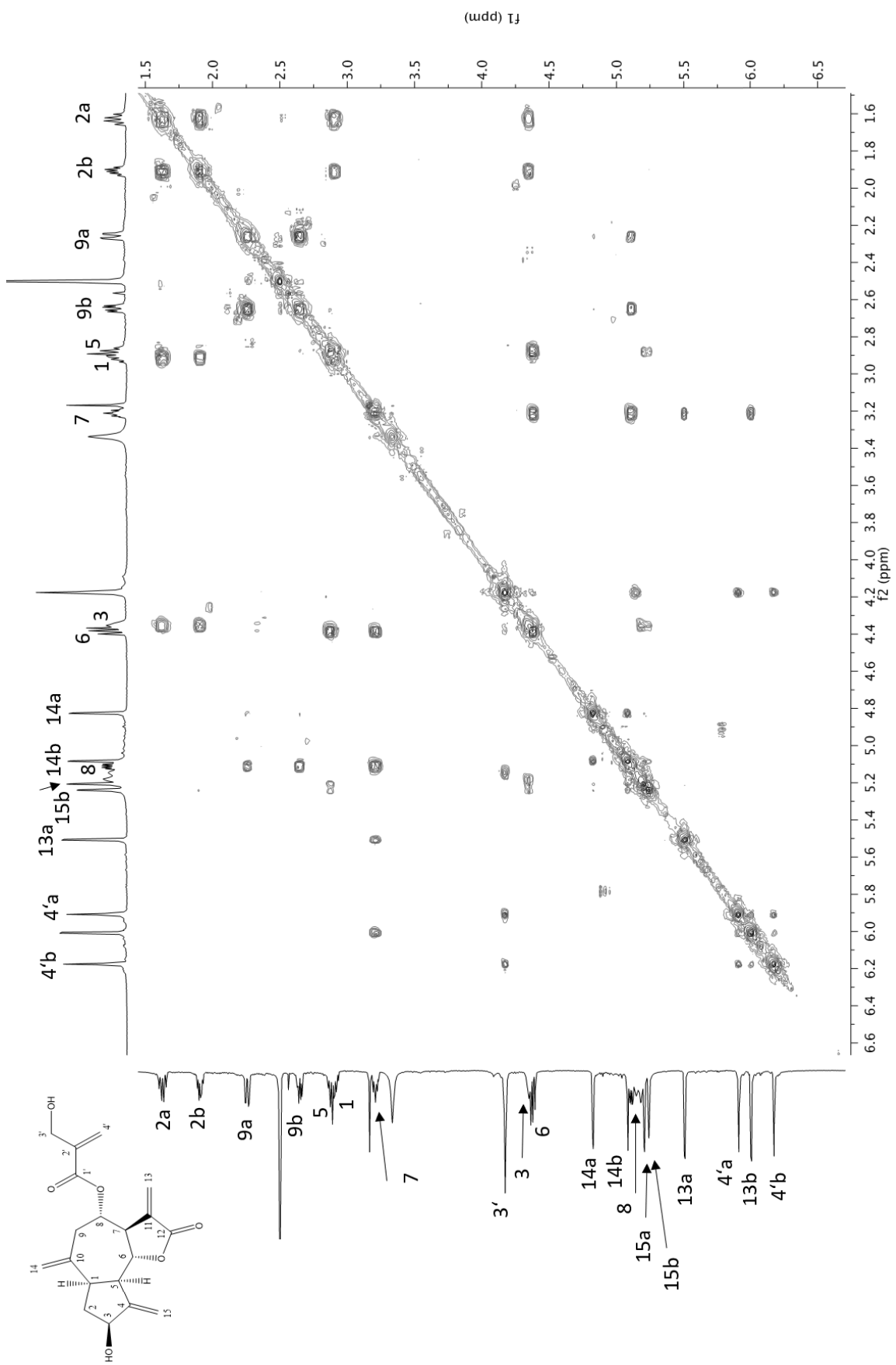


Abbildung 2.11: 2D-NMR-H,H-COSY-Spektrum der Verbindung 1 (DMSO-d₆)

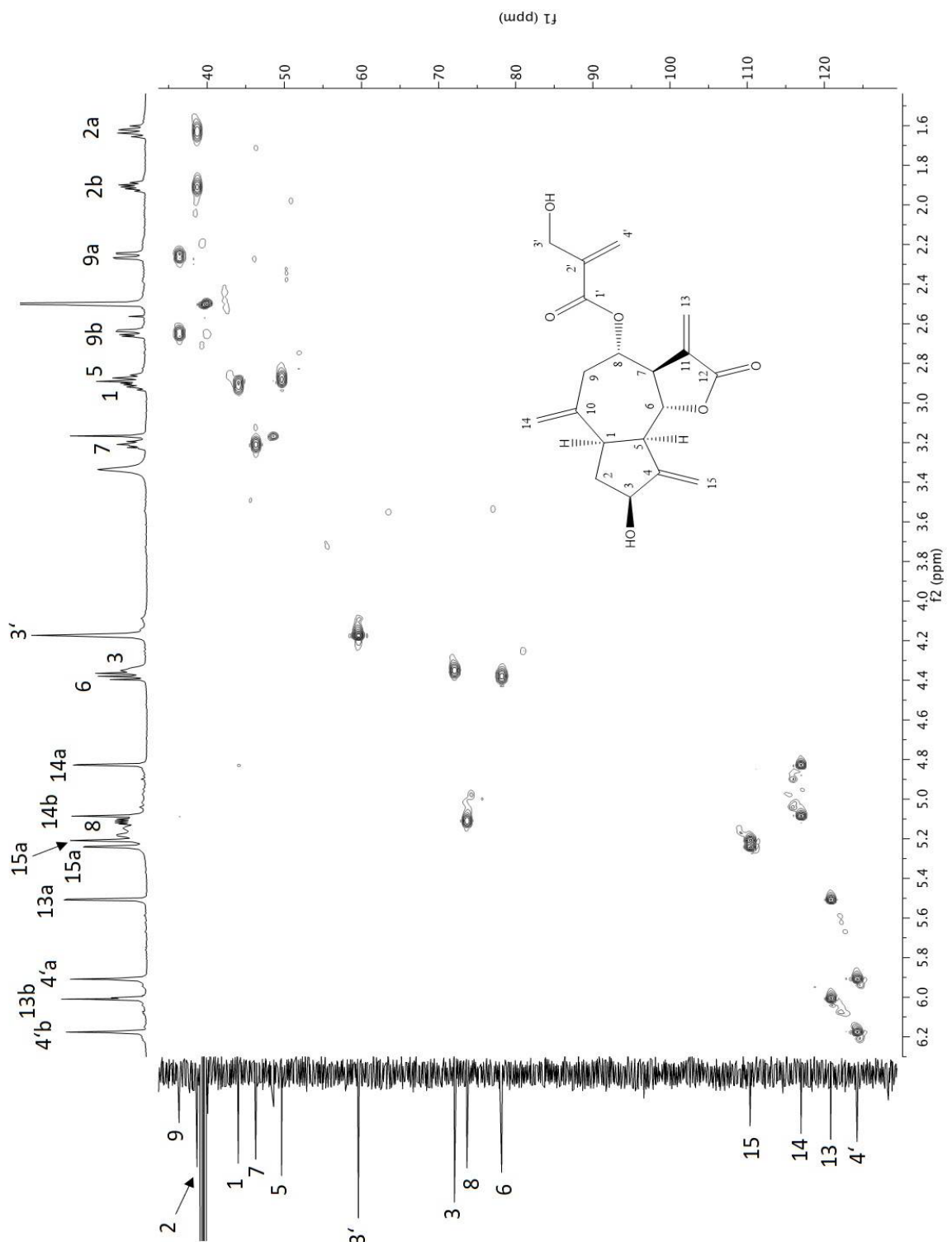


Abbildung 2.12: Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektrum (HSQC) von Verbindung 1 (DMSO-d₆)

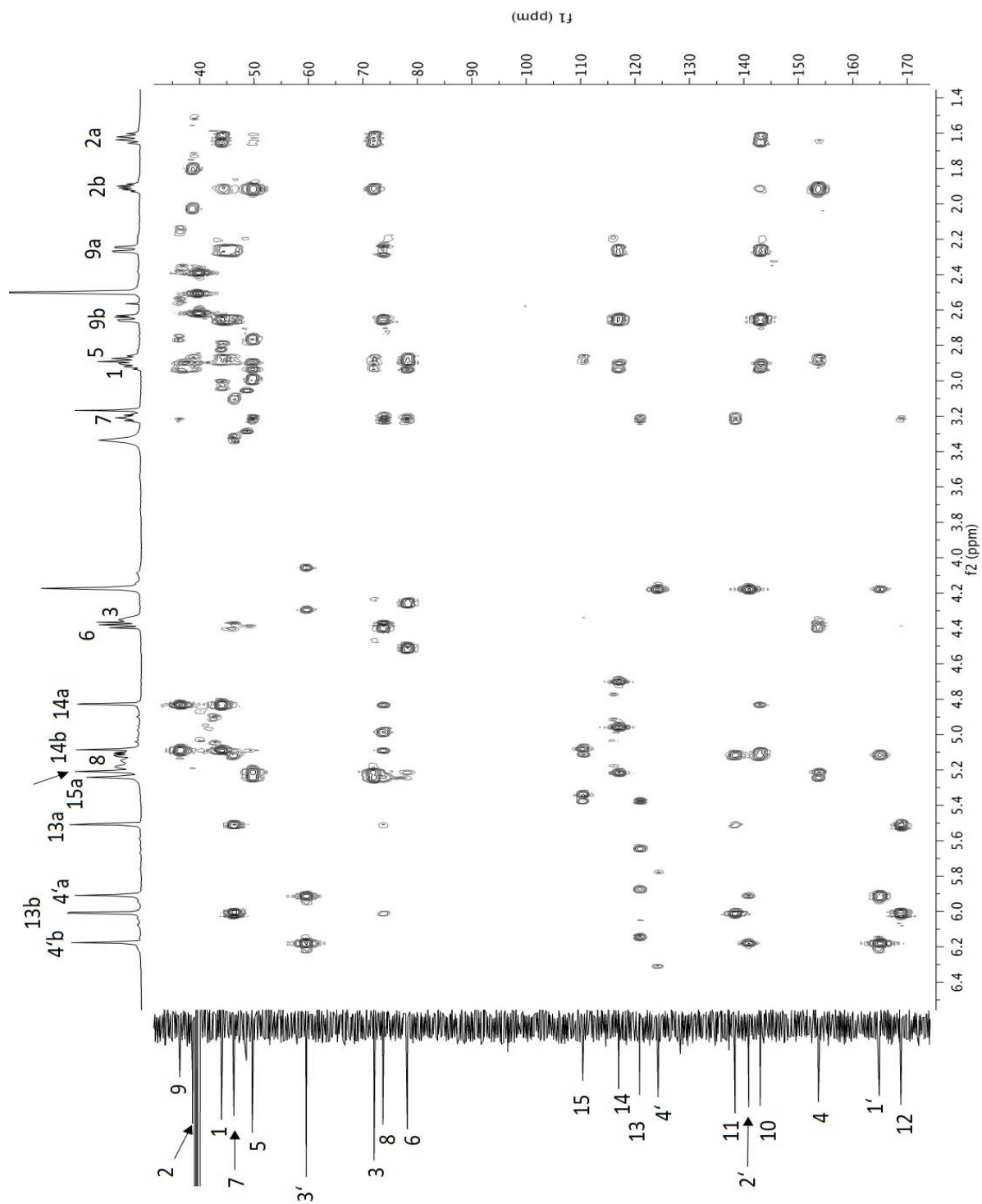
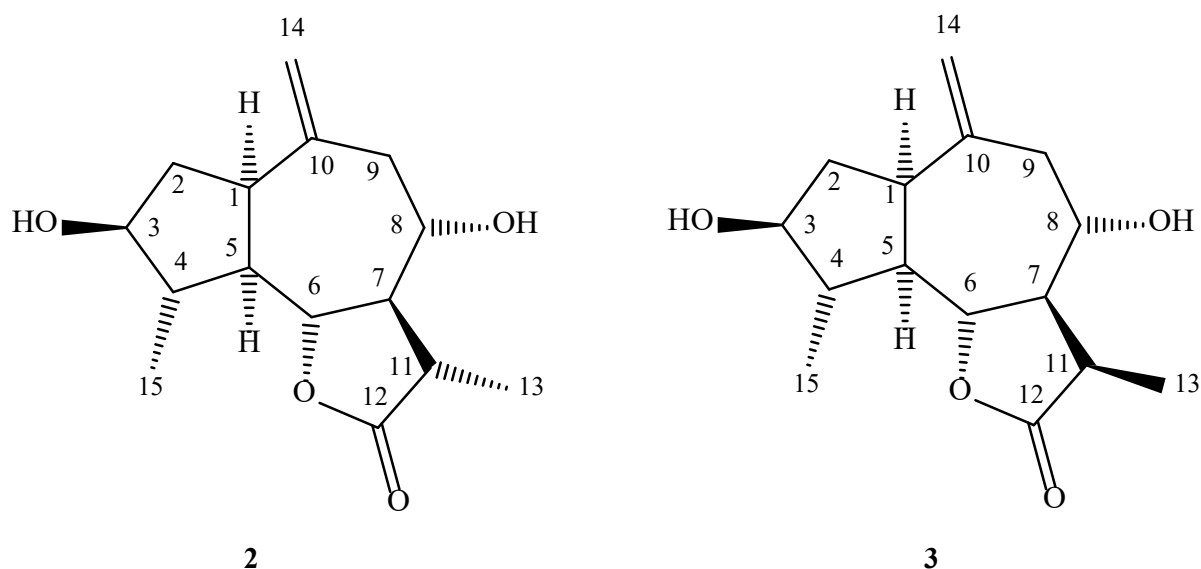


Abbildung 2.13: 2-D-Heteronukleares Multiple Bond Korrelationsspektrum (HMBC) von Verbindung **1** (DMSO- d_6)

2.2.2 Verbindung 2 (Isolipidiol) und 3 (Lipidiol)



Die Verbindungen **2** und **3** wurden im Gemisch bei der Aufreinigung von Fraktion V.b.D.8.19 des Dichlormethanextraktes erhalten (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3). 69,25 mg dieser Fraktion wurden an einer Kieselgelsäule in sechs Fraktionen (A bis F) mit einem Gemisch aus Dichlormethan/Hexan/Methanol (Fließmittelsystem SC 1, s. Exp. Teil, Kap. 5.2.3, Tab. 5.3) aufgetrennt. Im anschließend erstellten Dünnschichtchromatogramm fiel in Fraktion E eine Substanzzone auf, die eine Löschung des Fluoreszenzindikators bei $\lambda=254$ nm zeigte und sich nach dem Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz braun/violett färbte (s. Exp. Teil, Kapitel 5.2.1, Tab. 5.1).

Bei der anschließend durchgeführten HPLC (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.4, Tab. 5.4) wurden die Substanzen **2** und **3** bei einer Retentionszeit von 37,94 Minuten registriert.

Trotz weiterer Reinigungsversuche konnten nur 2,38 mg eines weiß-gelb, kristallinen Substanzgemisches gewonnen werden.

Die bei der Detektion der Peaks im HPLC mit Hilfe des Diodenarray-Detektors aufgenommenen UV-Spektren von **2** und **3** (s. Abb. 2.14, S.36) wiesen für beide Substanzen zwei Maxima bei $\lambda = 216$ und 283 nm auf, wobei die Intensität der längerwelligen Bande wesentlich geringer ausfiel. Die Lage der Maxima und das Aussehen der Spektren ließen bereits vermuten, dass es sich bei **2** und **3** ebenfalls um Sesquiterpenlactone handeln sollte (Heywood et al, 1977)

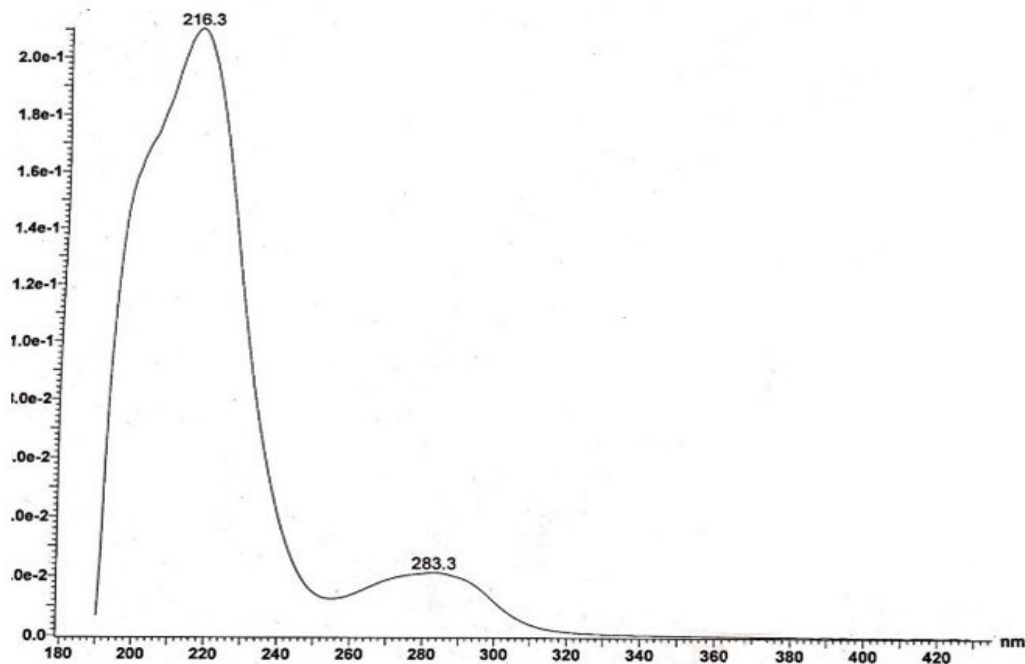


Abbildung 2.14: UV-Spektren von Verbindung **2** und **3** (in Methanol p.a.)

Das unter Elektronenimpakt-Bedingungen (EI) aufgenommene Massenspektrum des Gemisches von **2** und **3** (s. Abb. 2.16, S.38) zeigte das geringintensive Molekülion $[M]^+$ bei $m/z = 266$, begleitet von zwei Fragmenten bei $m/z 248 [M-18]^+$ und $230 [M-2 \times 18 \text{ oder } 248-18]^+$, was auf die Abspaltung von 2 Mol Wasser und damit auf das Vorhandensein zweier Hydroxylgruppen im Molekül hindeutet (Gross, 2013). Weitere intensive Fragmente treten bei $m/z = 168$ und 193 (Basispeak, 100%) auf. Im Gegensatz zu Cynaropikrin (**1**), fehlt das intensive Fragment bei $m/z 85$, welches charakteristisch für gesättigte C_5 -Säuren oder, wie im Fall von Cynaropikrin, für eine ungesättigte, hydroxylierte C_4 -Säure ist. Auch andere intensive Fragmente, die bei den häufig vorkommenden Estern von Sesquiterpenlactonen auftreten, z.B. $m/z = 71$ für einen Ester der Isobuttersäure oder $m/z = 43$, das Acylfragment von Essigestern, sind im Spektrum nur in geringer Intensität enthalten. Falls es sich bei diesen Fragmenten um Acylfragmente der genannten Säuren handeln würde, müssten jedoch auch Fragmente detektiert werden, die aus der Abspaltung der Säuren resultieren (M-Acyl), was aber hier nicht der Fall ist. Die Molmasse von 262, die im Bereich der Masse anderer Sesquiterpenlactonalkohole, wie z.B. der des Helenalins liegt, spricht ebenfalls für das

Vorliegen einer unveresterten Verbindung (Willhuhn et al, 1984). Für Sesquiterpenlactone ist es außerdem typisch, dass zusätzlich zur Abspaltung der im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen, auch der Lactonring geöffnet wird und die resultierende OH-Gruppe wiederum verloren geht, wobei gleichzeitig auch die entstandene Carbonsäure decarboxyliert und als CO₂ abgespalten wird (Heywood et al, 1977). Dieses Verhalten erklärt das Fragment bei m/z = 168, das demzufolge aus der Abspaltung von je einem Mol Wasser (18) und Kohlendioxid (44) aus dem Folgefragment bei m/z 230 gebildet werden könnte. (Heywood et al, 1977). Manche Sesquiterpenlactone, die so genannten Proazulene, führen bereits unter den Bedingungen einer Wasserdampfdestillation zur Abspaltung von Estern, Wasser und CO₂. Es bilden sich blaugefärbte, aromatische Verbindungen, die man Azulene nennt. Ein Beispiel dafür zeigt die Abbildung 2.15 (siehe S. 37), in der exemplarisch die Bildung des blau gefärbten Chamazulens aus dem Hauptsesquiterpenlacton der Schafgarbe (*Achillea millefolium*, Asteraceae), dem Proazulen Achillicin, dargestellt ist. Das Molekulargewicht des Chamazulens unterscheidet sich nur um 2 Atomeinheiten von dem Fragment bei m/z 168 (Motl et al, 1983).

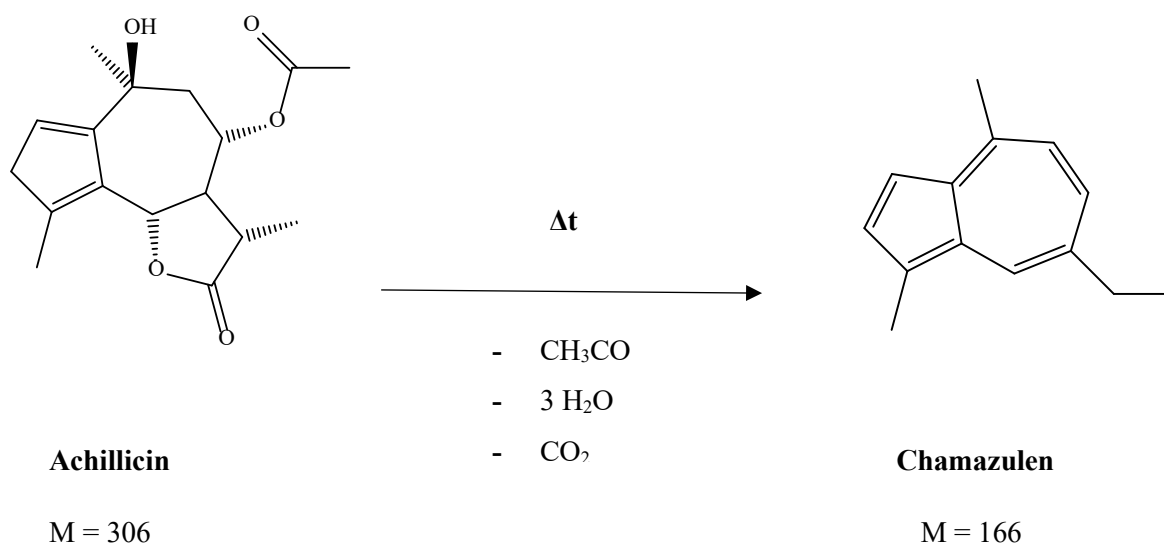


Abbildung 2.15: Azulenbildung aus Sesquiterpenlactonen

Betrachtet man den Lactonring des Achillicins (Abb. 2.15), bei dieser Verbindung handelt es sich um ein 11 β ,13-Dihydrosesquiterpenlacton von Guaianolidtyp, das im Gegensatz zum Cynaropikrin (**1**) keine exocyclische Methylengruppe am γ -Lactonring besitzt, so ließe sich das Fragment bei m/z = 193 formal als durch die Öffnung des Lactonrings und der Abspaltung der entstandenen Propionsäure-Seitenkette [M – HOOC-CH-CH₃; (M - 73)]⁺ erklären.

Durch die zwei nicht überlappenden Peaks im HPLC-Chromatogramm war bekannt, dass es sich um ein Gemisch zweier Verbindungen im Verhältnis von 3:2 handeln sollte, die sowohl chromatographisch als auch im UV-Verhalten relativ ähnlich sein mussten. Da das Massenspektrum nicht erkennen lässt, dass es sich um ein Gemisch zweier unterschiedlich schwerer Verbindungen handelt, musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei **2** und **3** um massengleiche, isomere Verbindungen handeln sollte. Die detektierte Molmasse und die Fragmentierung unterstützen die Annahme, dass es sich bei dem hier isolierten Gemisch um zwei Sesquiterpenlactone handeln könnte.

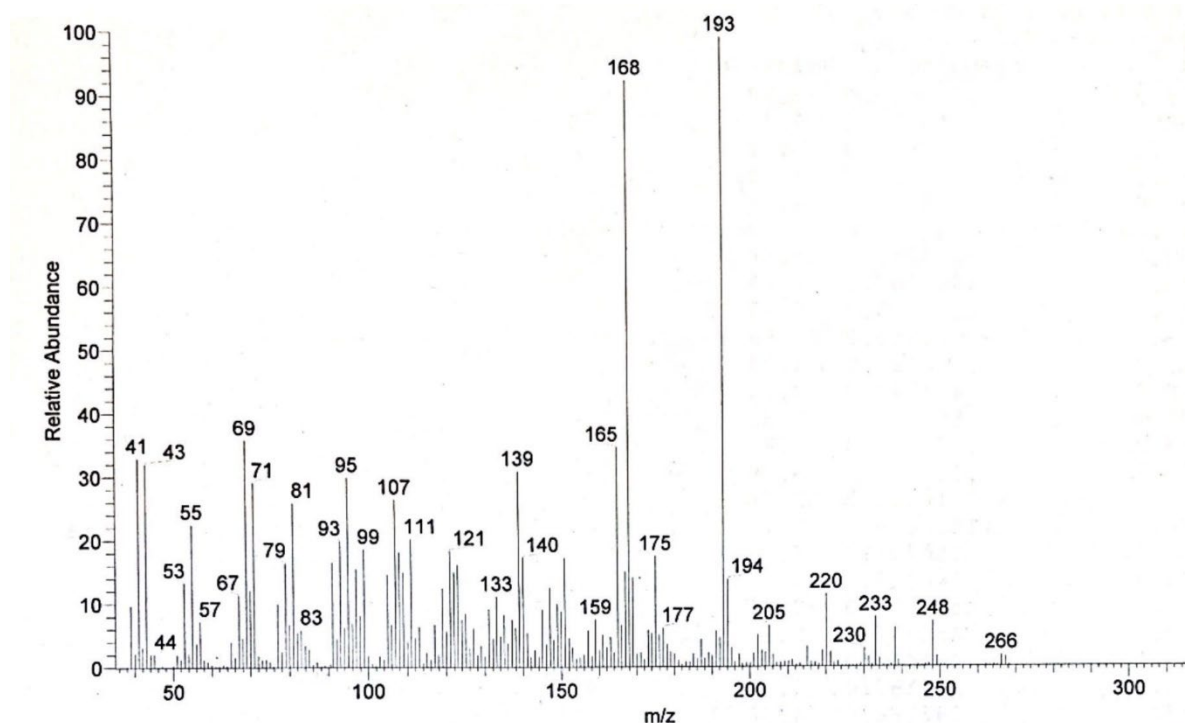


Abbildung 2.16: Massenspektrum von Verbindung **2** und **3**

Durch das zusätzlich aufgenommene Elektrospray-MS mit chemischer Ionisation (HRESI-MS) konnte die Masse auf vier Stellen hinter dem Komma genau bestimmt werden (s. Abb. 2.17, S.39). Die genaue Masse von **2** und **3** wurde im Spektrum bei $m/z = 267,1595$ ($[M+H]^+$) registriert, woraus sich die Summenformel $C_{15}H_{22}O_4$ ableiten lässt.

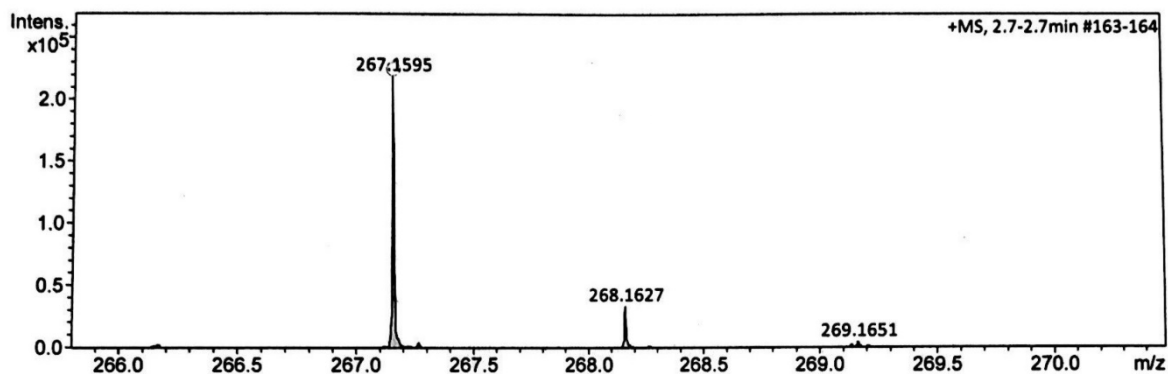
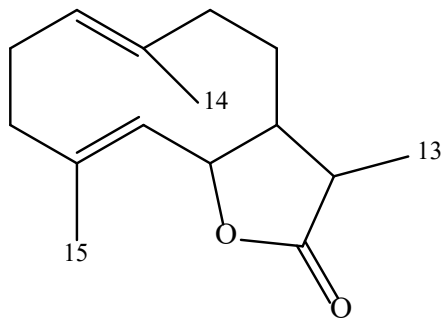
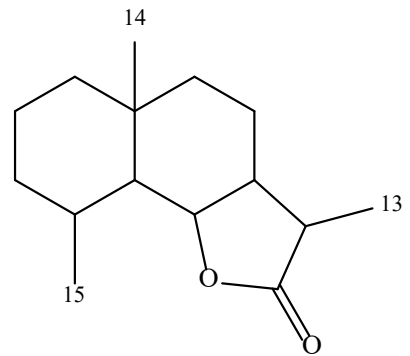


Abbildung. 2.17: HRESI-Massenspektrum von Verbindung **2** und **3**

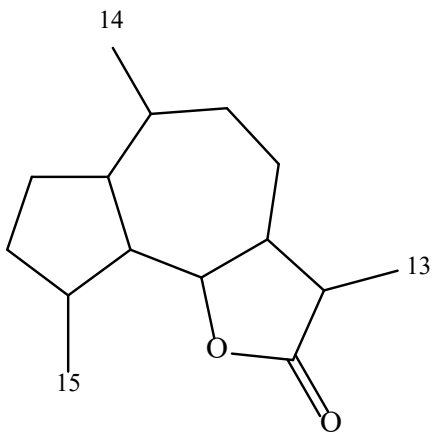
Zur vollständigen Aufklärung der Strukturen von **2** und **3** wurden ein- und zweidimensionale NMR Spektren in CDCl_3 aufgenommen (s. Abb. 2.20 - 2.34, S. 52-66). Das breitbandenkoppelte ^{13}C NMR Spektrum des Substanzgemisches von **2** und **3** zeigt erwartungsgemäß die Signale für jeweils 15 Kohlenstoffe, die aufgrund der unterschiedlichen Anteile am Substanzgemisch gut zu unterscheiden sind. Da es sich um isomere Verbindungen handelt, ist die Nummerierung der C-Atome identisch. Zur besseren Abgrenzung wurden die Kohlenstoffe der Nebenkompone **3** in Abbildung 2.21 mit einem „*“ gekennzeichnet. In den Abbildungen 2.21 und 2.22 ist die Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Verbindungen zur übersichtlicheren Betrachtung nochmal separat dargestellt. Im ^1H NMR Spektrum (s. Abb.2.20) **2** und **3** fällt sofort auf, dass das Spektrum, im Gegensatz zum Protonenspektrum von **1**, im Shiftbereich zwischen 1.0 und 1.5 ppm mehrere intensive Signale zeigt. Nach Integration und Spreizung konnten die Signale bei $\delta = 1.39$ und 1.27 ppm jeweils als Dublett für drei Protonen der Haupt- und Nebenkompone erkannt werden (s. Abb, 2.23 und Tab. 2.2, S.41). Das dritte Signal bei einen Shiftwert von ca. 1.2 ppm, wurde rechnerisch durch insgesamt etwa 4,5 Protonen verursacht, die jeweils drei Protonen einer zum Dublett aufspaltenden Methylgruppe der beiden im Verhältnis 2:1 vorliegenden Substanzen verursacht wurde. Mit Hilfe des HSQC Spektrums wurden die zugehörigen Kohlenstoffe bei $\delta = 18.3$ und 16.1 ppm bzw. 18.6 und 11.01 ppm im Bereich aliphatisch gebundener Methylgruppen registriert. Ebenso wie bei den Protonensignalen treten die korrespondierenden Kohlenstoffsignale entweder dicht nebeneinander- oder weiter auseinanderliegend auf.



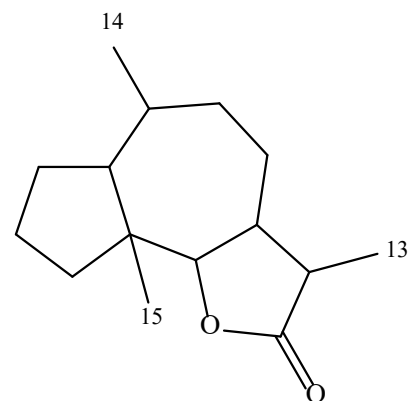
I



II



III



IV

Abbildung 2.18: Grundgerüst der Germacranolide (I), Eudesmanolide (II), Guaianolide (III) und Pseudoguaianolide (IV)

Tabelle 2.2: NMR Daten von **2** und **3** (600 bzw. 150 MHz in CDCl₃; δ in ppm (J in Hz))

	2		3	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	2.80 m	42.2	2.80 m	42.1
2a	1.70 m	38.4	1.70 m	38.2
2b	2.10 m		2.10 m	
3	3.70 m	78.3	3.70 m	78.2
4	1.82 m	47.2	1.85 m	47.4
5	1.92 m	51.2	1.85 m	50.8
6	3.93 t (10.1)	81.4	4.04 t (10.5)	81.5
7	1.87 m	58.3	2.24 dt (7.9 u. 10.3)	55.1
8	3.65 m	75.9	3.67 m	70.7
9a	2.08 m	47.3	2.06 m	46.6
9b	2.72 dd (4.4 u. 12.0)		2.74 dd (4.1 u. 11.0)	
10	-	143.4	-	143.1
11	2.52 dq (11.1 u. 7.0)	42.4	2.84 t (7.73)	38.6
12	-	179.0	-	179.6
13	1.39 d (7.0)	16.1	1.27 (7.6)	11.0
14a	4.99 s	115.2	4.97 s	114.9
14b	5.01 s		4.99 s	
15	1.18 d (6.6)	18.3	1.19 d (6.6)	18.6

Im ebenfalls aufgenommenen HMBC-Spektrum (s. Abb. 2.29, S. 61) finden sich neben den direkten H,C-Korrelationen über eine Bindung (¹J) auch Kopplungen über zwei und drei Bindungen (²J,³J). Das zur Hauptkomponente **2** gehörende Dublett für eine Methylgruppe bei δ = 1.39 ppm zeigt dabei ein Kreuzsignal mit dem für Sesquiterpenlactone typischen Carbonyl

eines cyclischen Esters (C-12) bei $\delta = 179.0$ ppm, weshalb sich diese Methylgruppe am γ -Lactonring befinden muss. Es handelt sich daher um die C-13 Methylgruppe, die durch Hydrierung der Doppelbindung zwischen C-12 und C-13 eines α,β -ungesättigten Lactons mit exocyclischer Doppelbindung entsteht. Auch für das Signal der Nebenkomponente bei $\delta = 1.27$ ppm findet sich eine entsprechende Korrelation mit dem Kohlenstoffsignal bei $\delta = 179.6$ ppm, so dass es sich auch bei **3** um ein Sesquiterpenlacton mit einer am C-12 des Lactonrings gebundenen Methylgruppe handeln muss. Weitere Korrelationen der beiden Protonensignale für H-13 von **2** und **3** führen zur Zuordnung der Signale für die Kohlenstoffe bei $\delta = 38.6$ (**3**) und 42.4 ppm (**2**) sowie 55.1 (**3**) und 58.3 ppm (**2**), bei denen es sich um die Signale der beiden Methinkohlenstoffe C-11 und C-7 der jeweiligen Verbindungen **2** bzw. **3** handeln muss. Über die Korrelation mit den zugehörigen Protonen, konnten die im höheren Feld auftretenden Signale C-11 zugeordnet werden, weil die beiden zugehörigen Protonensignale, das Dublett von Quartett bei $\delta = 2.52$ ppm (**2**) bzw. das Triplett bei $\delta = 2.84$ ppm (**3**), als Kopplungspartner der jeweiligen Methyldoublets (H-13) über das H,H-COSY Spektrum eindeutig zugeordnet werden konnten. Die Protonensignale für H-11 weisen dabei einen weiteren Kopplungspartner bei $\delta = 1.87$ ppm für Verbindung **2** und $\delta = 2.24$ ppm für Verbindung **3** auf. Bei diesen Signalen handelt es sich um die Protonen am C-7, deren Kohlenstoffsignale bei $\delta = 55.1$ und 58.3 ppm bereits als Kopplungspartner der Protonen an C-13 im HMBC gefunden wurden. Die Kopplungskonstante (J) der Kopplung zwischen H-13 und H-11 beträgt für beide Verbindungen 7.0 Hz, die Kopplungskonstanten zwischen H-11 und H-7 unterscheiden sich jedoch. Bei Verbindung **2** findet man bei Auswertung der ^1H NMR Signale eine $J_{7/11}$ -Kopplung von 11.1 Hz, während bei **3** eine Kopplung von 7.73 Hz ermittelt werden konnte (s. Abb. 2.20, S. 52 und Tab. 2.2, S. 41). Daraus ist zu folgern, dass die Protonen H-7 und H-11 zueinander trans- (**2**) und cis-ständig (**3**) angeordnet sein müssen. Die beiden isomeren Sesquiterpenlactone unterscheiden sich demnach durch die Stellung der Methylgruppe am γ -Lactonring, die unter bzw. über der Ringebene angeordnet sein muss. Die Signale der Protonen an C-7 von **2** und **3** weisen jeweils zwei weitere Kopplungspartner H-6 und H-8 auf, deren Signale im Resonanzbereich für Protonen an oxygenierten Sauerstoffen auftreten. Zwei dieser Signale bei $\delta = 3.93$ (**2**) und 4.04 ppm (**3**) besitzen neben H-7 nur noch einen weiteren Kopplungspartner (H-5) und spalten als Dublett von Dubletts mit Triplettcharakter auf. Dabei handelt es sich demnach um die Protonen H-6 von **2** und **3**. Es findet sich in beiden Fällen nur eine Kopplungskonstante von 10.1 bzw. 10.5 Hz (s. Tab. 2.2). Das bedeutet, dass die Protonen H-5, H-6 und H-7 bei beiden Verbindungen jeweils trans-ständig zueinander angeordnet sein

müssen. Ausgehend von der Tatsache, dass bei allen bisher in der Natur gefundenen Guaianoliden das Proton an C-7 α -ständig ist (Hou et al, 2003), folgt daraus, dass H-6 β -ständig und H-5 nachfolgend α -ständig sein muss. Daraus folgt, dass es sich bei beiden Verbindungen um ein 6,7-trans-Lacton handelt, das durch Veresterung der Carbonsäure (C-12) mit der β -ständigen Hydroxylgruppe an C-6 gebildet wurde. Aufgrund der Aufspaltung des Signals von H-7 bei **3** als Dublett von Triplets mit den Kopplungskonstanten 7.79 und 10.3 Hz (s. Tab. 2.2), kann abgeleitet werden, dass H-7 sowohl zu H-6 als auch H-8 trans-ständig ist. Daraus folgt, dass der Kohlenstoff C-8 ein β -ständiges Proton und eine α -ständige Hydroxylgruppe trägt. Bei Verbindung **2** kann dies wegen der Überlagerung von H-7 mit den Signalen von H-5 beider Verbindungen, nicht aus dem Spektrum abgeleitet werden. Da sich die Signale der Protonen an C-8 ebenfalls überlagern, muss davon ausgegangen werden, dass die Konfiguration an C-8 bei beiden Substanzen gleich ist. Aufgrund der α -Position des Protons an C-7, muss das Proton an C-11 in Verbindung **2** aufgrund der Kopplung von 11.1 Hz zwischen H-7 und H-11 β -ständig sein, die Methylgruppe befindet sich demnach in der α -Position unter der Ringebene. Bei Verbindung **3** ist die Methylgruppe an C-11 entsprechend β -positioniert.

Bei Sesquiterpenlactonen, die aus drei Molekülen aktivem Isopren bestehen, können bei den häufig in Asteraceen vorkommenden Germacranoliden, Eudesmanoliden, Guaianoliden und Pseudoguaianoliden drei Methylgruppen am Ringsystem auftreten (s. Abb. 2.19, S.49). Diese mit 13, 14 und 15 gekennzeichneten Methylkohlenstoffen, können auch oxidiert vorliegen und Sauerstoffe tragen, oder, wie bei **1** als exocyclische Methylengruppe auftreten.

Die Verbindungen **2** und **3** besitzen jeweils zwei Methylgruppen, woraus folgt, dass das dritte potenzielle Kohlenstoff oxidiert vorliegen muss. Wie bei **1** finden sich dementsprechend zwei Singulets bei $\delta = 4.99$ und 5.01 ppm für die Hauptkomponente **2** und 4.97 und 4.99 ppm für die Nebenkompente **3**. Die zugehörigen sp^2 -hybridisierten Methylenkohlenstoffe finden sich bei $\delta = 115.2$ (**2**) und 114.9 ppm (**3**) über die direkte Protonen-Kohlenstoff-Korrelation im HSQC-Spektrum (s. Abb 2.28, S.60). Auch in diesem Bereich ähneln sich die beiden isomeren Verbindungen. Im HMBC zeigen die Methylensignale von **2** und **3** intensive Kreuzsignale mit den Signalen der quartären Kohlenstoffe bei $\delta = 143.4$ und 143.1 ppm (s. Abb. 2.29. S. 61 und Tab. 2.2), sowie den Signalen bei $\delta = 42.2$ und 42.1 ppm und 47.3 und 46.6 ppm. Bei den bei ca. 42 ppm zur Resonanz kommenden Kohlenstoffen handelt es sich um Methinkohlenstoffe, deren zugehörige Protonen sich als Multipllett für je 1 Proton gemeinsam bei 2.80 ppm bzw. die Kohlenstoffe bei $\delta = 47.3$ und 46.6 ppm koppeln im HSQC Spektrum mit jeweils zwei

Protonen, woraus folgt, dass es sich um Methylenkohlenstoffe handelt. Bei Verbindung **2** treten diese beiden Signale bei $\delta = 2.08$ (Multipllett) und 2.72 ppm (Dublett vom Dublett) auf (s. Abb. 2.28 und Tab 2.2). Im COSY-Spektrum zeigt sich, dass diese beiden Protonen mit den bereits oben erwähnten Protonen an C-8 koppeln, so dass es sich um die Protonen an C-9 handeln muss. Damit ist bewiesen, dass die im Molekül vorhandene exocyclische Methylengruppe (C-14) an C-10 gebunden ist. Die zuvor beschriebenen Korrelationen der Methylenprotonen bestehen daher zu den Kohlenstoffen C-9 ($47,3$ und $46,6$ ppm) und C-1 ($\delta = 42.2$ und 42.1 ppm). Darüber hinaus findet sich eine schwächere Korrelation zwischen H-14 mit den Kohlenstoffsignalen bei $\delta = 75.9$ und 70.7 ppm (s. Abb. 2.29, S. 61 und Tab. 2.2). Es handelt sich dabei um eine 4J -Kopplung zu den Kohlenstoffen in Position 8.

Da es sich bei den beiden Verbindungen um Guaianolide handelt, findet sich im COSY Spektrum auch die Kopplung zwischen den Protonen H-1 und H-5 (s. Tab. 2.2, S.41), die ihrerseits jeweils eine weitere Kopplung zu den Protonen des an den Cycloheptanring annelierten Cyclopentanrings aufweisen. Während die Protonen an C-1 beider Verbindungen mit den sich überlagernden Methylenprotonen an C-2 bei $\delta = 1.70$ und 2.10 ppm koppeln, findet sich das Signal von H-4 bei beiden Verbindungen als Multipllett bei $\delta = 1.82$ ppm (**2**) und 1.85 ppm (**3**) (s. Abb.2.23, S.56). Diese drei Multipletts (H-2a, H-2b und H-4) besitzen im COSY jeweils ein Kreuzsignal mit dem Multipllett bei $\delta = 3.70$ ppm. Aufgrund der Lage dieses Protonensignals, dessen zugehöriges Kohlenstoffsignal bei $\delta = 78.3$ ppm detektiert wurde, ist einem sekundären Alkohol an C-3 zuzuordnen.

Die relative Stereochemie von **2** und **3** ist identisch. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um ein 3,8-Dihydroxy-guaia-10(14)-en-11,12-dihydro-12,6-olid. Aufgrund der sich überlagernden Protonen am Cyclopentanring (H-1 bis H-5) konnten nicht alle Kopplungskonstanten ermittelt werden. Die Stereochemie bleibt daher an vielen Stereozentren unklar. Aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen sollte die Stereochemie in diesem Bereich bei **2** und **3** gleich sein.

Eine Literaturrecherche hat ergeben, dass bisher sieben stereoisomere Verbindungen isoliert wurden, deren Strukturformel ohne Berücksichtigung der Stereochemie an den acht Stereozentren zur Struktur von **2** und **3** passt (s. Abb. 2.19, S.49). Um die Stereochemie an den Kohlenstoffen C-1, C-3 und C-4 zu klären wurden die NMR Daten dieser Verbindungen mit den hier für **2** und **3** ermittelten Daten verglichen. Da bei beiden hier isolierten Verbindungen H-5 zu H-6, H-6 zu H-7 und H-7 zu H-8 jeweils trans zueinander angeordnet sind, ergibt sich

durch die Tatsache, dass bei allen bisher in der Natur gefundenen Guaianoliden das Proton an C-7 α -ständig ist, die Position der OH-Gruppe an C-8 α -ständig sein muss. Dies ist nur bei vier der in Abb. 2.19 dargestellten Verbindungen der Fall (A, B, D und G). Die Methylgruppe an C-4 ist bei drei dieser Verbindungen α -ständig, Verbindung G besitzt eine β -ständige Methylgruppe an C-4. Leider finden sich in der Literatur keine brauchbaren ^{13}C NMR Daten für Lipidiol (A). Obwohl die absolute Konfiguration durch eine Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurde, wurden die Daten von Hao et al. (2013) nicht angegeben, auch nicht im „Supplementary Material“, das nur die Spektren des ebenfalls isolierten 4-Epi-Isolipidiols (G) enthält.

In den in dieser Arbeit gezeigten Spektren, wurden die beiden Signale für das C-4 von Verbindung **2** bei $\delta = 47.2$ ppm und das von Verbindung **3** bei $\delta = 47.4$ ppm detektiert. Diese Signale liegen somit bei sehr ähnlichen Shiftwerten wie die von Isolipidiol (B), $\delta = 47.7$ (in pyridin- d_5) bzw. 48.22 ppm (in CD_3OD), und Cynaroscolide (D), $\delta = 45.6$ ppm (in CDCl_3). Die Kohlenstoffsignale der zugehörigen Methylgruppen wurden bei Isolipidiol bei 18.6 (in pyridin- d_5) und 18.84 ppm (in CD_3OD) gefunden. Für Cynaroscolide wurde $\delta = 15.8$ ppm für C-15 angegeben (s. Tab. 2.3, S.50). Wir konnten 18.3 ppm für das C-15 von **2** und 18.6 ppm für das C-15 von **3** ermitteln. Die hier gefundenen Werte von 18.3 ppm für **2** und 18.6 ppm für **3** stimmen daher ebenfalls gut mit den für Isolipidiol publizierten Werten überein. Zusätzliche Unterstützung für das Vorliegen einer 4α -Methylgruppe ergibt sich durch den Vergleich der Kohlenstoffresonanzen mit den C-15 Werten von Verbindung F und G (Abb. 2.19, S.49). Bei diesen Lactonen findet sich das Signal für C-15 hochfeldverschoben bei $\delta = 8.7$ bzw. 9.2 ppm (in Pyridin- d_5). In einer Arbeit zu den NMR Studien der isomeren Dehydrocostuslactone und der Revision der Struktur der Dentatine A-C (Kisiel, 2011), in der es unter anderem auch um die 3-O- β -Glucopyranoside von 8-Epi-Isolipidiol (C), Dentalacton (E) und 4,8-Di-Epi-Isolipidiol (F) ging, wird darauf aufmerksam gemacht, dass die ^1H und ^{13}C NMR Shiftwerte in Pyridin- d_6 von α -ständigen Methylgruppen am C-4 entschirmt bei ca. 1.4 ppm (δ_{H}) und 18.6 ppm (δ_{C}) auftreten. Bei β -ständiger Methylgruppe finden sich die Signale bei ca. 1.2 ppm (δ_{H}) und ca. 8.3 ppm (δ_{C}). Demnach sollten **2** und **3** eine α -ständige Methylgruppe am C-4 besitzen.

Um zu klären, welche Konfiguration an C-3 bei **2** und **3** vorliegt, kann der Vergleich von 8-Epi-Isolipidiol (C) und Cynaroscolide (D), die sich durch die Position der Hydroxylgruppe an C-3 und C-8 unterscheiden, herangezogen werden. Für beide Verbindungen liegen NMR in Daten in deuteriertem Chloroform vor (s. Tab 2.3, S.50). Das Signal des 3β -hydroxylierten C-

3 im Cynaroscolide liegt bei $\delta = 74.5$ ppm, während der 3 α -hydroxylierte Kohlenstoff im 8-Epi-Isolipidiol bei $\delta = 78.08$ gefunden wurde (s. Tab 2.3, S.50). Die Kohlenstoffe von **2** und **3** finden sich bei nahezu identischen Shiftwerten bei $\delta = 78.2$ (**3**) und 78.3 (**2**). Bei beiden Verbindungen sollte es sich daher um 3 β -Hydroxy-4 α -methyl-guaianolide handeln, deren Cyclopentanring an allen C-Atomen die gleiche Konfiguration wie das Isolipidiol besitzt. Der Vergleich der ^{13}C NMR Daten von 8-Epi-Isolipidiol (s. Tab. 2.3) zeigt, dass die Shiftwerte in Chloroform bei ganz ähnlichen Resonanzfrequenzen auftreten, bis auf wenige Signale sind sie nur etwas hochfeldverschoben. Die Lage der Signale der zugehörigen Protonen unterstützt die getroffenen Zuordnungen (s. Tab. 2.2, S.41 und Tab. 2.4, S.51). Da sich **2** und **3** sich nur in der Position der Methylgruppe an C-11 voneinander unterscheiden, muss es sich bei einer der beiden Verbindungen um Isolipidiol (B) handeln, während die andere Verbindung Lipidiol (A) sein könnte. Im Isolipidiol (s. Tab. 2.3, S.51) findet man die Signale für 11 bei 42.6 ppm (δ_{C}) und 2.58 ppm (δ_{H}) und für 13 bei 16.7 ppm (δ_{C}) und 1.33 ppm (δ_{H}). In den Spektren des Gemisches von Verbindung **2** und **3** wurden Signale der Hauptkomponente **2** bei $\delta = 42.4$ ppm (δ_{C}) und 2.52 ppm (δ_{H}) für 11 und $\delta = 16.1$ (δ_{C}) und 1.39 ppm (δ_{H}) für 13 gefunden, so dass es sich bei **2** um das Isolipidiol handeln muss. Die α -Orientierung der Methylgruppe an C-11 wird zusätzlich durch Kopplungskonstante zwischen H-7 und H-11 bewiesen. Nach Herz et al. (1970) liegt die Kopplungskonstante bei trans-ständigen Protonen an C-7 und C-11 des γ -Lactonrings bei ca. 12 Hz, während sie bei cis-ständigen Protonen nur ca. 7.5 Hz beträgt. Leider ist das Signal von H-7 wegen der Überlagerung nicht auszuwerten, aber das H-11, das als Dublett vom Quartett bei $\delta = 2.52$ ppm auftritt (s. Abb, 2.30), besitzt zwei Kopplungskonstanten $J_{11,13} = 7.0$ Hz und $J_{7,11} = 11.1$ Hz. Leider wurde bei den Protonendaten für Isolipidiol (s. Tab 2.4, S.51) das H-11 nur als Multiplett beschrieben. Ein Vergleich zu den ebenfalls 7,11-trans-konfigurierten Verbindungen C, D, F und G (s. Abb 2.19, S.49 und Tab. 2.4, S.51) zeigt, dass die Kopplungskonstante dort immer größer als 10 Hz war. Die Unterschiede innerhalb dieser vier Verbindungen sind vermutlich auf die noch vorhandene Flexibilität des γ -Lactonrings zurückzuführen, der an einen relativ beweglichen 7-gliedrigen Ring gebunden ist. Die Struktur der Hauptkomponente **2** des hier isolierten Gemisches konnte damit eindeutig als 3 β ,8 β -Dihydroxy-guaia-10(14)-en-1 α ,4 β ,5 α ,6 β ,7 α ,11 β H-12,6 α -olid (Isolipidiol) ermittelt werden.

Da sich Verbindung **3** nur durch die Position der Protonen- Kohlenstoffsignale der Protonen des γ -Lactonrings unterschied, sollte es sich bei **3** um das C-11 Epimer von **2**, das Lipidiol, handeln. Entsprechend findet sich für **3** eine Kopplungskonstante $J_{7,11}$ von 7.79 Hz, wodurch

diese beiden Protonen als cis-ständig ausgewiesen werden. Nach Herz (1970) besteht eine zweite Möglichkeit der Beweisführung zur Stereochemie an C-11. Auch die ^3J -Kopplungen von H-13 und H-11 sind bei den Epimeren unterschiedlich. Im Falle von trans-ständigen Protonen an C-7 und C-11 fällt die ^3J -Kopplung zwischen H-11 und H-13 kleiner aus als im Falle einer cis-Stellung von H-7 zu H-11. Die Hauptkomponente **2** (Isolipidiol) weist eine $J_{11,13}$ Kopplung in Höhe von 7.0 Hz für das Dublett von H-13 aus, während diese Kopplung bei **3** $J_{11,13} = 7.6$ Hz etwas größer ausfällt und daher die cis-Position der Protonen H-7 und H-11 und die β -Orientierung der Methylgruppe an C-11 bestätigt. Auch die Lage des Methylkohlenstoffs C-13 bei 11.0 ppm spricht dafür, dass es sich um ein $11\alpha,13$ -Dihydro-Sesquiterpenlacton handeln sollte, Nach Kisiel (2011) sind die Kohlenstoffsignale der 11β -Methylgruppe gegenüber den jeweiligen Epimeren hochfeldverschoben. Bei Verbindung **3** handelt es sich somit um das $3\beta,8\beta$ -Dihydroxy-guaia-10(14)-en- $1\alpha,4\beta,5\alpha,6\beta,7\alpha,11\alpha$ -H-12, 6α -olid (Lipidiol).

Um die Überlegungen zur Stereochemie zu bestätigen, wurde abschließend ein NOESY-Spektrum des Gemisches von **2** und **3** aufgenommen (s. Abb. 2.31 bis Abb. 2.34, S.63 bis 66). Durch das „Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy“-Experiment, kann die Kopplung von Protonen durch den Raum nachgewiesen werden. Obwohl die Auswertung der NOE-Kontakte durch die Überlagerung der Signale beider Substanzen nicht immer eindeutig zuzuordnen war, konnte die Konfiguration an den Stereozentren bestätigt werden, die zuvor nur aufgrund der vorstehenden Überlegungen abgeleitet worden war. Das Dublett der drei äquivalenten Methylprotonen H-13 von Verbindung **3** zeigt einen NOE-Kontakt zu den β -ständigen Protonen an C-6 und C-8, woraus folgt, dass die Methylgruppe an C-11 ebenfalls oberhalb der Ringebene angeordnet sein muss. Bei Verbindung **2** gibt es keinen Kontakt zwischen diesen Protonen, dafür findet sich Kontakte zu den α -ständigen Protonen an C-1 und C-9. Zusätzlich findet man bei **2** einen NOE Kontakt zwischen dem β -orientierten Proton an C-11 und dem ebenfalls β -ständigen H-8. Dadurch ist die Stellung der Methylgruppe an C-13 als Unterschied zwischen **2** und **3** bewiesen. Kontakte zwischen H-15 von **2** und **3** und den Protonen an C-3, C-1 und C-9 α bestätigen die Positionen der β -ständigen Hydroxylgruppe an C-3 und die α -ständige Methylgruppe an C-4. Letztlich beweisen die Kontakte zwischen H-11 (β) in **2** und H-13 (β) in **3** die α -Position der OH-Gruppe an C-8 in beiden Verbindungen.

Beide Verbindungen konnten hier erstmals aus *Volutaria boranensis* isoliert werden. Wie Verbindung **1**, wurden auch Isolipidiol (**2**) und Lipidiol (**3**) in *Amberboa lippii* gefunden, allerdings waren die damals in CCl_4 veröffentlichten Daten eher spärlich.

Gonzales et al. (1970) veröffentlichten damals für Isolipidiol nur die Daten für die Protonen der Methylgruppe an C-4 ($\delta=1.19$ d (6)) und C-11 ($\delta=1.41$ d (7)), für Lipidiol veröffentlichten sie $\delta=1.19$ d (6) für H-15 und 1.41 ppm für H-13. Weitere Shiftwerte für Lipidiol wurden bei $\delta=3.83$ m (H-3), 4.22 t (H-6), 3.83 m (H-8) und 5.00 (H-14) angegeben. Die Daten für die Protonen an C-1, C-2, C-4, C-5, C-9 und C-11 fehlen bei Lipidiol, bei Isolipidiol sind sogar nur die Shiftwerte der Protonen angegeben wurden. Auch wenn durch chemische Reaktionen versucht wurde die Stereochemie zu klären, bleibt fraglich, ob es sich tatsächlich um diese beiden Isomere handelte, oder ob es vielleicht doch andere Isomere waren.

Abschließend bleibt noch zu erwähnen, dass der Vergleich der NMR Daten der Isomere A – G und der oben ausgeführten Unterschiede in den Kohlenstoffshifts des Methylkohlenstoffs C-14, die Struktur des Dentalactons (\cong 4,8-Epi-Lipidiol) revidiert werden sollten. Wie Kisiel (2011) in Ihrer Arbeit veröffentlichte tritt der α -ständige Methylkohlenstoff bei etwa 18 ppm auf, während α -positionierte Methylgruppen ca. bei δ_C 9 ppm auftreten. Für Dentalacton wird ein Kohlenstoffshift von 18.4 ppm angegeben, was auf das α -ständige Methyl hindeutet. Bei dem von Chung et. al. (1993) veröffentlichten Dentalacton sollte es sich daher um das 8-Epi-Lipidiol handeln, dass bisher noch nicht gefunden wurde.

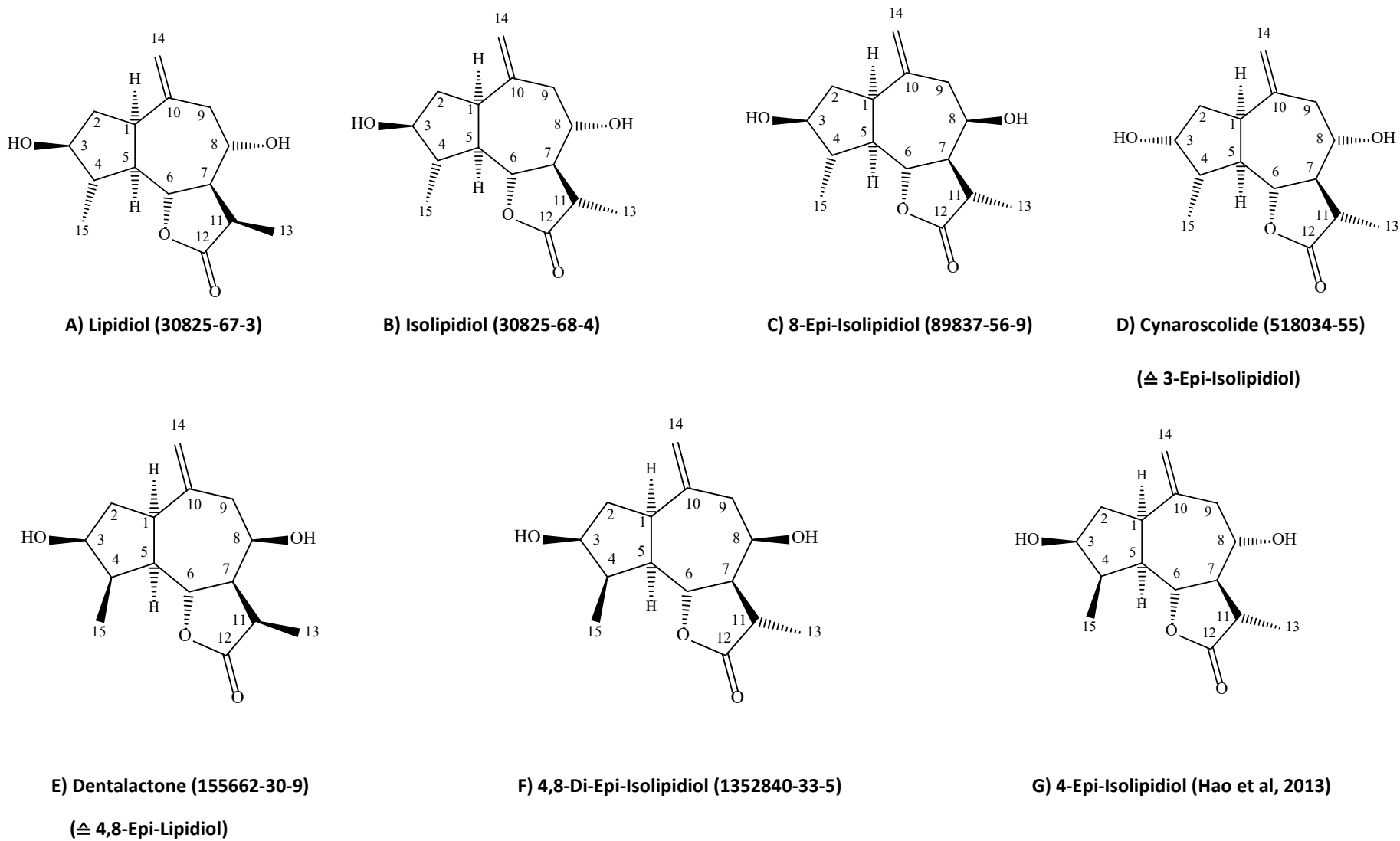


Abbildung. 2.19: Bisher gefundene, isomere Guaianolide und die zugehörigen CAS-Nummern

Tabelle 2.3: ^{13}C NMR Daten der bisher gefundenen Guaianolide B - G

	B		C		D	E	F	G
	Isolipidiol		8-Epi-Isolipidiol		Cynaroscolide	Dentalactone		
	m [b1]	p [b2]	c [c1]	p [c2]	c [d]	p [e]	? [f]	p [g]
1	43.56	43.0	42.04	43.02	45.5	42.8	41.5	41.9
2	35.53	39.4	38.22	39.76	39.8	39.8	35.0	35.7
3	79.10	78.0	78.08	78.13	74.5	78.0	73.4	73.5
4	48.22	47.7	46.98	47.67	45.6	47.6	41.2	42.0
5	52.27	51.6	50.78	52.14	50.8	52.0	48.1	48.5
6	83.87	82.2	79.57	80.96	82.2	81.0	77.1	79.1
7	60.03	58.9	57.77	56.75	59.5	56.4	55.6	57.9
8	77.10	76.1	62.67	63.68	76.2	63.8	63.6	75.9
9	48.91	48.7	43.90	45.53	49.0	45.6	47.4	51.2
10	146.31	145.8	142.75	144.54	146.2	144.9	143.7	145.5
11	43.51	42.6	36.85	37.08	42.6	37.0	37.1	42.6
12	181.87	179.0	178.81	179.13	179.2	179.0	179.6	179.7
13	16.77	16.7	12.74	13.30	16.7	12.5	13.2	17.4
14	115.08	113.9	116.30	115.33	113.2	114.6	114.2	113.5
15	18.84	18.6	18.19	18.51	15.8	18.4	8.7	9.2

p: Pyridin- d_5 ; m: CD_3OD ; c: CDCl_3

Tabelle 2.4: ¹H NMR Daten der bisher gefundenen Guaianolide B - G

	B		C	D	E	F	G
	m [b1]	p [b2]	c [c]	C	p [e]	? [f]	p [g]
	Isolipidiol		8-epi-isolipidiol		Dentalactone		
1	2.82 m		2.78 ddd (br.) (11.5, 10, 6)	3.49 dd (10.7, 7)	2.82 dt (br.) (8.8, 7.8, 2.4)	2.67 ddd (10.4, 10.2, 10)	2.75 m
2	1.68 m 2.05 m		1.75 ddd (12.8, 6, 6) 2.17 ddd (12.8, 11.5, 9)	1.94 dd (br.) (13.1, 10.7) 2.11 dd (br.) (13.1, 7)	2.11 ddd (7.9) 2.37 ddd (13, 8)	2.10 m 2.27 ddd (10.4, 10.4, 10.4)	2.14 m 2.27 overlap
3	3.60 m		3.71 ddd (9, 9, 6)	4.33 s (br.)	3.96 dt (7)	4.44 ddd (10.4, 6, 6)	4.48 ddd (16, 6.4, 3.2)
4	1.73 m		1.85 m	2.13 m	2.23 dq (8.1, 7)	2.43 ddq (7.2, 6, 6)	2.51 m
5	1.93 m		1.85 m	2.38 m	1.89 dq (10)	2.11 m	2.28 overlap
6	3.94 dd (10.2, 10.2)		4.01 dd (10, 10)	3.88 dd (10.4, 10.1)	4.64 t (10)	4.85 dd (10.4, 10.4)	4.24 dd (10.9, 9.8)
7	1.90 m		1.80 ddd (12.2, 10.1, 2.5)	2.22 dd (br.) (10.4, 9.8)	2.06 ddd (7, 2.2)	2.02 ddd (10.4, 10.4, 2.2)	2.21 q (br.) (10.4)
8	3.56 m		3.95 m (br.)	3.85 d (br.) (9.8)	4.20 dt (4.9)	4.16 ddd (4, 3.5, 2.2)	3.89 ddd (14.9, 9.9, 4.9)
9	2.08 m 2.71 dd (12.3, 4.25)		2.28 dd (13.4, 2.1) 2.71 dd (13.4, 5.2)	2.41 d (12.1) 3.02 dd (12.1, 4.1)	2.32 dd 2.88 dd (13.2)	2.16 dd (12.8, 3.5) 2.90 dd (12.8, 4)	2.28 overlap 3.08 dd (12, 4.8)
10	-		-	-	-		-
11	2.58 m		2.85 dq (12.2, 7)	2.80 dq (11.3, 7)	3.24 dq (7)	3.22 (10.4, 7.2)	2.92 dq (10.7, 7.1)
12	-		-	-	-		-
13	1.33 d (7)	1.69 d (7)	1.23 d (7)	1.70 d (7)	1.29 d	1.26 d (7.2)	1.73 d (7.1)
14	4.98 d (2.2) 5.00 d (5.3)	5.01 s 5.09 s	4.98 s (br.) 5.14 s (br.)	4.97 s 5.00 s	5.18 s (br.) 5.27 s (br.)	5.16 s 5.20 s	5.10 s 5.20 s
15	1.17 d (6.5)	1.45 d (6)	1.19 d (6.3)	1.50 d (6.7)	1.47 d	1.18 d (7.2)	1.27 d (7.3)

p: Pyridin-d₅; m: CD₃OD; c: CDCl₃

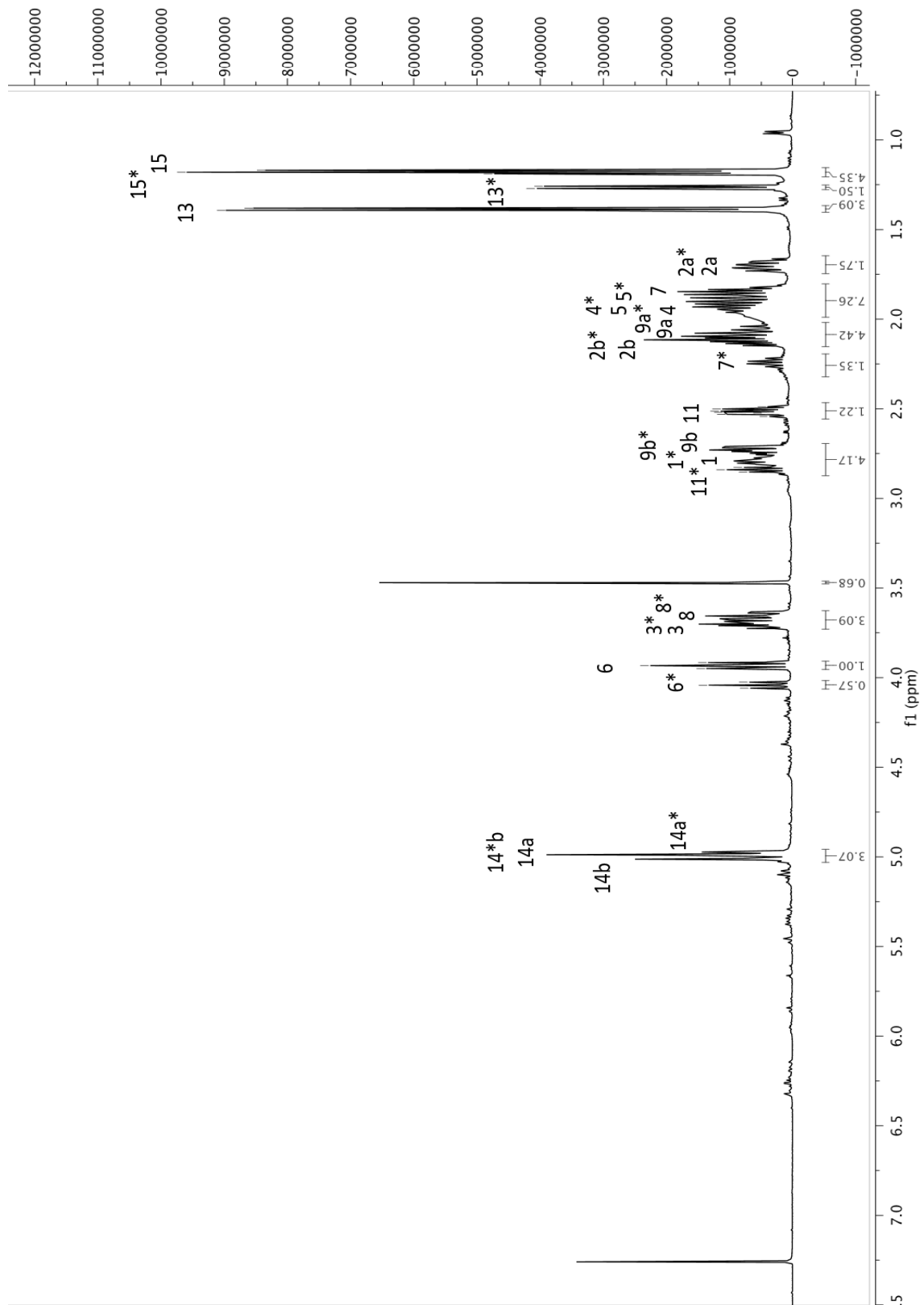


Abbildung 2.20: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl_3)

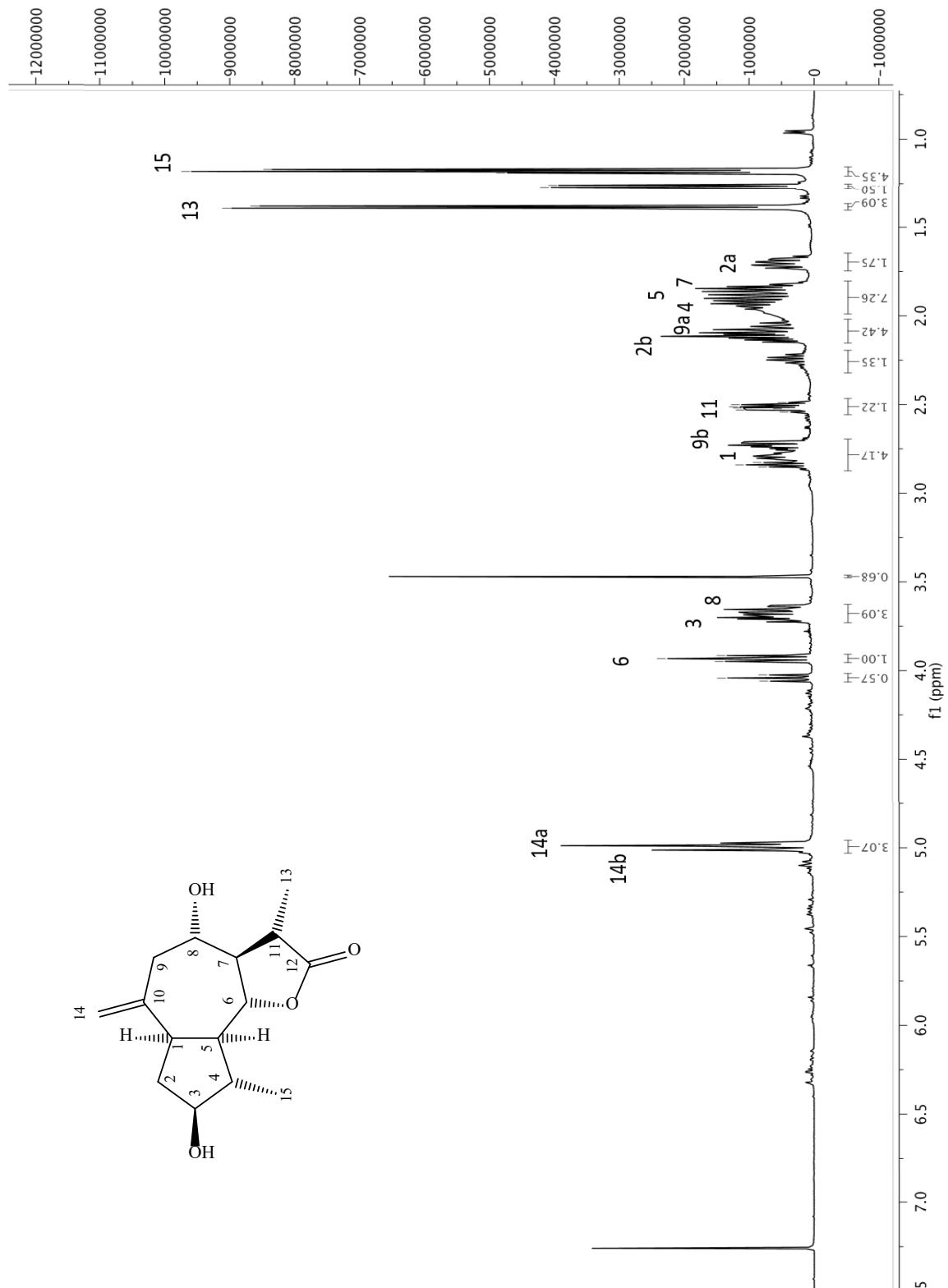


Abbildung. 2.21: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl_3) (Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **2**)

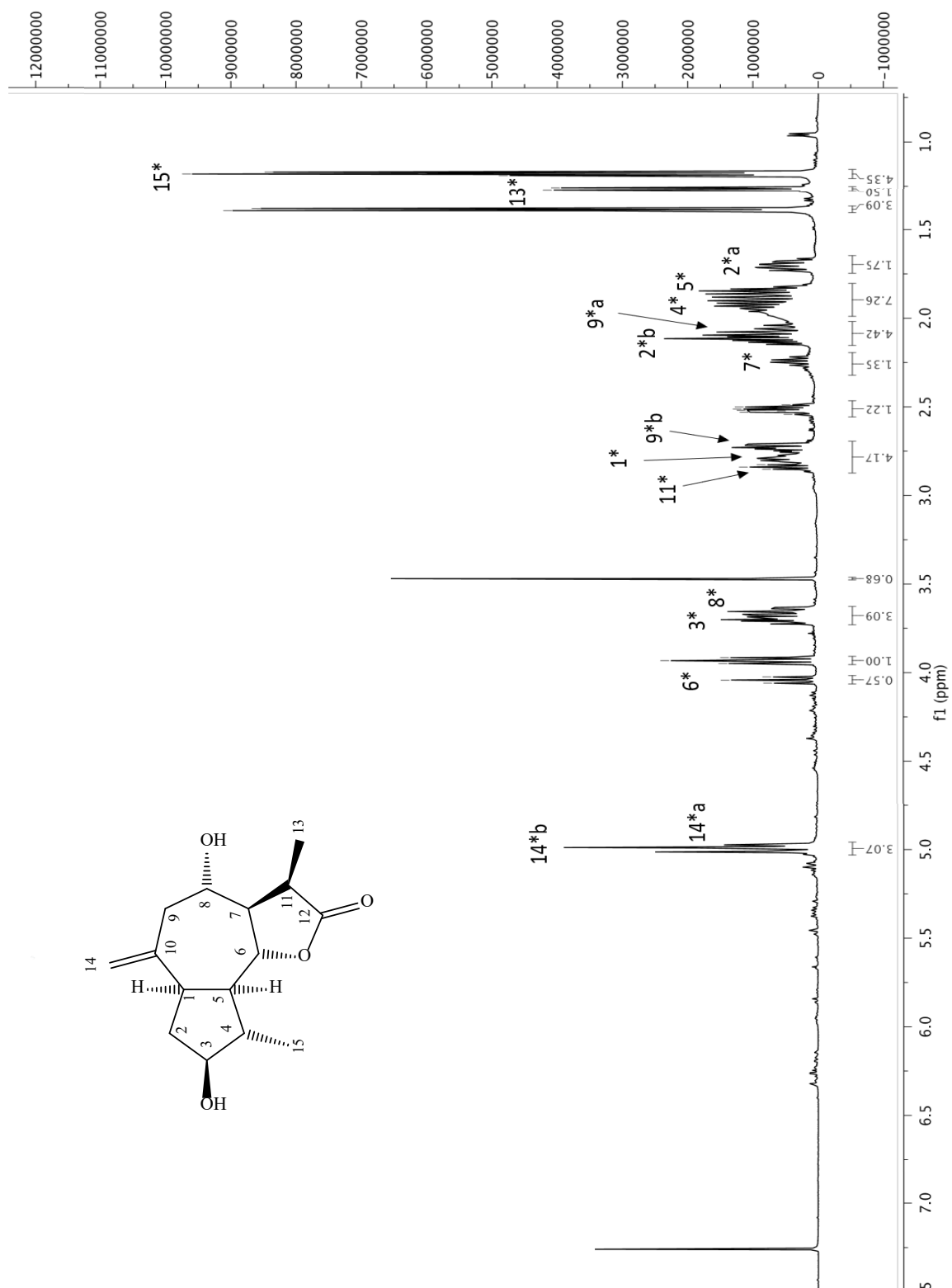


Abbildung. 2.22: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl_3) (Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **3** (durch * gekennzeichnet))

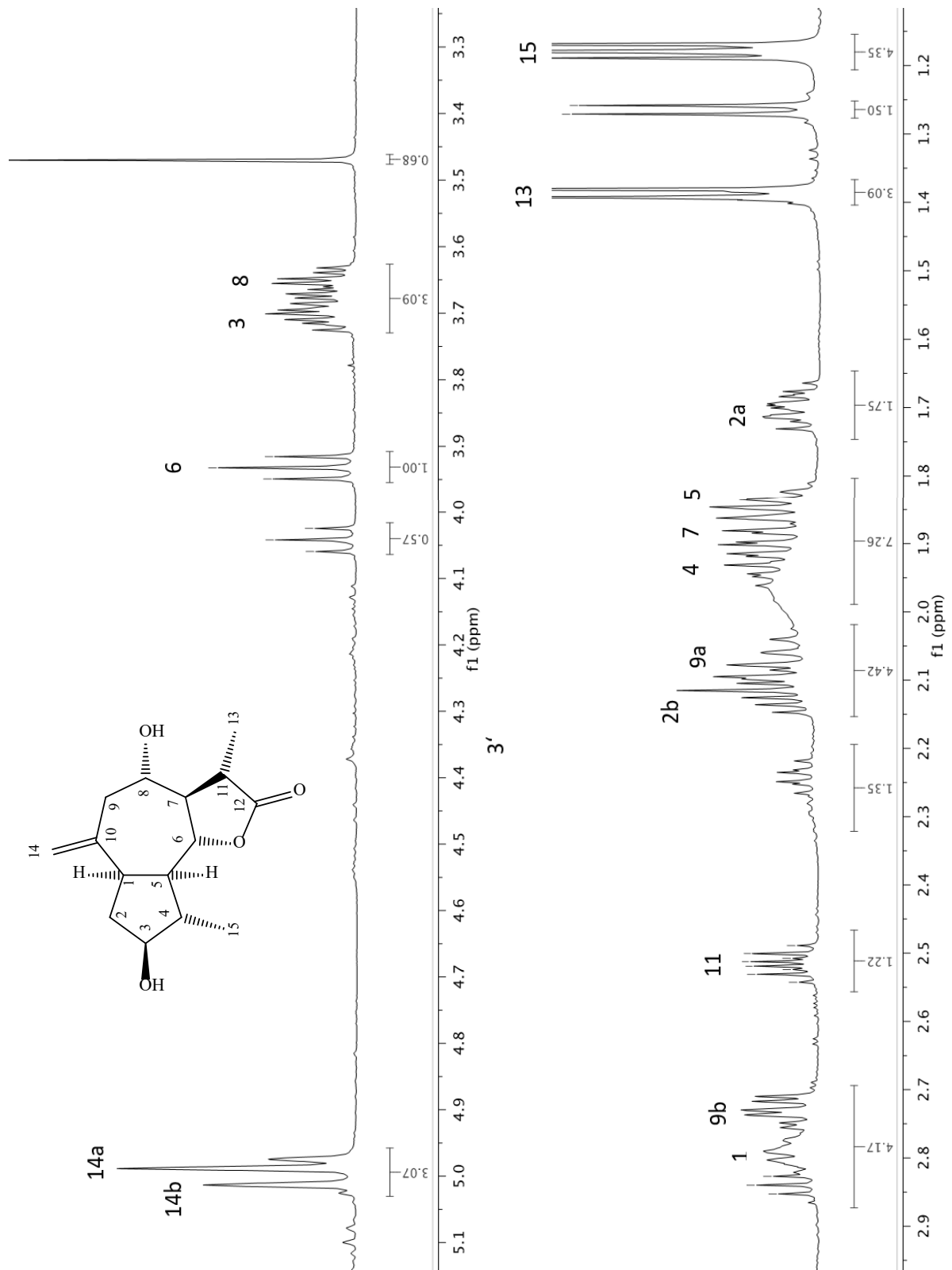


Abbildung 2.23: ¹H-NMR Spektrum (gespreizt) des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl₃) (Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **2**)

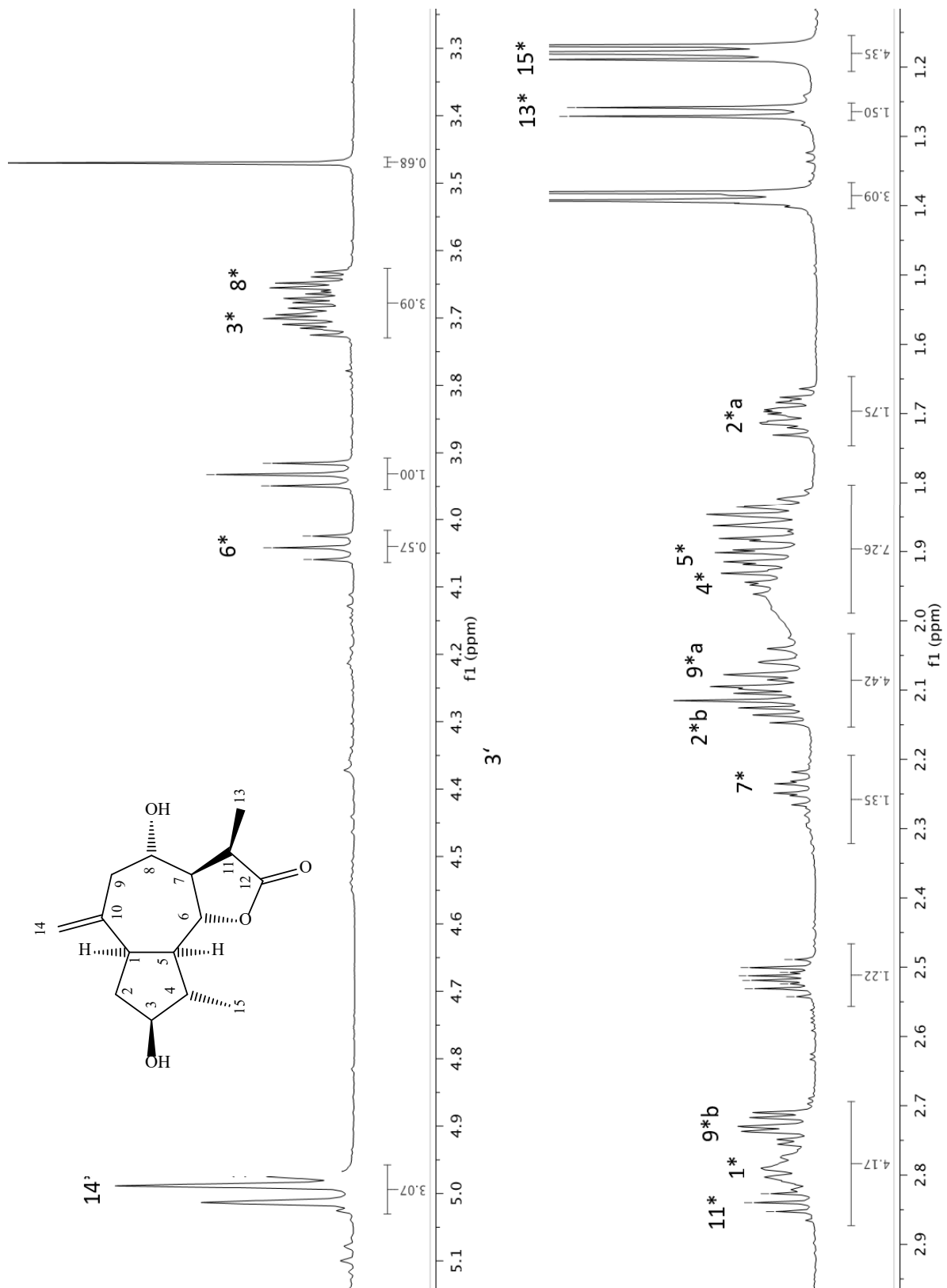


Abb.: 2.24: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (gespreizt) des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl_3)
(Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **3** (durch * gekennzeichnet))

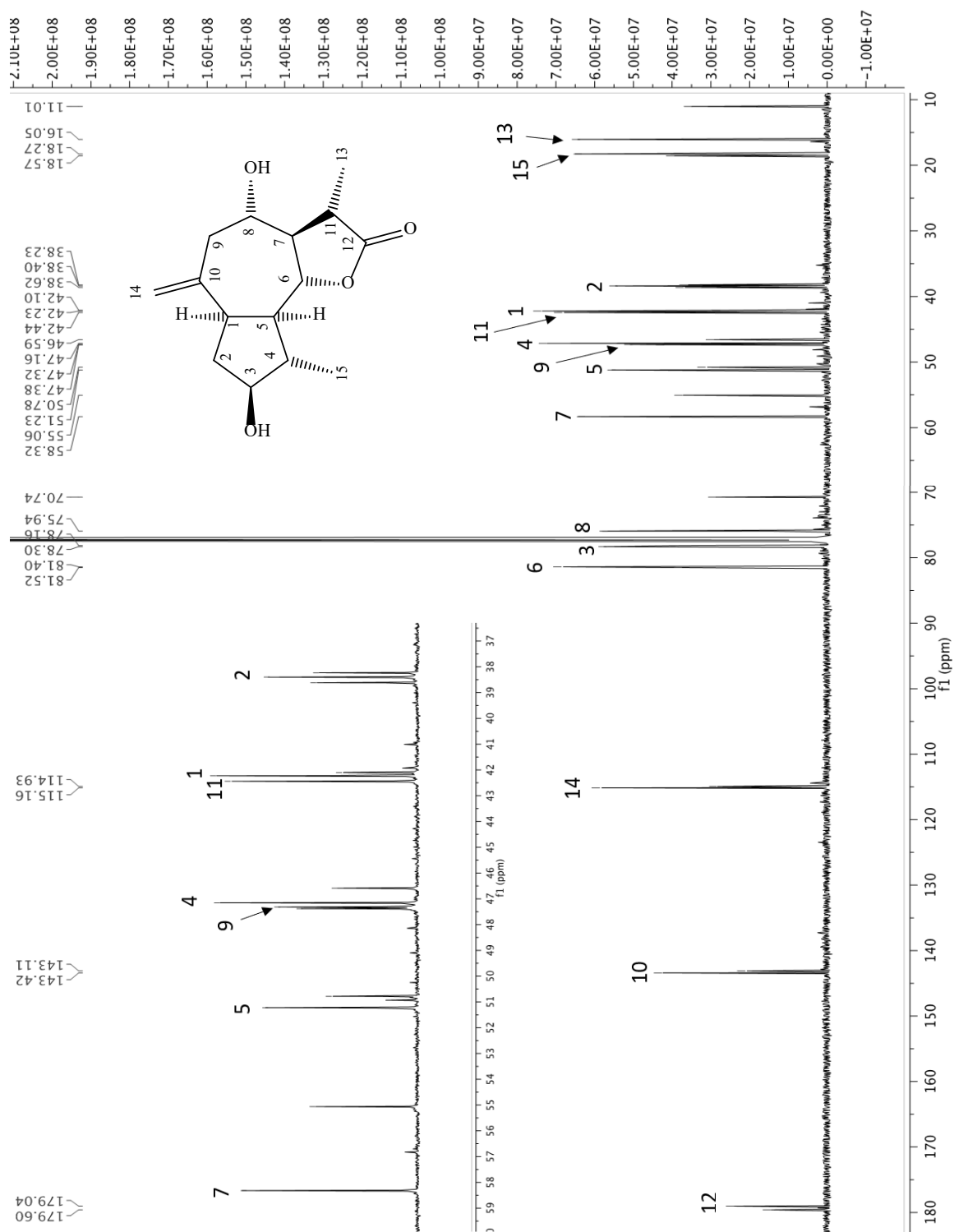


Abbildung 2.25: ^{13}C -NMR Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (150 MHz in CDCl_3) (Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **2**)

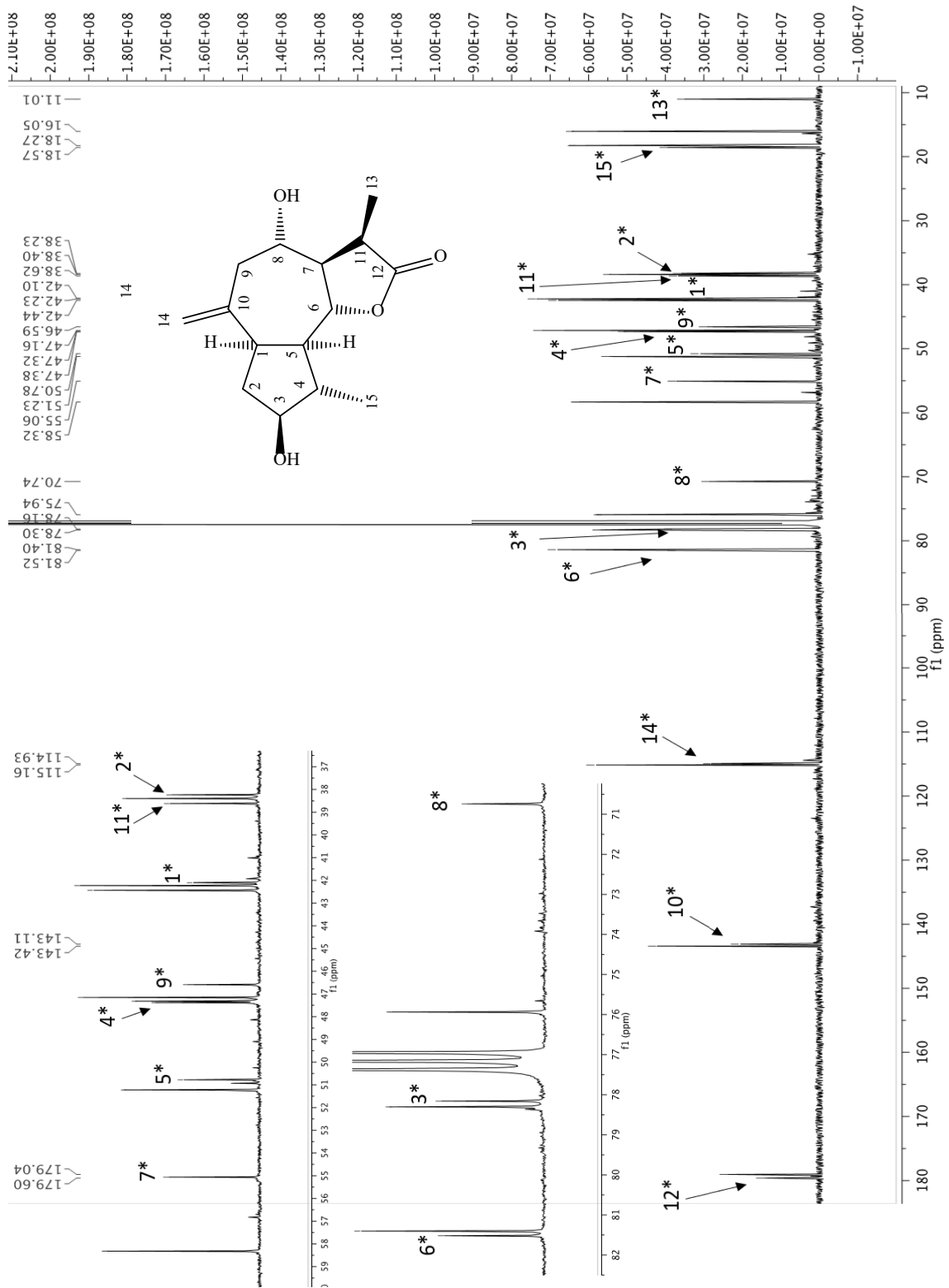


Abbildung 2.26: ^{13}C -NMR Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (150 MHz in CDCl_3) (Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **3** (durch * gekennzeichnet))

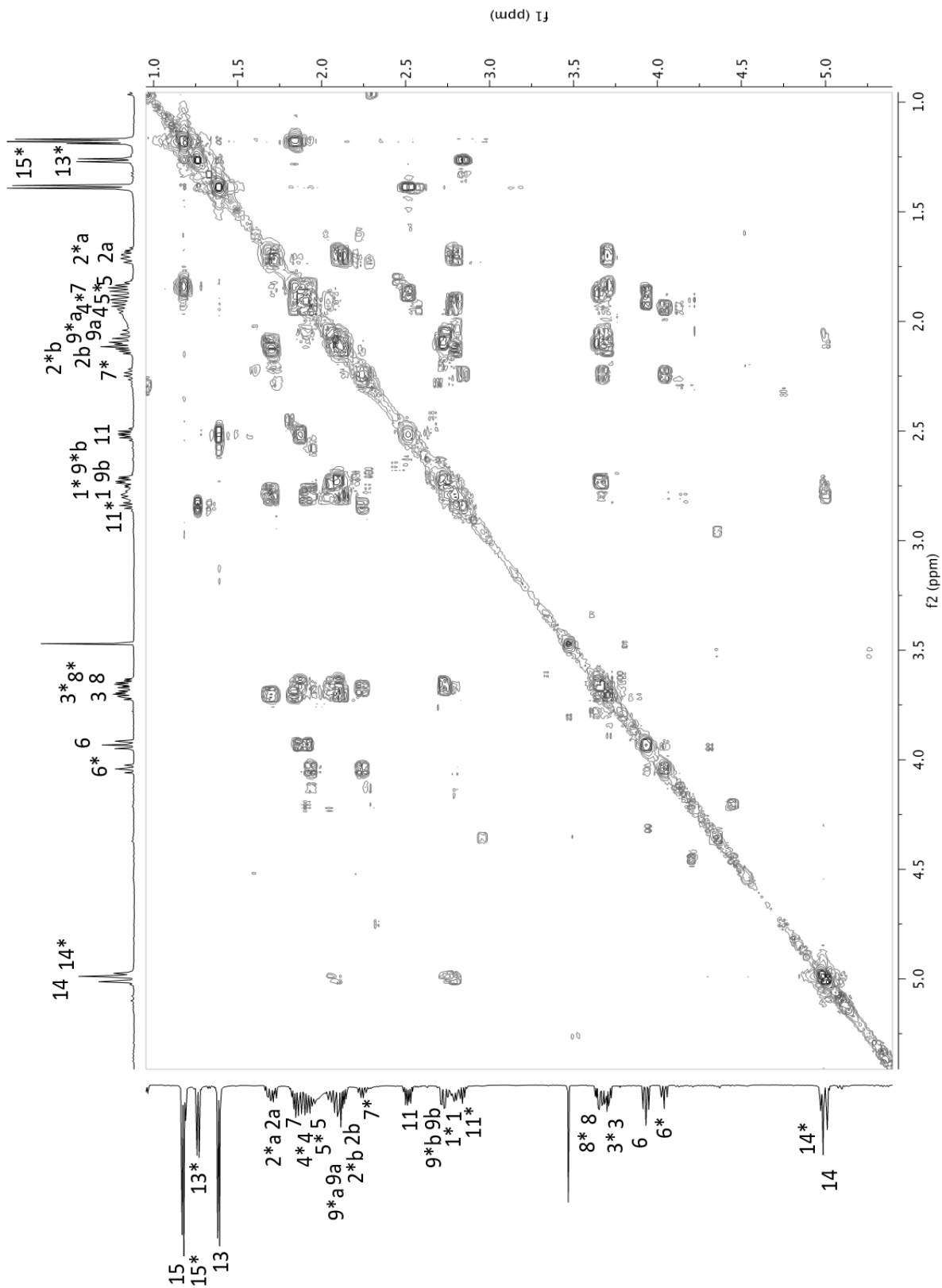


Abbildung 2.27: 2D-COSY Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl₃) (Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **2** und **3** (durch * gekennzeichnet)

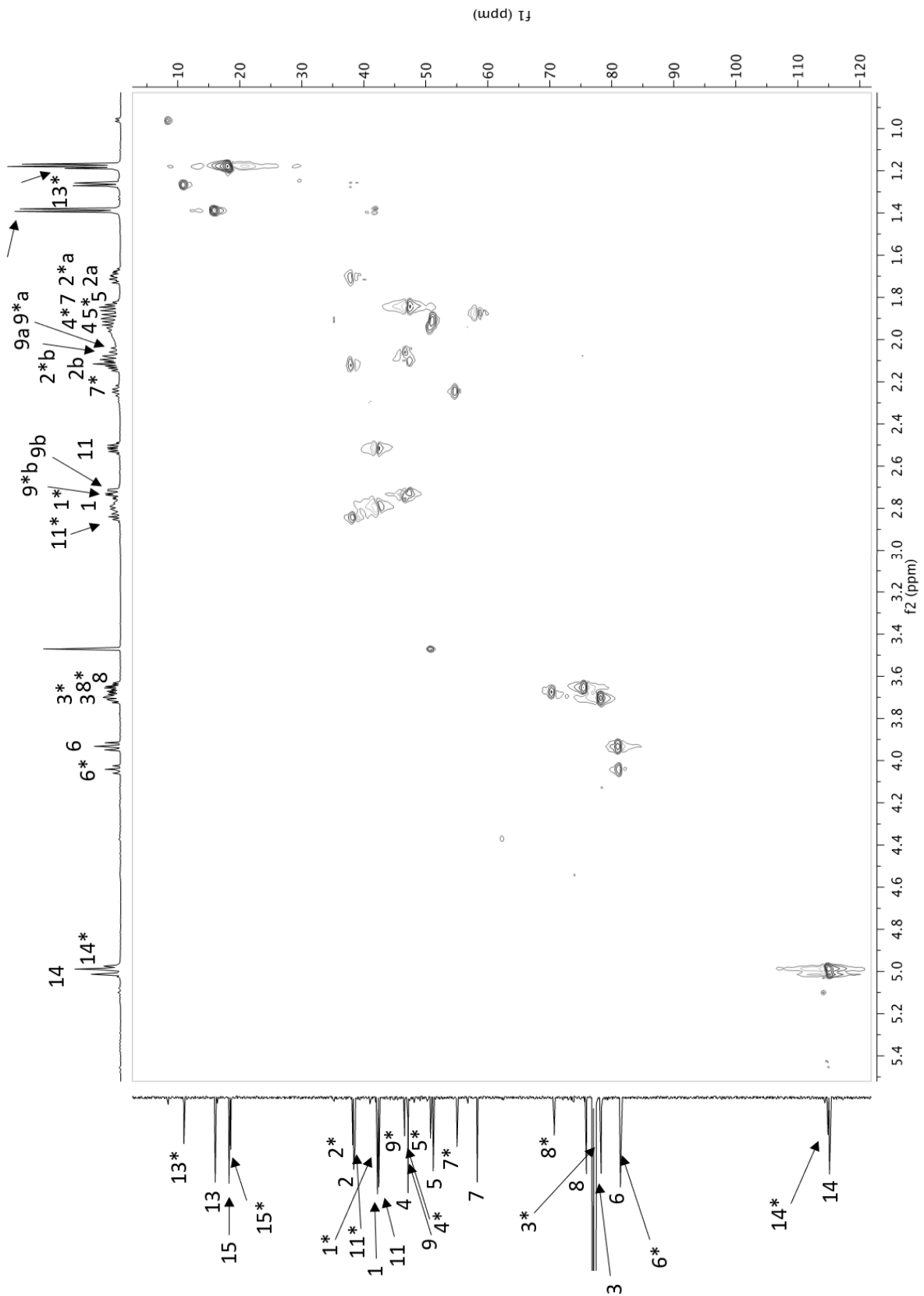


Abbildung 2.28: 2D-HSQC Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl_3)
 (Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **2** und **3** (durch * gekennzeichnet))

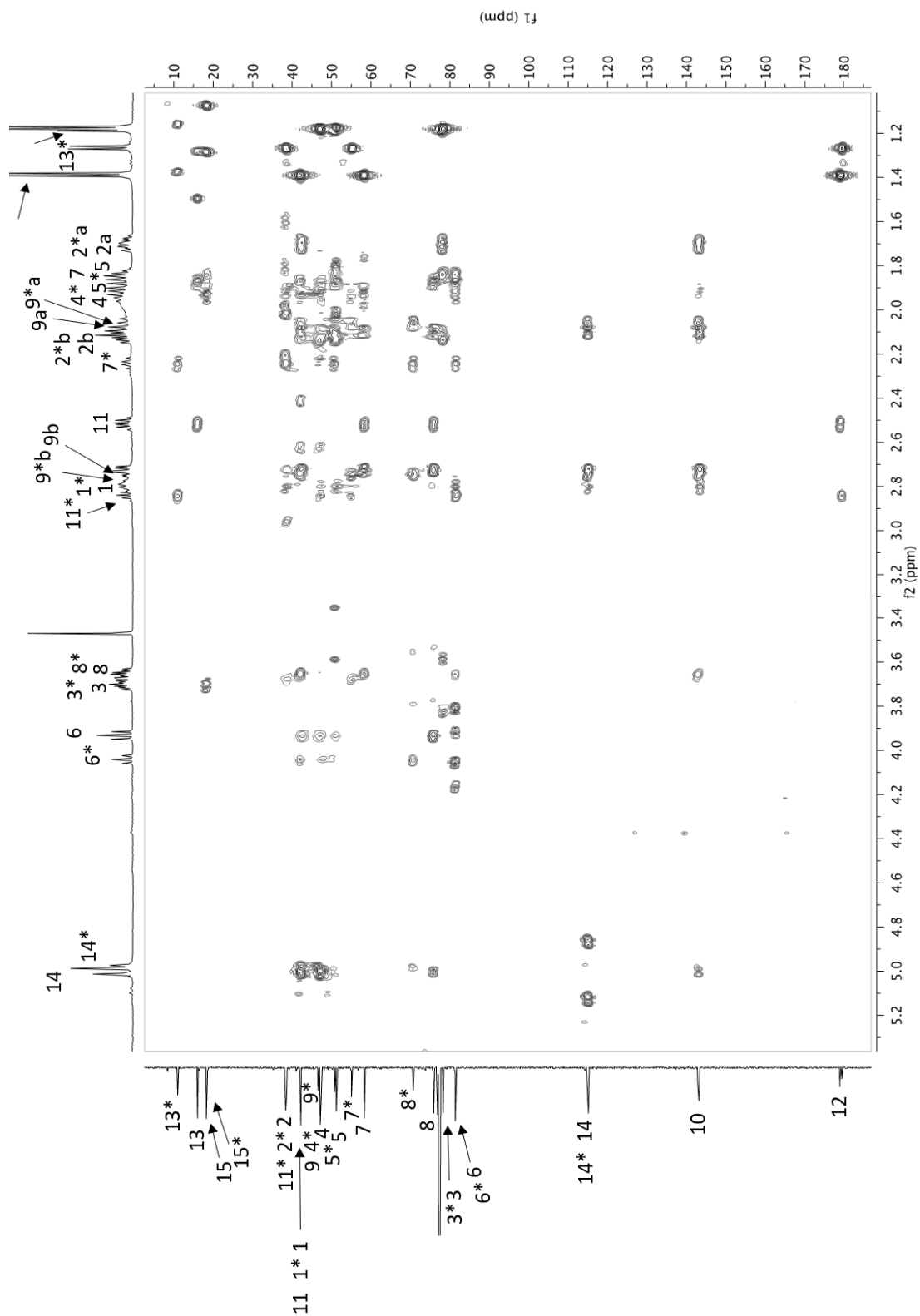


Abbildung 2.29: 2D-HMBC Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl_3)
 (Beschriftet wurden die Signale von Verbindung **2** und **3** (durch * gekennzeichnet))

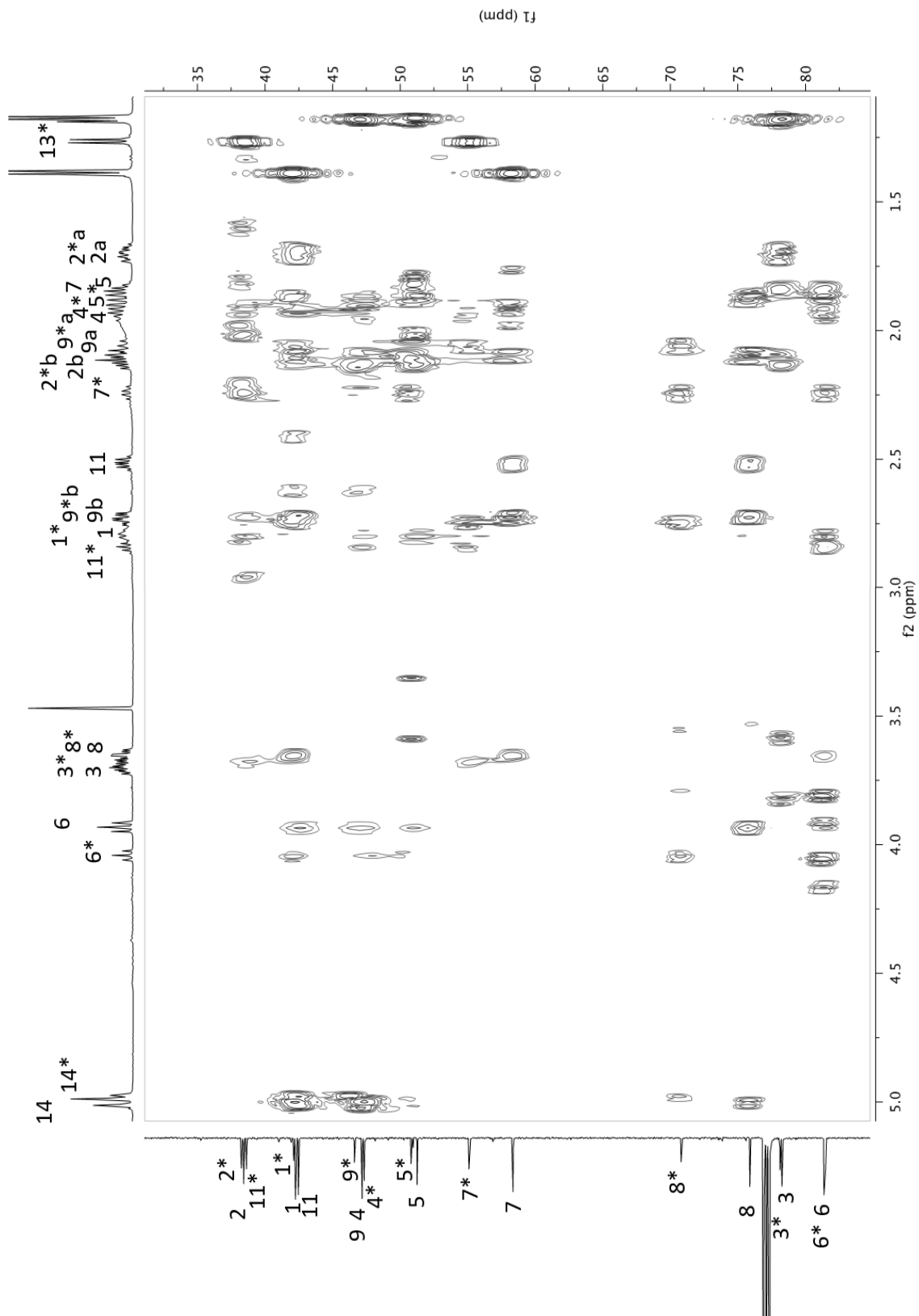


Abbildung 2.30: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl_3).

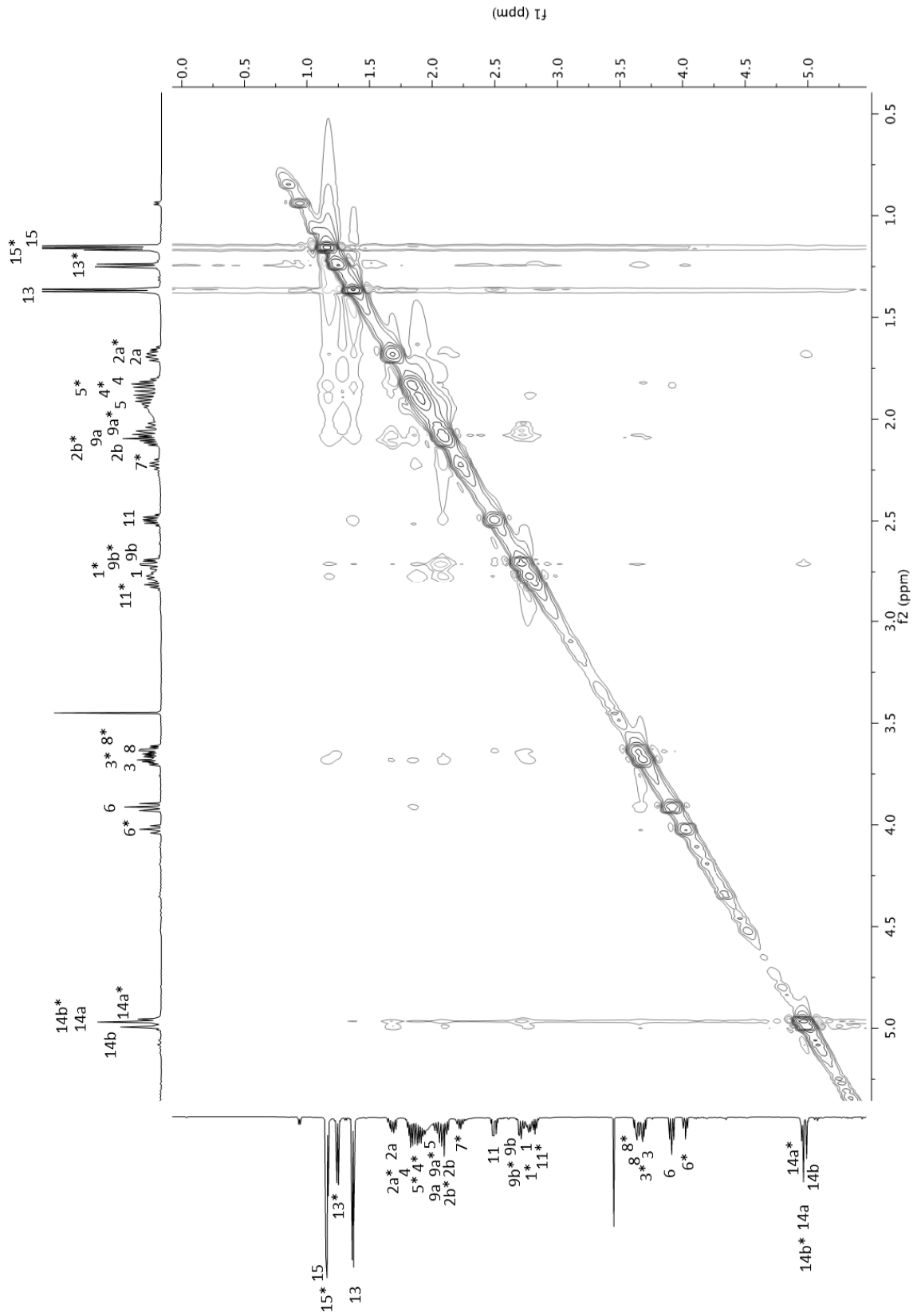


Abbildung. 2.31: 2D-NOESY Spektrum des Gemisches von **2** und **3** (600 MHz in CDCl₃).

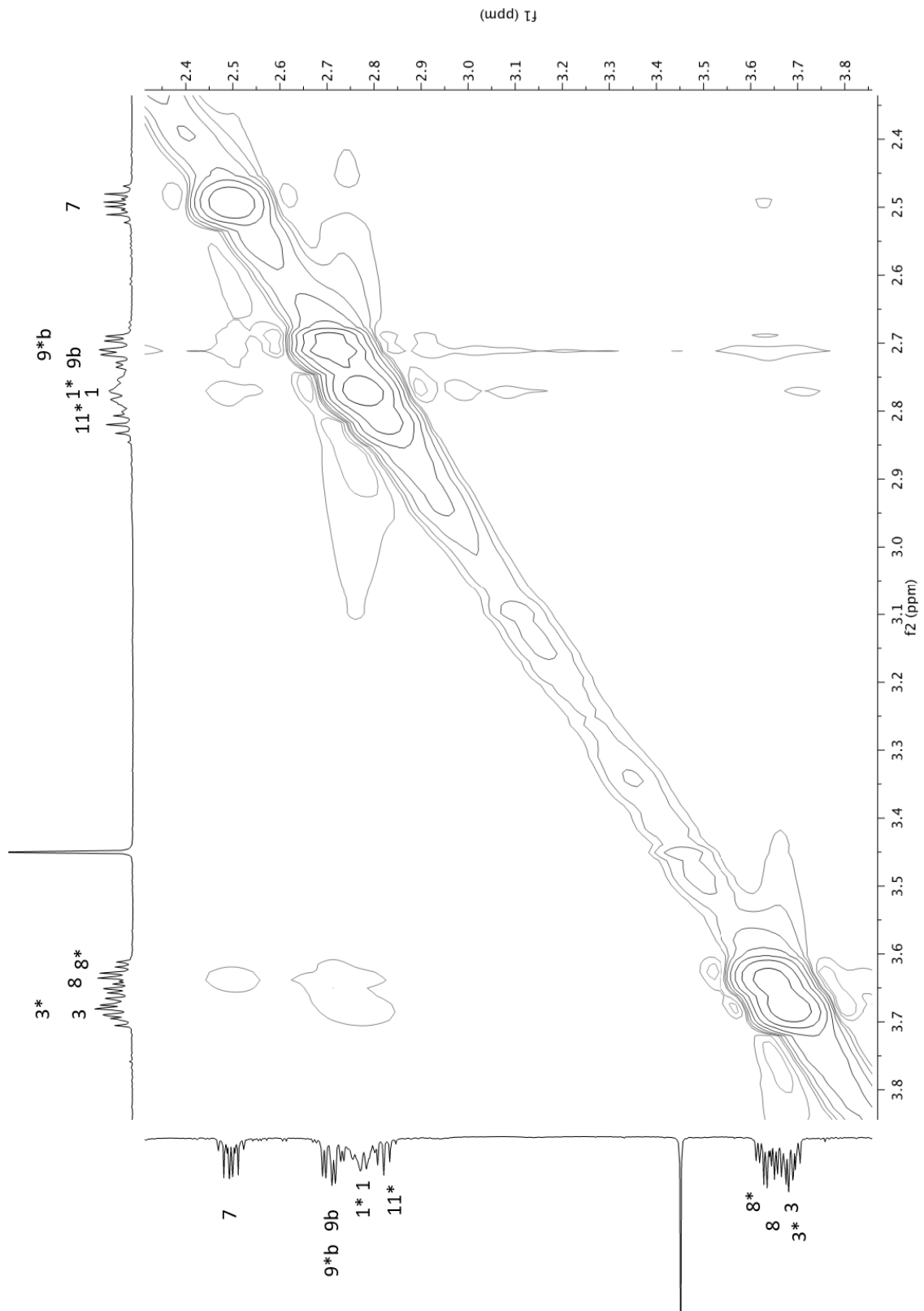


Abb. 2.32: Ausschnitt aus dem 2D-NOESY Spektrum von **2** und **3** (600 MHz in CDCl₃).

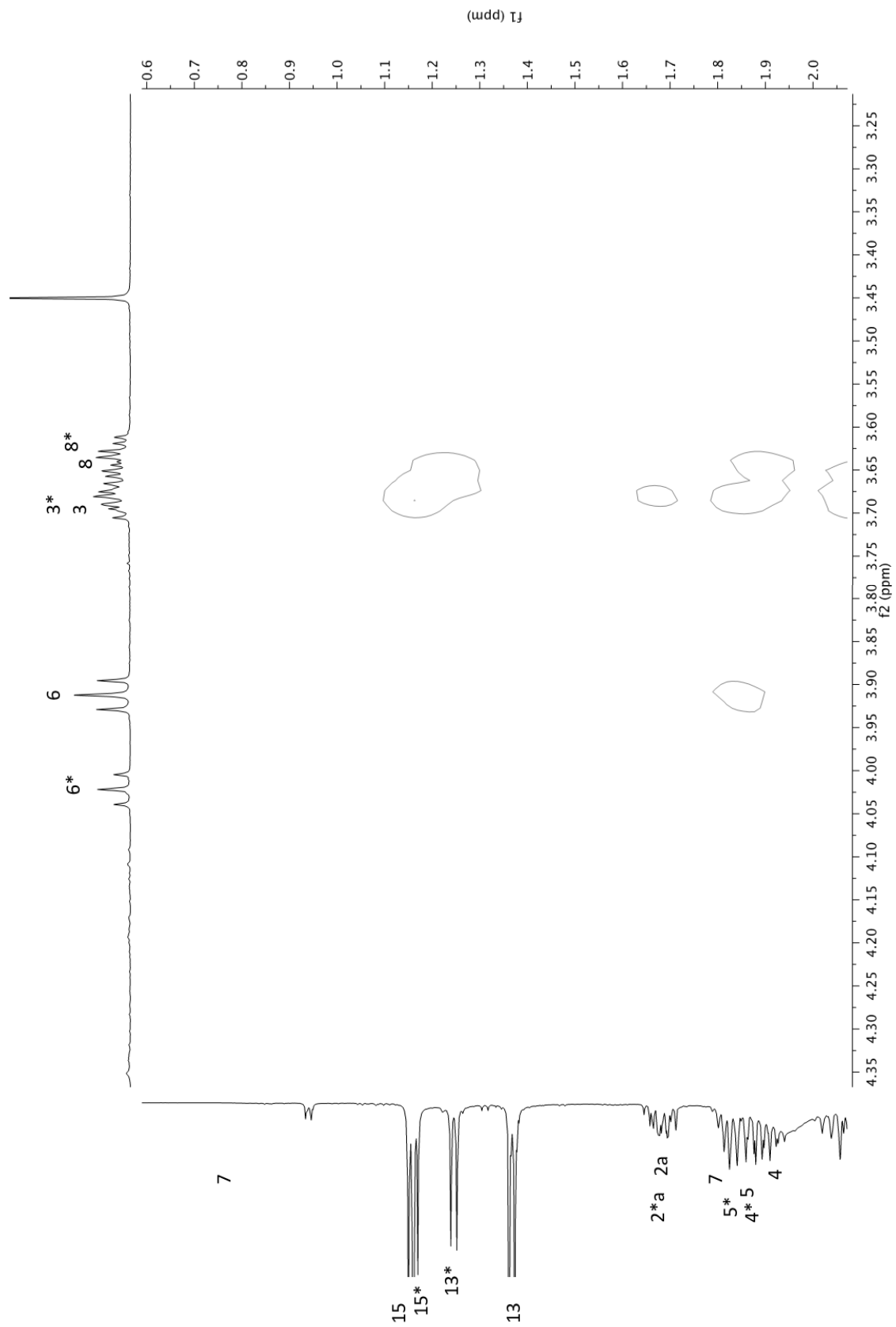


Abb. 2.33: Ausschnitt aus dem 2D-NOESY Spektrum von **2** und **3** (600 MHz in CDCl₃).

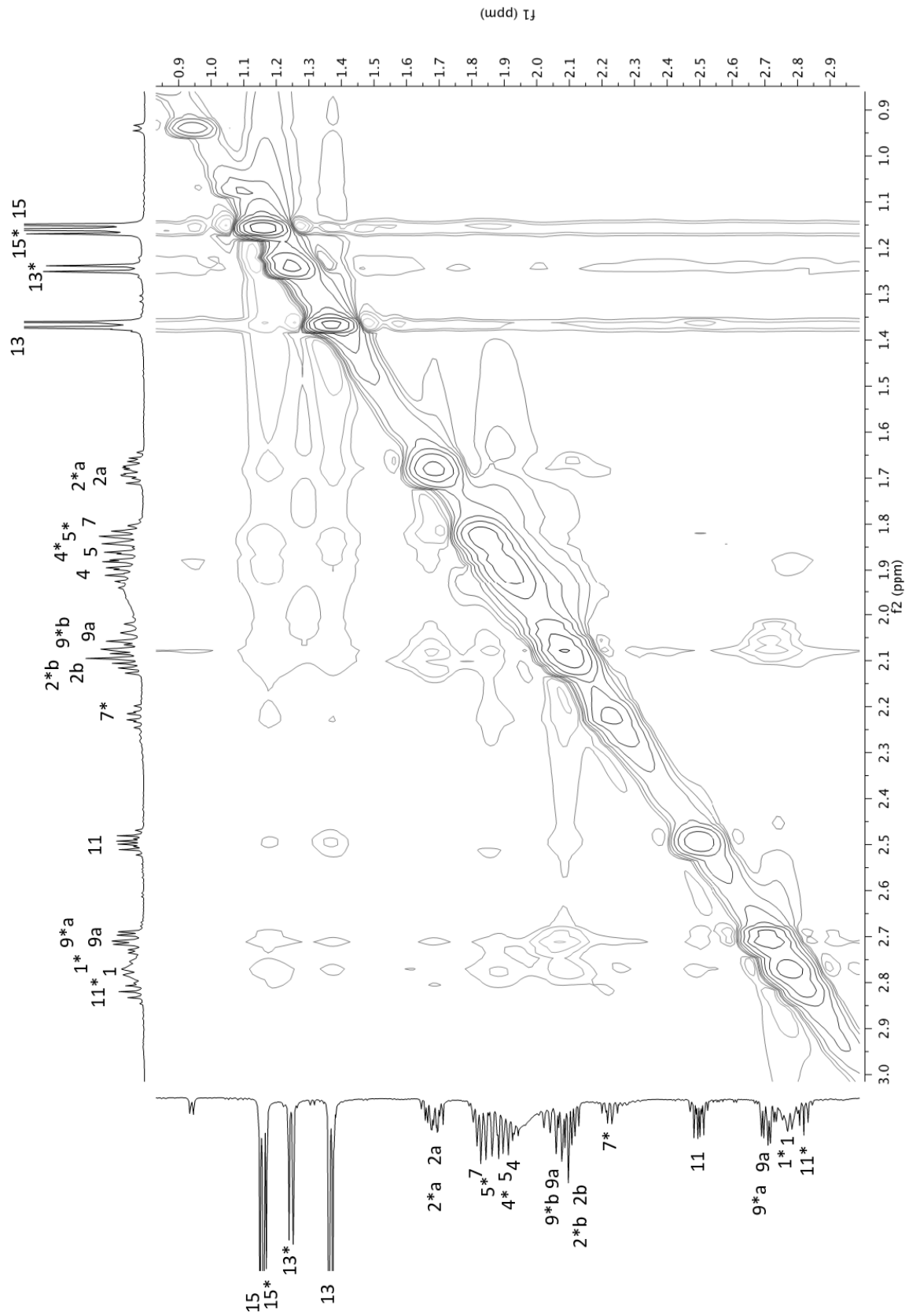
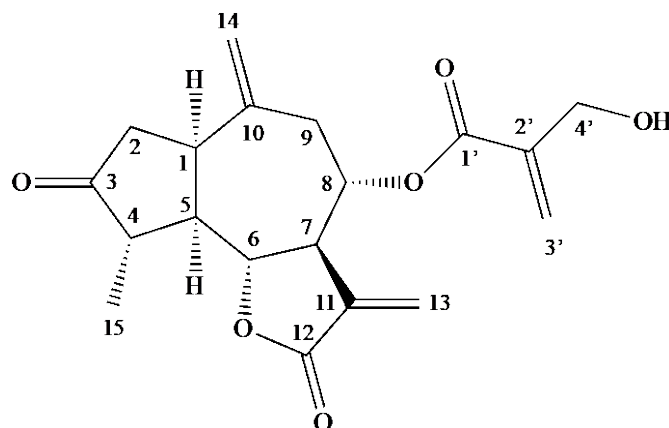


Abb. 2.34: Ausschnitt aus dem 2D-NOESY Spektrum von **2** und **3** (600 MHz in CDCl₃).

2.2.3. Verbindung 4 (4- α -Methylboranolacton)



Verbindung **4** konnte bei der chromatographischen Reinigung von Fraktion V.b.D.8.14.2.2 des Dichlormethanextraktes in einer Ausbeute von 2,32 mg gewonnen werden (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3).

Im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittelsystem DC1, s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1, Tab. 5.1) zeigte die Substanz bei R_f 0,41 eine fluoreszenzmindernde Substanzzone, die sich nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz gelb färbte. Ihre Retentionszeit im HPLC (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.4) betrug 21,05 Minuten, kürzer als Verbindung **1**, woraus eine geringere Lipophilie abgeleitet werden konnte. Das UV-Spektrum wies ein Maximum bei $\lambda = 213$ nm auf. Aufgrund der Ähnlichkeiten zur Verbindung **1**, konnte es sich bei **4** ebenfalls um eine Verbindung aus der Stoffgruppe der Sesquiterpenlactone handeln (Heywood et al, 1977)

Durch das Elektrospray-MS mit chemischer Ionisation (HRESI-MS) wurde die Fragmentierung der Substanz unterdrückt und die Masse konnte auf vier Stellen hinter dem Komma genau bestimmt werden (s. Abb.2.35, S.68) Die genaue Masse von **4** wurde im Spektrum bei $m/z = 347.1486$ ($[M+H]^+$) registriert, woraus sich die Summenformel $C_{19}H_{22}O_6$ ableiten lässt. Die Verbindung besitzt daher, genauso wie Verbindung **1**, neun Doppelbindungsäquivalente.

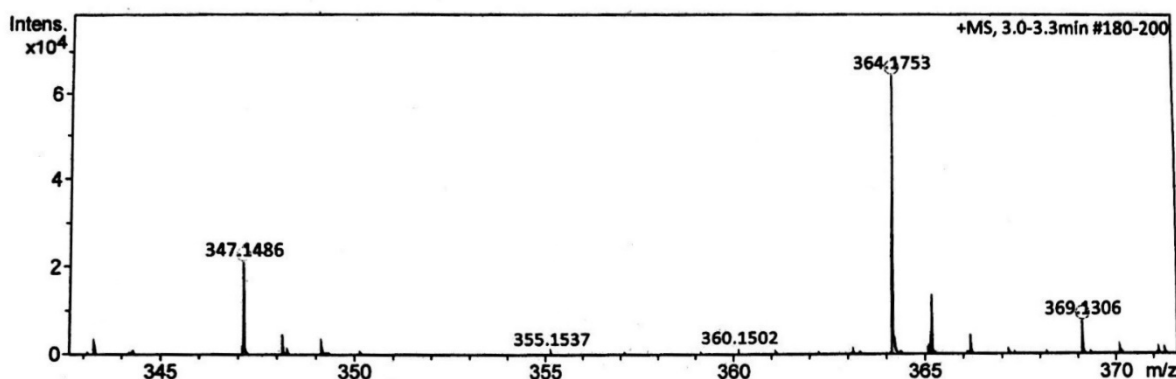


Abbildung 2.35: Massenspektrum von Verbindung **4** (HRESI-MS)

Zur Aufklärung der Struktur von **4** wurden ebenfalls ein- und zweidimensionale NMR Spektren in CD₃OD aufgenommen (s. Abb. 2.36 – 2.43, S.72 bis 79). Das ¹³C NMR Spektrum von Verbindung **4** (s. Abb. 2.38) zeigt achtzehn Kohlenstoffsignale, von denen 12 nach Auswertung DEPT-135 Spektrums (s. Abb. 2.39) protonierten Kohlenstoffen zugeordnet werden können. Fünf dieser Signale repräsentieren zweifach protonierte Kohlenstoffe, die übrigen Signale stehen für 7 Methyl- bzw. Methinkohlenstoffe mit einem bzw. drei gebundenen Protonen und 6 quartäre Kohlenstoffe, die nur in ¹³C NMR nicht aber im DEPT ein Signal zeigten. Aufgrund der genauen Massenmessung und der daraus abgeleiteten Summenformel sollte Verbindung **4** aber 19 Kohlenstoffe besitzen, woraus gefolgert werden konnte, dass das noch fehlende Signal entweder von einem der beiden Lösungsmittelsignale überdeckt wurde oder eines der im Spektrum gefundenen Signale muss zwei Kohlenstoffe repräsentieren. Im Vergleich zu **1** fällt der quartäre Kohlenstoff bei $\delta = 221.54$ ppm auf, bei dem es sich um das Signal des Carbonylkohlenstoffs eines Ketons handeln sollte. Ausgehend von der Massengleichheit und der gleichen Anzahl an Sauerstoffatomen, kann dies nur bedeuten, dass der sekundäre Alkohol in **1** durch ein Keton in **2** ersetzt wurde und in Gegenzug eine der in **1** vorhandenen exocyclischen Doppelbindungen nunmehr hydriert vorliegt. Die 2,3-Doppelbindung in der, an die alkoholische Gruppe an C-8 esterartig gebundenen Säure, sollte nach Auswertung des Massenspektrums noch vorhanden sein, so dass sich die, nach der Hydrierung entstandene Methylgruppe an C-4, C-10 oder C-11 befinden sollte. Tatsächlich findet sich ein Kohlenstoffsignal im Resonanzbereich aliphatischer Methylgruppen bei $\delta = 15.25$ ppm, das im ebenfalls aufgenommenen HSQC-Spektrum (s. Abb. 2.41) mit einem Dublett für drei Protonen bei $\delta = 1.23$ ppm koppelt. Wie bei **1** finden sich jeweils die Dubletts für die beiden Protonen an der exocyclischen Methylengruppe am γ -Lactonring (H-13 a,b) bei 5.83 und 6.21 ppm, bei ganz

ähnlichen Shiftwerten. Gleiches gilt für die beiden Signale von H-14 bei 4.91 und 5.11, die wie bei **1** als Singulett vorliegen. Über die im HSQC-Spektrum auftretenden Kreuzsignale lassen sich die zugehörigen Kohlenstoffe bei $\delta = 124.43$ (C-13) und 116.93 ppm (C-14) bei im Vergleich zu **1** ganz ähnlichen Shiftwerten identifizieren (122.39 und 118.15 in **1**).

Tabelle 2.5: NMR Daten von **4** (600 MHz in CD₃OD und DMSO-d₆; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H NMR		¹³ C NMR		DEPT
	CD ₃ OD	DMSO-d ₆	CD ₃ OD	DMSO-d ₆	
1	3.33 m	3.29 dd (8.2 u. 5.7)	41.47	40.06	CH
2a	2.47 m	2.34 m	43.07	42.35	CH ₂
2b		2.49 m			
3	-	-	221.54	218.63	
4	2.40 m	2.26 m	48.00	46.03	CH
5	2.41 m	2.38 m	52.29	50.24	CH
6	4.28 dd (9.8 u. 8.8)	4.32 d (10.4 u. 8.6)	83.59	81.07	CH
7	3.55 ddt (10.4 u. 8.7 u. 3.1)	3.50 ddt (10.3 u. 8.6 u. 3.1)	47.52	45.48	CH
8	5.14 m	5.06 ddd (10.4 u. 7.4 u. 5.8)	75.95	73.94	CH
9a	2.36 m	2.29 m	43.07	40.93	CH ₂
9b	2.96 dd (13.2 u. 5.8)	2.83 dd (13.3 u. 5.8)			
10	-	-	144.49	142.97	
11	-	-	138.45	137.25	
12	-	-	171.25	168.90	
13a	5.83 d (3.3)	5.67d (2.9)	124.43	122.69	CH ₂
13b	6.21 d (3.3)	6.08 d (2.9)			
14a	4.91 s	4.86 s	116.93	116.22	CH ₂
14b	5.11 s	5.02 s			
15	1.23 (6.8)	1.11 d (7.3)	15.25	14.73	CH ₃
1^c	-	-	166.31	164.65	
2^c	-	-	141.75	140.67	
3^a	6.00 d (1.3)	5.94 d (1.6)	126.23	124.60	CH ₂
3^b	6.34 d (1.3)	6.22 d (1.6)			
4^c	4.32 s	4.18 s	61.64	59.59	CH ₂

Da die Signale des Esters der α,β -ungesättigten 2-(Hydroxymethyl)-2-propensäure (s. Tab. 2.5, S. 70 und Abb. 2.36 bis 2.39) auch in den Spektren von **4** vorhanden waren, musste die 4,15-Doppelbindung bei **4** im Vergleich zu **1** hydriert vorliegen. Dementsprechend konnten die oben angesprochen Methylsignale dem C-15 zugeordnet werden. Das Signal für das H-4 fand sich nach Auswertung des H,H-COSY Spektrums (s. Abb. 2.40) als Multiplett bei $\delta = 2.40$ ppm. Der zugehörige Methinkohlenstoff fand sich im ^{13}C NMR und im DEPT Spektrum bei 48.00 ppm. Ausgehend von den Protonen an der Exomethylengruppe am γ -Lactonring (H-13a,b), die eine charakteristische allylische Kopplung mit dem Protonensignal bei $\delta = 3.55$ ppm in Höhe von 3.3 Hz zeigen (s. Abb. 2.40), konnte dieses Signal dem Brückenkopf H-7 zugeordnet werden ($\delta_{\text{C}} = 47.52$). Dieses Proton koppelt mit H-6 und H-8, deren Signale bei $\delta_{\text{H}} = 5.14$ (H-8) und 4.28 ppm (H-6) als Multiplett bzw. Triplet gefunden wurden. Die Größe der Kopplung konnte aufgrund der Aufspaltung des Signals von H-7 (ddt) ermittelt werden. Bei Auswertung dieses Signals konnten neben der allylischen Kopplung (3.3 Hz) zwei weitere Kopplungskonstanten in Höhe von 8.7 und 10.8 Hz ermittelt werden. Die kleinere der beiden findet sich im Triplettsignal des H-6 wieder, so dass hier, wie bei den Verbindungen **1** – **3** ein 6,7-trans-konfiguriertes γ -Lacton handelt. Die andere Kopplungskonstante in Höhe von 10.8 Hz, gehört demnach zur Kopplung mit H-8. Da das Proton an C-7 bei allen bisher in der Natur gefundenen Guaianoliden α -positioniert ist, muss das H-8 aufgrund der Größe der Kopplung β -ständig sein, wodurch sich der an dieser Position angeknüpfte Ester der 2-(Hydroxymethyl)-2-propensäure wie bei **1** in der α -Position befindet. Die Shiftwerte von H-8 bei $\delta = 5.14$ und das zugehörige Kohlenstoffsignal bei $\delta = 75.95$ im ^1H - und ^{13}C -NMR Spektrum von **4** bestätigen das Vorliegen des sekundären Alkohols an dieser Stelle im Molekül. Durch den Crosspeak zwischen dem Signal von C-1' bei $\delta = 166.31$ ppm und den H-8 wird die Position des Esters endgültig verifiziert (s. Abb. 2.43, S.79). Die zweite aus dem Signal von H-6 (s. Tab. 2.5 und Abb. 2.37) entnehmbare Kopplungskonstante ($J = 9.8$) gehört zu Kopplung mit dem Proton an C-5 ($\delta = 2.41$ ppm) und weist dieses Proton ebenfalls als trans zum β -ständigen H-6 aus. Wie bei **1** - **3** ist das H-5 α -ständig. Die bisher noch nicht erwähnten Methylengruppen C₂ und C₉ lassen sich aufgrund der Kopplungen mit H-1 und H-8 im COSY Spektrum lokalisieren. H-2 tritt als Multiplett bei $\delta = 2.47$ ppm auf, während die beiden Protonen am C-9 des Cycloheptanrings als Dublett vom Dublett bei $\delta = 2.96$ ppm (H-9b) und als Multiplett bei 2.36 ppm (H-9a) auftreten. Die zugehörigen Kohlenstoffe C-9 und C-2 konnten über ihre Cross-Peaks im HSQC Spektrum ermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Kohlenstoffshifts identisch waren und sich diese beiden Kohlenstoffe daher das Signal bei $\delta = 43.07$ teilen.

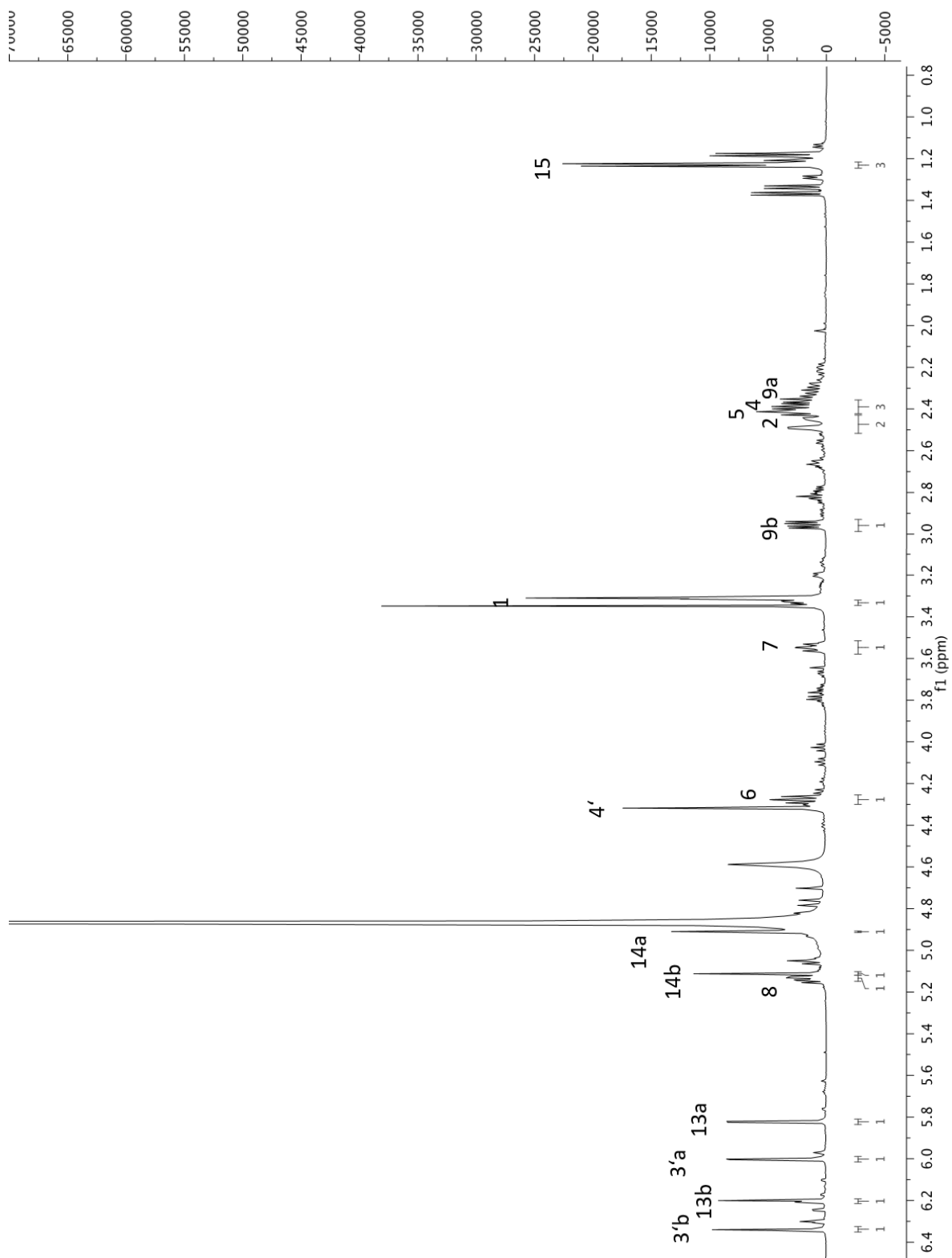


Abbildung 2.36: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung 4 (600 MHz in CD_3OD)

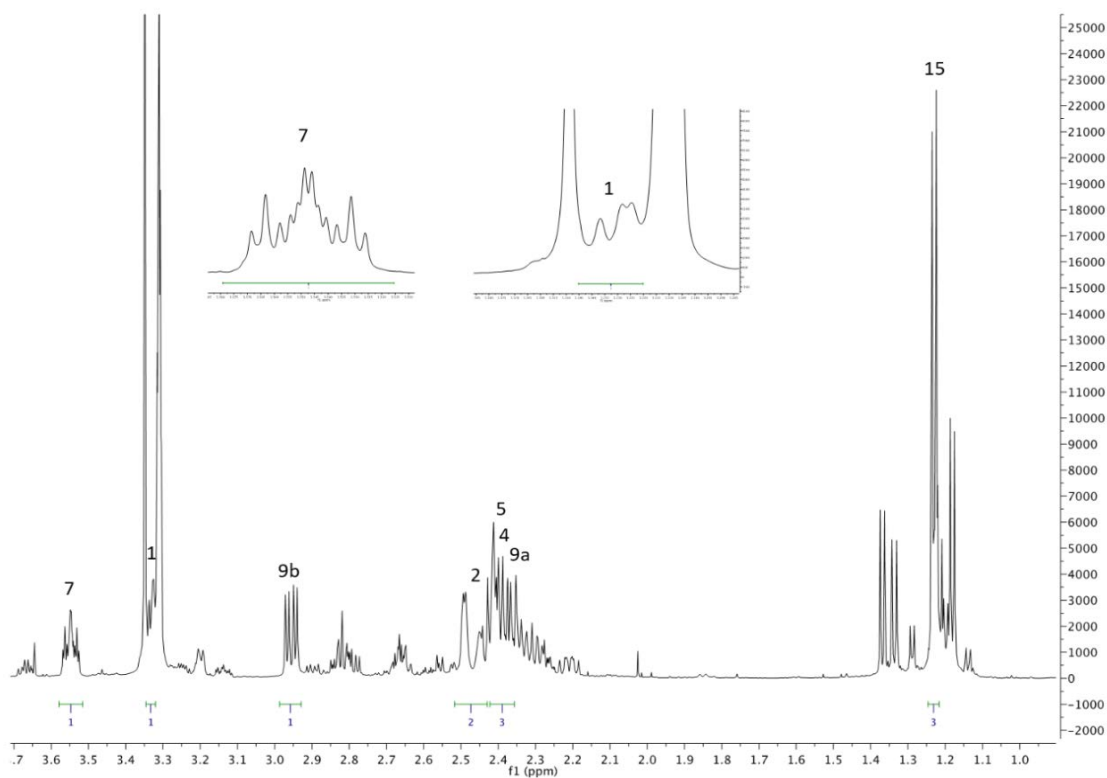
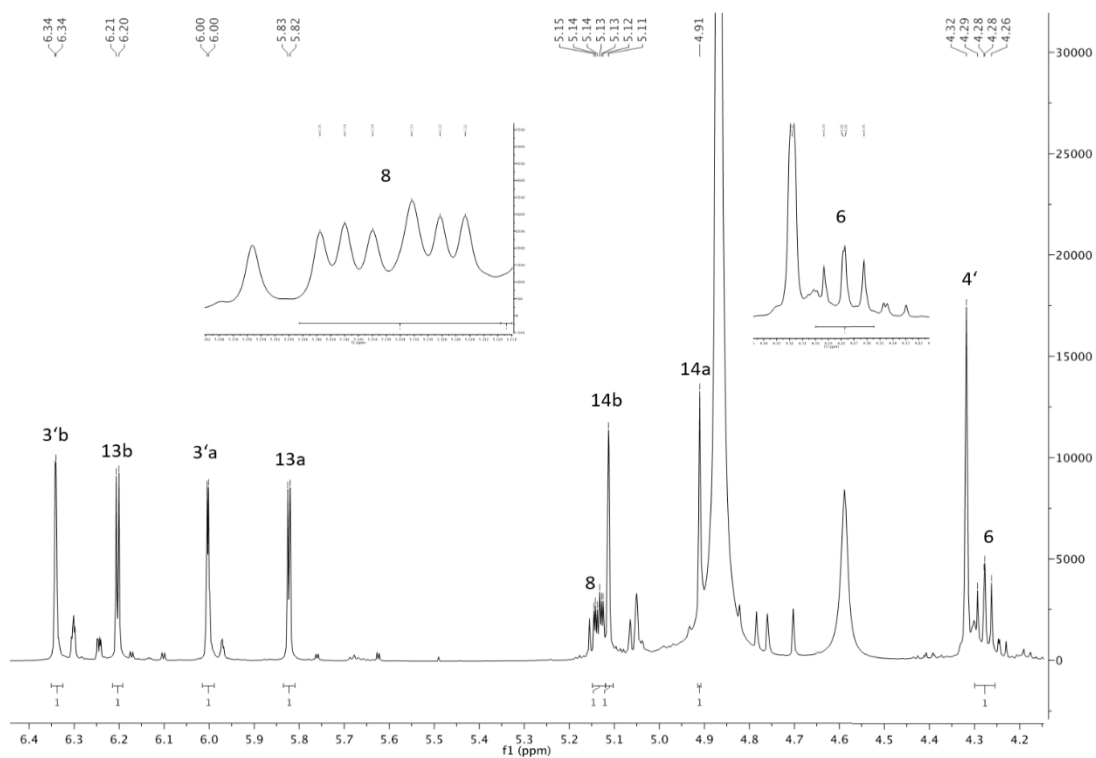


Abbildung 2.37: ^1H -NMR Spektrum (gespeizt) von Verbindung 4 (600 MHz in CD_3OD)

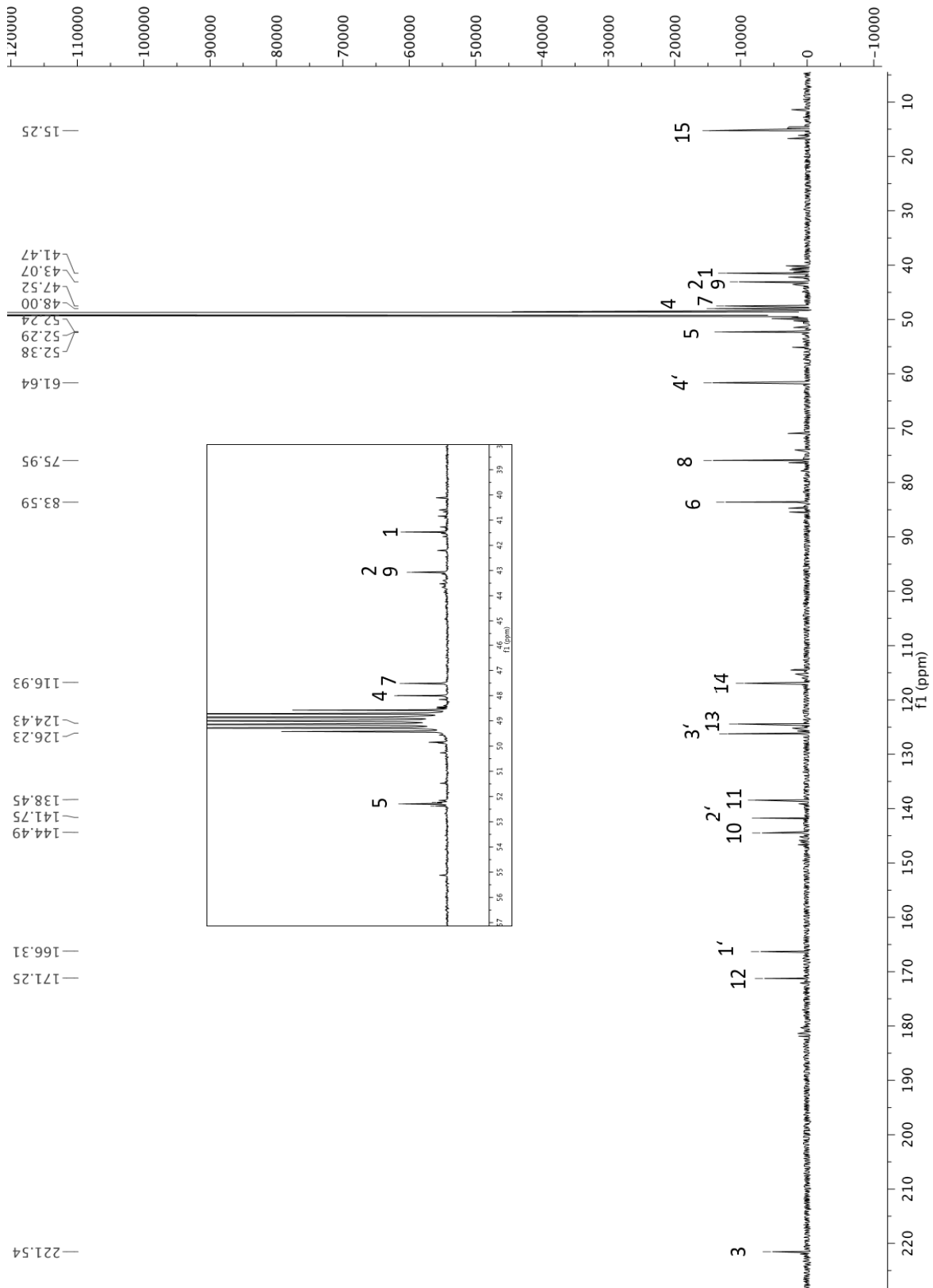


Abbildung 2.38: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 4 (150 MHz in CD_3OD)

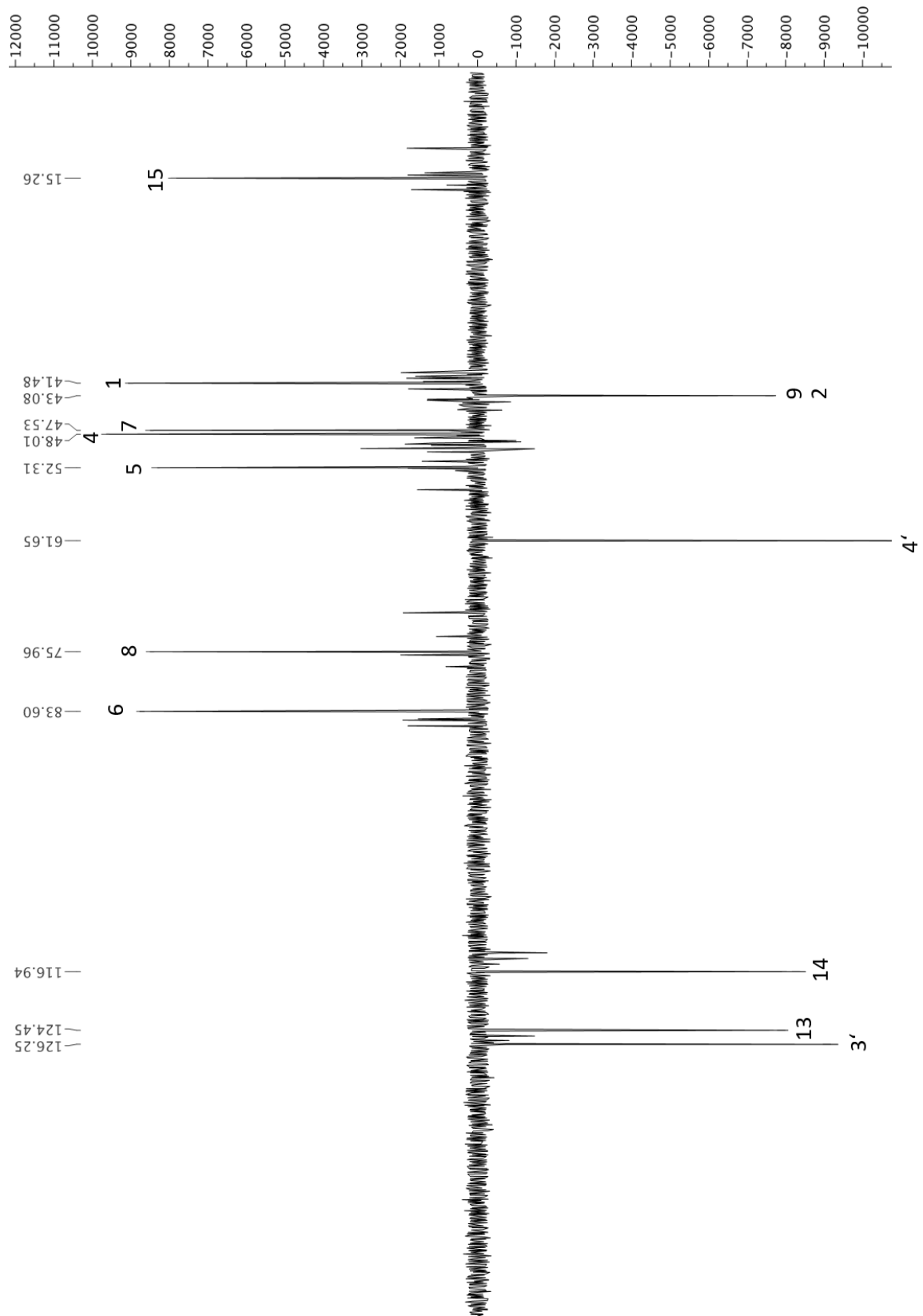


Abbildung 2.39: ^{13}C -NMR DEPT Spektrum von Verbindung 4 (150 MHz in CD_3OD)

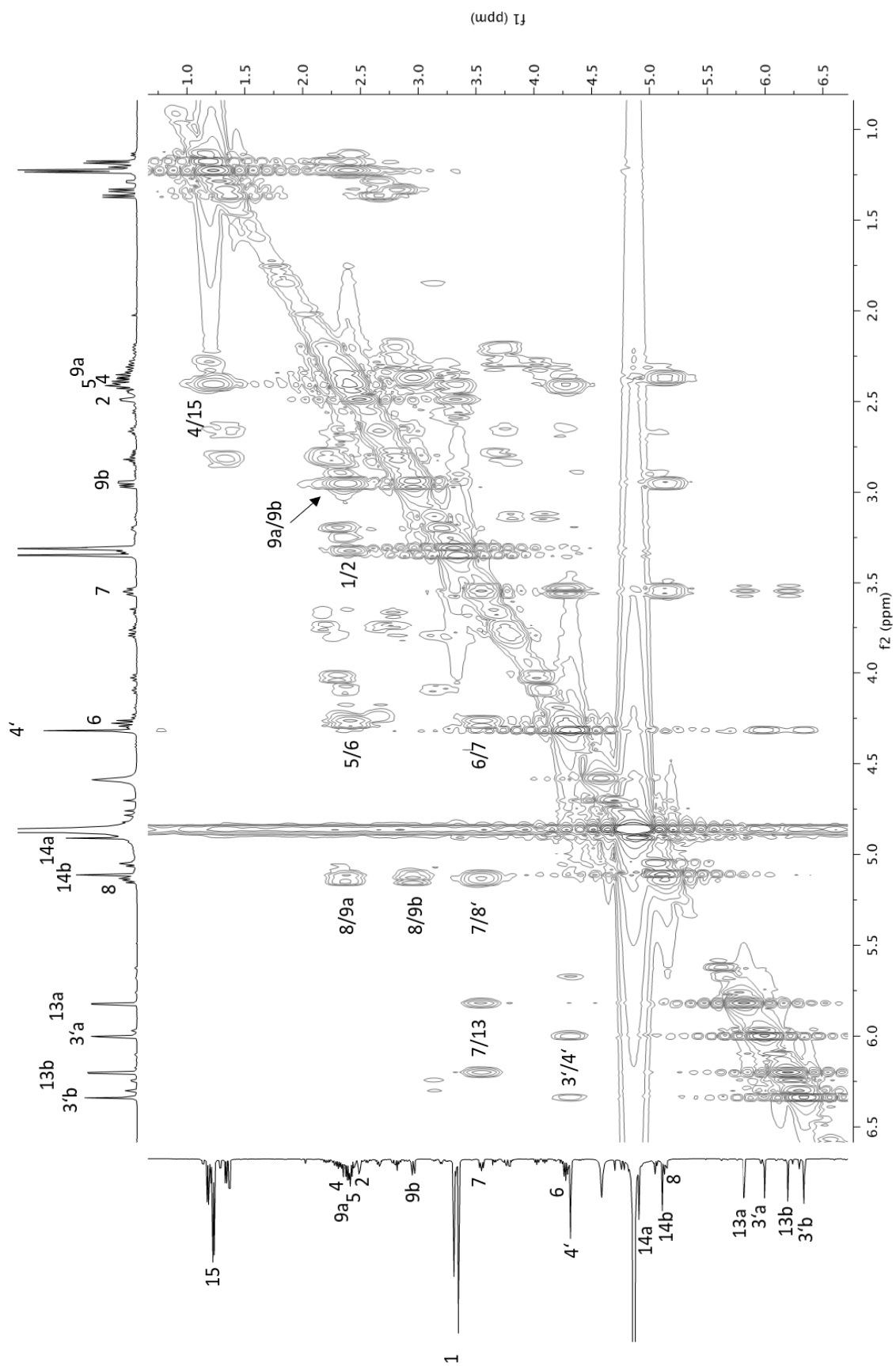


Abbildung 2.40: 2D-COSY-Spektrum von Verbindung 4 (600 MHz in CD₃OD)

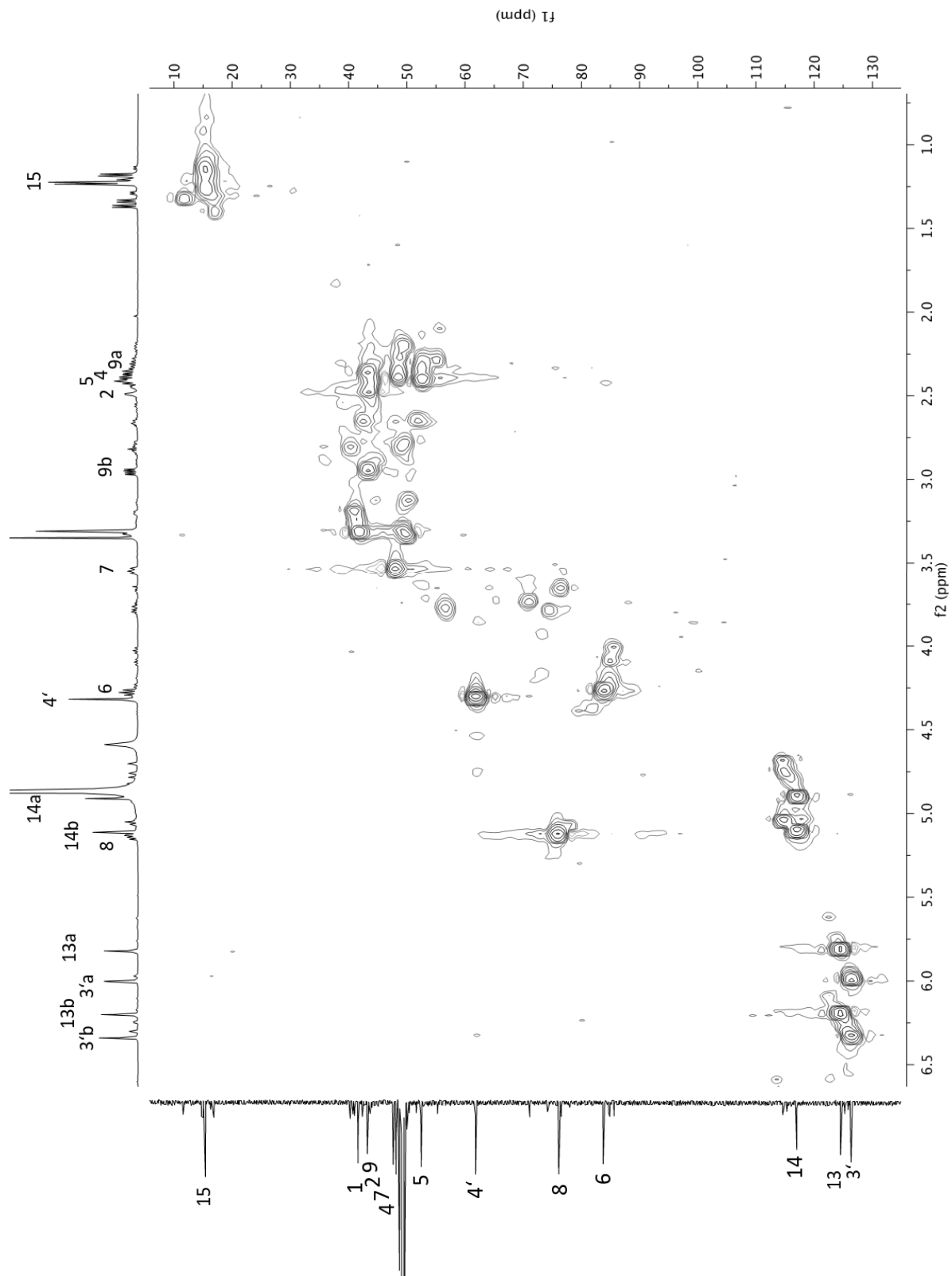


Abbildung 2.41: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 4 (600 MHz in CD₃OD)

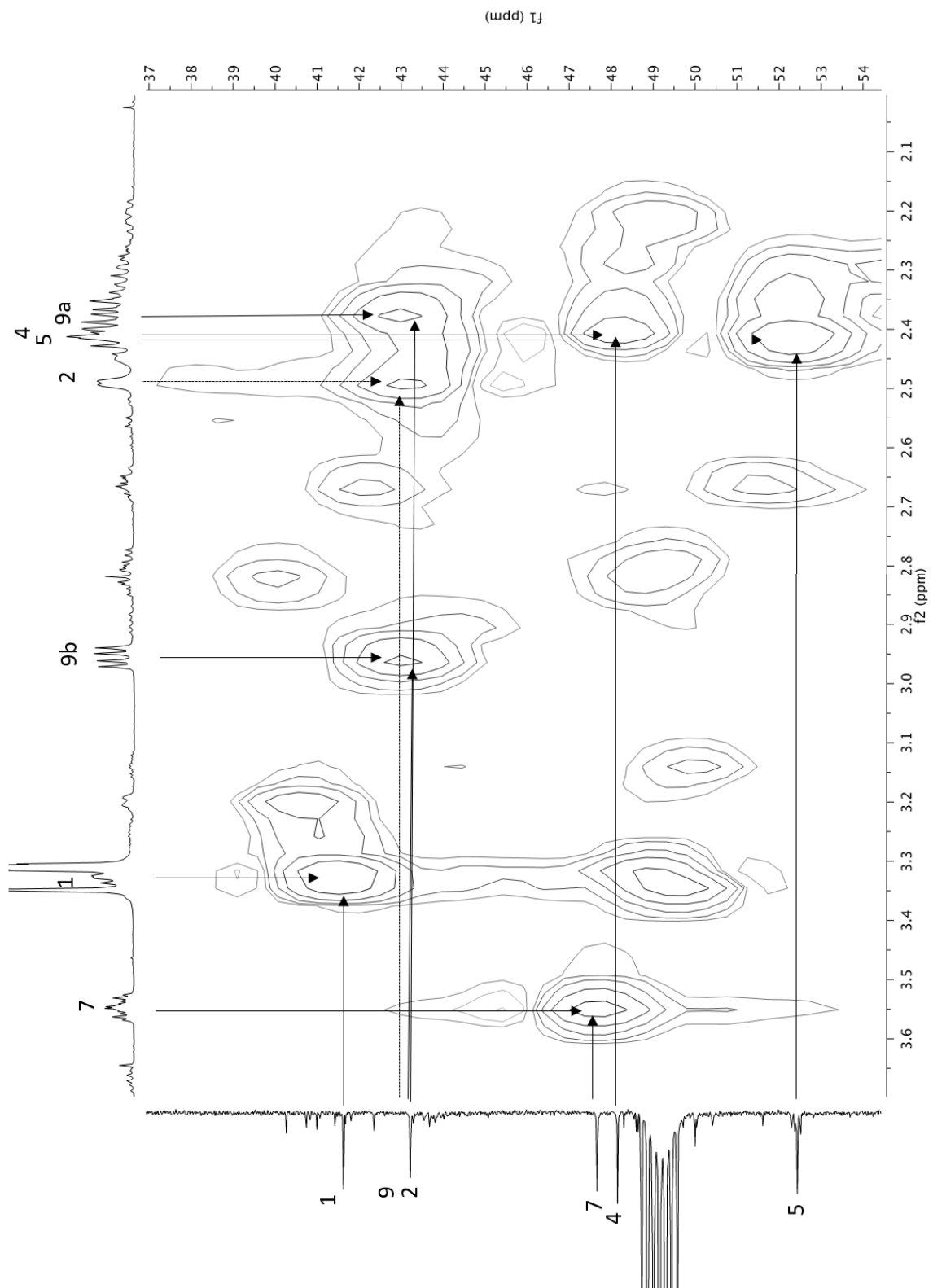


Abbildung 2.42: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von **4** (600 MHz in CD_3OD)

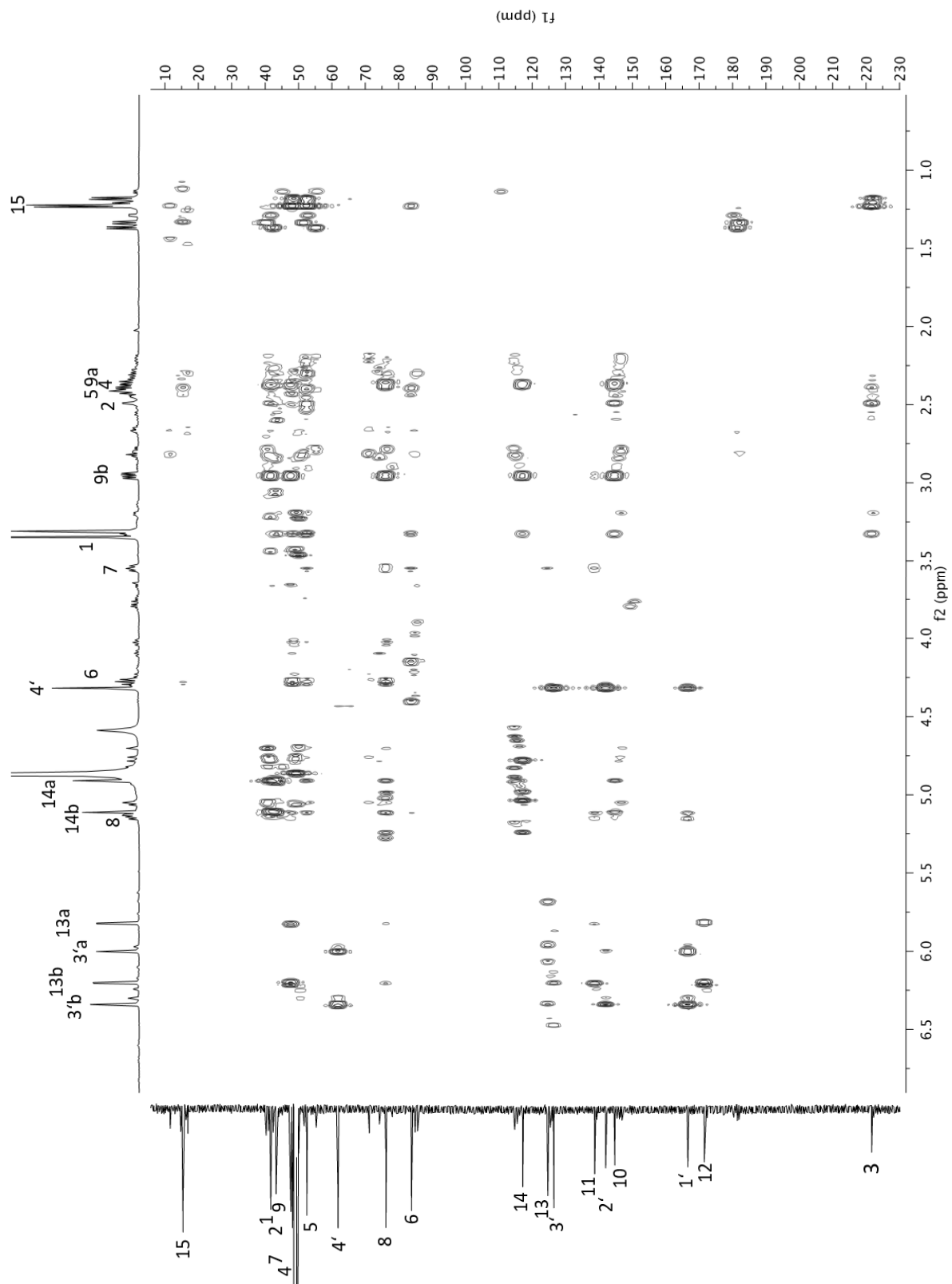


Abbildung 2.43: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 4 (600 MHz in CD_3OD)

Die Zuordnung aller Signale in den in CD₃OD aufgenommenen Spektren (s. Tab. 2.5), konnte durch die Auswertung des 2D-HMBC-Spektrums bestätigt werden. Bei Substanz **4** handelt es sich daher um ein 3-Oxo-8 β -hydroxy-guaia-10(14)-en-5 α ,6 β ,7 α ,11 α H-12,6 α -olid.

Da es sich bei dem Signal von H-5 im ¹H-NMR um ein Multiplett handelt, das mit Signal des H-4 überlagert ist, konnte die Stereochemie an diesem C-Atom mit Hilfe der in deuteriertem Methanol aufgenommenen Spektren nicht geklärt werden. Gleiches gilt für die Verknüpfung der beiden Ringe an dieser Position. Da auch das Signal für das Proton an C-1 bei $\delta = 3.33$ ppm keine Ermittlung der Kopplungskonstanten ermöglicht, bleibt die Verknüpfung der beiden Ringe an dieser Stelle zunächst unklar. Zur Verbesserung der Situation wurde ein Spektrensatz von Verbindung **4** in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆) aufgenommen (s. Tab. 2.5, S.70 und Abb. 2.44-2.53, S.82-91). Dabei zeigte sich, dass alle Signale leicht hochfeldverschoben vorlagen. Im Protonenspektrum (s. Abb. 2.44 und 2.45) wurde das Signal von H-8, das in CD₃OD von H-14b überlagert war, jetzt bei $\delta = 5.06$ als Dublett vom Dublett vom Dublett erkennbar. Es ließen sich drei Kopplungskonstanten erkennen, wodurch die bereits zuvor, nach Auswertung des Signals von H-7 im CD₃OD-Spektrum, ermittelte trans-Anordnung zwischen H-7 und H-8 bestätigt werden konnte. Die Kopplungskonstante $J_{7,8}$ beträgt 10.4 Hz. Leider sind die Signale von H-1, H-4 und H-5 immer noch nicht zweifelsfrei auswertbar, so dass auch nach Auswertung der in DMSO-d₆ aufgenommenen Spektren die Stereochemie in diesen drei Positionen unklar bleibt. Eine Auffälligkeit ergibt sich bei Betrachtung des ¹³C- und ¹³C-DEPT-Spektrums (s. Abb. 2.46 und 2.47). Bei Verwendung von DMSO-d₆ als Lösungsmittel fallen die Signale von C-2 und C-9 nicht mehr zusammen. In DMSO-d₆ treten sie getrennt bei $\delta = 42.35$ (C-2) und 40.93 (C-9) auf, während Sie in CD₃OD als ein ungetrenntes Signal bei $\delta = 43.07$ registriert wurden (s. Abb. 2.39).

Um die Stereochemie abschließend zu klären wurde, wie bei **2** und **3**, ein NOESY-Spektrum aufgenommen (s. Abb. 2.53). Aufgrund der im Spektrum auftretenden Kreuzsignale zwischen den drei äquivalenten Protonen der Methylgruppe an C-4 (H-15) mit den Protonen an C-5 und C-1 und dem gleichzeitigen Nuclear-Overhauser-Effekt zwischen dem β -ständigen H-6 und H-4, kann unzweifelhaft abgeleitet werden, dass die Methylgruppe an C-15, genauso wie H-5 und H-1 α -ständig sind. Es handelt sich somit bei Verbindung **5** um das 3-Oxo-8 β -hydroxy-guaia-10(14)-en-1 α ,4 α ,5 α ,6 β ,7 α ,6 α -olid.

Wenn man die Stereochemie an C-4 unbeachtet lässt, findet man bei der Struktursuche in den Chemical Abstracts unter www.scifinder.cas.org zwei Verbindungen mit unterschiedlichen CAS-Nummern (s. Tab. 2.6, S.92).

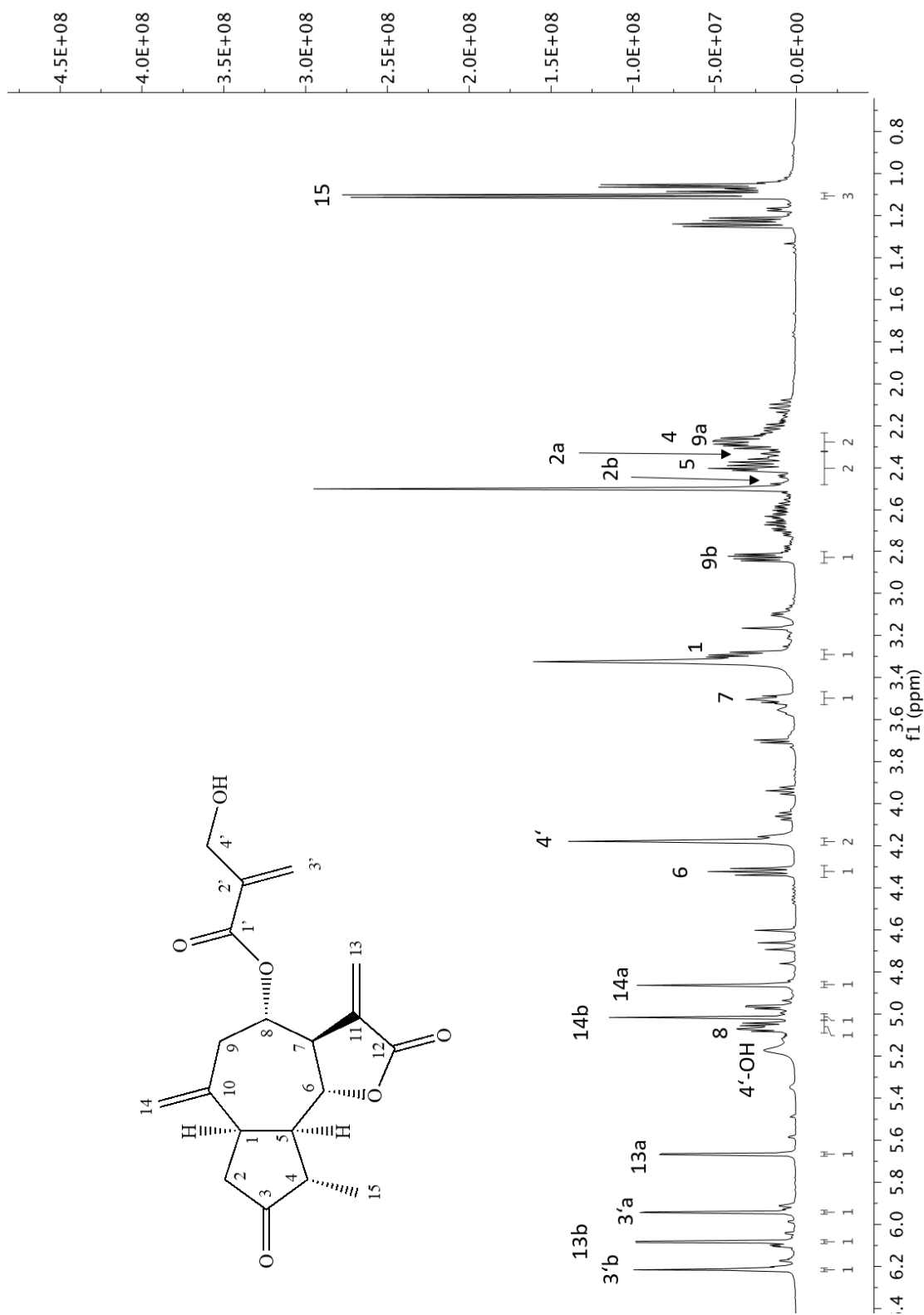


Abbildung. 2.44: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung 4 (600 MHz in DMSO-d_6)

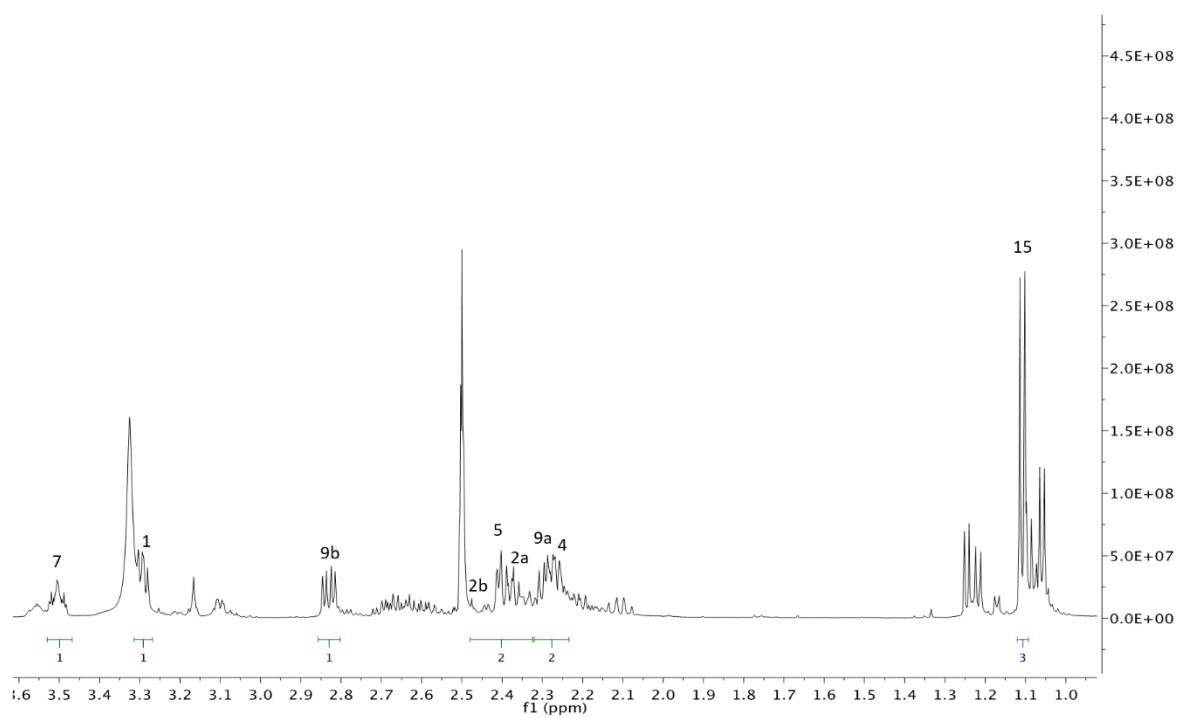
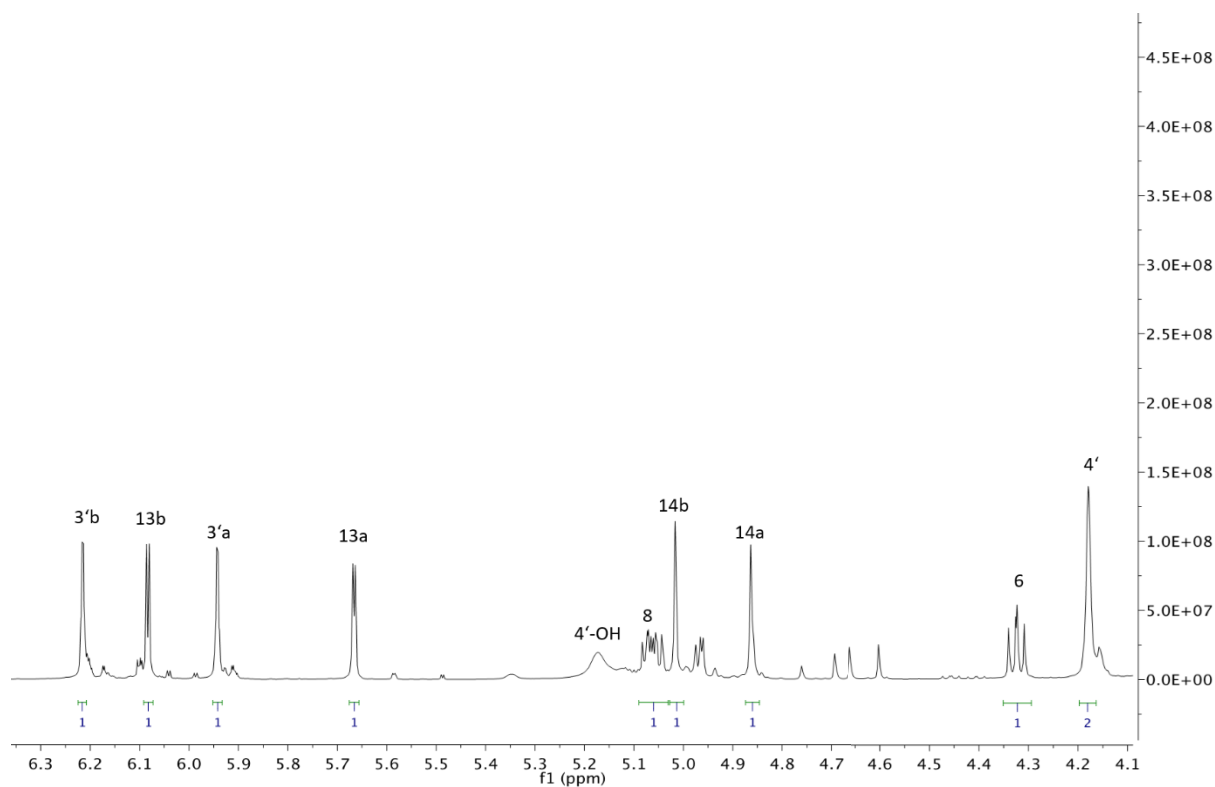


Abbildung 2.45: ¹H-NMR Spektrum (gespreizt) von Verbindung 4 (600 MHz in DMSO-d₆)

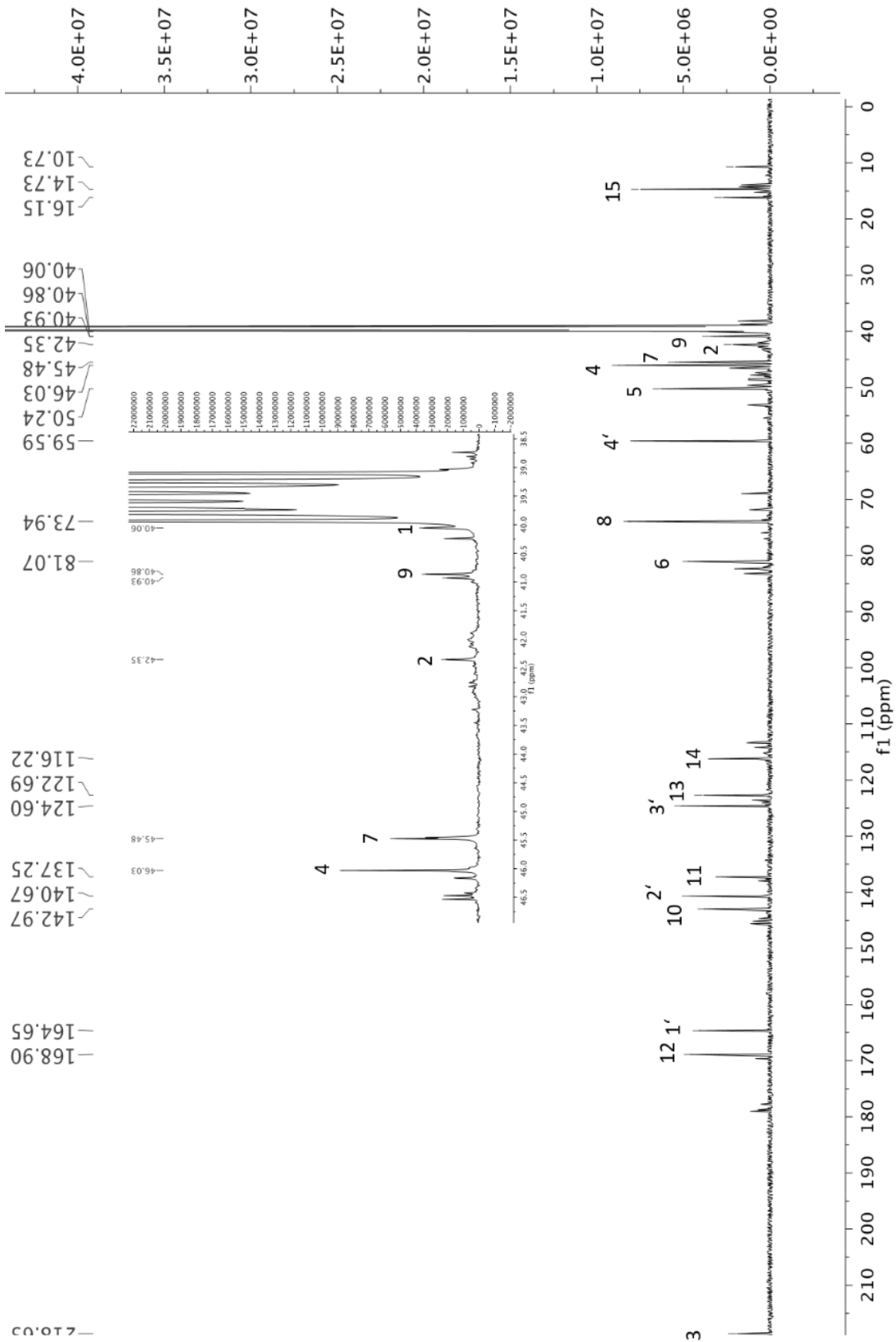


Abbildung 2.46: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 4 (150 MHz in DMSO-d_6)

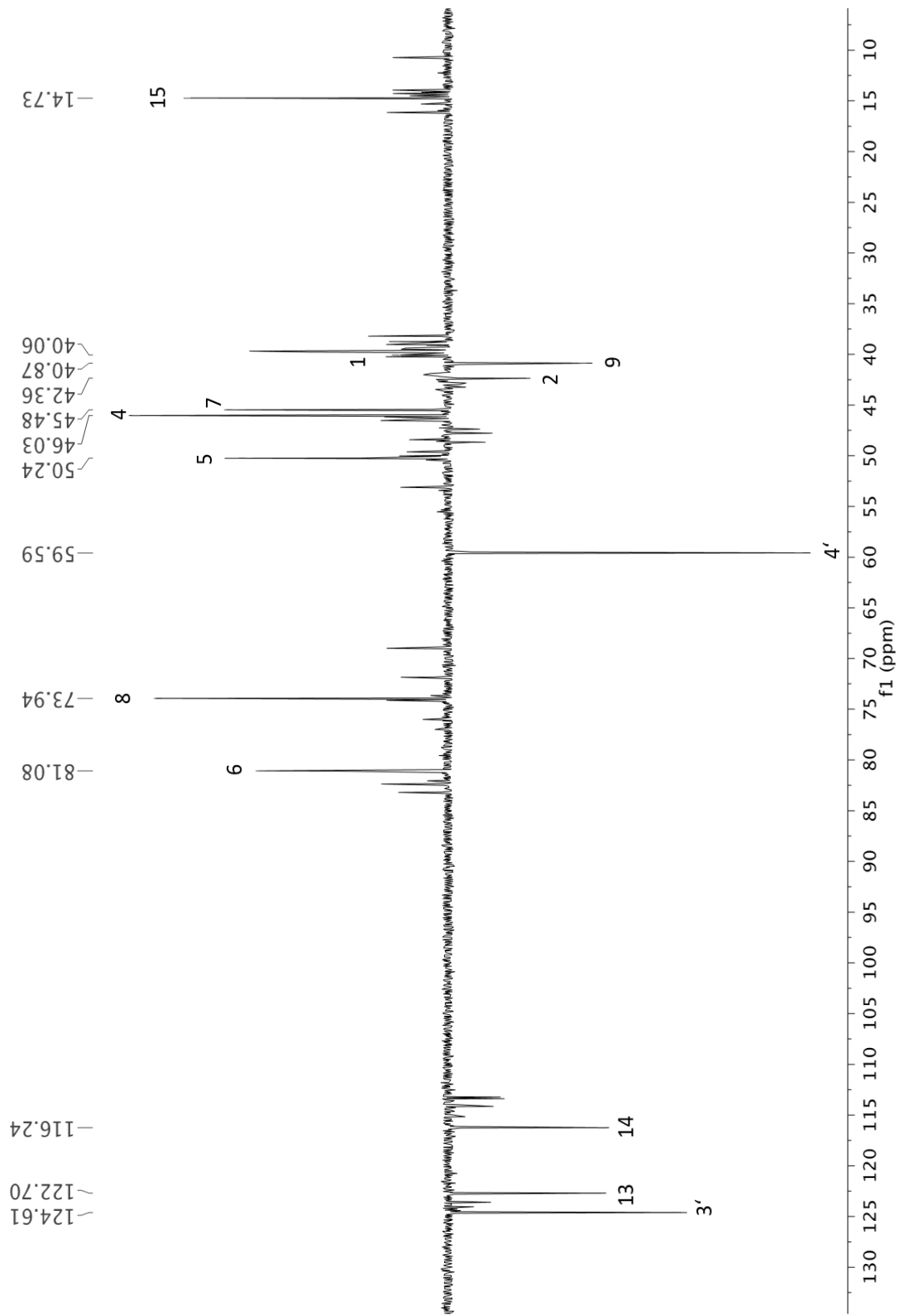


Abbildung 2.47: ^{13}C -NMR DEPT Spektrum von 4 (150 MHz in DMSO- d_6)

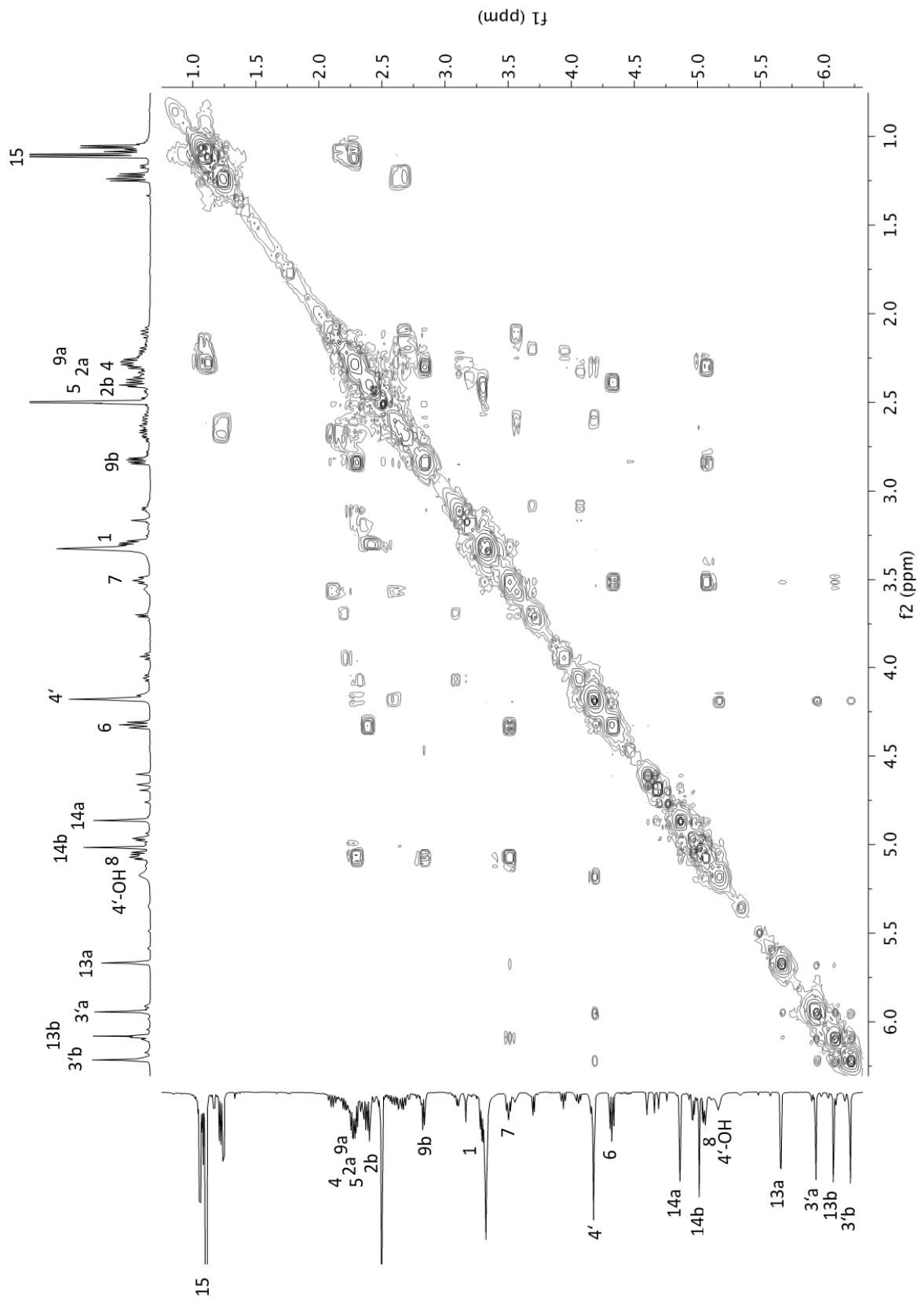


Abbildung 2.48: 2D-COSY-Spektrum von **4** (600 MHz in DMSO-d₆)

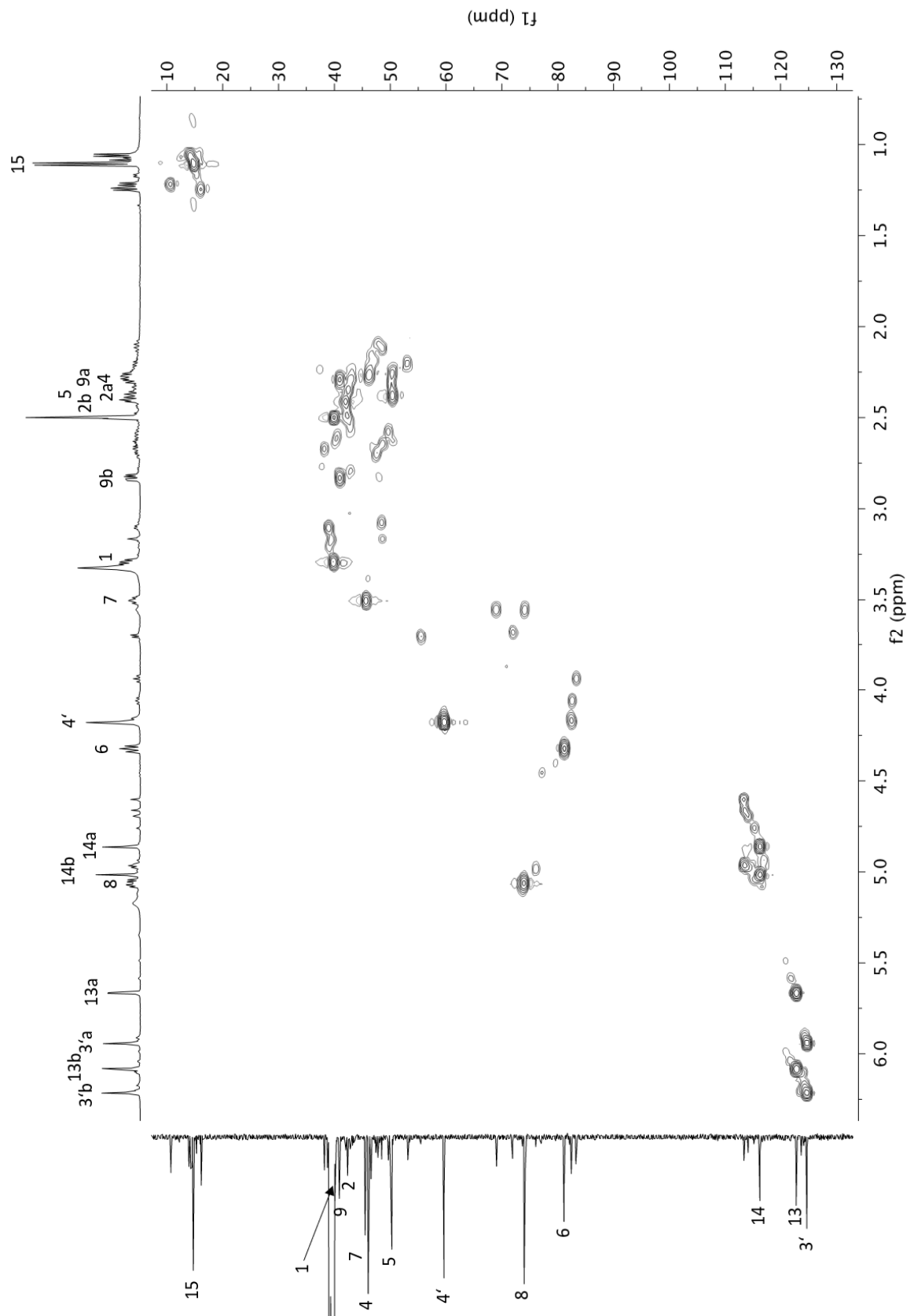


Abbildung 2.49: 2D-HSQC-Spektrum von **4** (600 MHz in DMSO- d_6)

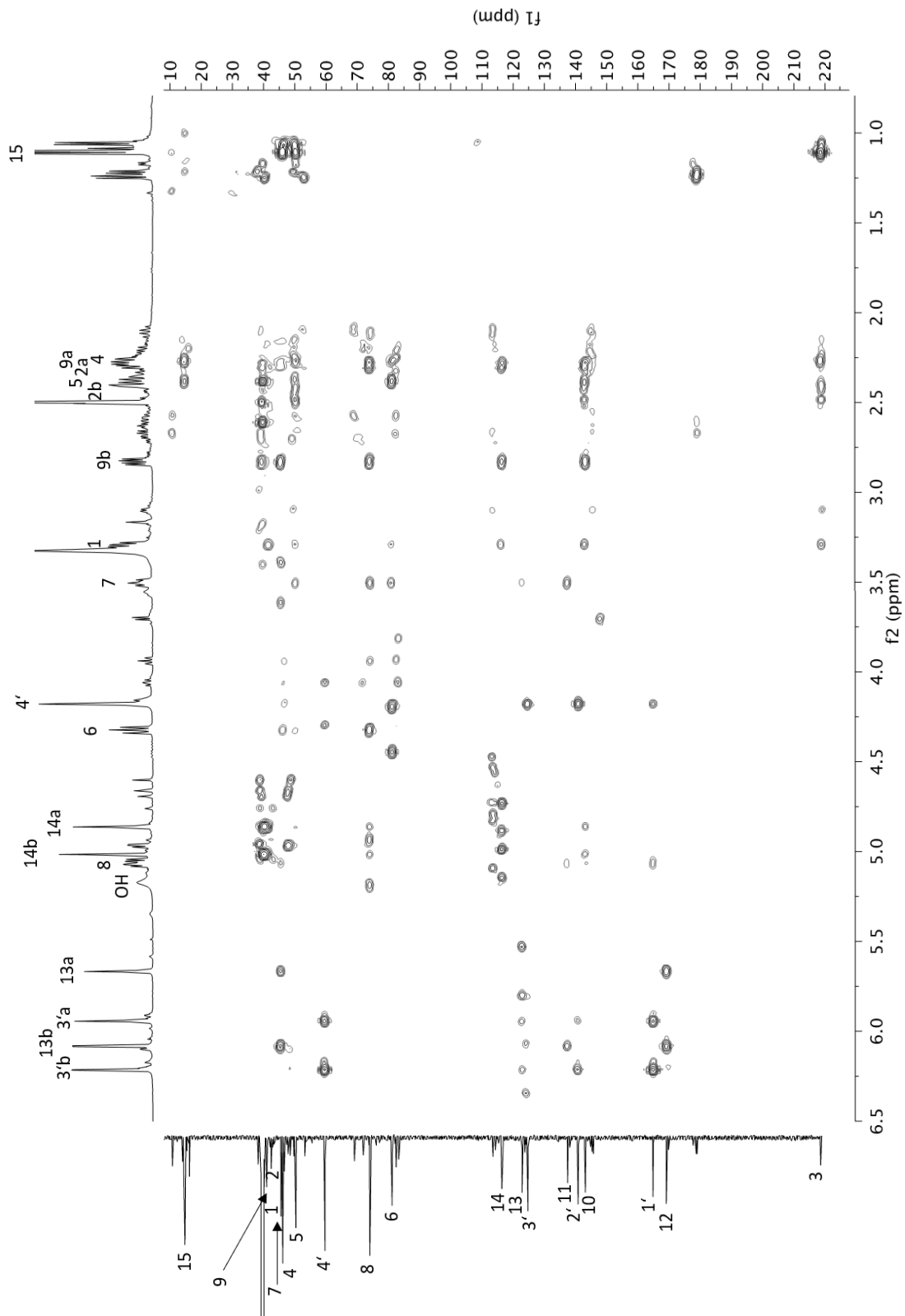


Abbildung 2.50: 2D-HMBC-Spektrum von **4** (600 MHz in DMSO-d₆)

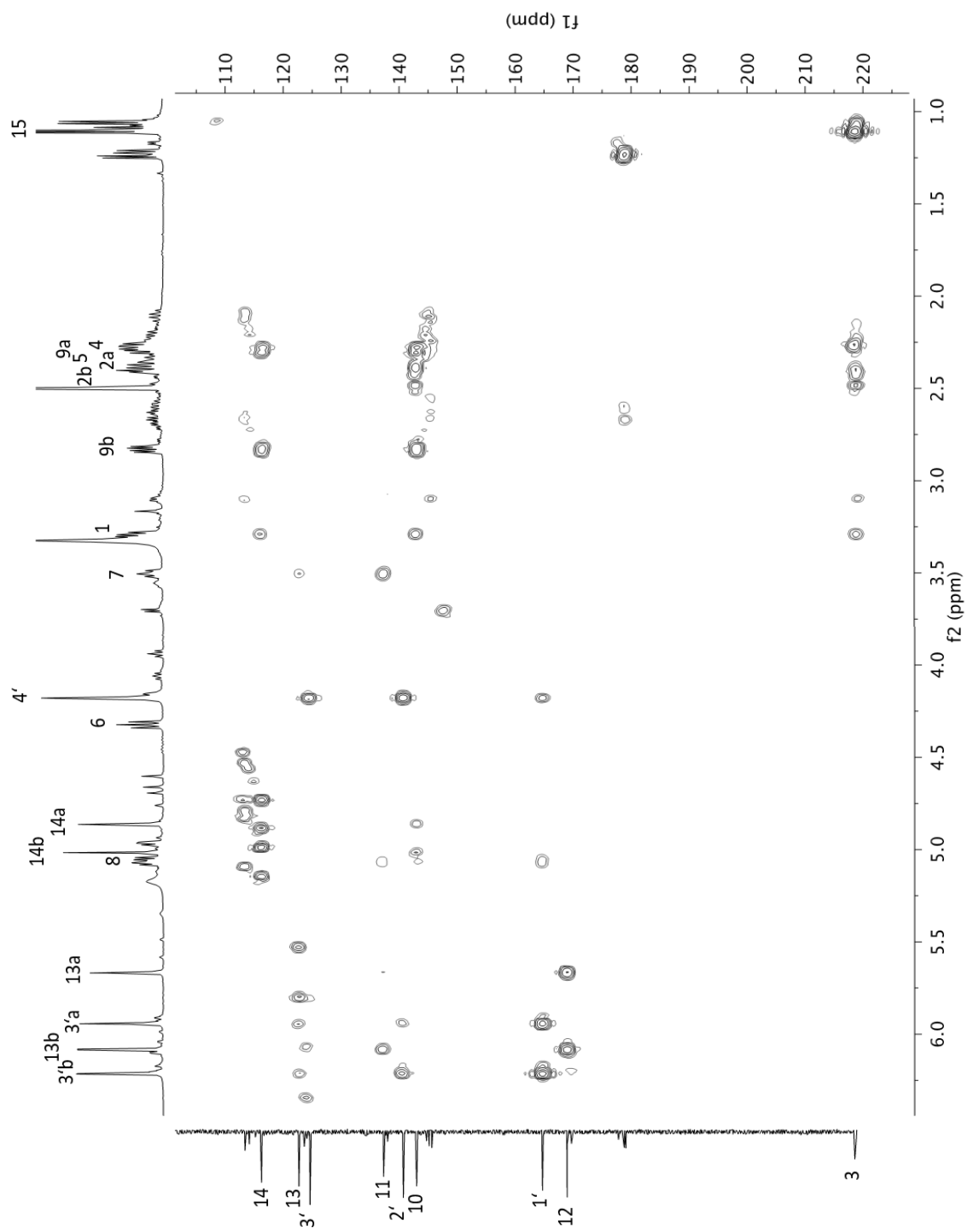


Abbildung 2.51: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von **4** (600 MHz in DMSO-d₆)

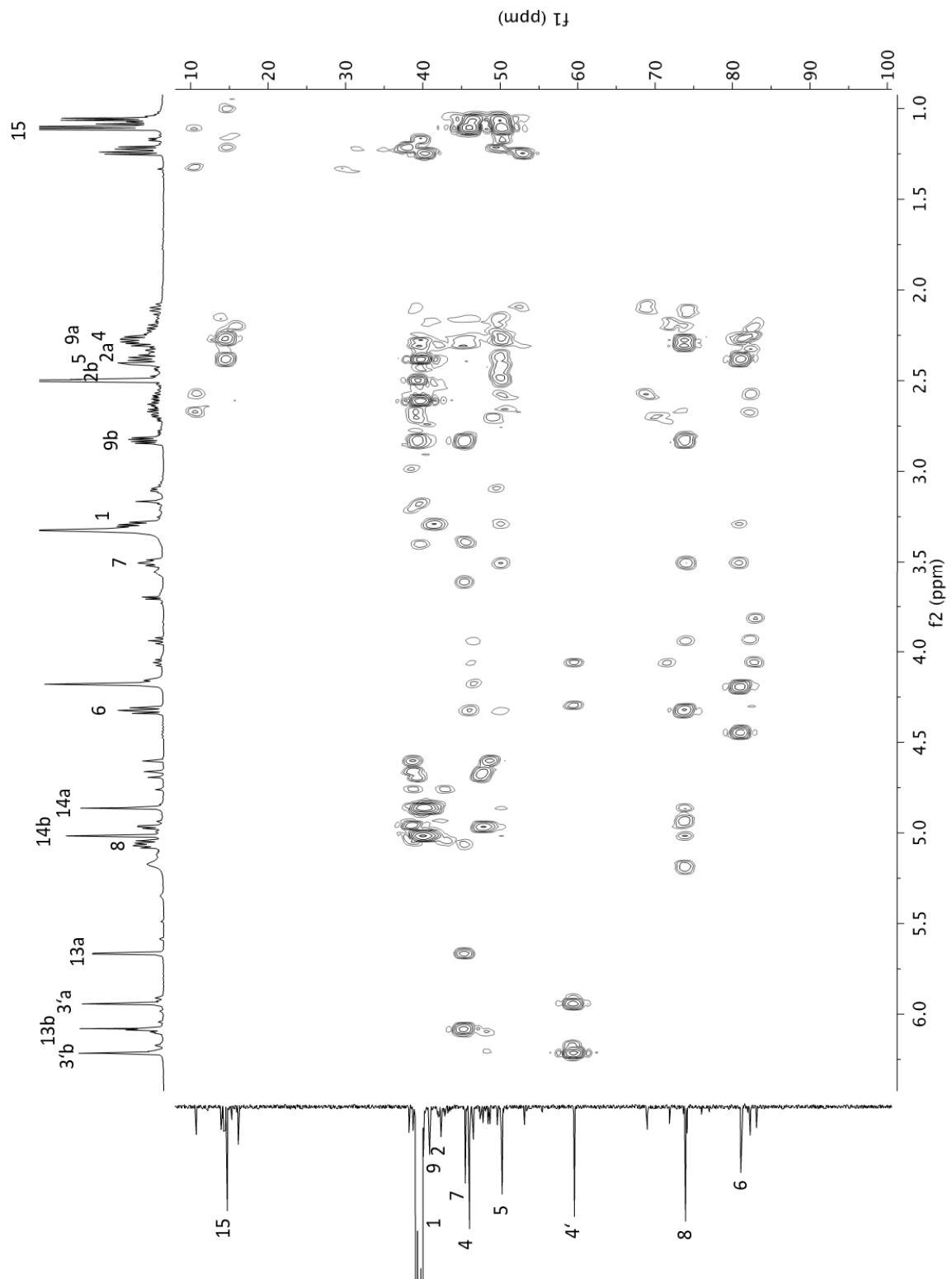


Abbildung 2.52: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von **4** (600 MHz in DMSO-d₆)

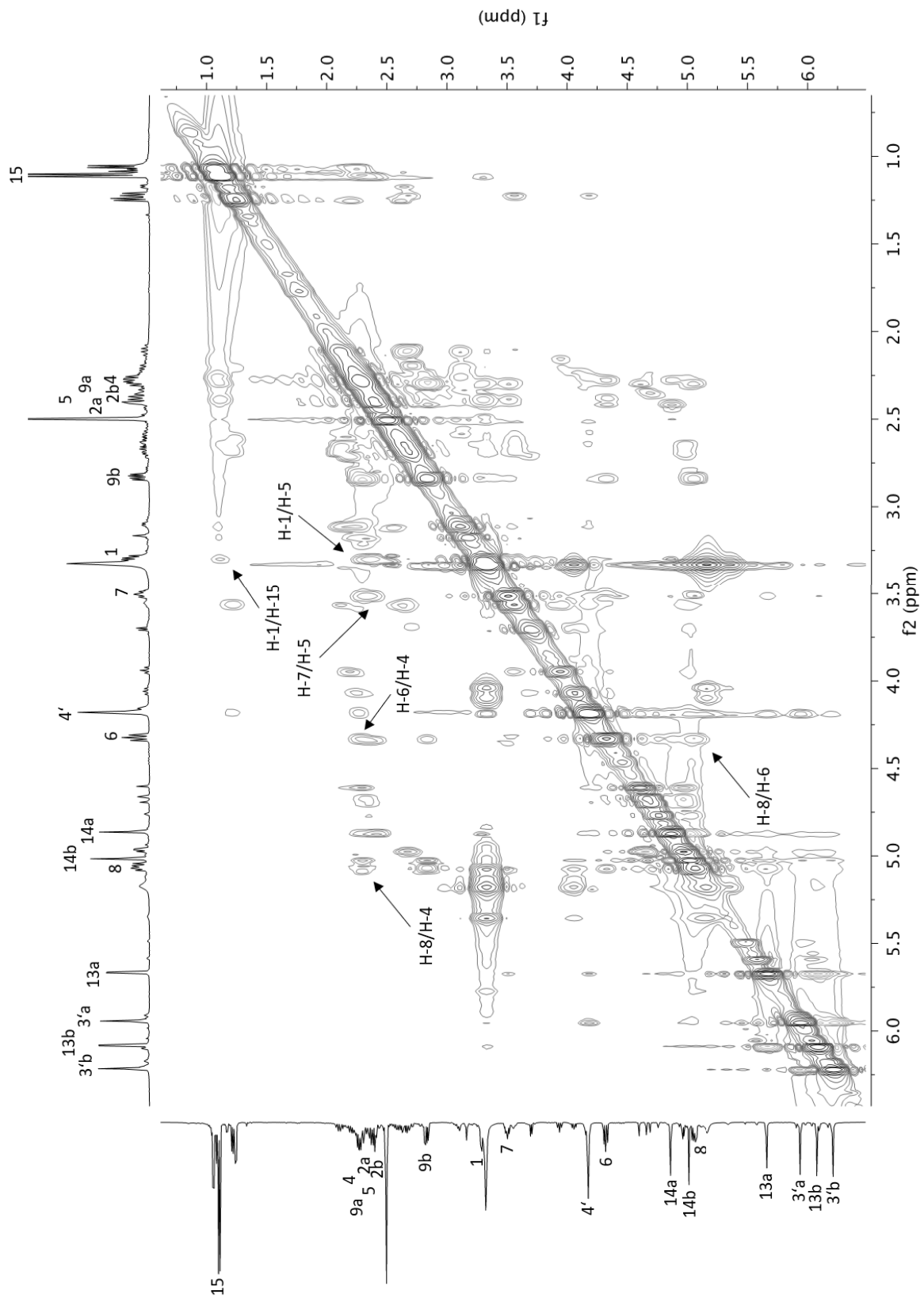
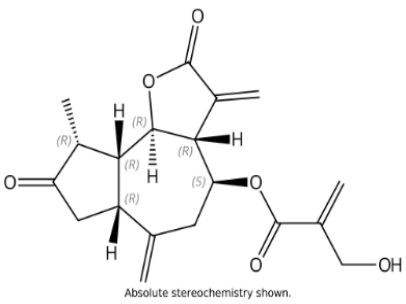
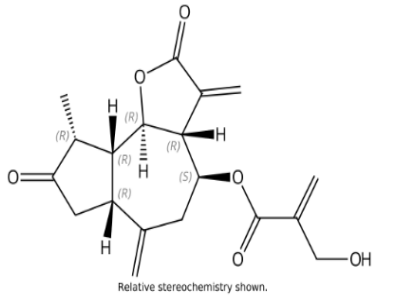


Abbildung 2.53: 2D-NOESY-Spektrum von Verbindung 4 (600 MHz in DMSO-d₆)

Tab 2.6: In den Chemicals Abstracts ausgewiesene Strukturen mit gleicher Esterkonfiguration an C-8 nach Suche bei www.scifinder.cas.org

CAS-Nummer	1482499-27-3	1212401-38-1
Struktur	 <p>Absolute stereochemistry shown.</p>	 <p>Relative stereochemistry shown.</p>
Summenformel	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	C ₁₉ H ₂₂ O ₆
Bezeichnung	2-Propenoic acid, 2-(hydroxy-methyl)-(3aR,4S,6aR,9R,9aR,9bR)-dodecahydro-9-methyl-3,6-bis(methylene)-2,8-dioxoazuleno[4,5-b]furan-4-yl ester	2-Propenoic acid, 2-(hydroxymethyl)-(3aR,4S,6aR,9R,9aR,9bR)-dodecahydro-9-methyl-3,6-bis(methylene)-2,8-dioxoazuleno[4,5-b]furan-4-yl ester, <i>rel</i> -
	Hartwell et al (2013)	Kato et al. (2011)

Bei beiden in die Chemical Abstracts aufgenommen Verbindungen, die im Gegensatz zu **4** eine 4 β -ständige Methylgruppe besitzen, handelt es sich vermutlich um die identische Substanz. Zu jeder Verbindung wird nur eine Quelle in der Literatur angegeben (s. Tab 2.6, S.92). Der Unterschied zwischen den beiden Verbindungen besteht lediglich darin, dass die Substanz im japanischen Patent (Kato et. al.) bezüglich der Stereochemie als relativ angegeben wird, während sie in der Arbeit von Hartwell et al (2013) mit ihrer absoluten Konfiguration angegeben wird. In beiden Publikationen findet sich keine direkte natürliche Quelle. Hartwell et al. verwendeten die Substanz bei ihren Screening-Untersuchungen zur Inhibition von Leukämie-Stammzellen. In der Veröffentlichung wurden mehr als 150 Substanzen ganz unterschiedlicher Struktur hinsichtlich ihrer Wirkung im angegebenen Testsystem überprüft. In der Veröffentlichung selbst findet sich das Stichwort „sesquiterpene lactone“ nur im Zusammenhang mit Parthenolid, einem aktiven Sesquiterpenlacton aus *Tanacetum parthenium*, dem in den USA häufig verwendeten „feverfew“, und dem Verweis auf eine Tabelle im Supplementary Material. Dort findet man das Isomer der von uns isolierten Verbindung **4** als Nummer 122 unter der Bezeichnung BRD6717. Als Quelle für die Verbindung wird „Analyticon“ angegeben, ohne weitere Information zur Bedeutung dieser Bezeichnung. In den Vereinigten Staaten von Amerika gibt es unter dem Namen eine Firma Analyticon Discoveries LLC in Rockville, MD 20855. Auf der Webseite gibt es grundsätzliche Informationen zu synthetischen und natürlichen Produkten, so dass nicht geklärt werden kann, um was es sich handelte. Kato et al verwendeten eine Verbindung von der Firma Aurora Fine Chemicals LLC aus San Diego, CA 92126, USA. Auf dieser Webseite gibt es eine Suchfunktion über die Struktur oder über das Molekulargewicht. Die Substanz ist dort zu einem Preis von 1290,- US \$ für eine Substanzmenge von 5 mg käuflich zu erwerben, eine natürliche Quelle ist jedoch nicht angegeben. Da es in den Chemical Abstracts keine weiteren Publikationen gibt, die die hier isolierte Verbindung **4** aus natürlicher Quelle beschreiben, handelt es sich bei **4** vermutlich um einen neuen Naturstoff.

Der dem Ester zugrunde liegende Sesquiterpenlactonalkohol wurde unter der Bezeichnung Grossheimin bereits im Jahre 1964 von Rybalko et al. aus *Grossheimia macrocephala* isoliert. Vier Jahre später wurde diese Verbindung auch in *Amberboa lippii* gefunden (Breton et al., 1968). 1972 taucht dann erstmals der Name Grosheimin in der Literatur auf (Corbella et. al., 1972), möglicherweise durch einen Schreibfehler, danach findet sich auch noch die Bezeichnung Grossheimin (Naidenova et al., 1977). Neben vielen synthetischen Esterderivaten, die zum Teil zur Strukturaufklärung genutzt wurden, aber wegen der vielfältigen Bioaktivitäten

von Sesquiterpenlactonen (Gonzales et al, 1978; Passreiter et al, 1997) auch zur pharmakologischen Testung synthetisiert wurden, gibt es unterschiedliche, natürlich vorkommende Esterderivate, von denen einige in Abb. 2.54 (S. 94) dargestellt sind.

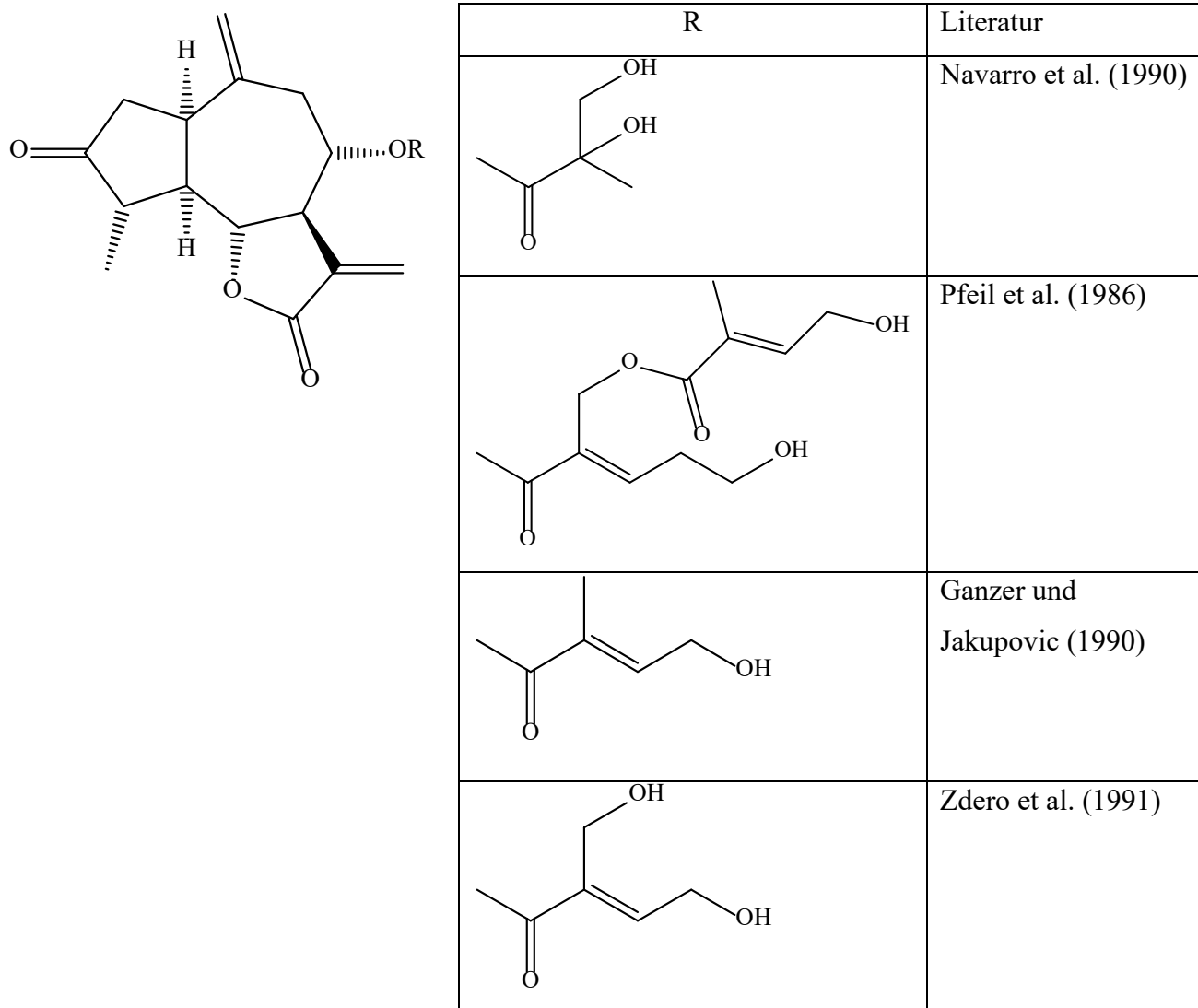


Abbildung. 2.54: Natürlich vorkommende Derivate von Verbindung 4.

Leider wurden nicht bei allen Substanzen komplette NMR Daten publiziert. In vielen Fällen wurden nur ^1H Daten veröffentlicht. Bei Navarro et. al (1990) finden sich die ^{13}C Daten zum dort gefundenen 2,3-Dihydroxy-isobuttersäure Ester in deuteriertem Benzol (C_6D_6). Die dort veröffentlichten Shiftwerte passen insgesamt sehr gut zu den hier ermittelten Daten.

Kurz nachdem unsere Strukturaufklärung abgeschlossen war, veröffentlichte eine Arbeitsgruppe aus Tunesien und Griechenland eine Arbeit zur Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus in Tunesien gesammeltem Pflanzenmaterial von *Volutaria lippii* (Rafrafi et al, 2021). Neben Cynaropikrin, das schon aus *Amberboa lippii*, eine für *Volutaria lippii* synonyme Bezeichnung (Mezache et al, 2010) bekannt war, und das auch hier isoliert werden konnte (Verbindung **1**), wurde auch ein Sesquiterpenlacton mit der Konfiguration von Verbindung **4** isoliert. Die Autoren konnten jedoch nicht klären, ob die Methylgruppe an C-4 α - oder β -ständig ist, so dass zunächst unklar bleibt, ob es sich um die identische Verbindung oder das C-4-Epimer von **4** handelt. Bei Durchsicht der von Rafrafi et. al (2021) veröffentlichten Daten und der im beigefügten „Supplementary Material“ veröffentlichten Spektren, fielen zusätzliche Ungereimtheiten auf. Tabelle 2.7 zeigt die von Rafrafi veröffentlichten, in CD₃OD gemessenen NMR Daten im Vergleich zu den von uns ermittelten Shiftwerten. Es fällt sofort auf, dass nicht alle ¹³C Daten mit unseren übereinstimmen. Abweichungen gibt es insbesondere bei den Werten für die Kohlenstoffe 2 und 9, die bei uns nur ein gemeinsames Signal bei $\delta = 43.07$ ppm im ¹³C NMR zeigen, während Rafrafi et al. (2021) die Signale der beiden Kohlenstoffe bei $\delta = 43.6$ (C-2) und 42.9 (C-9) ppm registriert haben. Da die Protonenwerte von H-9 völlig identisch und die Werte von H-2 nur geringfügig unterschiedlich waren (s. Tab. 2.5, S.70), glaubten wir zunächst an einen Fehler bei der Aufnahme unseres ¹³C NMR Spektrum, weshalb wir die Substanz erneut gemessen haben. Das Ergebnis war jedoch gleich und die Kohlenstoffe C-2 und C-9 fielen erneut zusammen. Anschließend haben wir uns die im Supplementary Material zur Verfügung gestellten Spektren näher angeschaut (s. Abb. 2.55-2.58, S.97-100).

Tabelle 2.7: Vergleich der NMR-Daten von **4** mit den Werten von Rafrafi et al. (2021)
(600 bzw. 125 MHz in CD₃OD; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H NMR		¹³ C NMR		
	4	Rafrafi	4	Rafrafi	$\Delta\delta_c$
1	3.33 m	3.35 m	41.47	41.3	0.17
2a 2b	2.47 m	2.55 dd (18.7 u. 8.8) 2.51 dd (18.7 u. 5.3)	43.07	43.6	-0.53
3	-		221.54	220.9	0.64
4	2.40 m	2.42 m	48.00	47.8	0.20
5	2.41 m	2.43 m	52.29	52.0	0.29
6	4.28 dd (9.8 u. 8.8)	4.28 dd (9.6 u. 8.8)	83.59	83.4	0.19
7	3.55 ddt (10.4 u. 8.7 u. 3.1)	3.54 dd (9.3 u. 8.8)	47.52	47.4	0.12
8	5.14 m	5.14 m	75.95	75.7	0.25
9a 9b	2.36 m 2.96 dd (13.2 u. 5.8)	2.36 dd (13.2 u. 8.0) 2.96 dd (13.2 u. 5.8)	43.07	42.9	0.17
10	-	-	144.49	144.2	0.29
11	-	-	138.45	138.3	0.15
12	-	-	171.25	170.8	0.45
13a 13b	5.83 d (3.3) 6.21 d (3.3)	5.83 (3.2) 6.20 d (3.2)	124.43	124.3	0.13
14a 14b	4.91 s 5.11 s	4.93 s 5.13 s	116.93	116.8	0.13
15	1.23 (6.8)	1.25 d (7.0)	15.25	14.9	0.35
1'	-	-	166.31	166.0	0.31
2'	-	-	141.75	141.7	0.05
3'a 3'b	6.00 d (1.3) 6.34 d (1.3)	6.02 d (1.3) 6.36 d (1.3)	126.23	126.0	0.23
4'	4.32 s	4.34 s	61.64	61.4	0.04

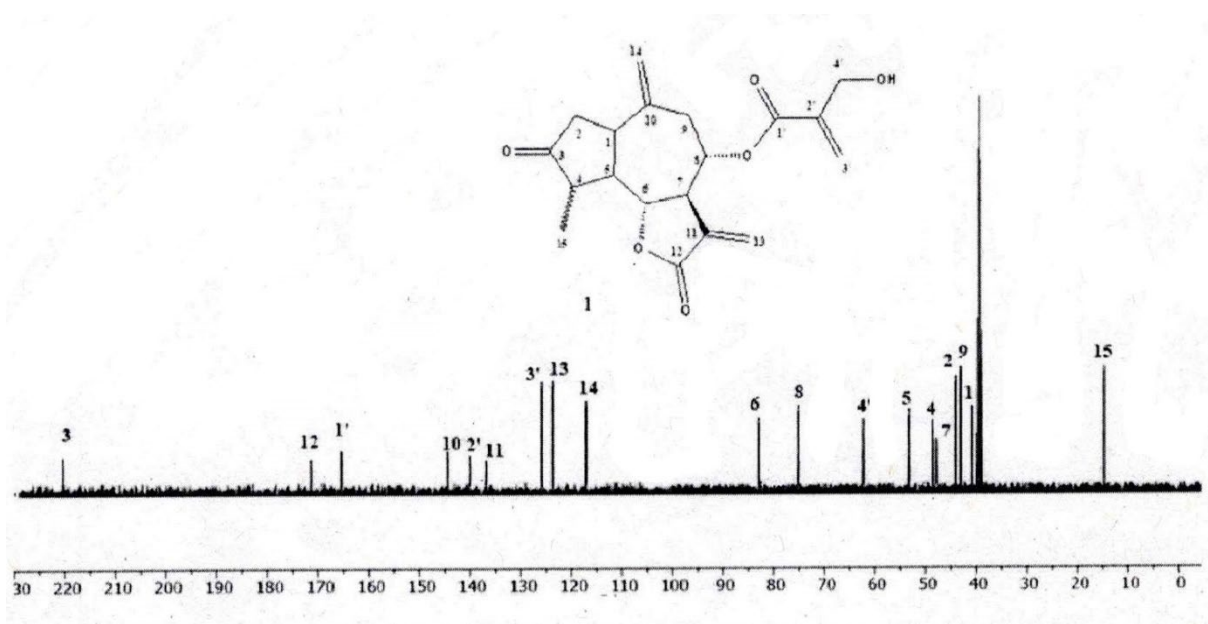
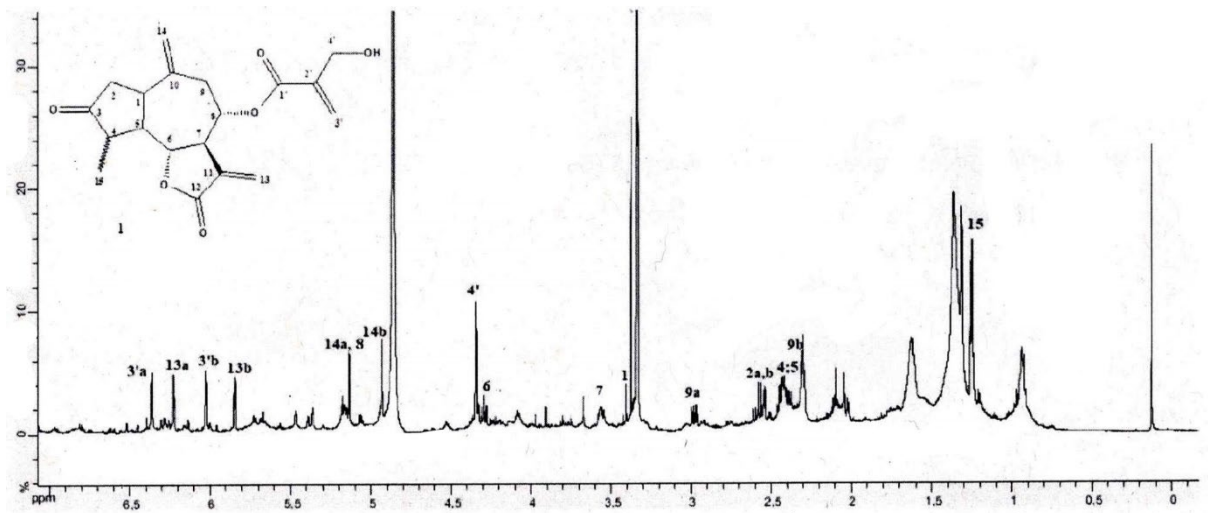


Abbildung 2.55: ^1H und ^{13}C -NMR Spektren zu den NMR-Daten aus dem Supplementary Material von Rafrafi et al. (2021)

Wenn man sich die Spektren (^1H - und ^{13}C -NMR) in Abb. 2.55 ansieht, die von Rafrafi et al. (2021) zusammen mit der Publikation veröffentlicht wurden, fällt als erstes auf, dass die beiden Spektren nicht im gleichen Lösungsmittel aufgenommen wurden. Während die Lösungsmittelsignale im ^1H -NMR Spektrum bei ca. 3.35 und 4.9 ppm auftreten, findet sich das Lösungsmittelsignal im ^{13}C -NMR Spektrum bei knapp unter 40 ppm. Normalerweise treten die Lösungsmittelsignale bei CD_3OD im Protonenspektrum bei 3.30 und 4.98 ppm und im Kohlenstoffspektrum bei 49.0 ppm auf (Hoffmann, 2006 und www.ia.uni-bremen.de/nmr/d_lsm.html). Das Protonenspektrum wurde passend zu den veröffentlichten Daten in CD_3OD aufgenommen, während das ^{13}C -NMR Spektrum ein Lösungsmittelsignal enthält, das dem des Dimethylsulfoxids bei $\delta = 39.5$ entspricht (s. Abb. 2.46, S.86). Offenbar wurde dieser Umstand von den Referees von Biochemical Systematics and Ecology übersehen. Es wäre natürlich denkbar, dass dieses Spektrum aus Versehen in die beigefügte Datensammlung geriet und die Shiftwerte aus einem nicht beigefügten Spektrum in Methanol- d_4 veröffentlicht, oder man hat die ^{13}C -Daten aus dem HMQC und HMBC-Spektrum ermittelt. Diese beiden Spektren sind in Abbildung 2.56 und 2.57 (S. 99 u.100) dargestellt. Im HSQC kann man erkennen, dass die Kreuzsignale von C-2 und C-9 zu zwei unmittelbar nebeneinander liegenden Kohlenstoffsignale gehören. Leider wurde auf das Spektrum nur das ^1H -NMR Spektrum auf projiziert, so dass auch dieses 2D-Spektrum nicht erkennen lässt, ob die ^{13}C -Daten mit Hilfe eines separaten Spektrums ermittelt wurden. Beim HMBC Spektrum kann man allerdings sehen, dass das ^1H -NMR in CD_3OD mit dem ^{13}C -NMR in $\text{DMSO}-d_6$ kombiniert wurde, weshalb viele Cross-Peaks, je nach Shiftdifferenz, etwas neben den ^{13}C NMR Signalen lagen. Es ist nur schwer vorstellbar, dass diese Problematik nicht aufgefallen ist, wobei ein Blick auf das ebenfalls als Nachweis für die Richtigkeit der Struktur 2D-COSY (s. Abb. 2.58, S.100) zeigt, dass insgesamt nicht sehr genau gearbeitet wurde, denn der 2D-Plot wurde nicht richtig kalibriert, was an den Lösungsmittelsignalen gut zu erkennen ist.

Aufgrund der beschriebenen Unterschiede sollte es sich bei dem von Rafrafi et al. (2021) isolierten Guaianolid nicht um die hier als Verbindung **4** beschriebene Substanz, sondern vielmehr sollte es sich um ein Isomer handeln. Da die Stereochemie von Rafrafi et al. an C-4 leider nicht geklärt werden konnte, könnte es sich möglicherweise um das C-4 Epimer von **4** mit einer β -ständigen Methylgruppe am Cyclopentanonring handeln.

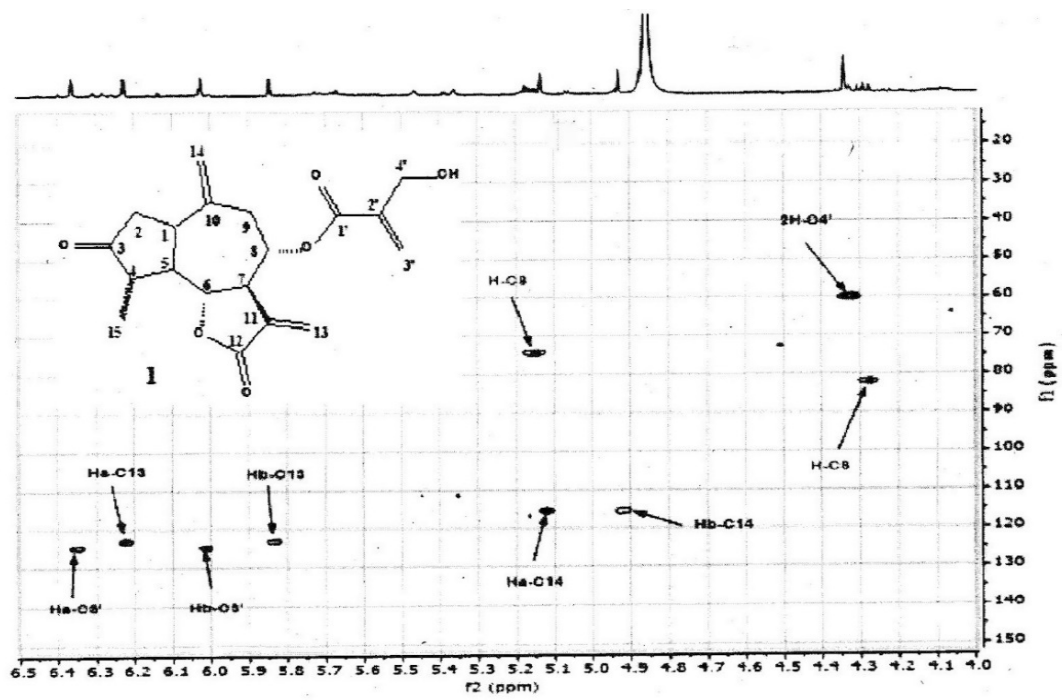
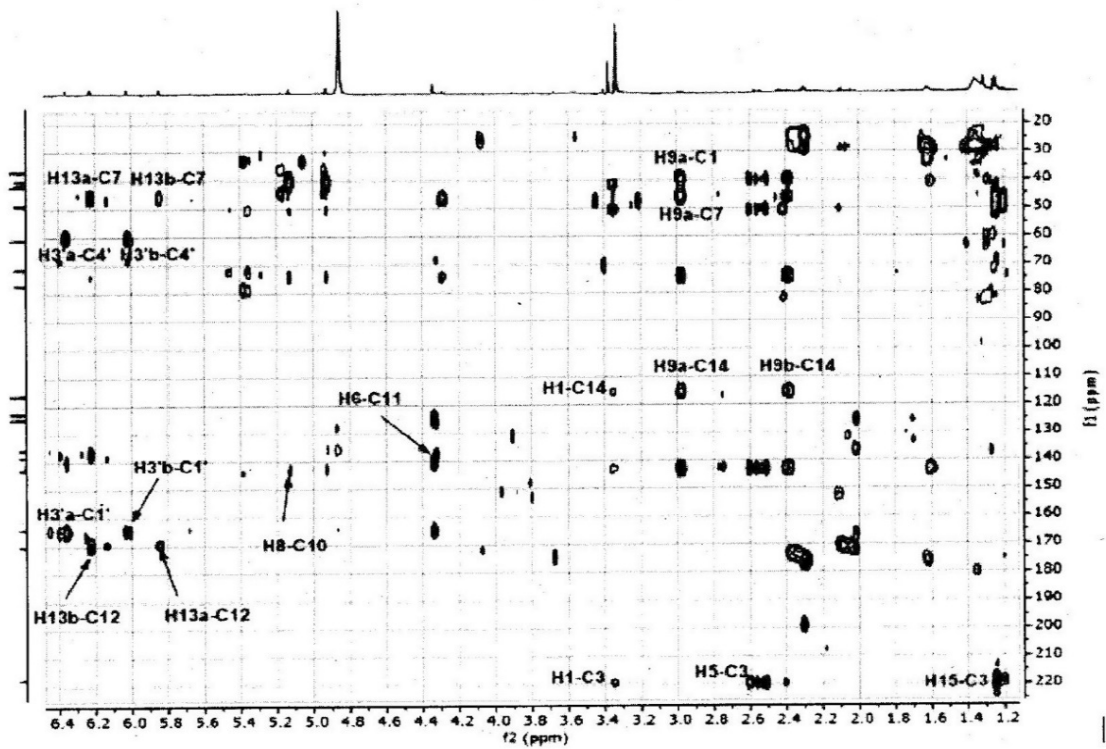


Abbildung 2.56: 2D-HSQC Spektren zu den NMR Daten aus dem Supplementary Material von Rafrafi et al. (2021)

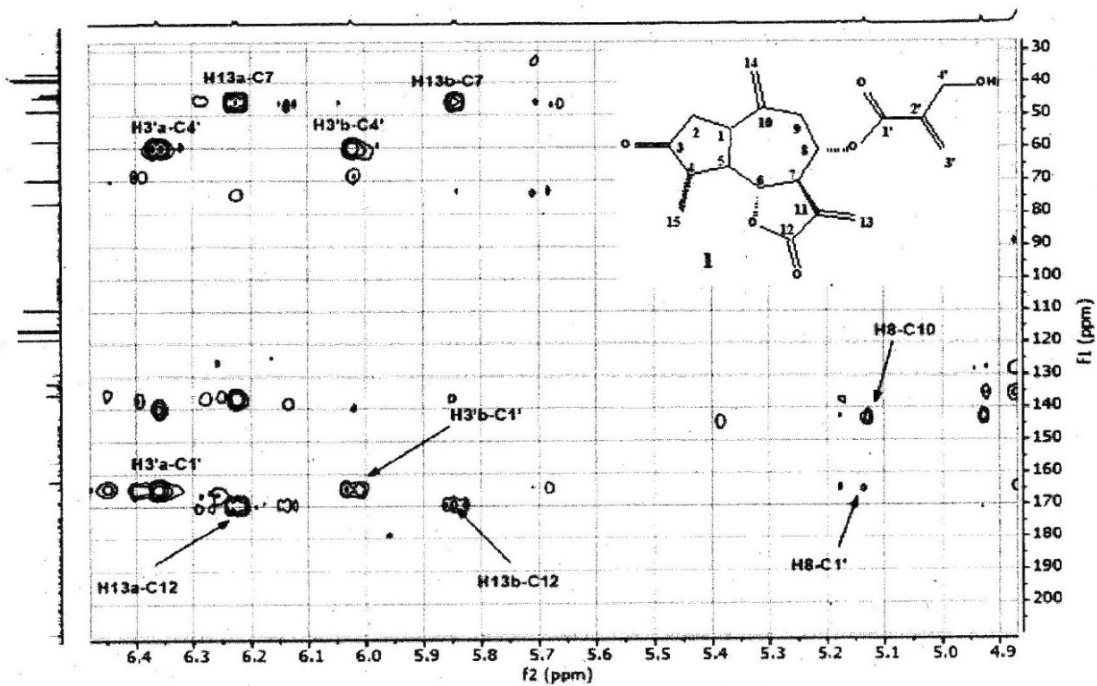


Abbildung 2.57: 2D-HMBC Spektren zu den NMR Daten aus dem Supplementary Material von Rafrafi et al. (2021)

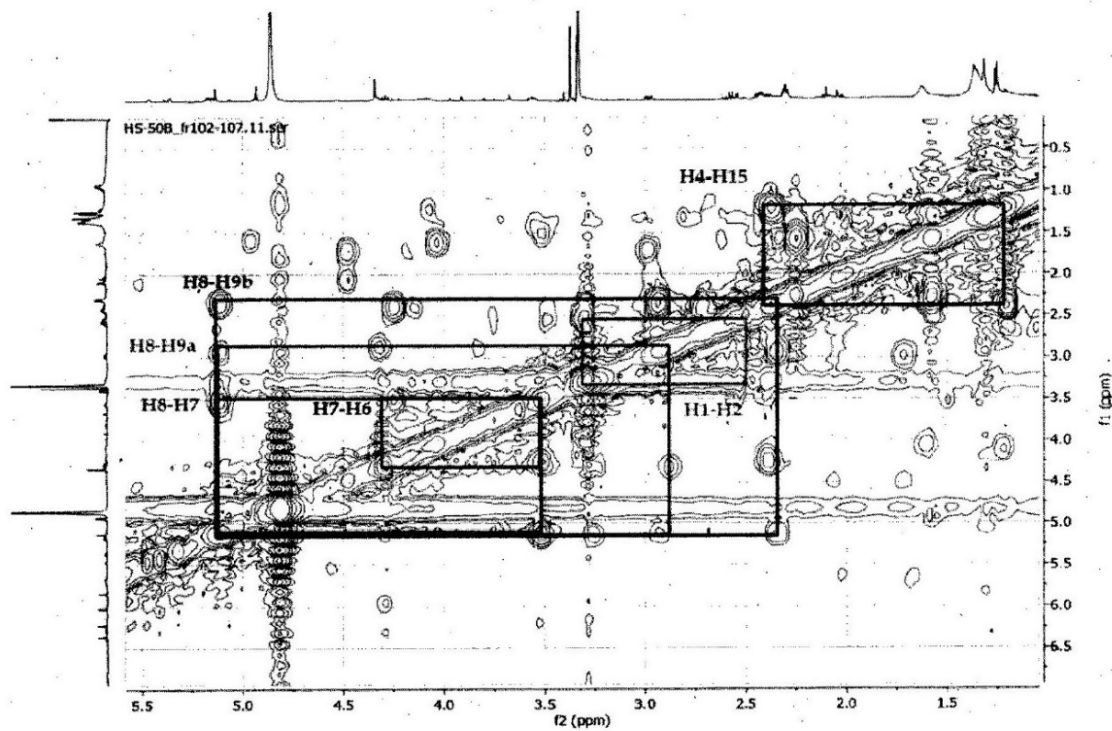
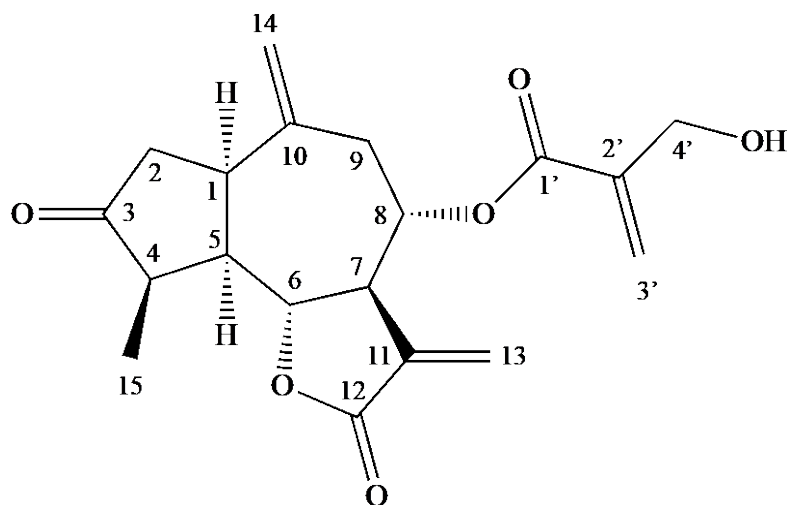


Abb. 2.58: 2D-COSY-Spektrum aus dem Supplementary Material von Rafrafi et al. (2021)

2.2.5 Verbindung 5 (4- β -Methylboranolacton)



Bei der chromatographischen Aufarbeitung der Fraktion in der Verbindung **4** enthalten war, konnte Verbindung **5** neben Verbindung **4** in einer Ausbeute von 1,91 mg gewonnen werden (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3).

Im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittelsystem DC 1, s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1) zeigte **5** eine Löschung des Fluoreszenzindikators bei einem R_f-Wert von 0,41. Nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz färbte sich **5** ebenso wie **4** gelb. Ihre Retentionszeit im HPLC (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.4) betrug 21,08 Minuten, kürzer als Verbindung **1**, woraus eine geringere Lipophilie abgeleitet werden konnte. Das UV-Spektrum ließ, wie beiden zuvor beschriebenen Verbindungen **1** und **4** aufgrund der Maxima bei $\lambda = 21$ nm vermuten, dass es sich auch bei **5** um ein Sesquiterpenlacton handelt (Heywood et al, 1977).

Bei der massenspektrometrischen Analyse waren die Verbindungen **4** und **5** nicht zu unterscheiden. Da **4** und **5** bei der präparativen HPLC durch fraktioniertes Auffangen des Substanzpeaks in drei aufeinanderfolgende Eluate gewonnen wurden, dachte man zunächst an identische Verbindungen. Im HRESIMS (s. Abb. 2.59. S.102) mit hochauflösender Massenmessung zeigte **5** das Quasimolekülion $[M+H]^+$ bei $m/z = 347.1489$ registriert, woraus sich genauso wie bei **4** die Summenformel C₁₉H₂₂O₆ ableiten lässt. Auch **5** besitzt daher, genauso wie Verbindung **1** und **4**, neun Doppelbindungsäquivalente.

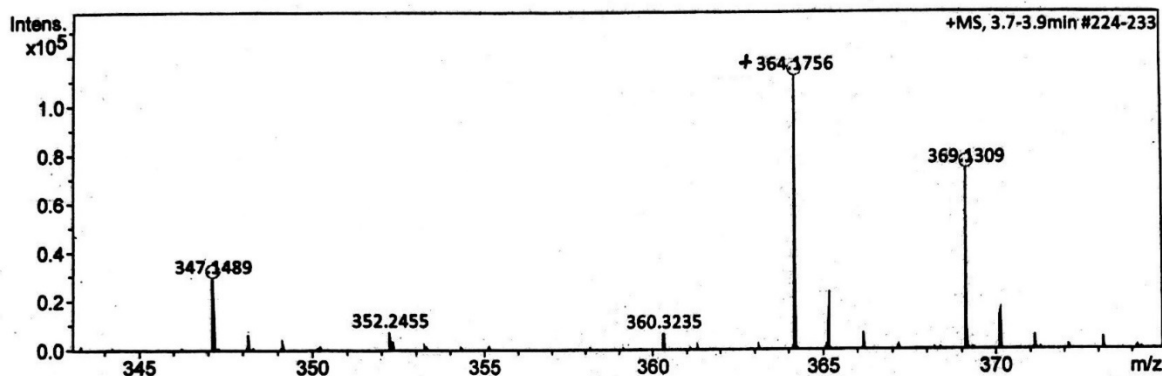


Abbildung. 2.59: Massenspektrum von Verbindung **5** (HRESI-MS)

Nach der Aufnahme der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren in CD_3OD (s. Abb. 2.60 und 2.65, S.108 bis 113) fiel auf, dass sich die Spektren von **4** und **5** sehr stark ähneln, wobei das Protonenspektrum von **5** deutlich besser aufgelöst war als das Spektrum von **4**. Insgesamt gesehen waren auch die Signale von H-4, H-5 und H-9a weniger stark überlagert als im ^1H -Spektrum von **4**, wodurch die Interpretation der relativen Stereochemie möglich wird. Die Shiftwerte der Protonen sind so gering, dass man nach der Auswertung des Protonenspektrums (s. Abb. 2.60 und Tab. 2.8, S.105) davon ausgehen müsste, dass es sich bei **4** und **5** ^1H -identische Verbindungen handeln müsste. Im ^{13}C -NMR Spektrum fanden sich die Signale für 19 Kohlenstoffe (s. Abb. 2.65), wie dies nach Auswertung des hochauflösenden Massenspektrums zu erwarten war. Bei Verbindung **4** fehlte eines dieser Signale im Spektrum (in CD_3OD), weil die Signale von C-2 und C-9 zu einem Signal bei $\delta = 43.07$ ppm zusammenfielen (s. Abb. 2.46, S.86). Im Shiftbereich zwischen 40 und 50 ppm fanden sich bei Verbindung **4**, vier Signale für C-1 bei $\delta = 41.47$, C-2 und C-9 gemeinsam bei $\delta = 43.07$, C-7 bei $\delta = 47.52$ und C-4 bei 48.00 ppm. Nur das Signal bei $\delta = 43.07$ wurde als CH_2 -Kohlenstoff erkannt, so dass im DEPT-Spektrum von **4** nur ein nach unten weisendes Signal in diesem Bereich des Spektrum zu erkennen war. Bei Verbindung **5** finden sich insgesamt fünf Signale in diesem Shiftbereich (s. Abb. 2.65 und Tab. 2.8, S.107), von denen zwei Signale, bei $\delta = 43.13$ und 43.86 ppm von CH_2 -Kohlenstoffen verursacht wurden (s. Abb. 2.66, S.114 und Tab. 2.8, S.105), was über das ebenfalls aufgenommene ^{13}C -DEPT-Spektrum nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 2.66). Um die Struktur von **5** endgültig aufzuklären, wurden wie bei **1-4** auch die homo- und heteronuklearen Korrelationsspektren (COSY, HSQC und HMBC) in CD_3OD aufgenommen (s. Abb. 2.67 –270, S. 115-118). Mit Hilfe der in den Korrelationsspektren

auf tretenden Signale gelang die Zuordnung sämtlicher in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren auftretenden Signale. Bei Verbindung **5** handelt es sich ebenso wie bei **1** und **4** um den Ester der 2-Hydroxy-methylacrylsäure (Budesinsky and Saman, 1995), deren Signale bei $\delta_{\text{C}} = 166.28$ ($1'$), 141.82 ($2'$), 126.15 ($3'$) und 61.65 ppm ($4'$), sowie $\delta_{\text{H}} = 6.00$ und 6.34 ppm ($3'$) und 4.32 ($4'$) auftraten. Die übrigen 15 Kohlenstoffsignale waren dem Sesquiterpenlacton zuzuordnen. Wie bei **4** finden sich im Spektrum von **5** die typischen Signale für eine exocyclische Methylengruppe am γ -Lactonring ($\delta_{\text{C}} = 124.38$, $\delta_{\text{H}} = 6.2$ und 6.0 ppm). Ausgehend von diesem Signal (C-13, H-13a,b) lassen sich die zugehörigen Kohlenstoffe C-7 ($\delta_{\text{C}} 47.51$), C-11 ($\delta_{\text{C}} 138.48$) und C-12 ($\delta_{\text{C}} 171.20$) leicht über das HMBC (s. Abb. 2.70, S. 120) zuordnen. Während die beiden zuletzt genannten Kohlenstoffe als quartäre C-Atome keinen Kopplungspartner in HSQC-Spektrum (s. Abb. 2.69) besitzen, findet man das Methinproton des C-7 bei $\delta_{\text{H}} = 3.55$ ppm. Ausgehend von H-7, das wegen seiner allylischen Kopplung mit H-13 und den Protonen an C-6 und C-8 als Dublett vom Dublett zum Triplet in Erscheinung tritt, lassen sich C-8 ($\delta_{\text{C}} 75.94$) und C-6 ($\delta_{\text{C}} 83.60$) im für veresterte, sauerstoffsubstituierte Kohlenstoffe leicht zuordnen. Aufgrund der ^3J -Korrelation zwischen C-1' und H-8 bestätigt sich, genauso wie bei **4**, die Position des 2-Hydroxy-methylacrylesters an dieser Position. Weitere Kopplungspartner von H-8 im COSY sind die beiden Protonen an C-9 ($\delta_{\text{H}} = 2.37$ (9a) und 2.96 (9a)). Der zugehörige Kohlenstoff findet sich bei $\delta_{\text{C}} = 43.13$ ppm. Damit ist eines der oben genannten CH_2 -Signale im Shiftbereich von 40 bis 50 ppm zugeordnet. Wenn man die Spektren von **4** und **5** miteinander vergleicht, findet man nur eine sehr geringe Shiftdifferenz zwischen den beiden Kohlenstoffen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die beiden Sesquiterpenlactone sich in diesem Bereich strukturell kaum unterscheiden. Wie bei **4** zeigen die beiden Protonen an C-9 im HMBC-Spektrum eine Korrelation mit dem Kohlenstoffsignal der an C-10 gebundenen, exocyclischen Methylengruppe ($\delta_{\text{C}} = 116.87$), deren Protonen als Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 4.91$ und 5.11 ppm auftreten. Die weiteren Signale lassen sich über die COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren zuordnen. So findet sich das Signal von H-5 bei $\delta_{\text{H}} = 2.42$ ppm über die Korrelation mit H-6. H-5 zeigt wiederum Korrelationen mit H-1 ($\delta_{\text{H}} 3.34$) und H-4 ($\delta_{\text{H}} 2.40$). Die zugehörigen Kohlenstoffe findet man bei $\delta_{\text{C}} = 41.55$ (C-1), 48.00 (C-4) und 52.32 (C-5). Wie bei **4** koppelt das H-4 mit den Protonen einer am zugehörigen Kohlenstoff gebundenen Methylgruppe (C-15), deren Signale sich bei $\delta_{\text{H}} = 1.23$ ppm bzw. $\delta_{\text{C}} = 15.26$ ppm in den Spektren finden. Die restlichen Signale des ^{13}C -NMR-Spektrums bei 221.34 und 43.86 ppm konnten dem Carbonylkohlenstoff C-3 und dem benachbarten C-2 zugeordnet werden. Das Signal des C-2 wird daher neben dem C-9 als zweites Signal eines Methylenkohlenstoffs im

Shiftbereich von 40 bis 50 ppm registriert. Im Gegensatz zum in Methanol gemessenen Kohlenstoffspektrum von Verbindung **4** fallen die beiden Signale im Spektrum von **5** nicht zusammen. Die am C-2 von **5** gebundenen Protonen finden sich bei $\delta_{\text{H}} = 2.52$ (H-2a) und 2.55 (H-2b). Die Zuordnung dieser Signale wird durch die entsprechenden Korrelationen im HSQC und HMBC bestätigt (s. Abb. 2.68 und 2.70, S.116 u. 118). Leider wurde das HMBC in Bezug auf die Resonanzfrequenzen nicht weit genug aufgenommen, so dass keine Korrelationen zum Signal des quartären Carbonylkohlenstoff C-3, der im Spektrum nicht zu sehen ist, auftritt. Aufgrund der zwischen den anderen Kohlenstoffen und Protonen auftretenden Kreuzsignalen in diesem und in den anderen zweidimensionalen Spektren und dem Vergleich zu Verbindung **4**, besteht an der Position des Ketons an C-3 kein Zweifel.

Tabelle 2.8: NMR Daten von **5** (600 MHz in CD₃OD und DMSO-d₆; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H NMR		¹³ C NMR		
	CD ₃ OD	DMSO-d ₆ (J in Hz)	CD ₃ OD	DMSO-d ₆	DEPT
1	3.34 ddd (8.30 u. 6.40 u. 3.96)	3.29 dd (8.2 u. 5.7)	41.55	40.06	CH
2a	2.52 dd (17.39 u. 5.03)	2.34 m	43.86	42.35	CH ₂
2b	2.55 dd (17.39 u. 8.75)	2.49 m			
3	-	-	221.34	218.63	
4	2.40 dd (7.63 u. 2.24)	2.26 m	48.00	46.03	CH
5	2.42 m	2.38 m	52.32	50.23	CH
6	4.28 dd (9.78 u. 8.72)	4.33 dd (10.4 u. 8.5)	83.60	81.10	CH
7	3.55 ddt (10.35 u. 8.70 u. 3.17)	3.51 ddt (10.6 u. 8.6 u. 3.1)	47.51	45.45	CH
8	5.14 ddd (10.83 u. 8.34 u. 6.12)	5.06 ddd (10.6 u. 7.6 u. 5.9)	75.94	73.93	CH
9a	2.37 dd (13.23 u. 8.00)	2.29 m	43.13	40.92	CH ₂
9b	2.96 dd (13.16 u. 5.80)	2.83 dd (13.1 u. 5.8)			
10	-	-	144.55	142.98	
11	-	-	138.48	137.25	
12	-	-	171.20	168.91	
13a	5.82 d (2.90)	5.67d (2.8)	124.38	122.71	CH ₂
13b	6.20 d (3.36)	6.08 d (3.3)			
14a	4.91 s	4.86 s	116.87	116.22	CH ₂
14b	5.11 s	5.02 s			
15	1.23 d (6.9)	1.11 d (7.2)	15.26	14.73	CH ₃
1'	-	-	166.28	164.65	
2'	-	-	141.82	140.67	
3'a	6.00 d (1.53)	5.94 d (1.9)	126.15	124.60	CH ₂
3'b	6.34 d (1.25)	6.22 d (1.7)			
4'		4.18 s	61.65	59.58	CH ₂

Die relative Stereochemie ergibt sich aus der Interpretation der Aufspaltungsmuster der Protonensignale (s. Abb. 2.60-2.61, S.108-109). Das Signal des Protons an C-7 bei $\delta_H = 3.55$ ppm zeigt drei Kopplungskontanten (J) in Höhe von 10.35, 8.7 und 3.17 Hz (s. Tab. 2.8 und Abb. 2.63, S.111) und spaltet zum Dublett vom Dublett vom Triplet auf. Im 2D-COSY-Spektrum zeigt H-7 Kreuzsignale zu den Signalen bei $\delta_H = 4.28$ (H-6), 5.14 (H-8), 5.82 (H-13a) und 6.20 ppm (H-13b). Wie bei **4** ist die Kopplung in Höhe von etwa 3 Hz auf die allylische Kopplung mit den beiden Protonen an C-13 zurückzuführen (Morrison et al, 1978).

Aufgrund der Höhe der Kopplungen mit H-7 sind die Protonen an C-6 ($J = 8.7$) und C-8 ($J = 10.8$ Hz), wie bei den Verbindungen **1** und **3**, trans-angeordnet. Ausgehend vom, für natürlich vorkommende 6,7-trans-Guaianolide typischen, alphasständigen H-7 sind H-6 und H-8 β -ständig. Die Orientierung von H-5 ergibt sich aus der zweiten Kopplung, die aus dem Signal von H-6 bei $\delta_H = 4.28$ ppm in Höhe von 8.72 Hz. Diese beiden Protonen sind damit auch bei **5** trans zueinander angeordnet, sodass H-5 als α -ständig erkannt werden kann. Da sich die Protonen H-4, H-5 und H-9a im Spektrum von **5** weniger stark überlagern, das Signal von H-1 besser aufgelöst ist und auch die beiden dicht nebeneinander liegenden Signale der beiden Protonen an C-2 ihre Aufspaltung erkennen lassen, kann die Position der Protonen an C-4 und C-1 aufgrund der Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **5** erkannt werden.

Das Protonensignal von H-1 (s. Abb. 2.63) spaltet aufgrund der drei Kopplungspartner (H-2a, H-2b und H-5) zum Dublett vom Dublett vom Dublett auf. Die drei ermittelten Kopplungskonstanten betragen 8.30, 6.40 und 3.96 Hz. Zwei Kopplungen in dieser Höhe fanden sich in den Signalen von H-2a und H-2b wieder. Das Aufspaltungsmuster des Signals von H-5 konnte auch im Spektrum von **5** nicht eindeutig erkannt werden, aber die, wie bei den zuvor beschriebenen Verbindungen **1-4**, vorliegende cis-Verknüpfung des Cycloheptan- und Cyclopentanrings wird dadurch bestätigt, dass im Signal von **1** keine der vicinalen Kopplungskonstante auf eine trans-Verknüpfung der Ringe hindeutet. Neben den Kopplungen mit H-1 und H-6 koppelt das Proton an C-5 auch mit H-4, das seinerseits mit der an C-4 gebundenen Methylgruppe (H-15) koppelt. Das Signal von H-4 spaltet zum Dublett von Dublett mit Kopplungskonstanten in Höhe von 7.6 u. 2.2 Hz auf, wobei die größere Kopplungskonstante zur Wechselwirkung mit den drei äquivalenten Methylprotonen an C-15 gehört. Die andere Kopplung mit H-5 fällt mit 2.2 Hz wesentlich geringer aus.

Der mit Hilfe der Karplus-Gleichung bestimmte Torsionswinkel zwischen den Protonen an C-4 und C-5 beträgt nur etwa 2° , was für das Vorliegen zweier zueinander cis-konfigurierter Protonen spricht. Im Gegensatz zu Verbindung **4** ist das H-4 in **5** α -ständig, die Methylgruppe an C-4 befindet sich demnach in der β -Position. Verbindung **5** stellt sich daher als C-4 Epimer des Guaianolids **4** heraus.

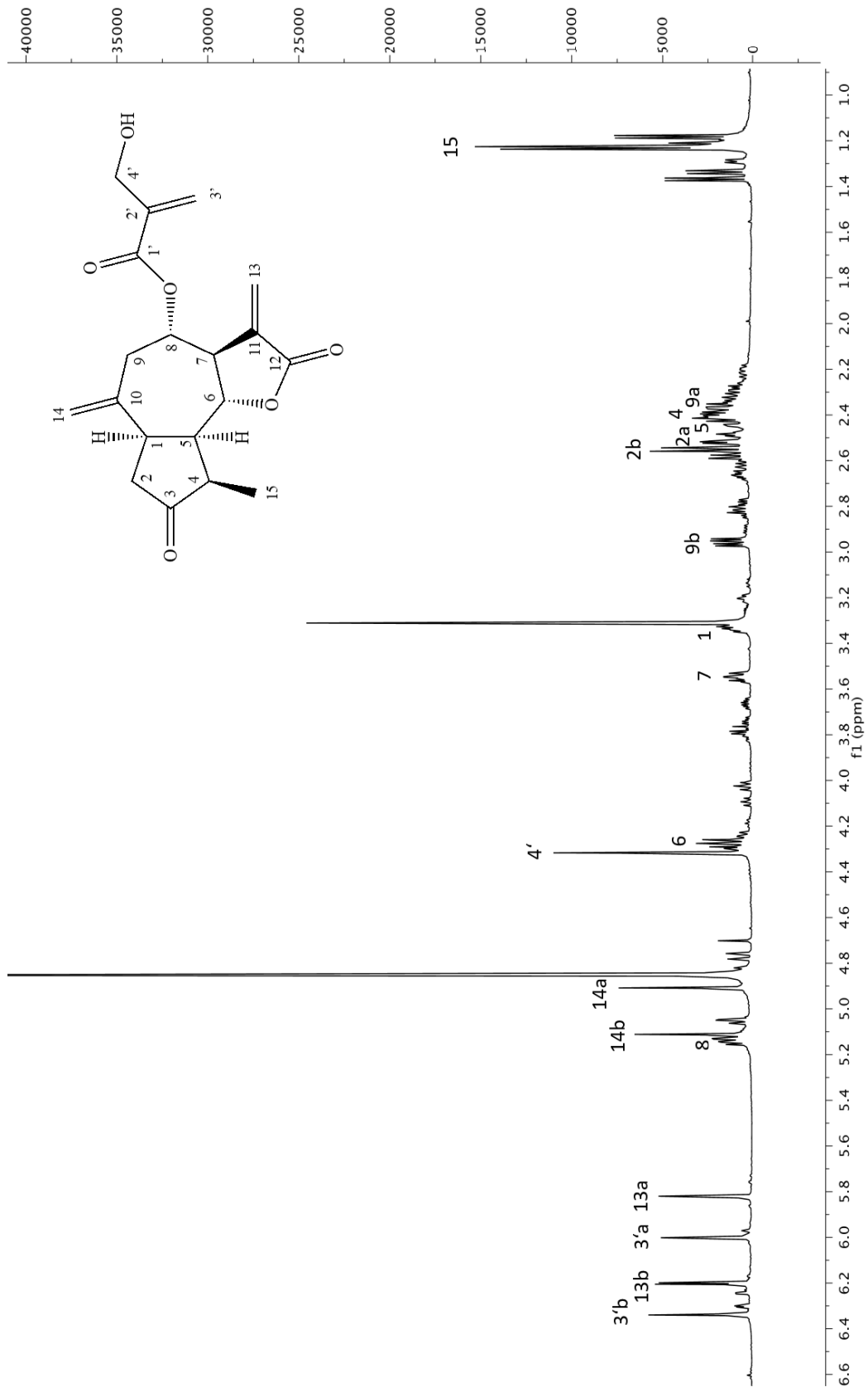


Abbildung 2.60: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung 5 (600 MHz in CD₃OD)

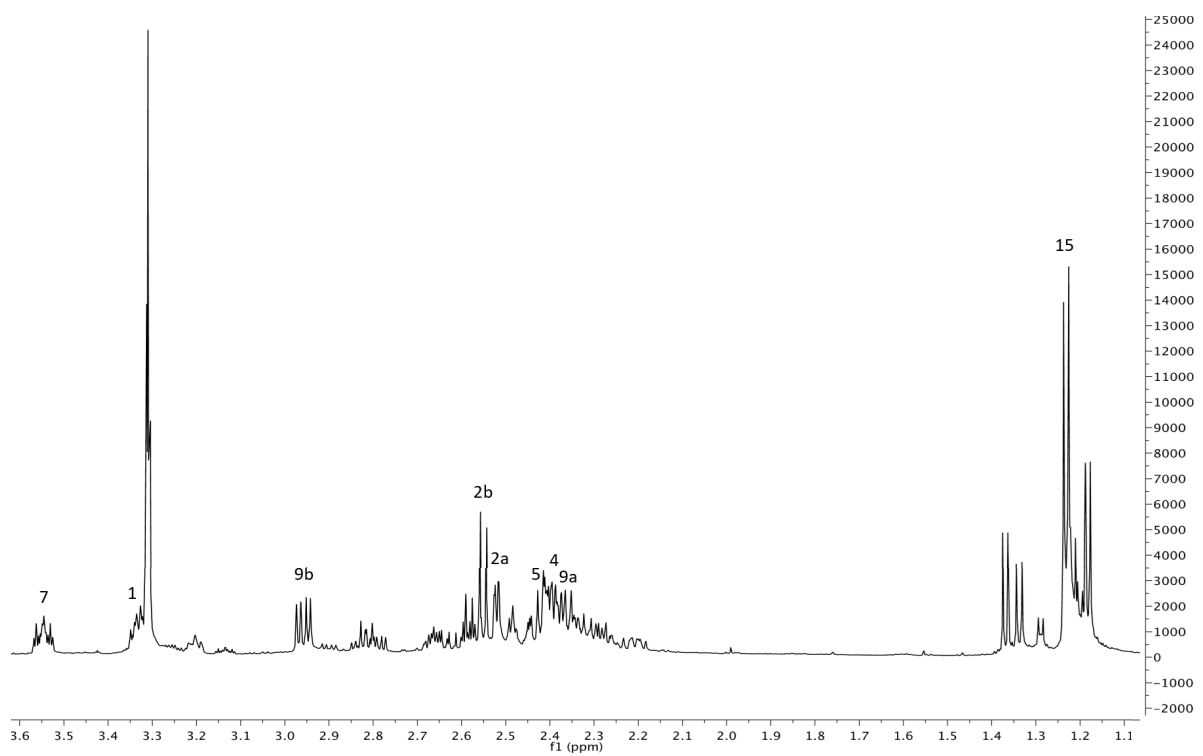
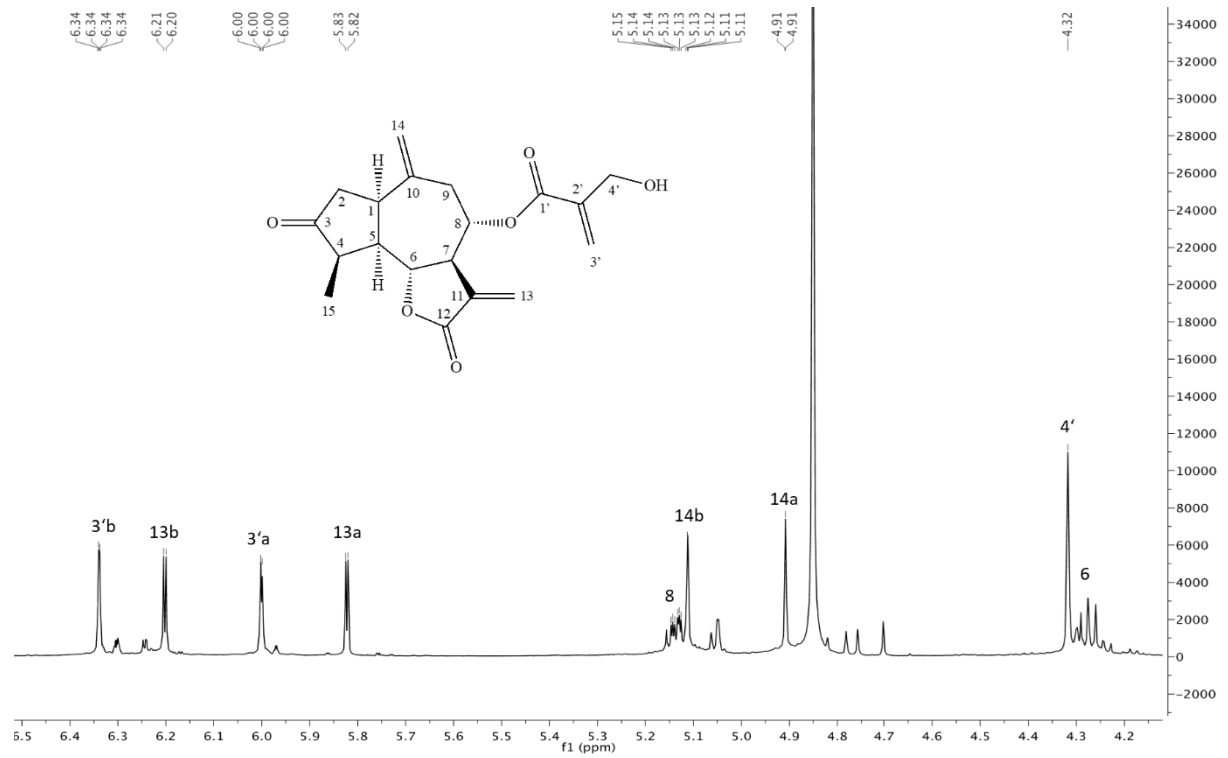


Abbildung 2.61: ¹H-NMR Spektrum (gespreizt) von Verbindung 5 (600 MHz in CD₃OD)

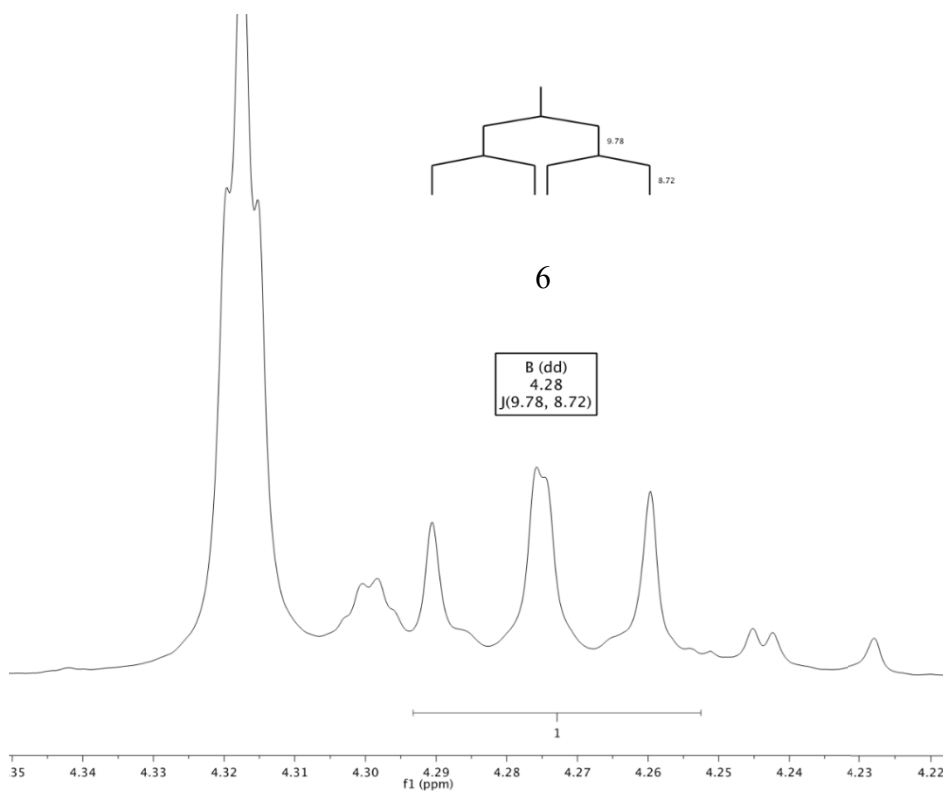
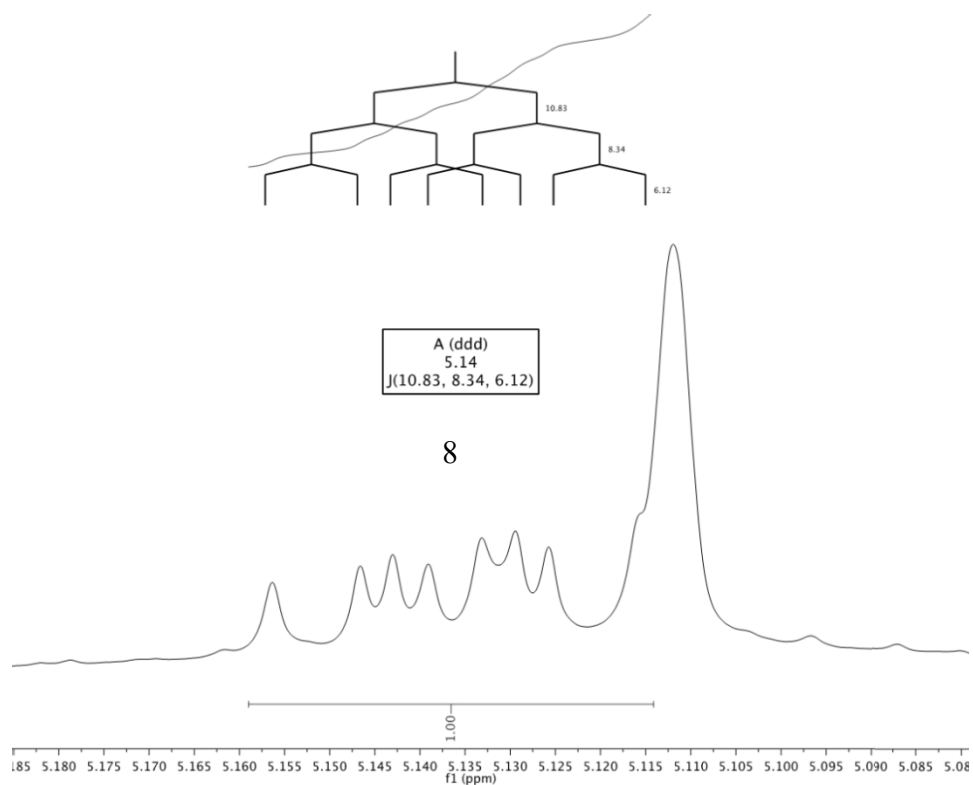


Abbildung 2.62: Ausschnitte aus dem ^1H -NMR Spektrum von Verbindung **5** (600 MHz in CD_3OD) zur Ermittlung der Kopplungskonstante

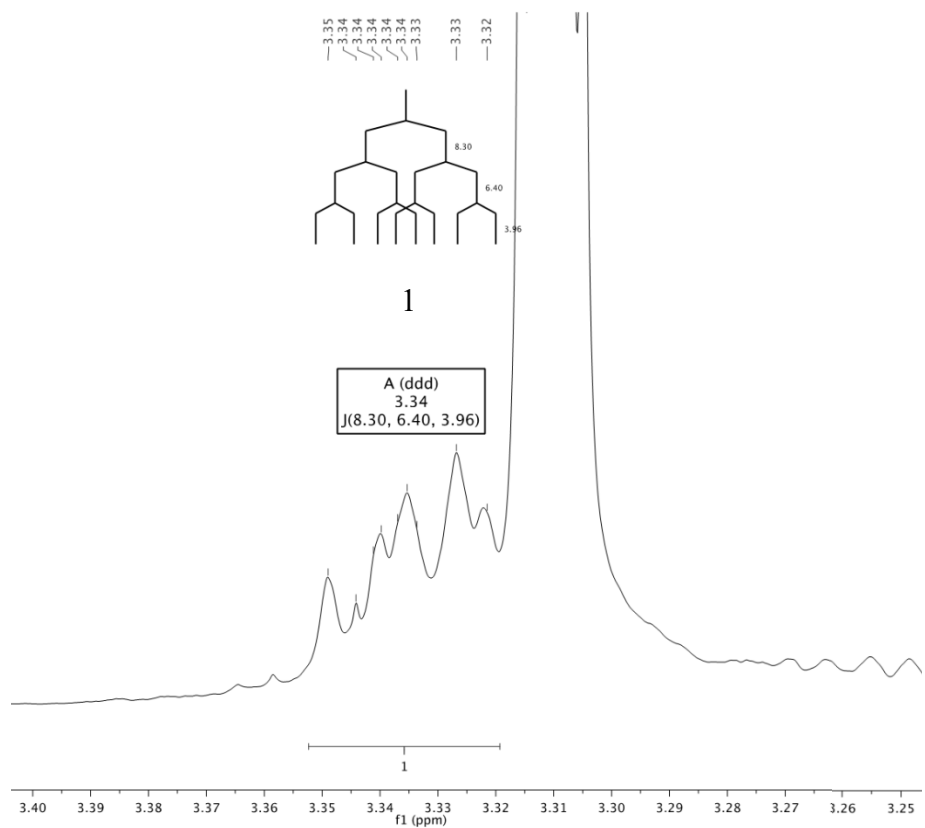
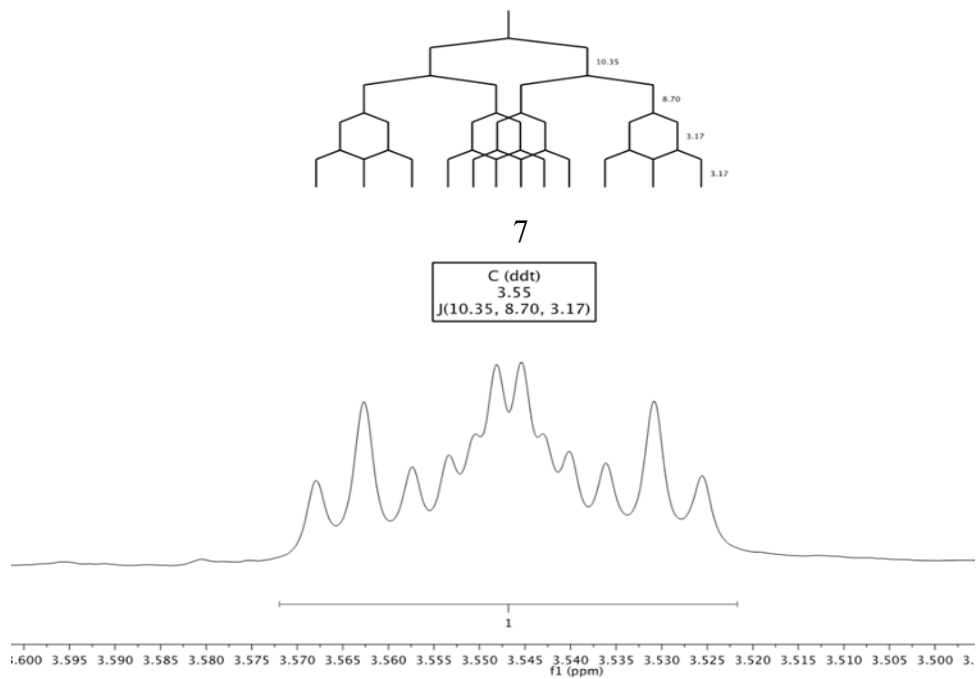


Abb. 2.63: Ausschnitte aus dem ^1H -NMR Spektrum von Verbindung 5 (600 MHz in CD_3OD) zur Ermittlung der Kopplungskonstanten

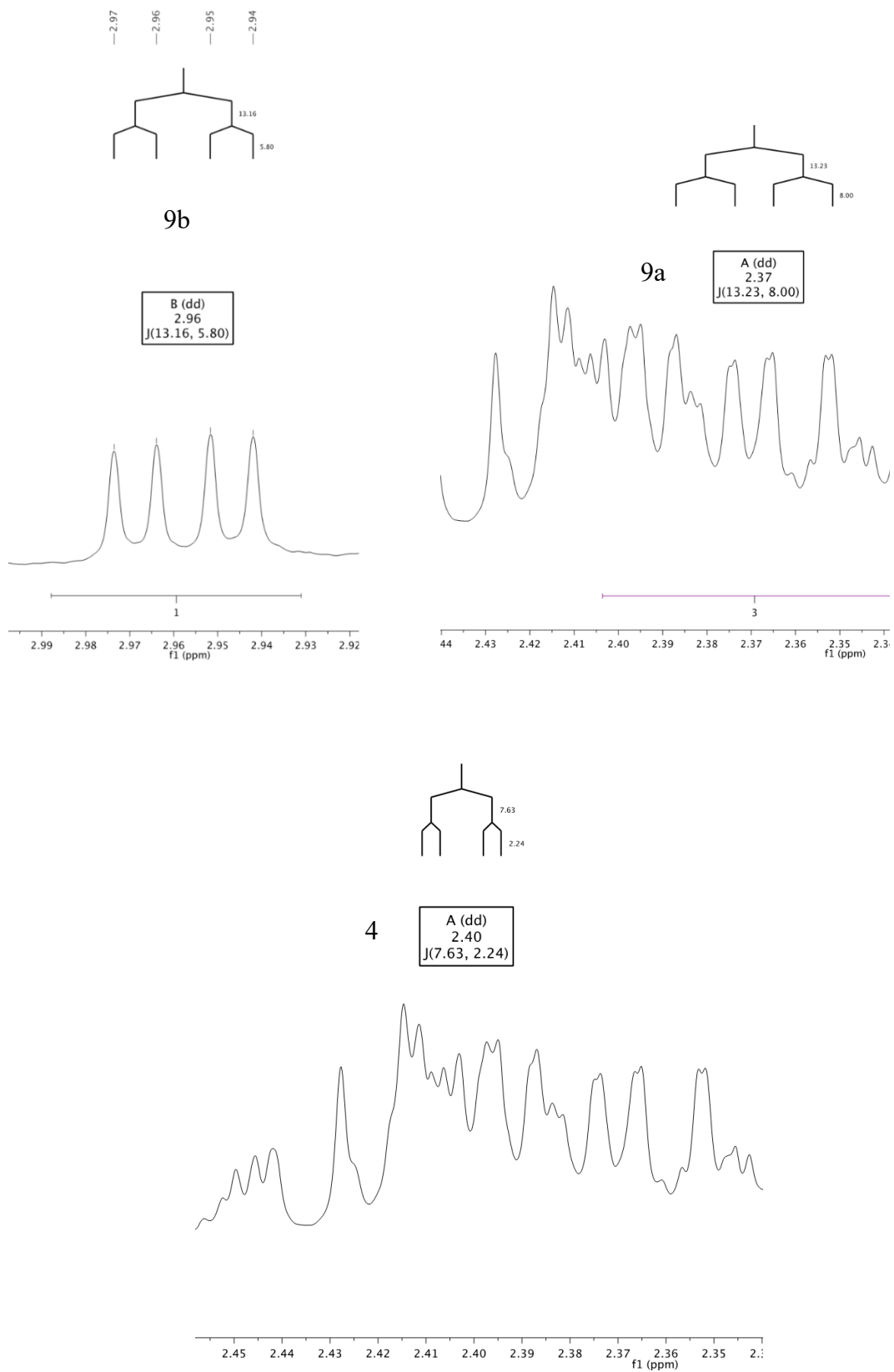


Abb. 2.64: Ausschnitte aus dem ^1H -NMR Spektrum von Verbindung **5** (600 MHz in CD_3OD) zur Ermittlung der Kopplungskonstanten

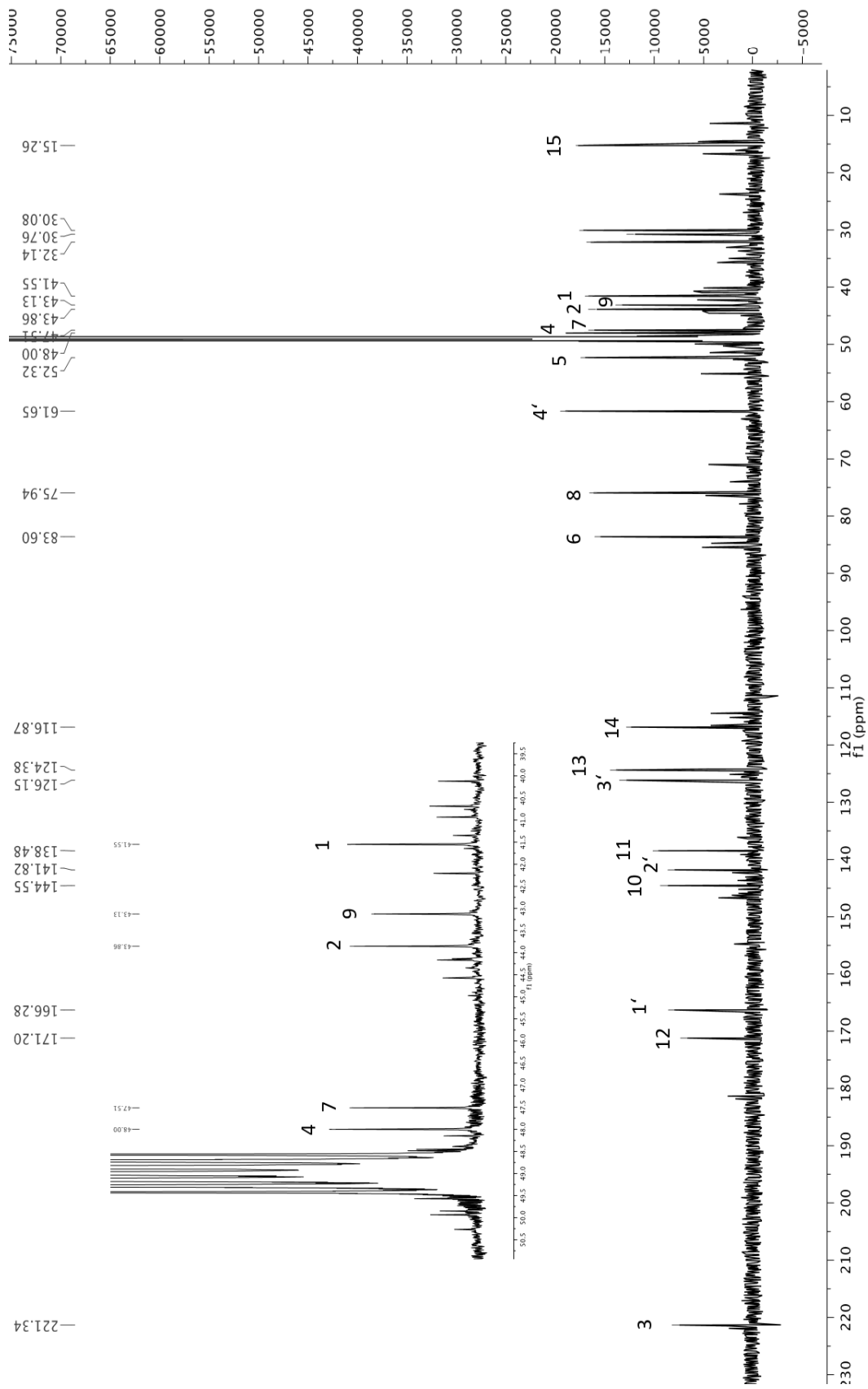


Abb. 2.65: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 5 (150 MHz in CD_3OD)

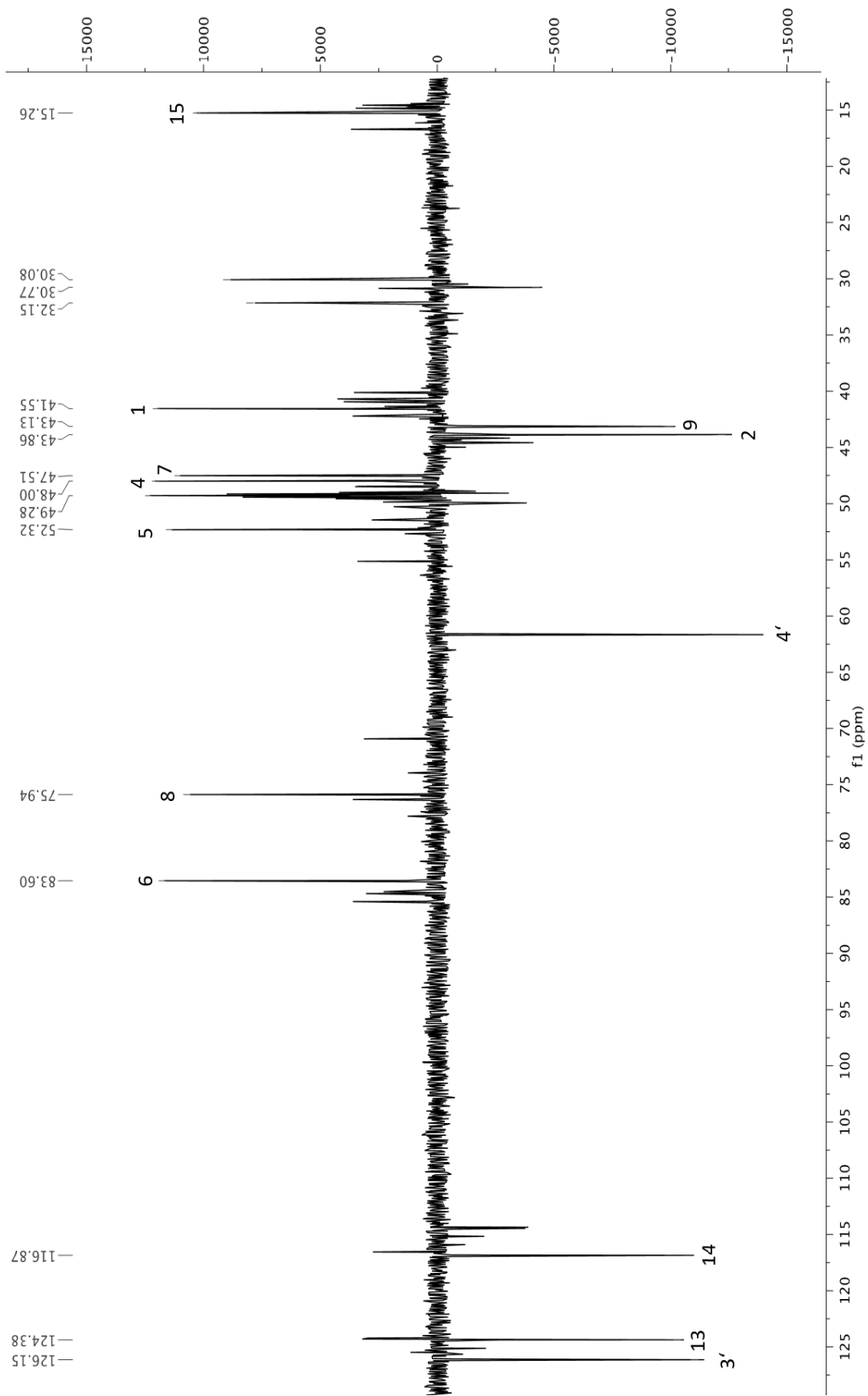


Abbildung. 2.66: ^{13}C -NMR DEPT Spektrum von Verbindung 5 (150 MHz in CD_3OD)

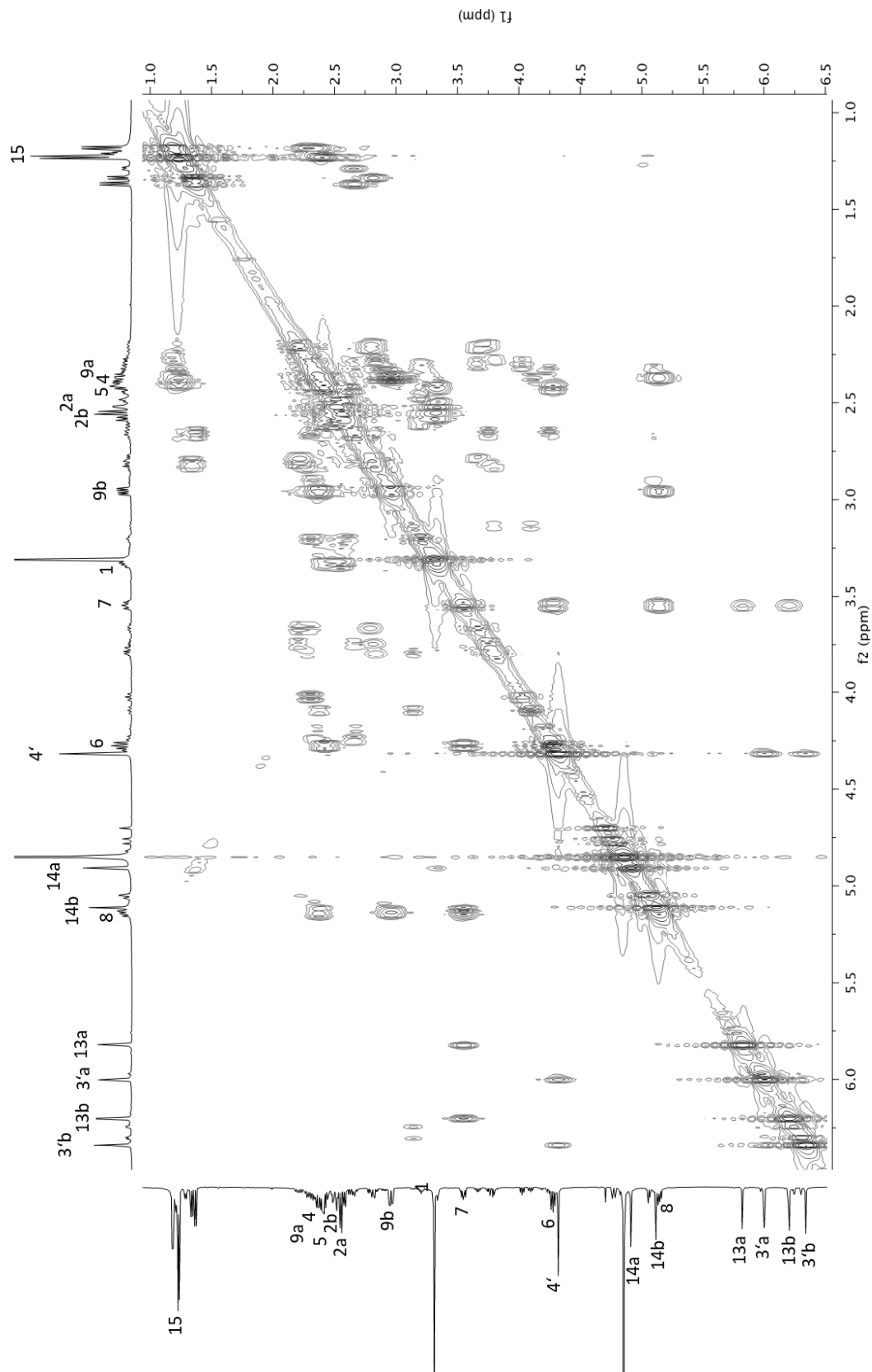


Abbildung 2.67: 2D-COSY-Spektrum von **5** (600 MHz in CD_3OD)

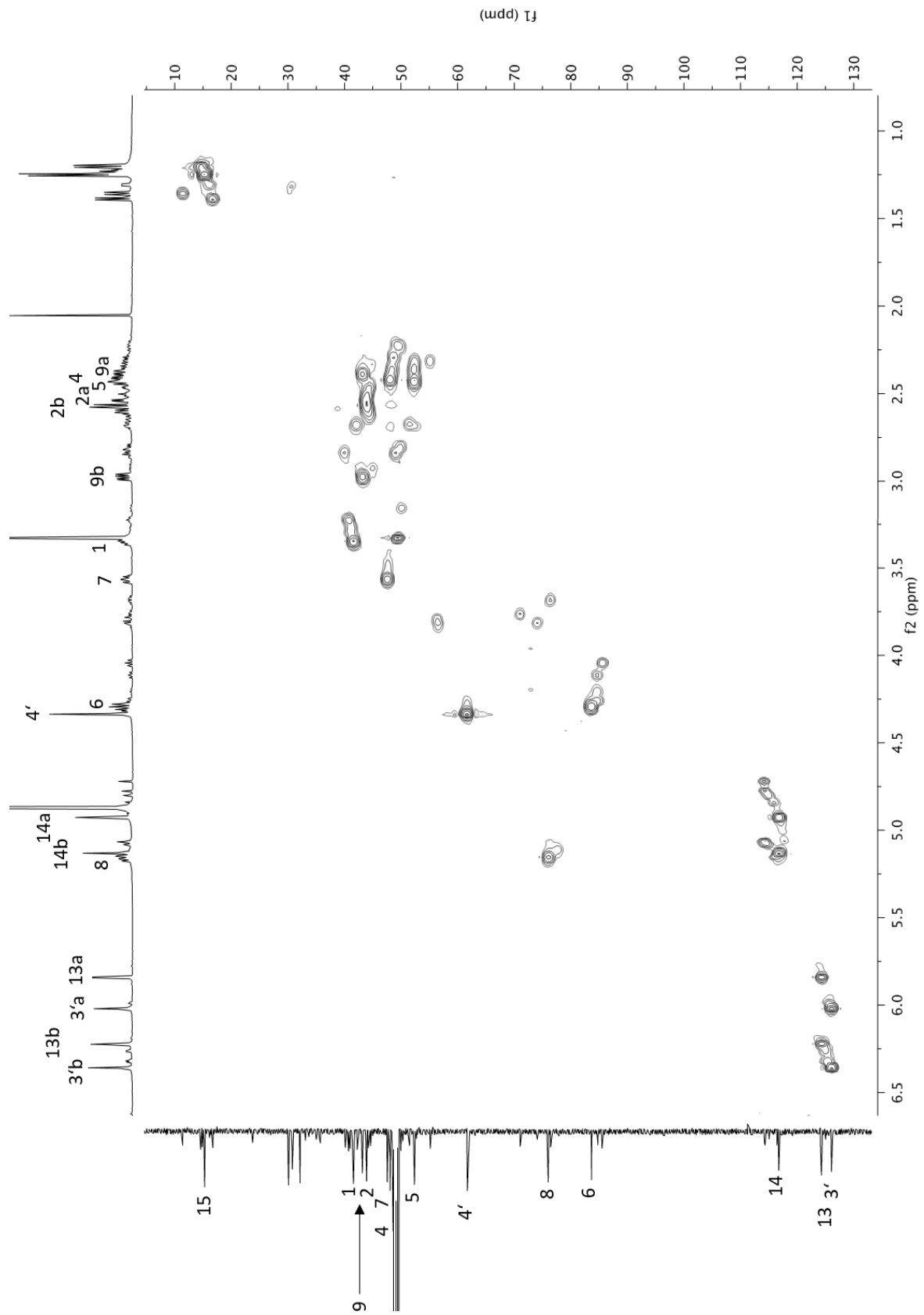


Abbildung 2.68: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 5 (600 MHz in CD₃OD)

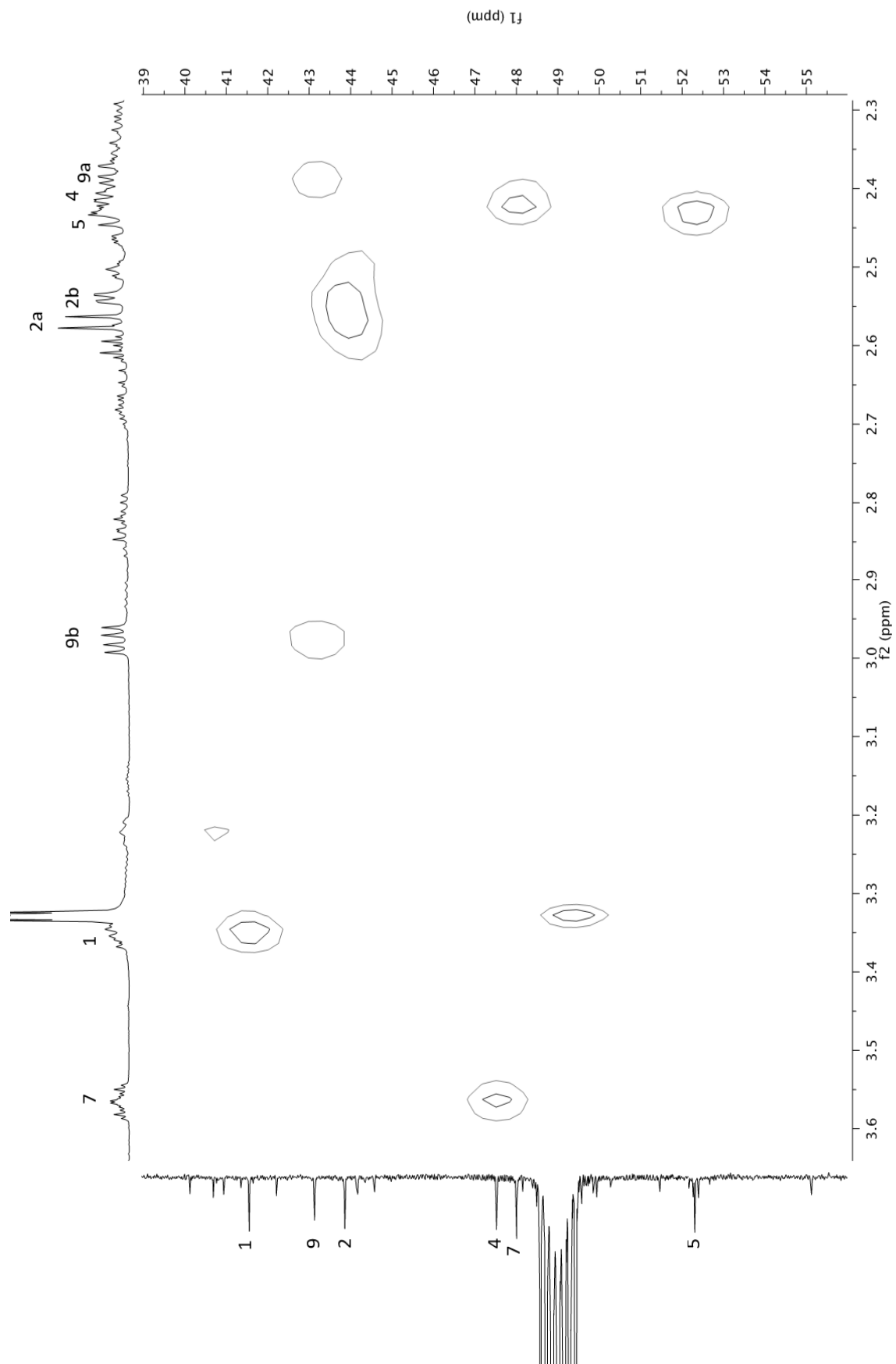


Abbildung 2.69: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von **5** (600 MHz in CD_3OD)

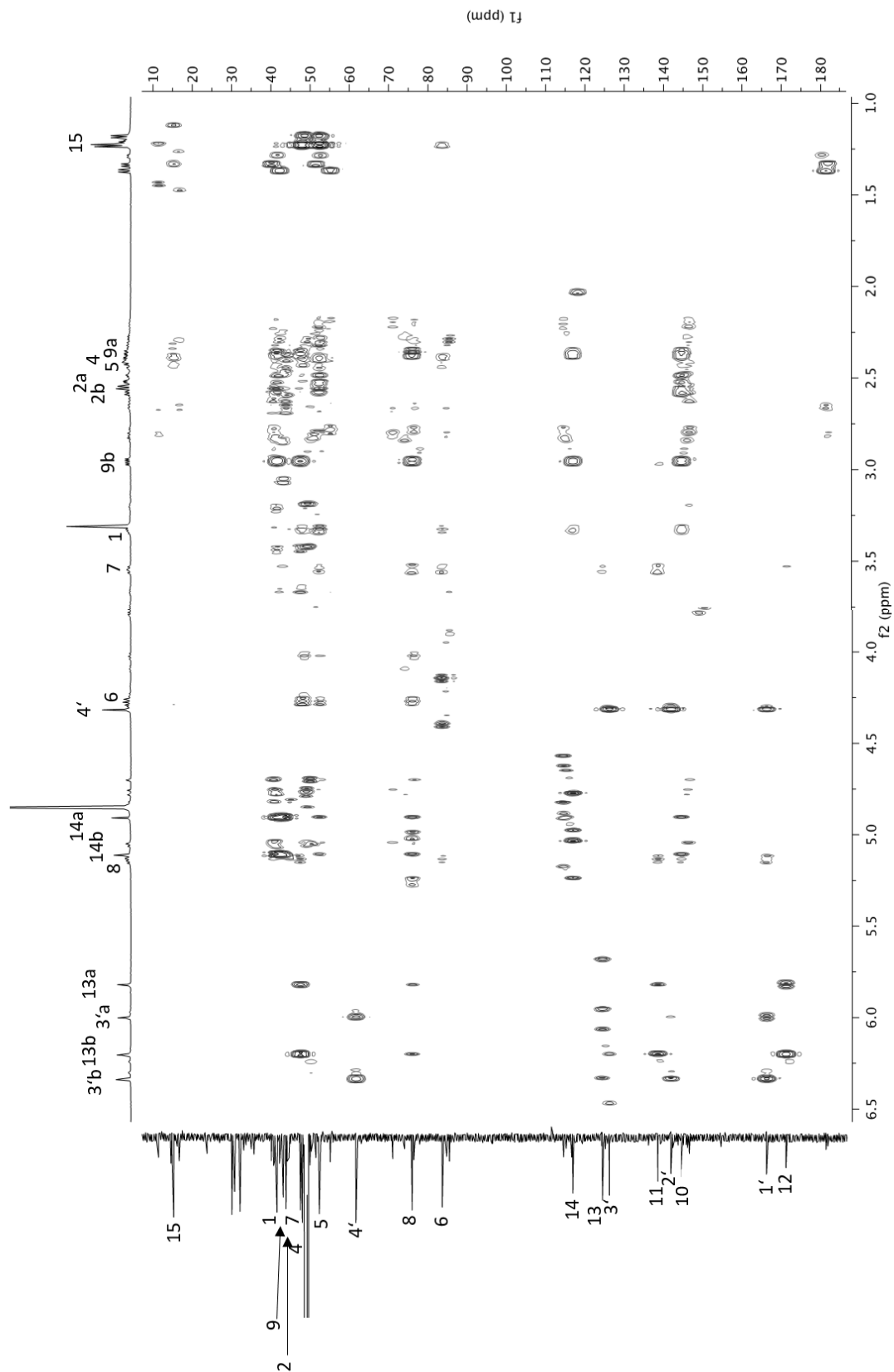


Abbildung 2.70: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 5 (600 MHz in CD₃OD)

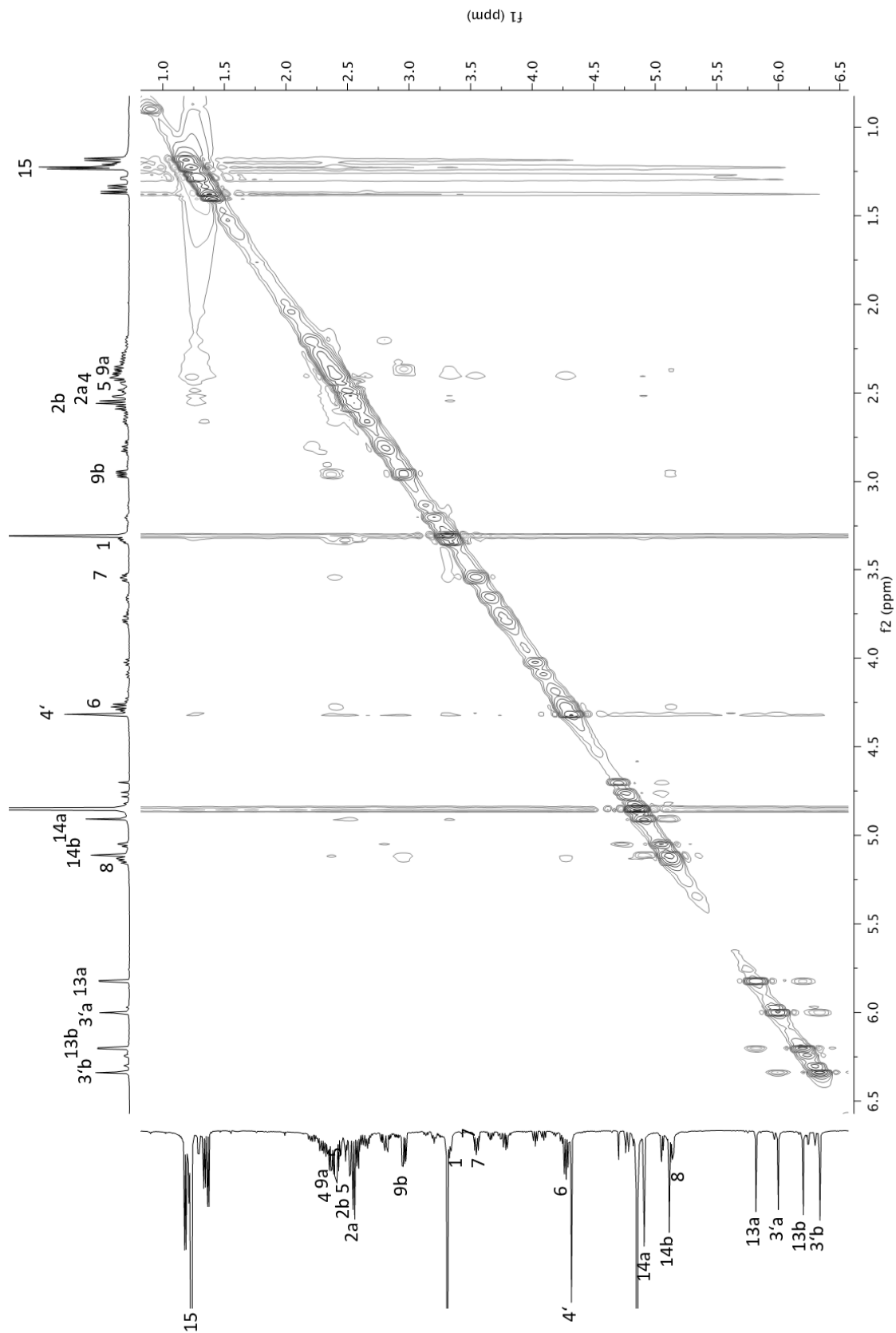


Abbildung 2.71: 2D-NOESY-Spektrum von Verbindung **5** (600 MHz in CD₃OD)

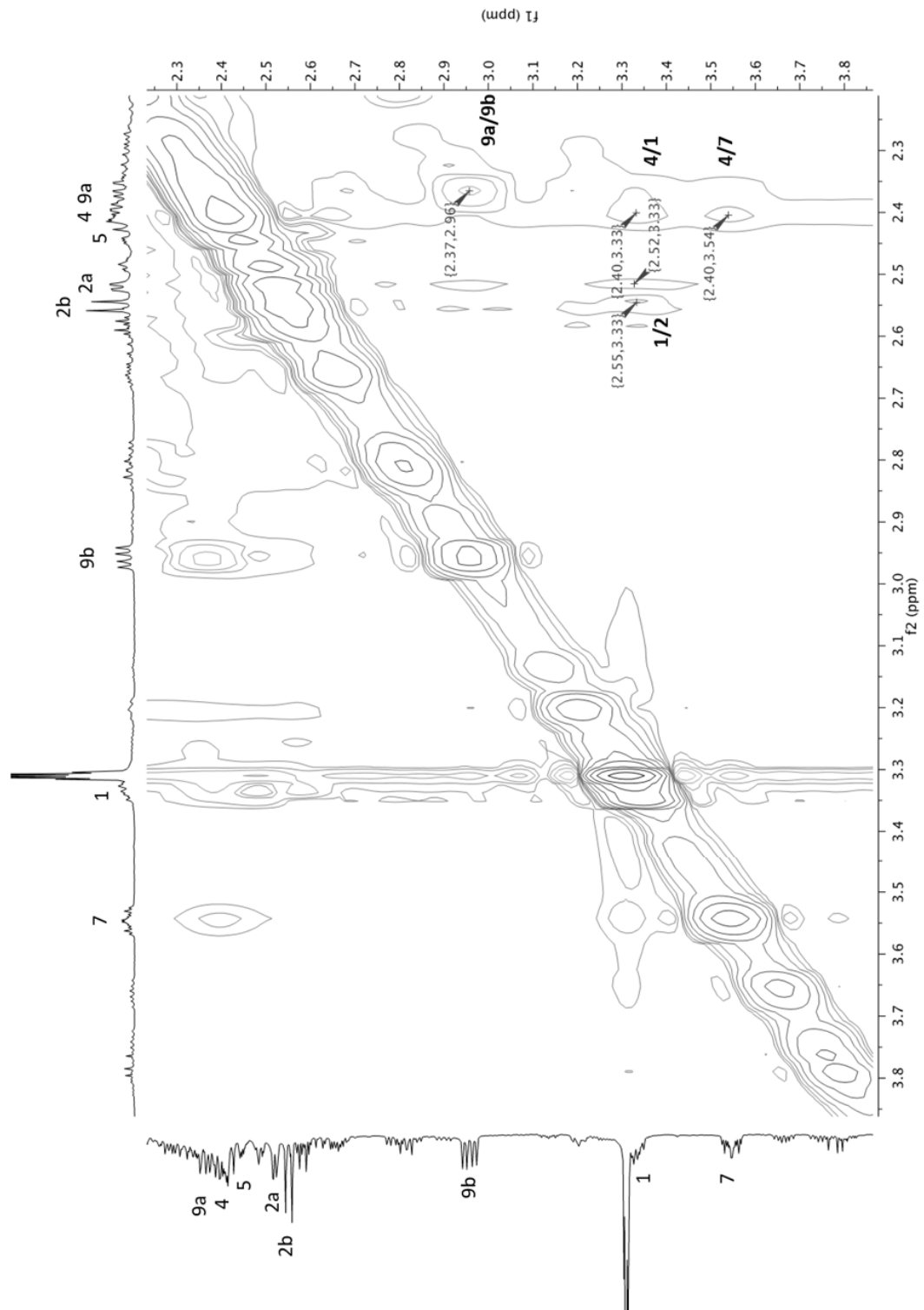


Abb. 2.72: Ausschnitt aus dem 2D-NOESY-Spektrum von Verbindung 5 (600 MHz in CD₃OD)

Zusätzlich bestätigt wird die Stereochemie durch das ebenfalls aufgenommene zweidimensionale NOESY-Spektrum (s. Abb. 2.71, S.119). Die Crosspeaks zwischen den β -orientierten Protonen H-6 und H-8 bestätigen die α -Position des 2-Hydroxymethylacrylsäureesters an C-8. (Abb.2.72, S.120) zeigt einen Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum, in dem die Cross-Peaks zwischen H-4 ($\delta_{\text{H}} = 2.40$ ppm) und H-1 ($\delta_{\text{H}} = 3.34$ ppm) sowie H-4 und H-7 ($\delta_{\text{H}} = 3.55$ ppm) die α -Position des Protons an C-4 bestätigen. Bei Verbindung **4** handelt es sich demnach um das 3-Oxo-8-(2-Hydroxymethyl-methacryloyl-oxy)-guaia-10(14)-en-12,6-olid handeln. Diese Substanz findet sich, wie bereits bei Verbindung **4** beschrieben, als *rel*-(3*aR*,4*S*,6*aR*,9*R*,9*aR*,9*bR*)-Dodecahydro-9-methyl-3,6-bis(methylene)-2,8-dioxoazuleno[4,5-*b*]furan-4-yl 2-(hydroxymethyl)-2-propenoate unter der Cas-Registry-Number 1212401-38-1, ohne Angabe einer natürlichen Resource. Wie bei **4** sollte es sich daher um einen neuen Naturstoff handeln.

Vergleicht man die von Rafrafi veröffentlichten Daten, dann ist festzustellen, dass die hier für **5** ermittelten Daten besser passen. Das gilt insbesondere für die Shiftwerte von H-2 und C-2, die relativ gut übereinstimmen. Wie bereits bei der Strukturaufklärung von **4** besprochen, haben Rafrafi et al. (2021) in der veröffentlichten NMR-Tabelle Daten angegeben, die dem im Supplementary Material beigefügten Spektrum nicht entsprechen. Es bleibt daher unklar, ob die Substanzen wirklich identisch sind, weil das ^{13}C -Spektrum in Methanol fehlt. Um zu klären, ob das im Supplementary Material der Rafrafi Publikation veröffentlichte, offensichtlich in DMSO- d_6 aufgenommene Spektrum der hier isolierten Verbindung **5** ähnelt, wurde ein Satz Spektren in DMSO- d_6 aufgenommen (s. Abb. 2.73 – 2.78, S.122-127). Nach Auswertung der Daten (s. Tabelle 2.8, S.105) zeigte sich, dass die beiden Verbindungen **4** und **5** nahezu identische Spektren ergeben. Der Unterschied besteht hauptsächlich darin, dass das C-2 in CD_3OD im ^{13}C -NMR-Spektrum von **5** im Vergleich zu **4** um ca. 0.8 ppm hochfeldverschoben ist. Die zugehörigen Protonen zeigen ein anderes Aufspaltungsmuster bei sehr geringer Verschiebung der Signale. Vergleicht man das ^1H -NMR Spektrum aus der Publikation von Rafrafi et. al (2021) mit unseren Spektren, so sieht das Spektrum, insbesondere im Resonanzbereich der Protonen an C-2, dem Spektrum von **5** sehr ähnlich.

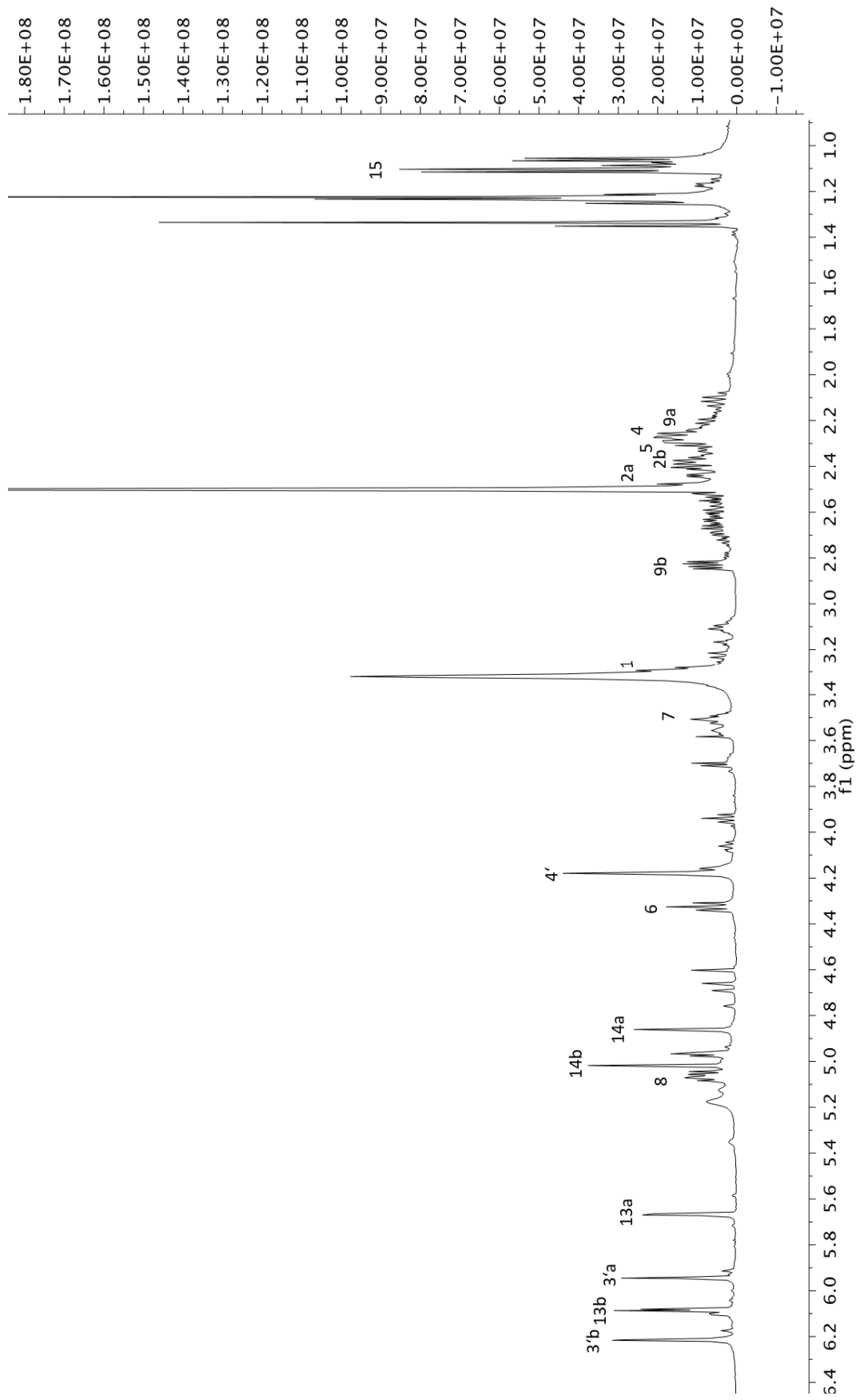


Abbildung. 2.73: ¹H-NMR Spektrum von **5** (600 MHz in DMSO-d₆)

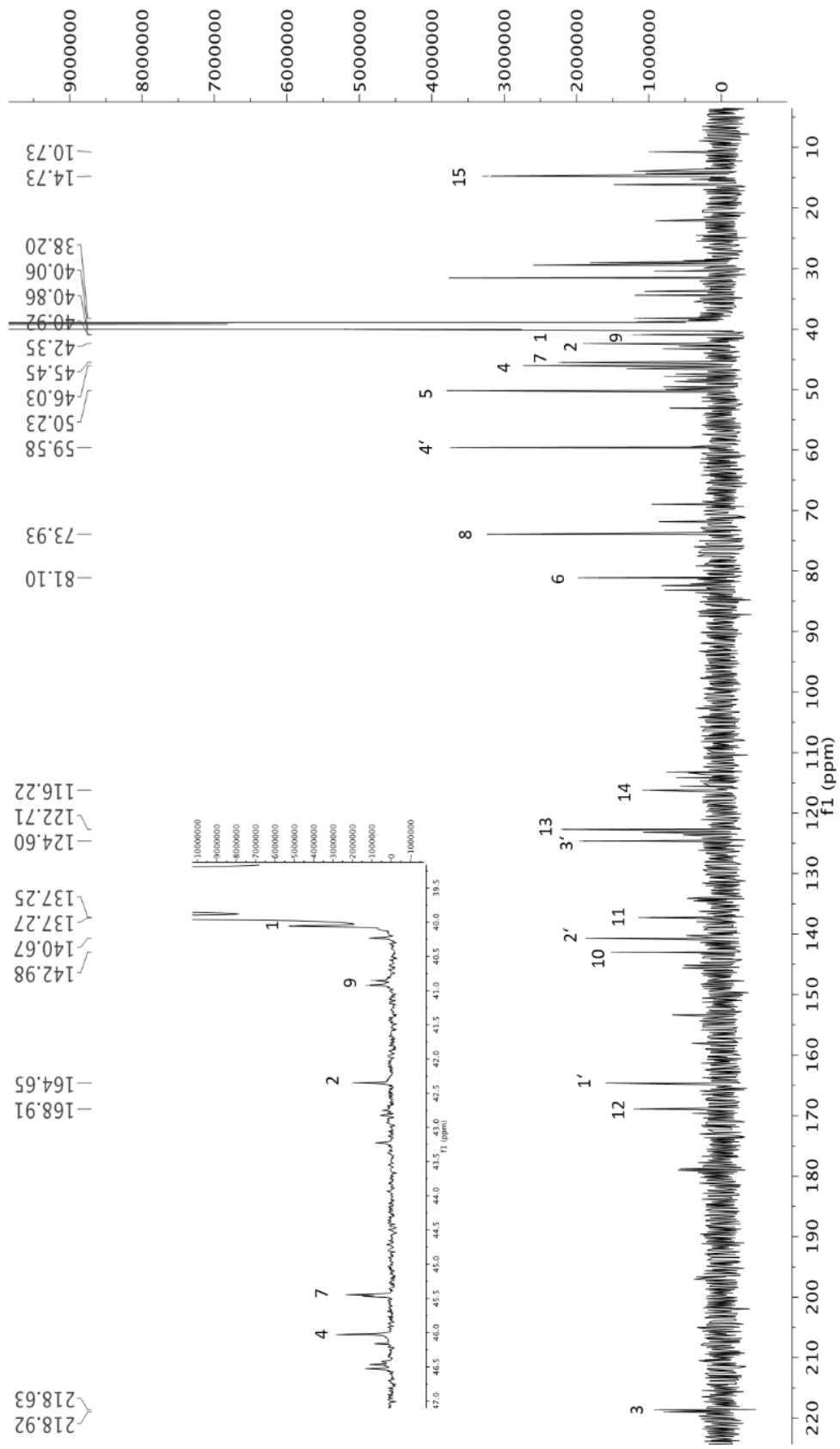


Abbildung 2.74: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 5 (150 MHz in DMSO-d_6)

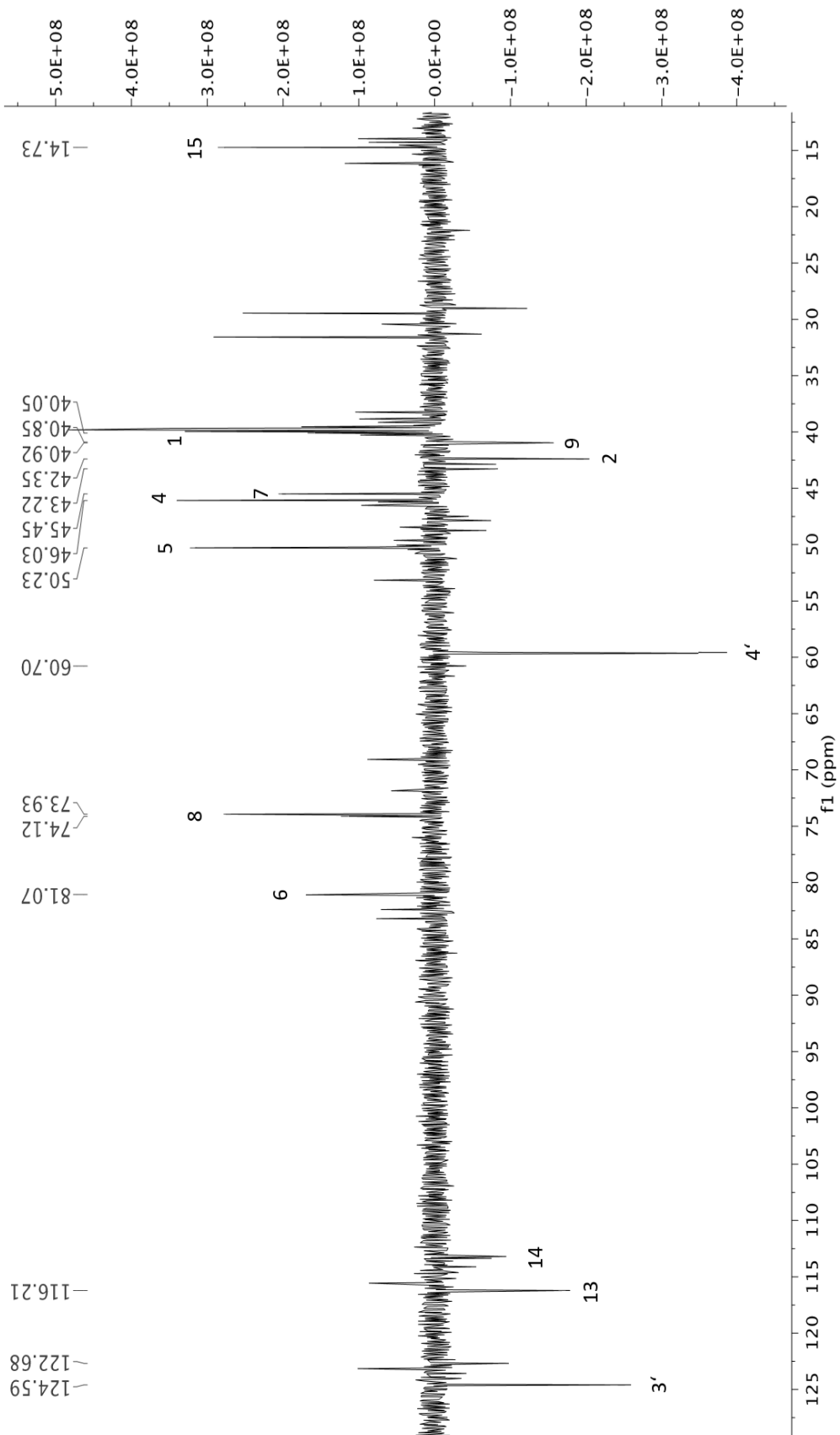


Abbildung 2.75: ^{13}C -NMR DEPT Spektrum von **5** (150 MHz in DMSO- d_6)

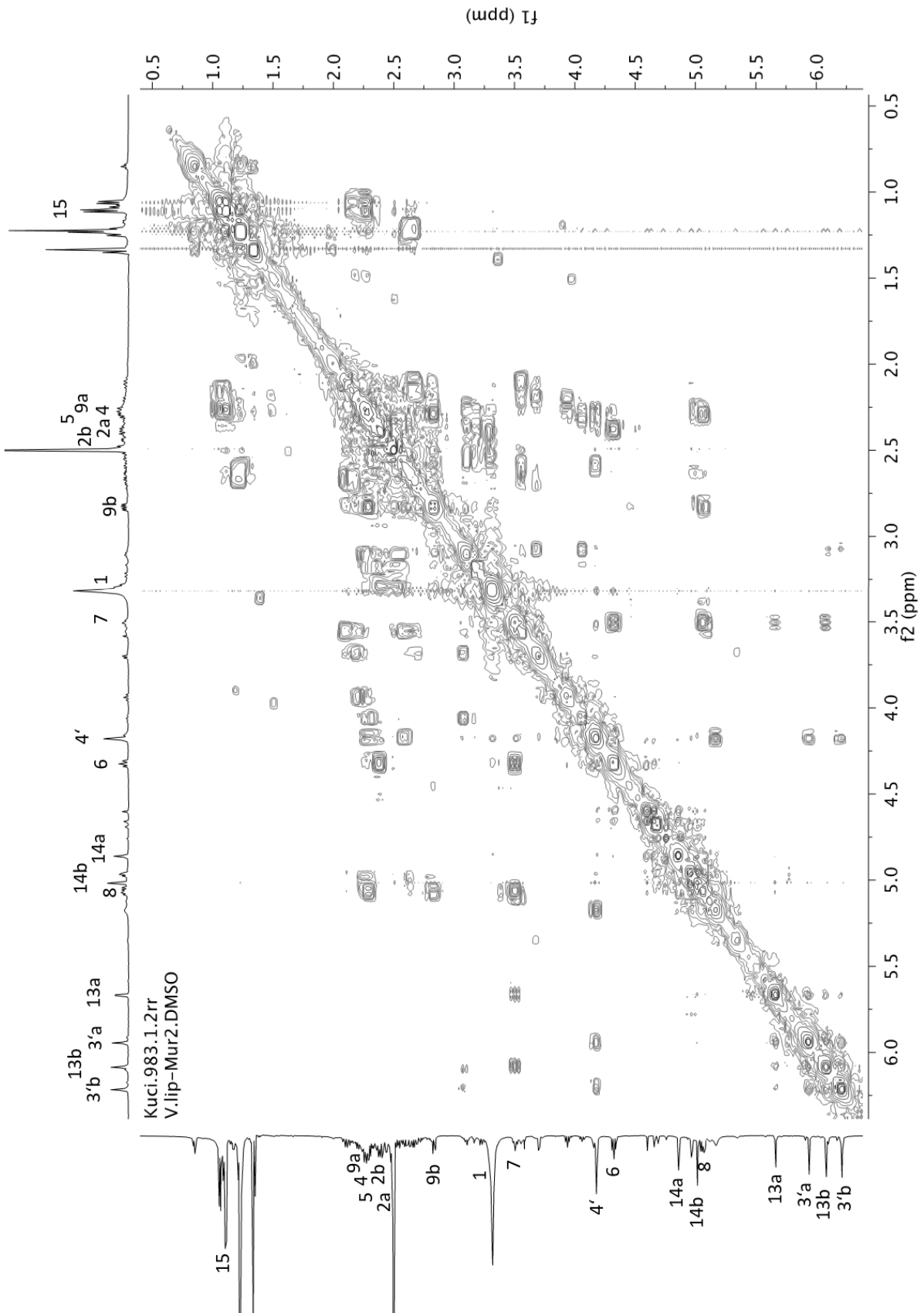


Abbildung: 2.76: 2D-COSY-Spektrum von 5 (600 MHz in DMSO-d₆)

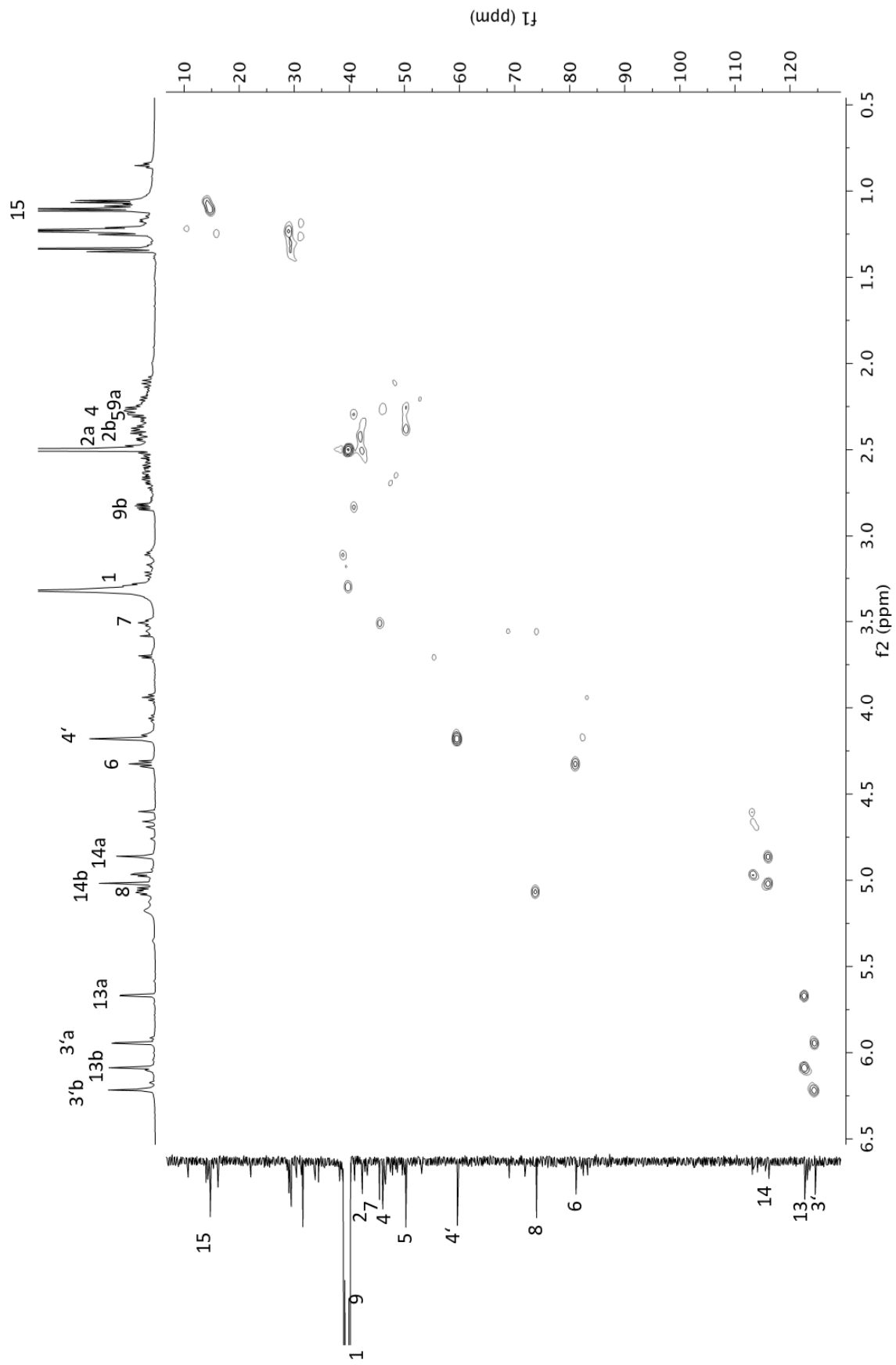


Abbildung 2.77: 2D-HSQC-Spektrum von **5** (600 MHz in DMSO- d_6)

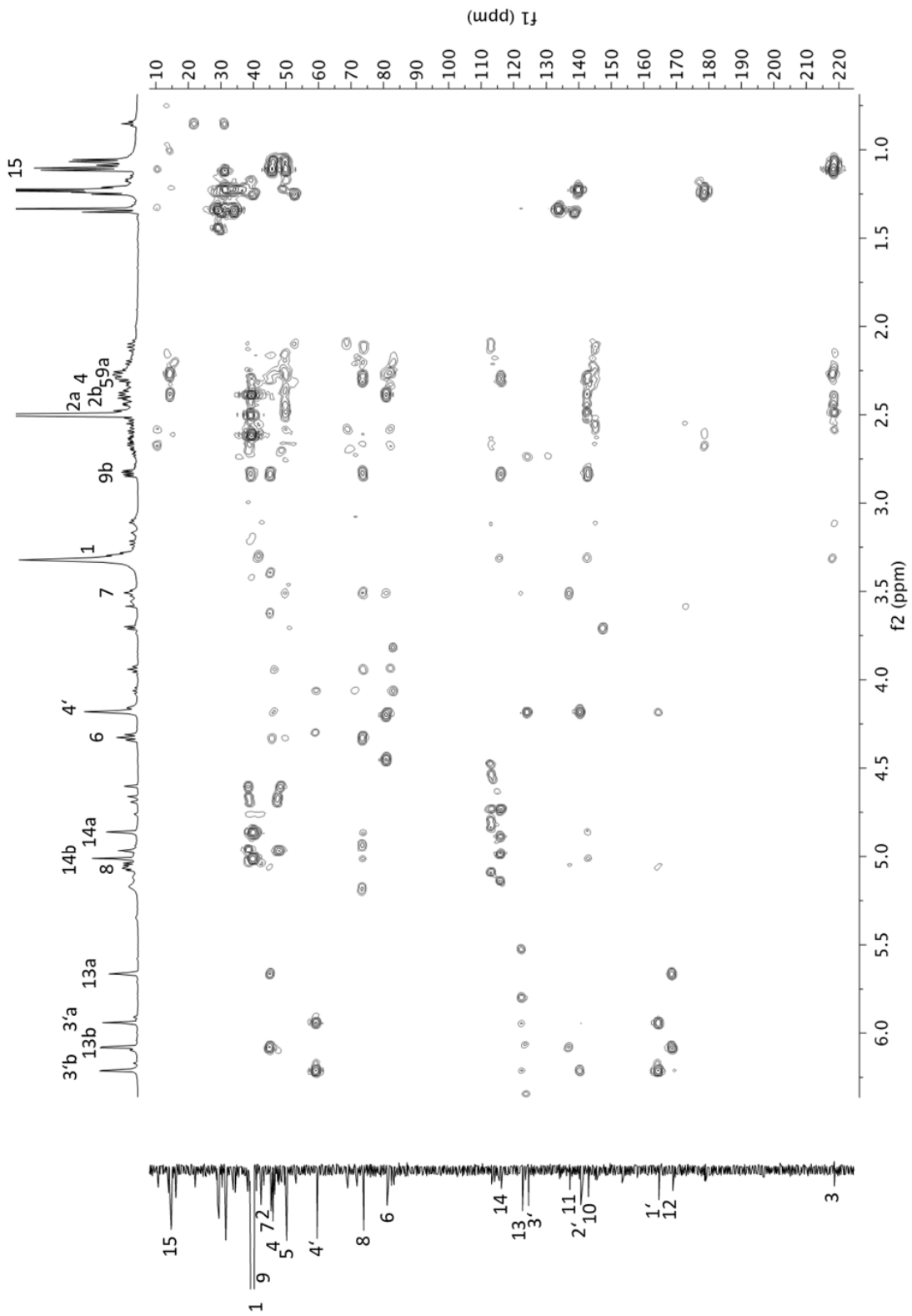


Abbildung 2.78: 2D-HMBC-Spektrum von **5** (600 MHz in DMSO- d_6)

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den beiden, hier isolierten Verbindungen **4** und **5** wirklich um zwei Substanzen handelt, wurde abschließend ein ^{13}C -DEPT-Spektrum einer bei der Isolierung und Trennung der beiden Isomere erhaltenen Zwischenfraktion in CD_3OD aufgenommen. Abbildung 2.79 zeigt den wesentlichen Ausschnitt aus diesem Spektrum. Wie man sehen kann, finden sich die Signale der Kohlenstoffe C-2 und C-9 von **5** bei den entsprechenden Shiftwerten von $\delta = 43.86$ und 41.13 ppm im Spektrum wieder. Neben dem Signal für C-9 findet sich bei $\delta = 43.07$ das gemeinsame Signal der Kohlenstoffe C-2 und C-9 von **4**, die hier die Nebenkomponente in diesem Gemisch darstellt. Damit ist eindeutig gezeigt, dass es sich bei den beiden Guaianoliden **4** und **5** tatsächlich um zwei Verbindungen handelt.

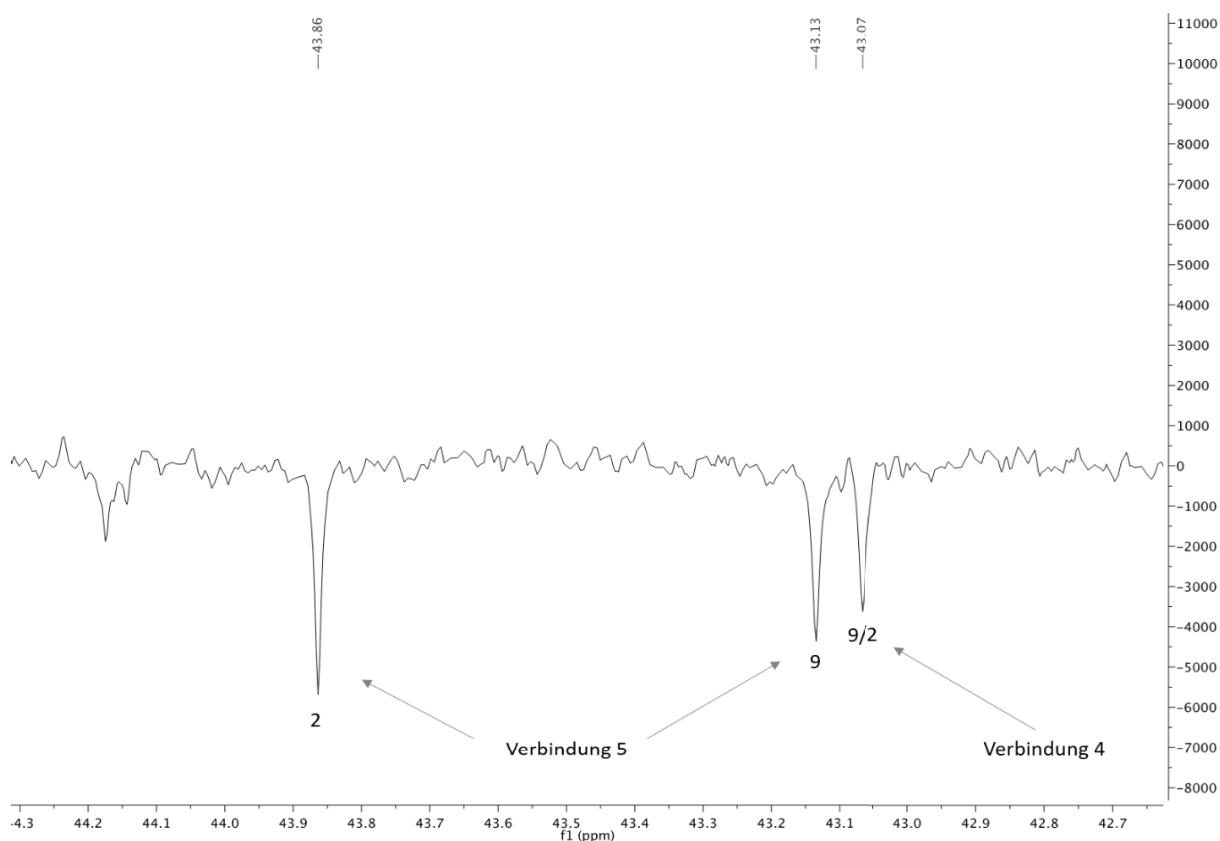
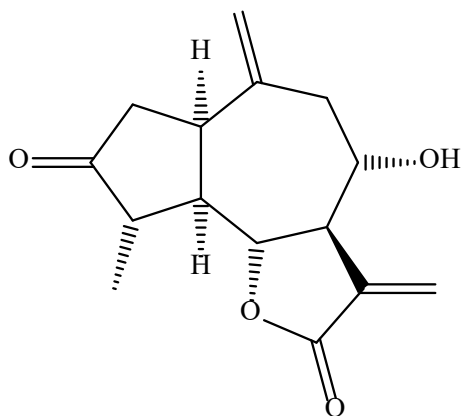


Abbildung 2.79: Ausschnitt aus dem ^{13}C -DEPT-Spektrum eines Gemisches von **4** und **5**

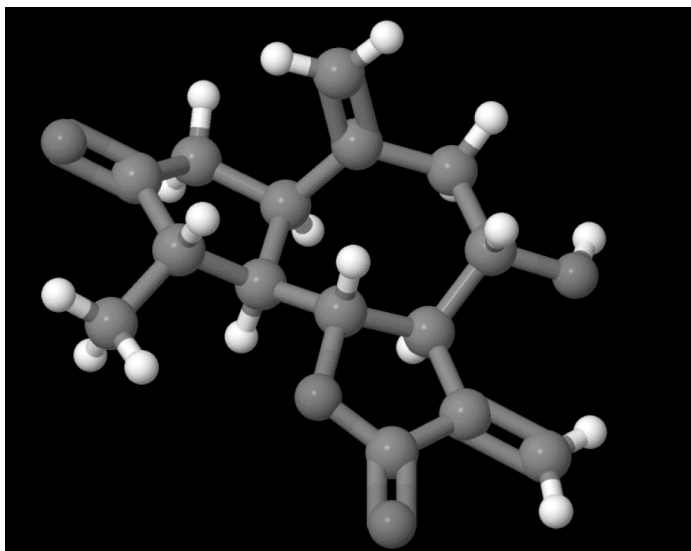
Über die Frage, warum sich die Spektren der beiden Substanzen in DMSO kaum und in Methanol nur wenig voneinander unterscheiden, kann nur spekuliert werden. Verbindung **4** und **5** unterscheiden sich nur in der Position der Methylgruppe an C-4 voneinander, die chemische Umgebung ist an allen Positionen gleich. Da der Cycloheptanring in den bisher gefundenen Guaianoliden sehr flexibel ist, kann dieses Ringsystem verschiedene Konformationen annehmen und dadurch die Position sich gegenseitig störender Substituenten, wie z.B. Methylen- und Methylsubstituenten an den Positionen C-10 und C-4 energetisch verbessern (Faszylova und Turdybekov, 2000).

Die epimeren Verbindungen **4** und **5** stellen beide einen 2-Methylenhydroxymethacrylsäureester des Grosshemins dar (Scheichenko & Rybalko, 1972), der an der α -ständigen Hydroxylgruppe an C-8 gebunden ist. Auf der Webseite des "Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)" (www.ccdc.cam.ac.uk) finden sich die Modelle der Kristallstrukturen von Grosshemin und seinem an der α -ständigen Hydroxylgruppe an C-8 mit Essigsäure gebildeten Esterderivat (s. Abb. 2.80 und 2.81, S. 130 u.131). In der Kristallstruktur liegen die beiden Verbindungen in unterschiedlichen Konformationen vor. Während beim Grosshemin (Bild I in der Abbildung 2.80) zu erkennen ist, dass die exocyclische Methylengruppe an C-10 nach oben gerichtet, über dem Cyloheptanring steht, der relativ relaxiert in einer Art Sesselkonformation vorliegt, ist sie in der Kristallstruktur des Grossheiminacetats unter dem Ring angeordnet (s. Abb. 2.81). Der Unterschied könnte auf die freie Hydroxylgruppe des Grosshemins zurückzuführen sein, wodurch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden sein sollten, die in Kristallen des Grossheiminacetates nicht gebildet werden können.

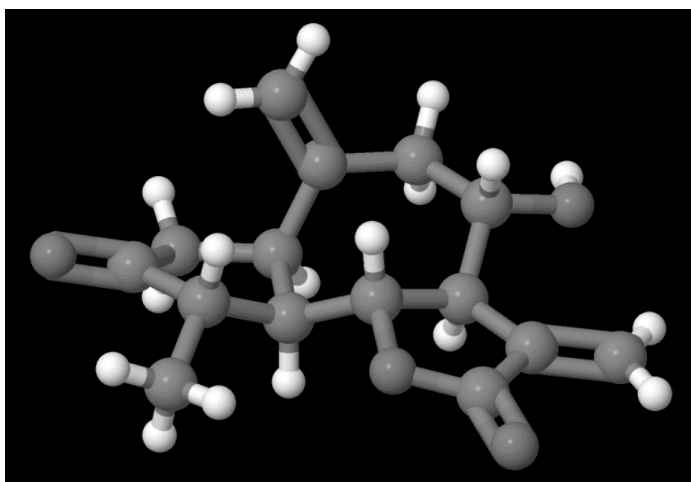
Welche der Konformationen in Lösung vorliegt, kann aus der Kristallstruktur nicht abgeleitet werden. Um den Versuch zu starten den Grund für die Unterschiede in den Spektren der beiden C₄-Epimere **4** und **5** zu erklären ist es dennoch hilfreich die beiden Kristallstrukturen genauer anzuschauen. Im Grosshemin, und selbstverständlich auch in seinem Acetat, liegt die Methylgruppe an C-4 in der α -Position vor. Wie man jeweils auf dem Bild II der Kristallstruktur der Grossheimine (s. Abb. 2.80 und 2.81) erkennen kann, liegt der Cyclopentanonring in der Halbsesselkonformation vor, bei der alle fünf Kohlenstoffe mehr oder weniger in einer Ebene angeordnet sind.



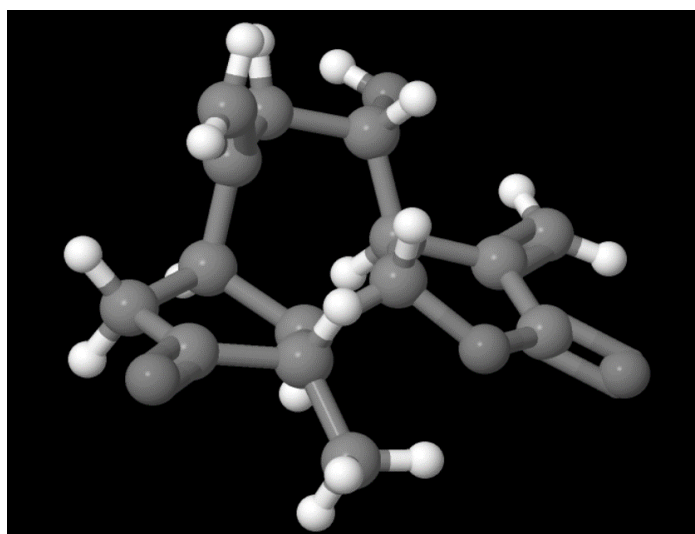
Grossheimin



I

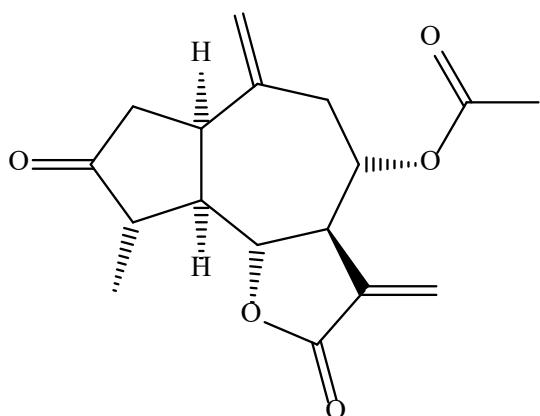


II

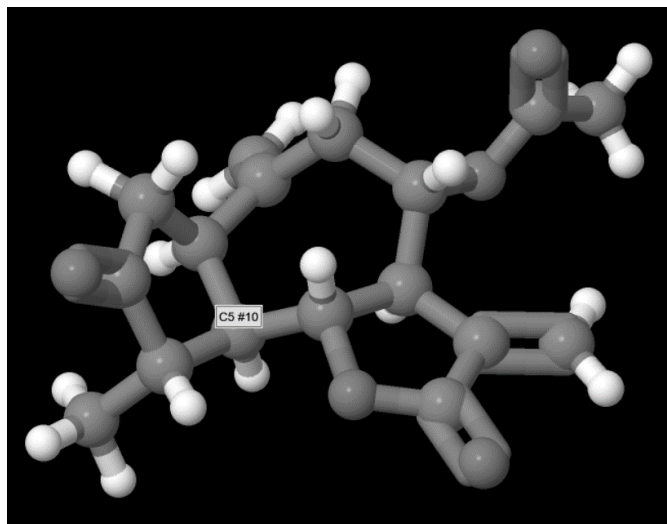


III

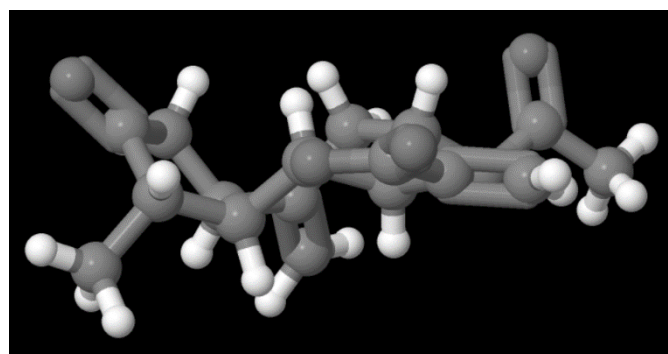
Abbildung. 2.80: 3D-Struktur von Grossheimin (CCDC 605933, nach Macias et al., 2006)



Grossheiminacetat



I



II

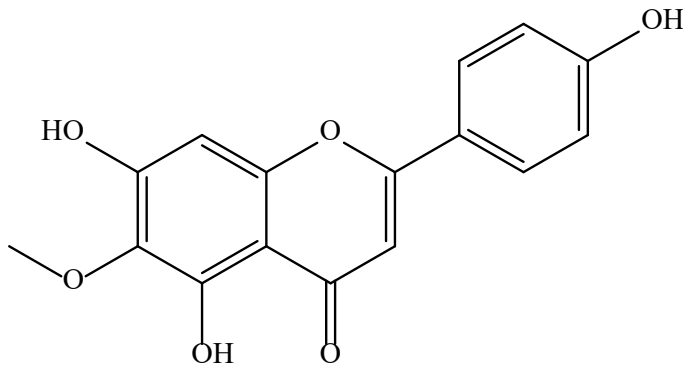
Abb. 2.81: 3D-Struktur von Grossheiminacetat (CCDC 1441214, nach Fazylova et al., 2006)

Wenn die Methylgruppe den Platz mit den H-4 tauscht, dann besteht im Falle der Konformation des Grossheimins (Abb. 2.80), die Möglichkeit, dass der Fünfring seine Konformation ändert, weil die nun β -ständige Methylgruppe an C-4 nach oben gerichtet ist und von der ebenfalls nach oben gerichteten Methylengruppe an C-12 abgestoßen wird. Diese Änderung der Konformation hätte dann aber nur relativ geringe Konsequenzen für die anderen Atome. Bei der im Abbildung 2.81 dargestellten Konformation des Grossheiminacetat ist diese Erklärung nicht möglich, weil die beiden C-Atome in beiden Fällen zu weit voneinander entfernt sind. Über die Flexibilität des Cycloheptanrings verbunden mit dem leichten Übergang des Cyclopentanrings von der Halbsesselform (twisted chair) in die Briefumschlagform (envelope) wird deutlich, dass sich die chemischen Verschiebungen beider Verbindungen kaum unterscheiden müssen.

Der von uns bemerkte Unterschied besteht ja nicht generell, sondern nur bei der Aufnahme der Spektren in Methanol-d₄. Methanol besitzt im Gegensatz zu DMSO eine alkoholische Hydroxylgruppe, die Wasserstoffbrücken mit den Carbonylgruppen von **4** und **5** bilden kann. Möglicherweise kommt es nur im Falle von Verbindung **5** zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke (CD₃-OD-----O=C₃-R), was dann zur Änderung der Konformation des Cyclopentanonrings und zur Tieffeldverschiebung des C-2 führt. Leider konnten wir nicht genügend Substanz isolieren, um weitergehende Untersuchungen durchzuführen. Es wäre wünschenswert, die beiden Verbindungen in größerer Konzentration zu isolieren und die Konformationen von **4** und **5** über eine Röntgenstrukturanalyse miteinander zu vergleichen.

Bei einer der beiden Verbindungen **4** und **5**, die beide erstmals aus *Volutaria boranensis* isoliert worden sind, handelt es sich um einen neuen Naturstoff. Wie bereits ausgeführt ist es wahrscheinlicher, dass **5** zeitgleich mit den hier isolierten und identifizierten Verbindungen von Rafrafi et al. (2021) aus *V. lippi* isoliert wurde, so dass Verbindung **4** einen neuen Naturstoff darstellen sollte.

2.2.5. Verbindung 6 (Hispidulin)



Fraktion V.b.D.8.12 fiel nach Versetzung mit Lösungsmittel (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3) als gelbe kristalline Substanz aus (10,21mg). Die ausgefallene Substanz sah bereits bei Tageslicht auf der DC-Platte (DC1, s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1) gelb aus und ließ deshalb vermuten, dass es sich um ein Flavonoid handeln könnte. Nach Besprühen der Dünnschichtplatte mit dem für Flavonoide üblicherweise verwendeten Naturstoffreagenz A (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1), zeigte die Verbindung **6** eine orangefarbene Fluoreszenz. Im HPLC (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.4) besitzt **6** eine Retentionszeit von 25,18 Minuten. Das mit Hilfe des Diodenarray-Detektors gleichzeitig aufgenommen UV-Spektrum zeigt zwei Maxima bei $\lambda = 270$ nm und 346 nm, was aufgrund der Lage der Maxima im Bereich von $\lambda = 300 - 380$ nm und $\lambda = 240 - 280$ nm vermuten lassen, dass es sich bei Verbindung **6** um ein Flavon handelt (Mabry et al, 1975).

Im HRESI-MS mit hochauflösender Massenmessung (s. Abb. 2.82, S.134) zeigte **6** das Quasimolekülion $[M+H]^+$ bei $m/z = 301.0709$, woraus sich die Summenformel $C_{16}H_{12}O_6$ ableiten lässt.

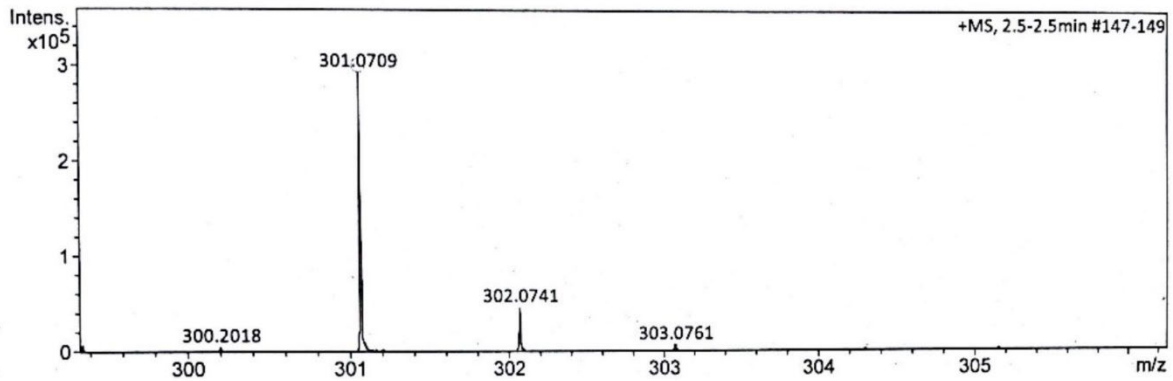


Abbildung 2.82: HRESI-Massenspektrum von Verbindung **6**

Bei Flavonoiden, die, aufgrund ihrer absorbierenden Eigenschaften im kurz- und langwelligen UV-Bereich in allen höheren Pflanzen vorkommen und so einen wichtigen Beitrag zu einem wirksamen UV-Schutz der oberirdischen Pflanzenorgane leisten, handelt es sich um sehr häufig in der Natur gefundene Verbindungen (Mabry et al, 1975). Wegen Ihrer gelben oder orangenen Farbe besitzen sie auch große Bedeutung bei der Färbung von Blüten (Blaschek, 2016) Ihr chemisches Grundgerüst besteht in der Regel aus drei Ringen (A, B und C), wobei die meisten Substanzen zur Gruppe der Flavanone, Flavanonole, Flavone und Flavonole gehören (s. Abb. 2.83, S 135).

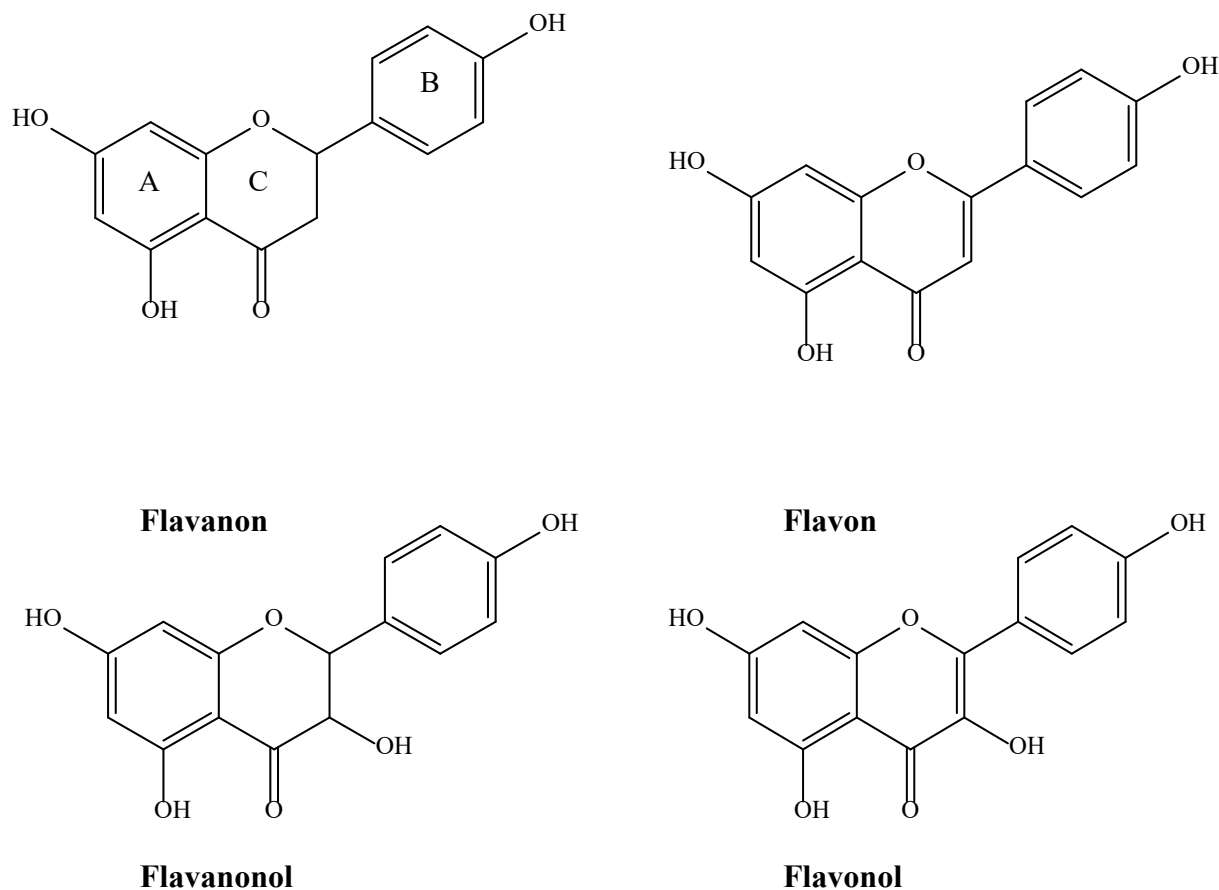


Abbildung 2.83: Vier häufige Grundstrukturen natürlich vorkommender Flavonoide.

Zur eindeutigen Aufklärung der Struktur von **6** wurden zunächst ein- und zweidimensionale Spektren in deuteriertem Methanol aufgenommen. Abbildung 2.84 (siehe S. 138) zeigt das ^1H NMR Spektrum von **6**, in dem insgesamt fünf Signale gefunden wurden, deren Integrale zeigen, dass diese insgesamt neun Protonen repräsentieren. Im tiefen Feld bei $\delta = 7.48$ und 6.93 ppm finden sich zwei Dubletts für jeweils zwei Protonen, deren Koppelung im zweidimensionalen H,H-COSY-Spektrum nachgewiesen werden konnte. (s. Abb. 2.86, S.140). Da in diesem Spektrum keine weiteren Protonen-Protonen Interaktionen nachgewiesen werden konnten, handelt es sich bei den übrigen drei Signalen um Singulett. Da keine Signale von aliphatischen, an sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffen gebundenen Protonensignale (H-2 und H-3 in Flavanonen und Flavanonolen) vorhanden sind, handelt es sich bei **6** um eine Flavon oder Flavonol.

Wie in der Abbildung 2.83 (siehe S. 135) dargestellt, besitzen die meisten Flavonoide eine Hydroxylgruppe am C-4' des B-Rings. Diese phenolische OH-Gruppe kann jedoch auch von einer oder zwei ortho-ständigen Hydroxylgruppen an C-3' und C-5' begleitet sein. Flavonoide

mit einer 3',4',5'-Trihydroxysubstitution sind allerdings sehr oxidationsempfindlich. Das hier gefundene Spinsystem mit zwei Dubletts für jeweils zwei Protonen spricht für ein AA'BB'-System, bei dem von vier relativ ähnlichen Protonen jeweils zwei chemisch, aber nicht magnetisch äquivalent sind. Am B-Ring eines 4'-monohydroxylierten Flavonoids (Abb. 2.83) befinden sich vier Protonen in den Positionen 2', 3', 5' und 6'. Jeweils zwei dieser Protonen sind wegen der freien Drehbarkeit um die Bindung zwischen C-2 und C-1' chemisch äquivalent. Typischerweise finden sich dann zwei Dublett für die Protonen an C-2' und C-6' beziehungsweise C-3' und C-5' im Bereich aromatischer Protonen bei $\delta = 7.48$ und 6.93 ppm. Das im tieferen Feld auftretende Signal gehört dabei zu den Protonen H-2' und H-6', während das im höheren Feld bei $\delta = 6.93$ ppm auftretende Signal den beiden Protonen an C-3' und C-5' zuzuordnen ist (Mabry et al, 1975). Die Kopplungskonstante in Höhe von ca. 8 Hz liegt im typischen Bereich für eine ortho-Kopplung am Aromaten. Bei den drei Singulets bei $\delta = 3.88$, 6.56 und 6.59 ppm handelt es sich bei den im tiefen Feld auftretenden Resonanzen um zwei Signale für jeweils ein Proton, während das Signal bei $\delta = 3.88$ ppm drei äquivalente Protonen einer Methylgruppe repräsentiert. Aufgrund der chemischen Verschiebung sollte es sich hierbei um einen Methylether handeln (Dominik et al., 2013). Methoxysubstituenten finden sich in Flavonoiden sehr häufig, wobei ihre Position am Flavonoidringsystem sehr variabel ist. Bei Flavonen ist eine Methoxysubstitution der Kohlenstoffe im A- oder B-Ring möglich, bei Flavonolen kann auch eine Methylierung der Hydroxylgruppe an C-3 zu einer solchen Gruppierung führen. Bei 4',5, 7-Trihydroxy-Flavonoiden mit einem AA'BB'-Spinsystem im B-Ring wären die beiden Protonen an C-6 und C-8 vorhanden, wenn sich die Methoxygruppe am C-3 eines Flavonols bzw. am C-5, C-7 oder C-4' eines Flavonols oder Flavons befände. In all diesen Fällen würden die Protonen H-6 und H-8 jeweils mit einer für meta-ständige Protonen typischen Kopplungskonstanten (J) in Höhe von ca. 2-3 Hz aufspalten. Da hier jedoch zwei Singulets für je ein Proton im aromatischen bzw. olefinischen Bereich auftreten, muss es sich bei **6** um ein an C-6 oder C-8 methoxyliertes Flavon handeln, bei dem ein Singulett vom Proton an C-3 und das andere von H-6 oder H-8 verursacht wurde. Die meisten der zu den jeweiligen Protonen gehörigen Kohlenstoffe lassen sich über das HSQC-Spektrum zuordnen (s. Abb. 2.86, S.140 und Tab 2.9, S.137). Wie zu erwarten war, besitzen auch die Kohlenstoffe C-2' und C-6' ($\delta = 129.5$ ppm) sowie C-3' und C-5' ($\delta = 117.0$) ppm jeweils ein gemeinsames Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum.

Tabelle 2.9: NMR Daten der Verbindung **6** (600 MHz in CD₃OD; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H	¹³ C
2	-	166.4
3	6.59 s	103.4
4	-	184.3
5	-	154.7
6	-	132.9
7	-	158.8
8	6.56 s	95.3
9	-	154.0
10	-	105.8
1'	-	123.3
2'	7.84 d (J=8.2 Hz)	129.5
3'	6.93 d (J=8.5 Hz)	117.0
4'	-	162.8
5'	6.93 d (J=8.5 Hz)	117.0
6'	7.84 d (J=8.2 Hz)	129.5
OCH₃ an C-6	3.88 s	60.9

Der Kohlenstoff der aromatisch gebundenen Methoxygruppe findet sich im typischen Resonanzbereich bei $\delta = 60.9$ ppm. Die Zuordnung der dicht nebeneinander liegenden Protonen Singulets bei $\delta_H = 6.56$ und $\delta_C = 95.3$ ppm bzw. $\delta_H = 6.59$ und $\delta_C = 103.4$ ppm bedarf einer genaueren Erklärung. Während die Protonen bei ganz ähnlichen Shiftwerten registriert werden, kommt einer der beiden Kohlenstoffe bei tieferem Feld zur Resonanz (103.4 ppm). Bei diesem C-Atom sollte es sich um das C-3 handeln, das sich direkt neben der Ketogruppe (C-4) des C-Rings befindet. Dies wird durch ein Kreuzsignal des H-3 (6.59 ppm) mit dem für Flavone typischen quartären Kohlenstoff bei $\delta_C = 184.3$ ppm im HMBC (s. Abb. 2.88, S. 142) bestätigt.



Abbildung 2.84: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung 6 (600 MHz in CD₃OD)

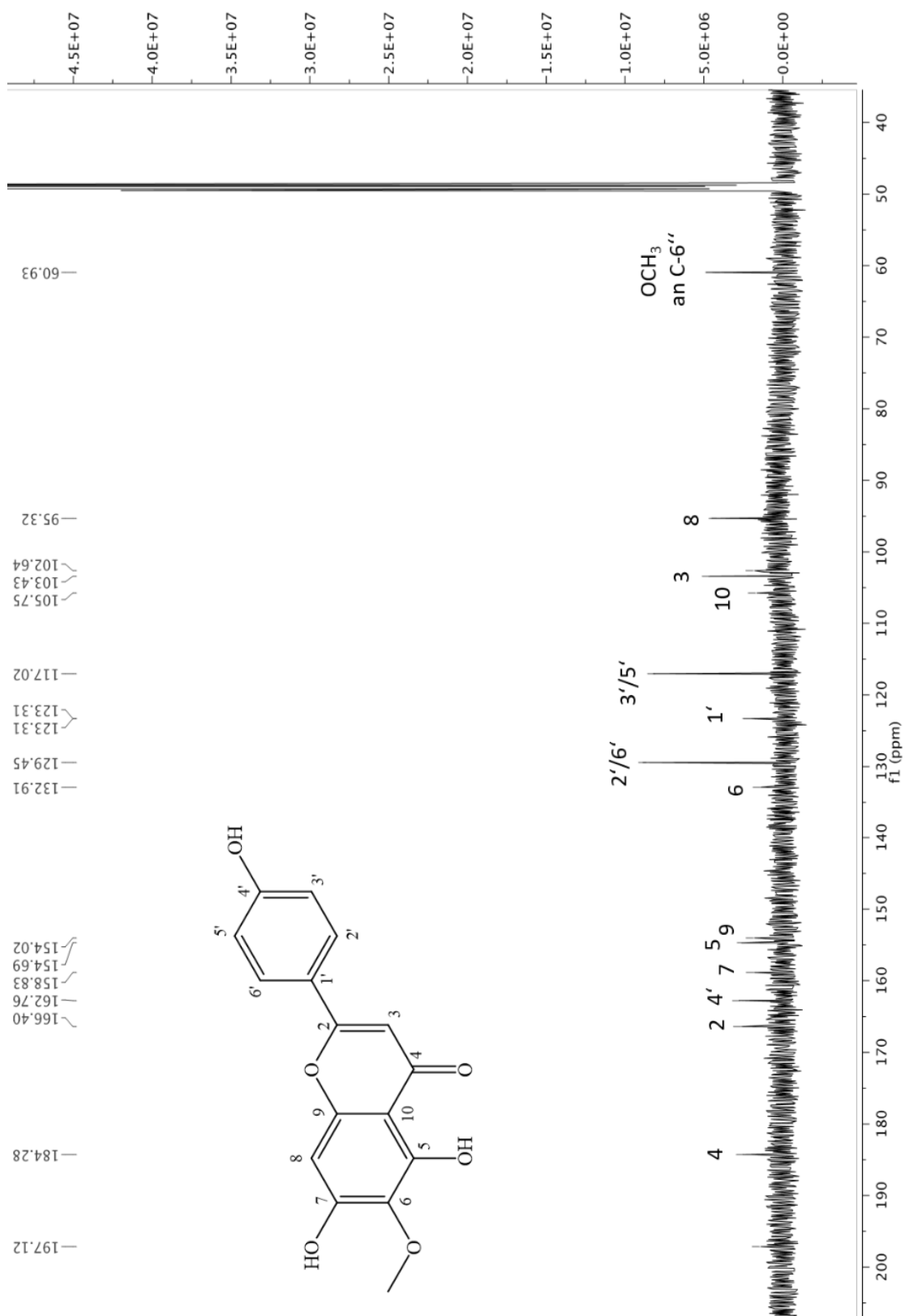


Abbildung 2.85: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 6 (150 MHz in CD_3OD)

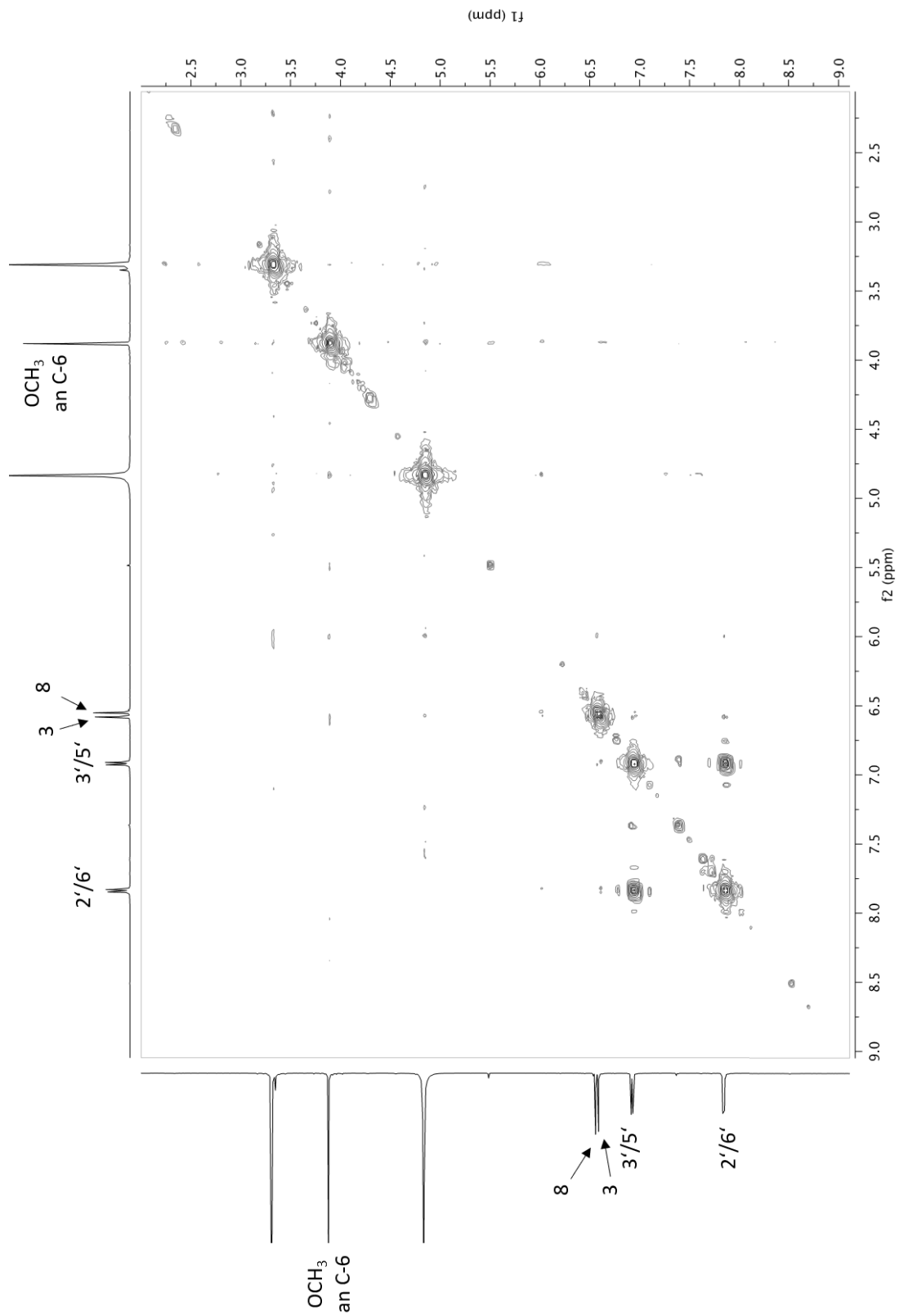


Abbildung 2.86: 2D-COSY-Spektrum von **6** (600 MHz in CD₃OD)

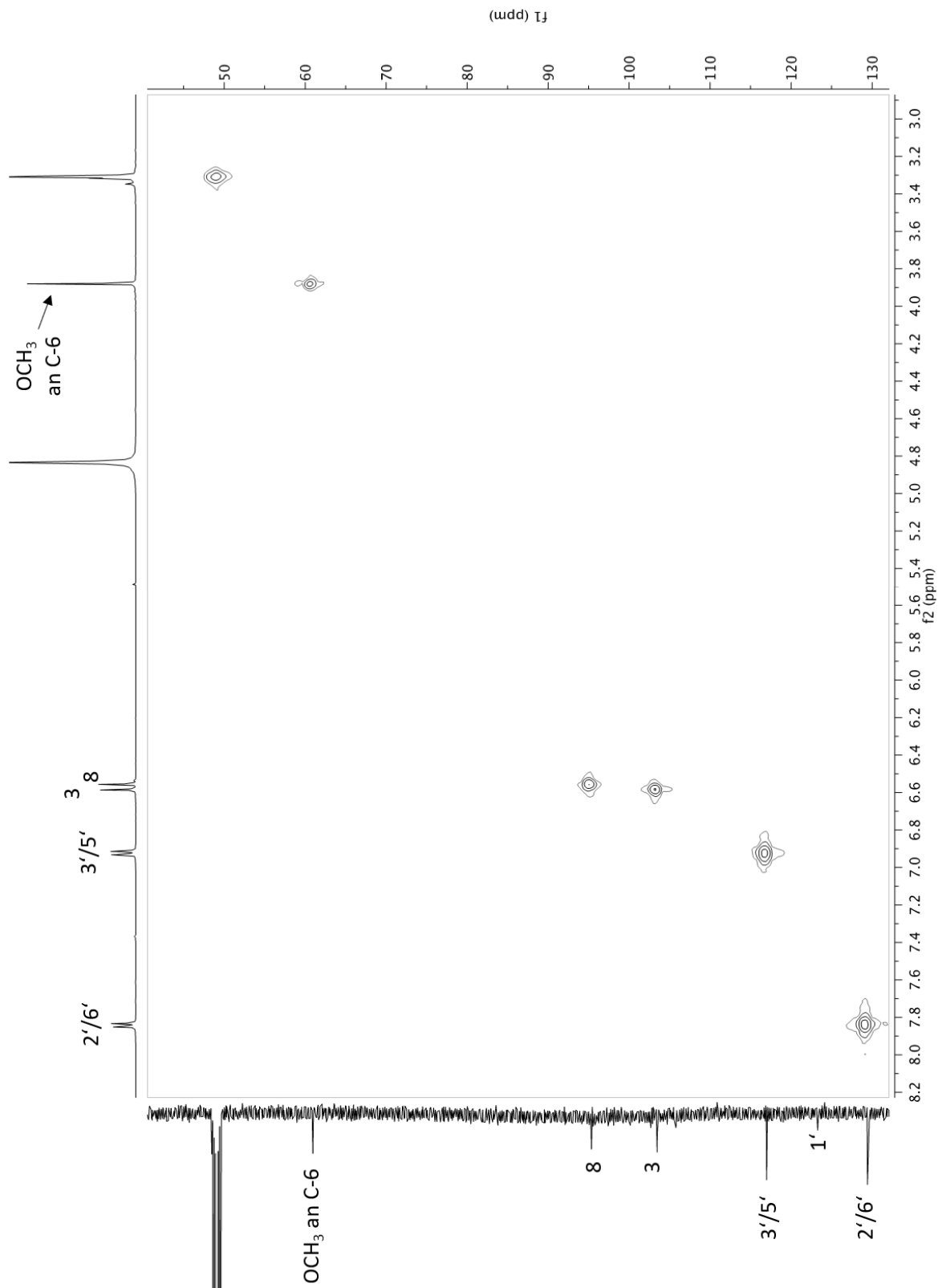


Abbildung 2.87: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **6** (600 MHz in CD₃OD)

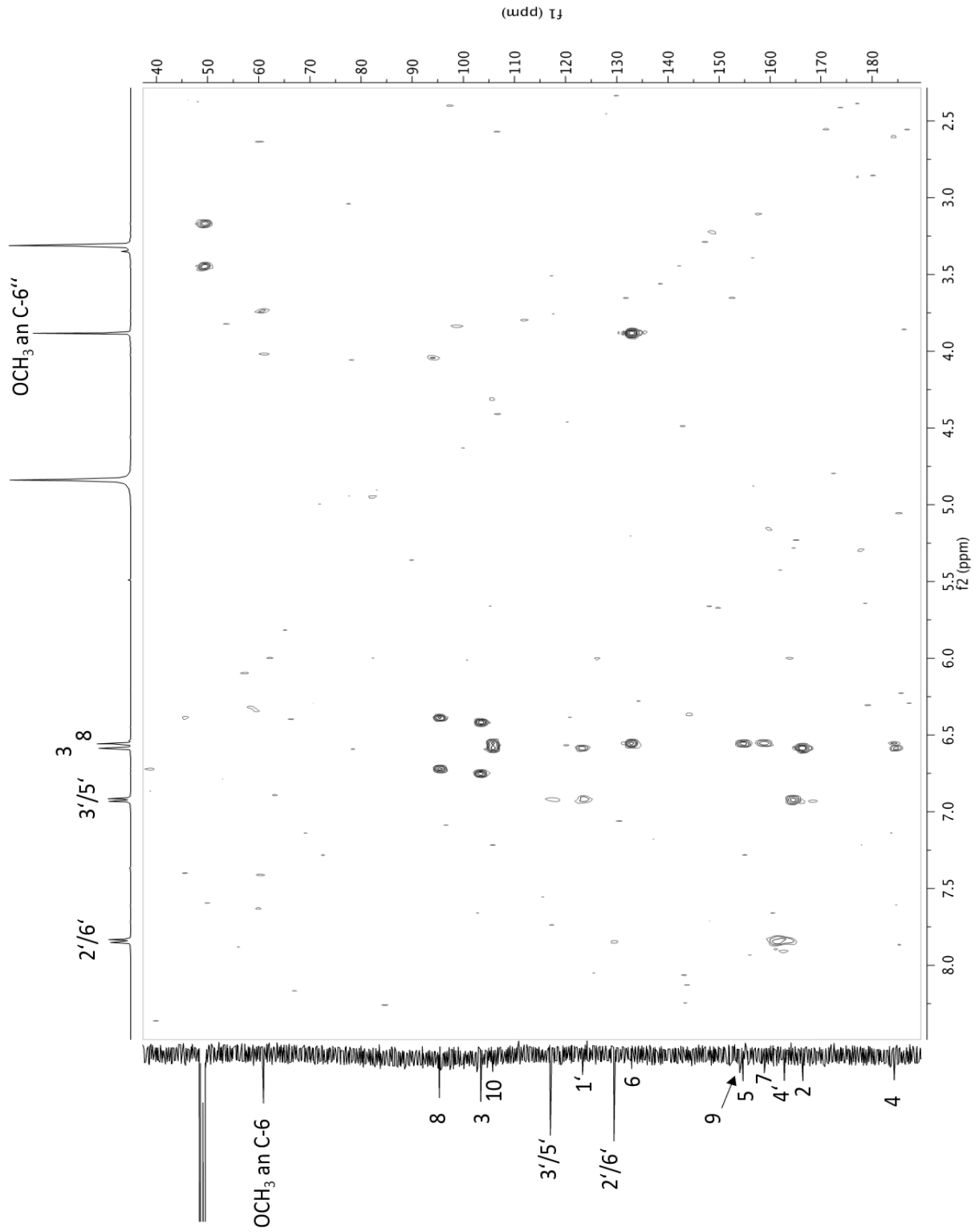


Abb. 2.88: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 6 (600 MHz in CD₃OD)

Mit Hilfe des HMBC-Spektrums konnten auch die anderen quartären Kohlenstoffe zugeordnet werden. So zeigten die Crosspeaks für die ^3J -Kopplungen zwischen H-3 und H-3'/H-5' mit dem Kohlenstoff bei $\delta = 123.3$ ppm, dass es sich dabei um das C-1' handeln musste. C-4' fand sich durch seine Korrelation mit H-2'/H-6' im Bereich sauerstoffs substituierter, aromatischer Kohlenstoffe bei $\delta = 162.8$ ppm. Abschließend blieb noch die Zuordnung der Kohlenstoffe und Protonen im A-Ring zu klären. Aufgrund der ^3J -Kopplung der Methoxyprotonen mit dem Kohlenstoff bei $\delta = 132.9$ ppm, konnte dieses aromatische C-Atom als der die Methoxygruppe tragende Kohlenstoff des A-Rings erkannt werden. Dieser Kohlenstoff besitzt mit dem Proton bei $\delta = 6.56$ ppm einen weiteren Kopplungspartner, bei dem es sich um das H-6 oder H-8 handeln musste. Somit musste sich die Methoxygruppe, wie bereits vermutet, entweder an C-6 oder C-8 befinden. Obwohl das fragliche Proton weitere long-range Kopplungen mit noch nicht zugeordneten quartären Kohlenstoffen besitzt, war eine endgültige Zuordnung der Signale nicht zweifelsfrei möglich. Aus diesem Grund wurden weitere Spektren in DMSO- d_6 aufgenommen (s. Abb. 2.89 bis 2.92, S.146 bis 149). Da es sich bei Dimethylsulfoxid nicht um ein protisches Lösungsmittel handelt, kommt es nicht zum Austausch von aciden Protonen mit Deuterium. Wenn eine Substanz, so wie in hier vorliegenden Fall zuerst in CD_3OD gemessen wurde, muss die Probe vor dem Eintrag in DMSO- d_6 allerdings zunächst eine Weile in nicht-deutertem Methanol gelöst werden, damit ein Rücktausch des Deuteriums gegen Wasserstoff an den Hydroxylgruppen erfolgen kann. Im anschließend aufgenommen Protonenspektrum (s. Abb 2.89, S.146) fällt sofort das Protonensignal bei $\delta = 13.07$ ppm auf, welches keine ^1J -Korrelation zu einem Kohlenstoff im HSQC-Spektrum (s. Abb. 2.91) besitzt. Es handelt sich dabei um das Hydroxylproton der phenolischen OH-Gruppe an C-5, das wegen einer Wasserstoffbrücke mit dem Keton des C-Rings sehr weit tieffeldverschoben auftritt. Über die Kreuzsignale dieses OH-Protons mit den Kohlenstoffsignalen bei $\delta = 152.7$ (C-5), 131.4 (C-6) und 103.8 ppm (C-10), konnte jetzt auch eine Zuordnung der Position der Methoxygruppe nachgewiesen werden. Es handelt sich demnach bei Verbindung **6** um das 6-Methoxyderivat des Apigenins, das unter dem Namen Hispidulin bekannt ist. Diese Verbindung wurde bereits sehr häufig gefunden, unter anderem auch im *Volutaria lippi* (Rafrafi et al, 2021). Die Chemical Abstracts verzeichnen 1.127 Literaturstellen zu dieser Substanz. Erstmals erwähnt wurde die Verbindung von Rangaswami und Rao (1961) als Inhaltsstoff von *Digitalis lanata*, einer auch bei uns bekannten wichtigen Arzneipflanze, Die von uns ermittelten NMR Daten in DMSO- d_6 stimmen sehr gut mit den Daten von Xia et. al (2007) überein.

Da die Verbindung bereits vor so langer Zeit isoliert wurde, existieren keine vollständigen NMR-Daten in Methanol, die wir hier erstmals ermittelt haben.

Für *Volutaria boranensis* ist es das erste als Inhaltsstoff beschriebene Flavonoid.

Tabelle 2.10: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten von Verbindung **6** (δ in ppm, 600 bzw. 150 MHz in DMSO- d_6)

	^1H NMR	Hispidulin (Xia et. al, 2007)	^{13}C NMR	Hispidulin (Xia et. al, 2007)
2	-	-	163.7	163.9
3	6.77	6.78 s	102.3	102.5
4	-	-	182.1	182.2
5	-	-	152.7	152.9
6	-	-	131.4	131.5
7	-	-	157.5	157.5
8	6.58 s	6.60 s	94.3	94.4
9	-	-	152.2	152.5
10	-	-	103.8	104.1
1'	-	-	121.2	121.3
2'	7.92 d (J=8.9 Hz)	7.92 d (J=8.2 Hz)	128.4	128.6
3'	6.92 d (J=8.9 Hz)	6.92 d (J=8.5 Hz)	116.0	116.1
4'	-	-	161.2	161.3
5'	6.92 d (J=8.9 Hz)	6.92 d (J=8.5 Hz)	116.0	116.1
6'	7.92 d (J=8.9 Hz)	7.92 d (J=8.2 Hz)	128.4	128.6
OCH₃ an C-6	3.75 s	3.75 s	60.0	60.0
OH an C-5	13.07 s	13.08 s	-	-

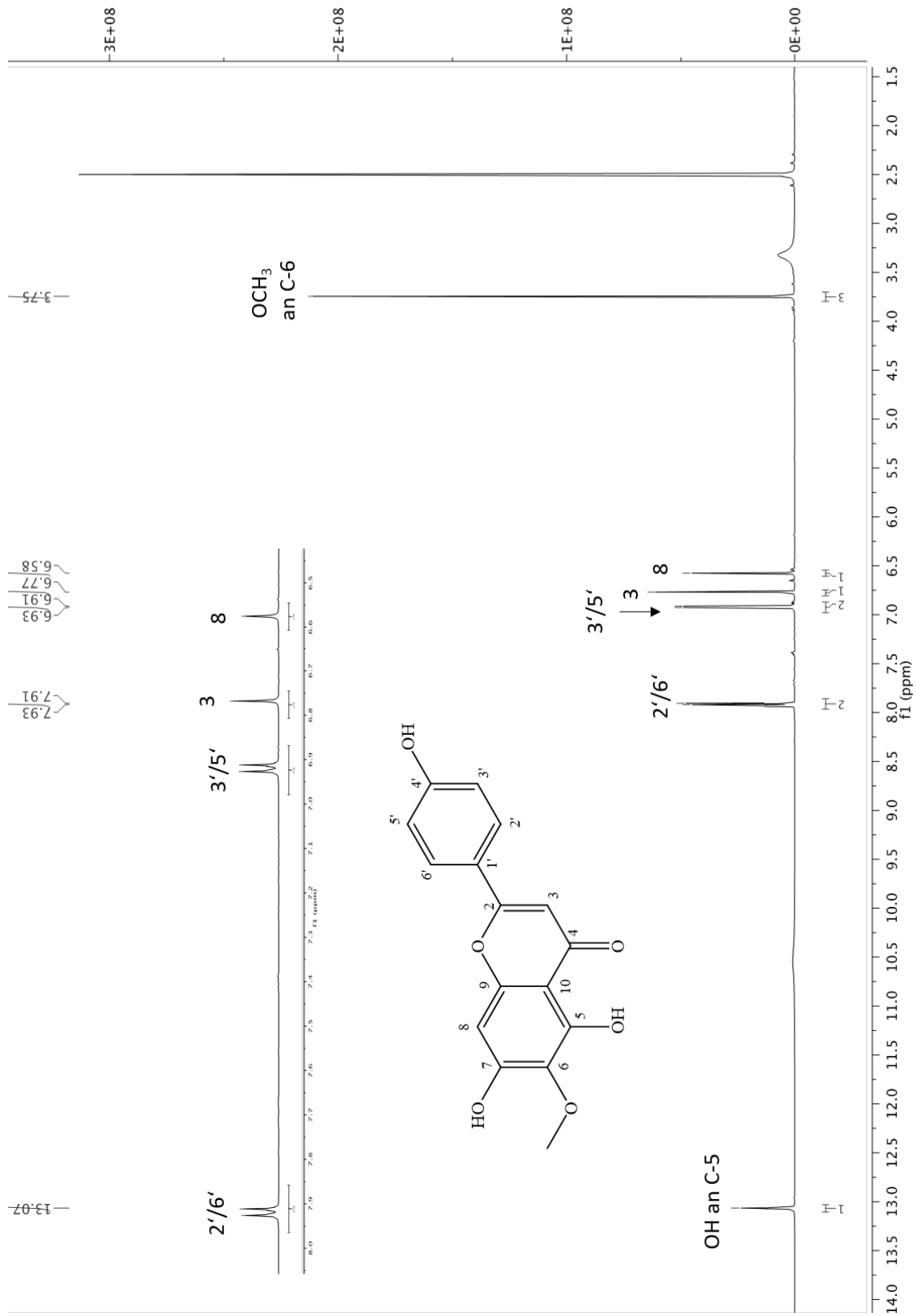


Abbildung 2.89: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **6** (600 MHz in DMSO-d)

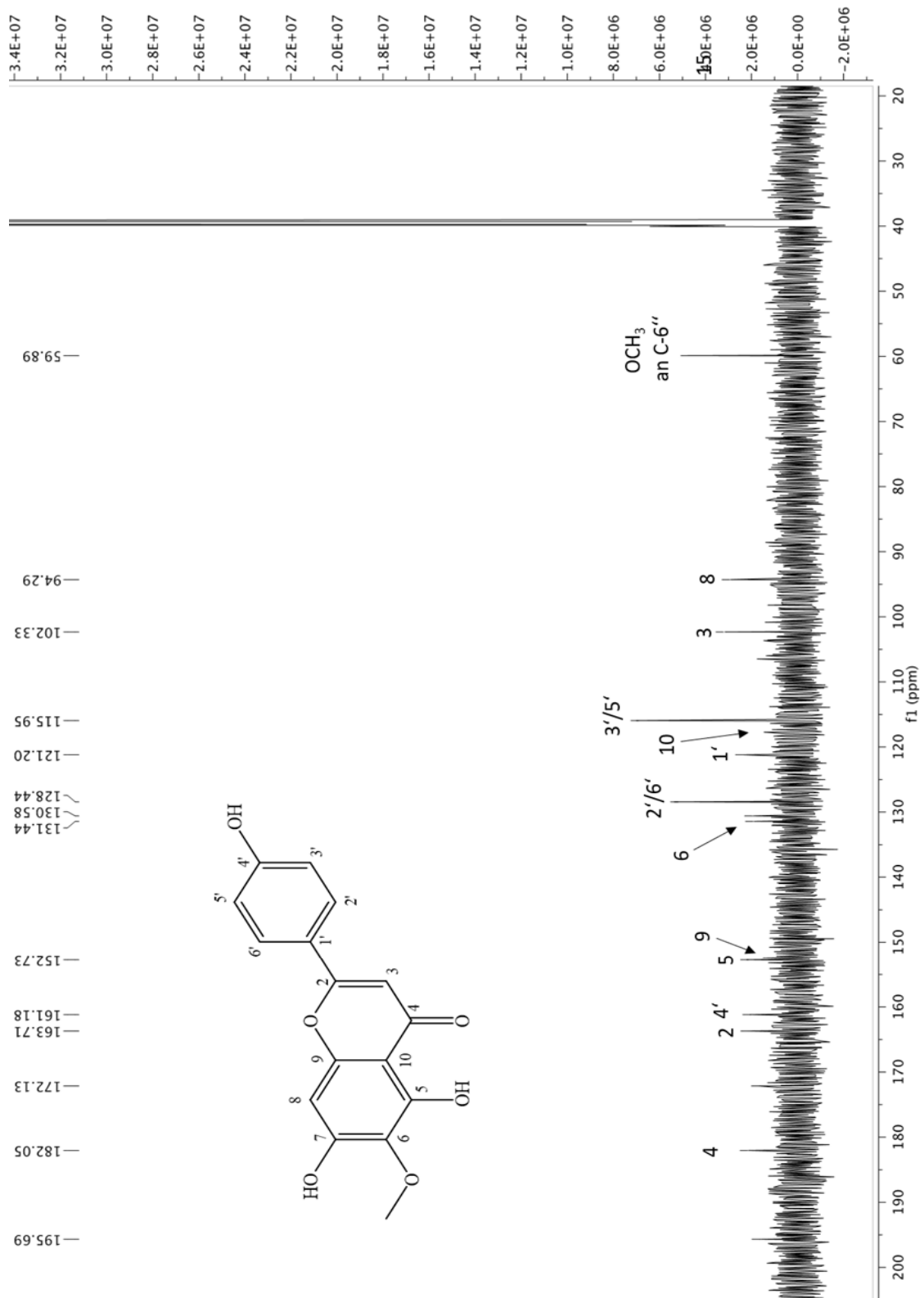


Abbildung 2.90: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 6 (150 MHz in DMSO-d_6)

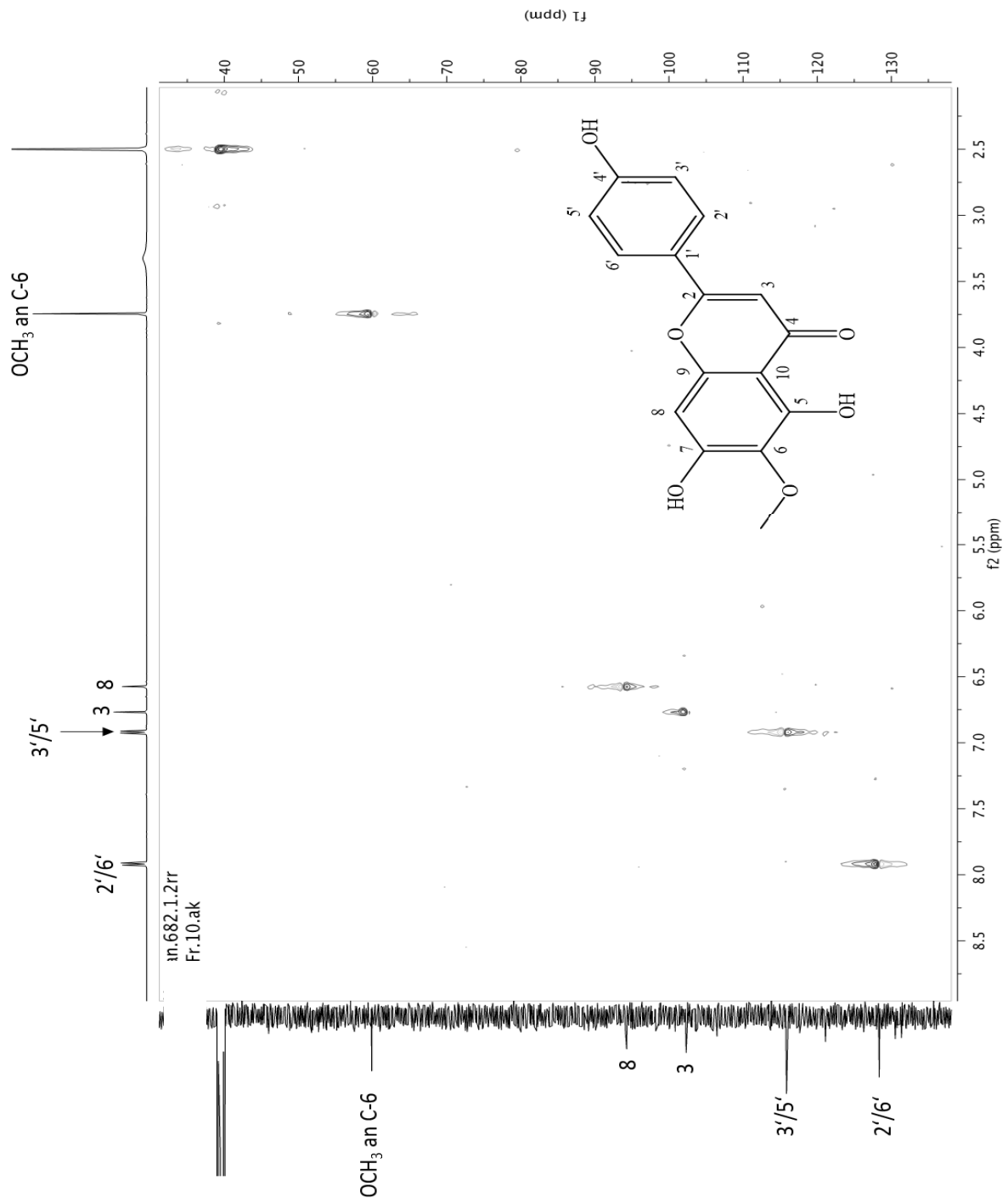


Abbildung 2.91: 2D-HSQC-Spektrum von **6** (600 MHz in DMSO- d_6)

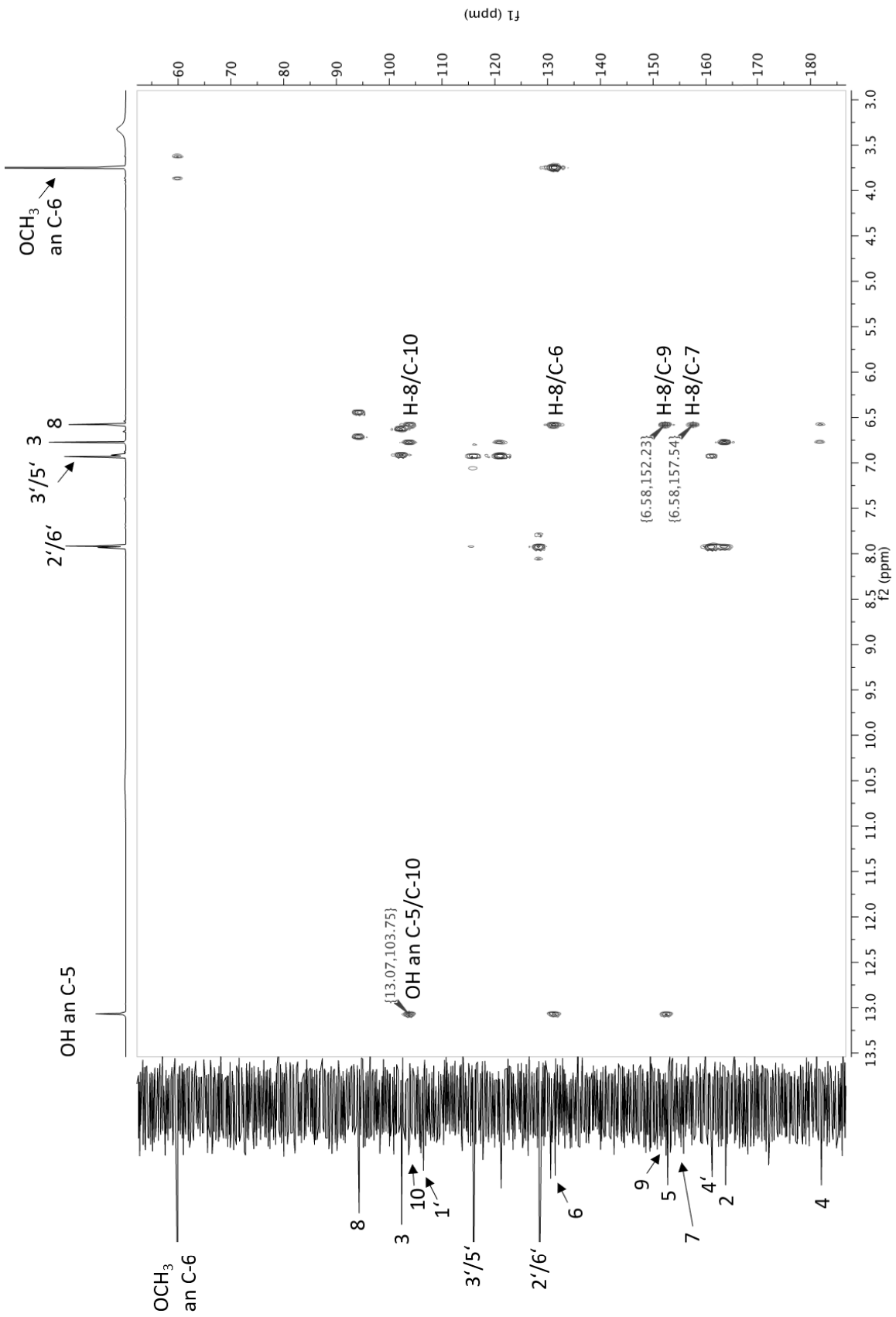
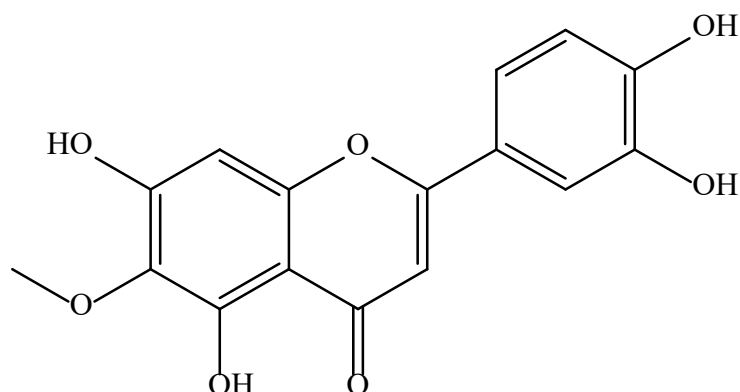


Abbildung 2.92: 2D-HMBC-Spektrum von 6 (600 MHz in DMSO-d₆)

2.2.6. Verbindung 7 (Eupafolin)



Neben dem Hispidulin (**6**) konnte ein weiteres Flavonoid aus Fraktion V.b.D.8.13 isoliert werden. Im Dünnschichtchromatogramm (DC1, s. Exp. Teil, Kap.5.2.1) trat Verbindung **7** bei $R_f = 0,36$ in Erscheinung. Die detektierte Substanzzone zeigte wie **6** bereits bei Tageslicht einen gelben Fleck auf der DC-Platte. Nach Besprühen der Dünnschichtplatte mit Naturstoffreagenz A (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1), zeigte die Verbindung **7** eine orangefarbene Fluoreszenz. Es wurden 2,07 mg einer gelben, amorphen Substanz erhalten (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3). Die Retentionszeit von **7** im HPLC (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.4) beträgt 23,27 Minuten. Das mit Hilfe des Diodenarray-Detektors gleichzeitig aufgenommenen UV-Spektrum zeigt wie bei **6** zwei Maxima bei $\lambda = 241\text{nm}$ und 348nm . Wie bei Verbindung **7** sollte es sich daher um ein Flavon handeln (Mabry et al, 1975).

Das unter Elektronenimpakt-Bedingungen (EI) aufgenommene Massenspektrum von **7** (s. Abb. 2.93, S. 151) zeigte das Molekülion (M^+) bei $m/z = 316$. Aufgrund der Fragmente bei m/z 298 $[M-H_2O]^+$, $m/z = 273$ $[M-CO-CH_3]^+$ und des intensiven Fragmentes bei $m/z = 155$ (Basis-Ion, 100%), Die im Massenspektrum detektierte Molmasse ergibt genau ein Sauerstoffatom mehr als Verbindung **6** und auch die typische Fragmentierung (Lang, 2001) unterstützt die Annahme, dass es sich bei **7** um eine ähnliche Verbindung wie **6** handeln muss und sich die Summenformel $C_{16}H_{12}O_7$ ergibt.

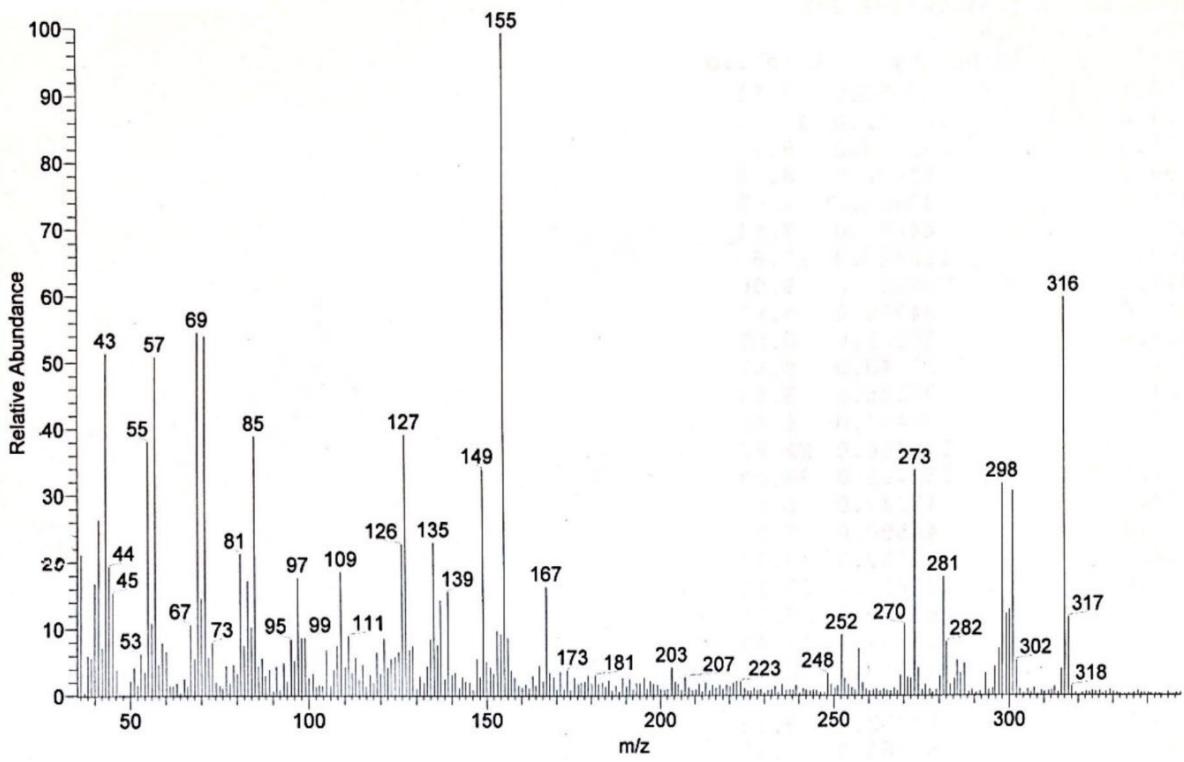


Abbildung 2.93: Massenspektrum von Verbindung 7

Die Strukturaufklärung von **7** gelang mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen Spektren, die wie bei **6** in deuteriertem Methanol aufgenommen wurden. Das Protonenspektrum von **7** (s. Abb. 2.95, S.155) zeigt im Gegensatz zum Spektrum von **6** ein Signal mehr. Der Grund dafür ist, dass die beiden im Spektrum von **6** gefundenen Dubletts für je zwei äquivalente Protonen eines AA'BB' Systems im Spektrum von **7** durch drei Signale für jeweils 1 Proton ersetzt sind. Das bedeutet, dass der B-Ring in **7** anders substituiert, vorliegen muss als bei **6**. Die drei Signale treten als Dublett bei $\delta = 6.90$ ppm, als Dublett vom Dublett bei $\delta = 7.39$ ppm und als verbreitertes Singulett bei $\delta = 7.38$ ppm auf, wobei sich die beiden letztgenannten Signale überlagern. Aufgrund der Kopplungskonstanten in Höhe von $J = 8$ und 2.3 Hz, kann dieses Spinsystem als ein ABX-System dreier Protonen am Aromaten erkannt werden, bei dem zwei Protonen den A,B-Teil bilden und ein weiteres Proton als X-Teil fungiert. Solche Spinsysteme sind bei 5,7-Hydroxyflavonoiden typisch für Substanzen deren B-Ring 3',4'- oder 2',4'-disubstituiert ist (Bezuidenhoudt et al, 1987). Bei seltener vorkommenden Flavonoiden, bei denen die, aufgrund der Biosynthese auf dem gemischten Polyketidweg, normalerweise vorhandene Hydroxylgruppe an C-5 (Sticher et al, 2015) nachträglich entfernt wurde, kann ein solches ABX-System im $^1\text{H-NMR}$ auch durch die Protonen an C-5, C-6 und C-8 gebildet werden (s. Abb. 2.95, S. 155)

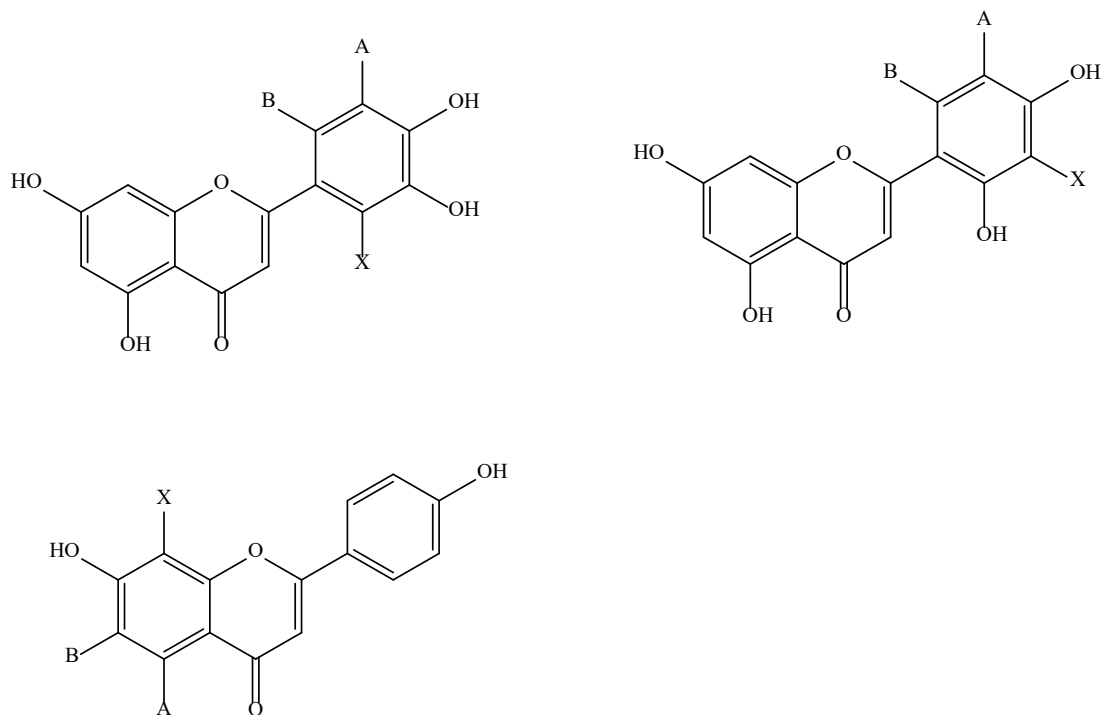


Abbildung 2.94: Flavonoide mit ABX-Spinsystemen

Neben diesen drei Signalen finden sich drei weitere Signale als Singulett bei $\delta = 6.53$, 6.53 und 3.88 ppm. Das Integral des Singulett bei $\delta = 3.88$ ppm entspricht 3 Protonen und liegt beim gleichen Shiftwert, wie das Signal der an C-6 des A-Rings in Verbindung **6** gebundenen Methoxygruppe. Die anderen beiden Singulett sollten, wie bei **6** den Protonen an C-3 und C-8 zugeordnet werden. Wenn man von der Masse von $m/z = 316.17$ g/mol ausgeht, dann muss es sich bei **7** um das an C-3' zusätzlich hydroxylierte Derivat des Hispidulins (Verbindung **6**) handeln. Dieses Flavonoid ist unter dem Namen Eupafolin bekannt.

Tabelle 2.11: NMR Daten der Verbindung **7** (600 MHz in CD₃OD; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H	Eupafolin (Wei et al, 2004)	¹³ C	Eupafolin (Wei et al, 2004)
2	-	-	166.0	166.4
3	6.54 s	6.54 s	103.3	103.4
4	-	-	184.1	184.2
5	-	-	n.d.	154.6
6	-	-	132.9	132.8
7	-	-	155.0	154.0
8	6.53 s	6.54 s	95.7	95.2
9	-	-	159.3	158.7
10	-	-	105.3	105.7
1'	-	-	123.6	123.7
2'	7.38 s (br.)	7.36 s	114.1	114.1
3'	-	-	147.1	147.0
4'	-	-	151.1	151.0
5'	6.90 d (J=8.0 Hz)	6.89 d (J=8.4 Hz)	116.8	116.8
6'	7.39 dd (J=8.0 u. 2.3 Hz)	7.37 d (J=8.4 Hz)	120.2	120.3
OCH₃ an C-6	3.88 s	3.87	60.8	60.9

Ein Vergleich der Protonendaten der hier isolierten Verbindung **7** mit den Daten von Wei et al, (2004) veröffentlichten ebenfalls in CD₃OD ermittelten NMR-Daten für Eupafolin zeigen, dass es sich um diese Verbindung handeln sollte. Leider war das von uns aufgenommene ¹³C-NMR

(s. Abb. 2.96, S.156) nicht gut aufgelöst, so dass nicht alle Kohlenstoffsignale zu erkennen waren. Während die protonierten Kohlenstoffe zu erkennen waren und so über das HSQC gut zugeordnet werden konnten, sind einige der meist geringer intensive, quartären Kohlenstoffe leider nicht zu erkennen. Die meisten Signale (s. Tab. 2.11, S.153) konnten jedoch über die Korrelationen im HMBC-Spektrum zugeordnet werden (s. Abb. 2.99, S. 159). So lässt sich der Carbonylkohlenstoff des Cyclopentenonrings (C-4) über seine 2J -Korrelation bei 184.1 ppm bei einem im Vergleich zu den Literaturdaten (Wei et al, 2004) identischen Shiftwert lokalisieren. Die übrigen C6Atome des C-Rings (C-2, C-9 und C-10) findet man über die 3J -Korrelationen zwischen H-2' und H-5' und C-2 sowie H-3 und C-10 und die 2J -Korrelation zwischen H-8 und C-9 (s. Abb. 2.99 und Tab. 2.11). Die beiden meta-ständigen Protonen des B-Rings (H-2' und H-6') zeigen noch eine weitere 3J -Kopplung mit dem quartären Kohlenstoff bei $\delta = 151.1$ ppm, der dem hydroxylierten C-4' zugeordnet werden kann (s. Abb. 2.99). Das H-5' bei $\delta = 6.90$ ppm besitzt zwei 3J Kopplungen zu den quartären Kohlenstoffen bei $\delta = 123.6$ und 147.1 ppm. Das im höheren Feld zur Resonanz kommende C-Atom koppelt auch mit dem Proton bei $\delta = 6.54$ ppm. Es muss sich daher um das C-1' handeln, was auch die richtige Zuordnung des Protonensignals von H-3 bestätigt, wodurch dieses Signal des H3 als Proton an C-3 bestätigt. Bei dem anderen Kohlenstoff handelt es sich demnach um das C-3', dass ebenso wie das bei einem ähnlichen Shift gefundene C-4' hydroxyliert sein muss. Die noch fehlenden drei C-Atome lassen sich leider nicht alle im Spektrum lokalisieren. Die Kohlenstoffe C-6 ($\delta_C = 132.9$ ppm) und C-7 ($\delta_C = 155.0$ ppm) zeigen jeweils eine 2J - bzw. 3J -Korrelation mit dem Proton an C-8 ($\delta_H = 6.53$ ppm). Dabei kann C-6 ($\delta_C = 132.9$ ppm) über die zusätzliche Korrelation mit den drei äquivalenten Protonen der Methoxygruppe ($\delta_H = 3.88$ ppm) eindeutig zugeordnet werden, der andere Crosspeak muss daher durch die 2J Kopplung zu C-7 verursacht sein ($\delta_C = 155.0$ ppm). Im Molekül gibt es kein Proton, das über zwei oder drei Bindungen mit C-5 koppeln könnte, weshalb dieser Kohlenstoff nicht zweifelsfrei über das HMBC Spektrum lokalisiert werden konnte. Ebenfalls mögliche Korrelationen über vier Bindungen (4J) mit den Protonen an C-3 bzw. C-8 sind möglich, lassen sich aber nicht von den anderen Korrelationen differenzieren. Insgesamt stimmen auch die hier gefundenen ^{13}C -Daten mit den von Wei et al. (2004) veröffentlichten Daten gut überein. Dem dort isolierten Eupafolin wurde ein Shiftwert von $\delta_C = 154.6$ ppm zugeordnet.

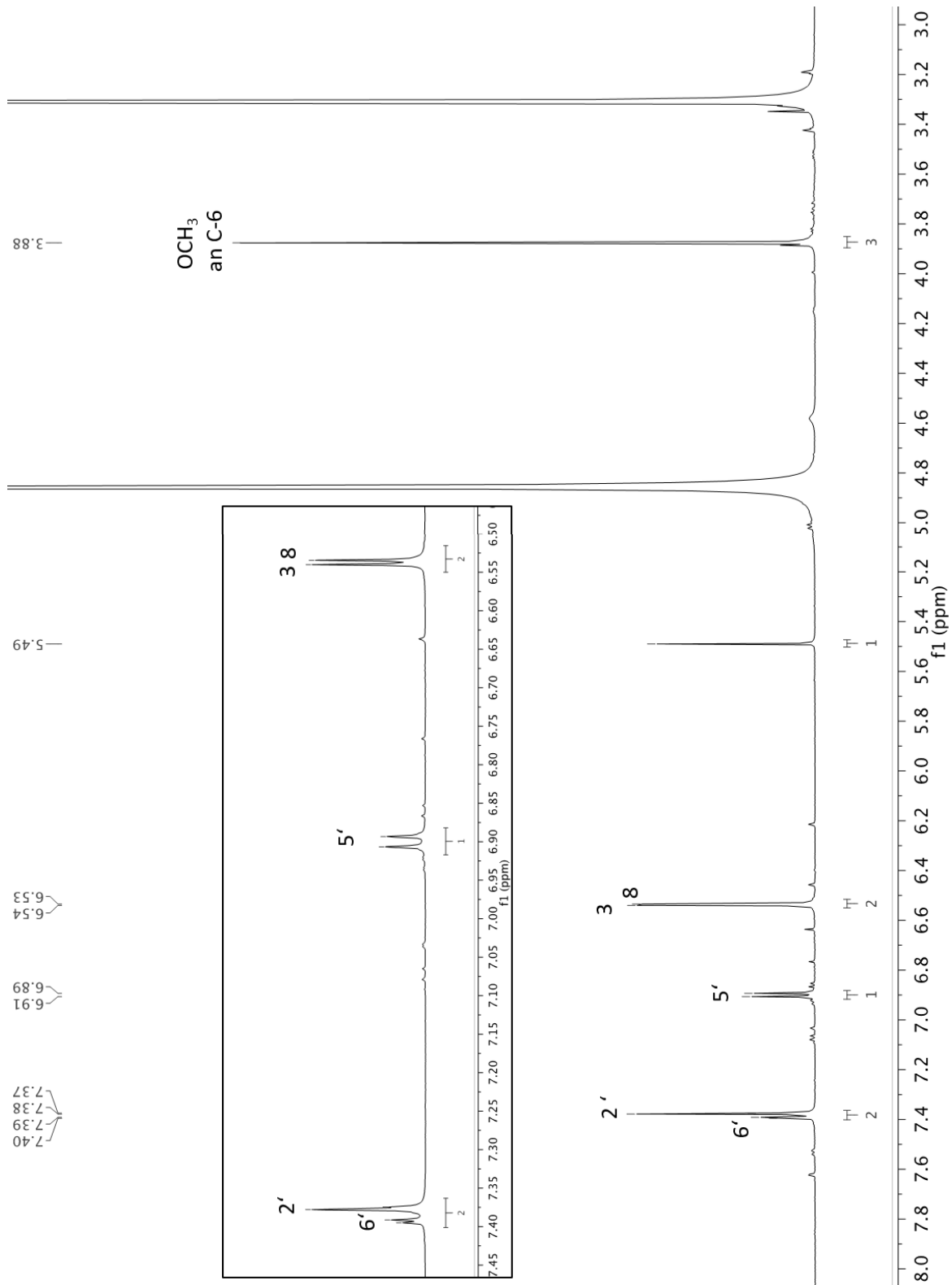


Abbildung 2.95: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung 7 (600 MHz in CD_3OD)

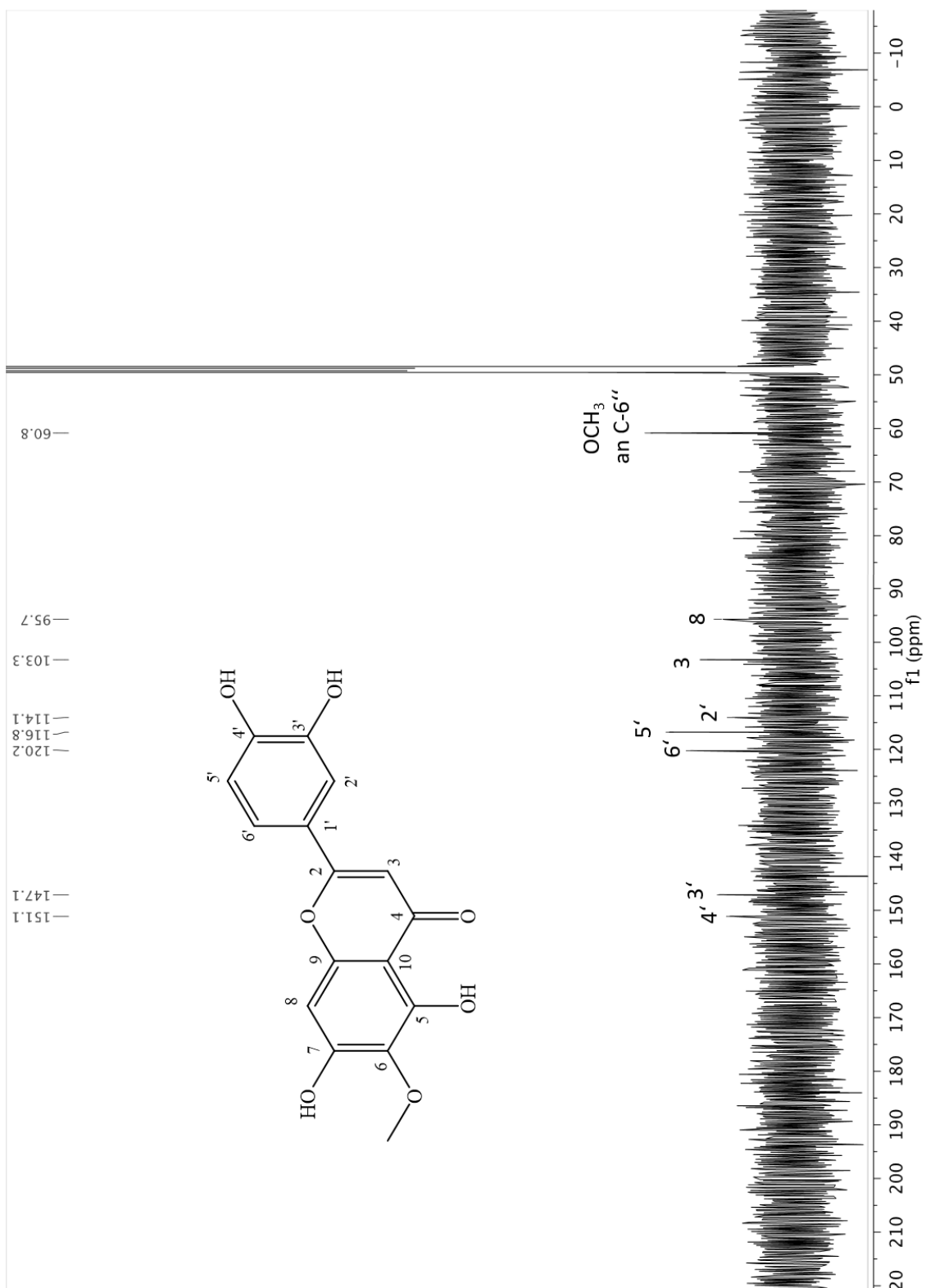


Abbildung 2.96: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **7** (150 MHz in CD_3OD)

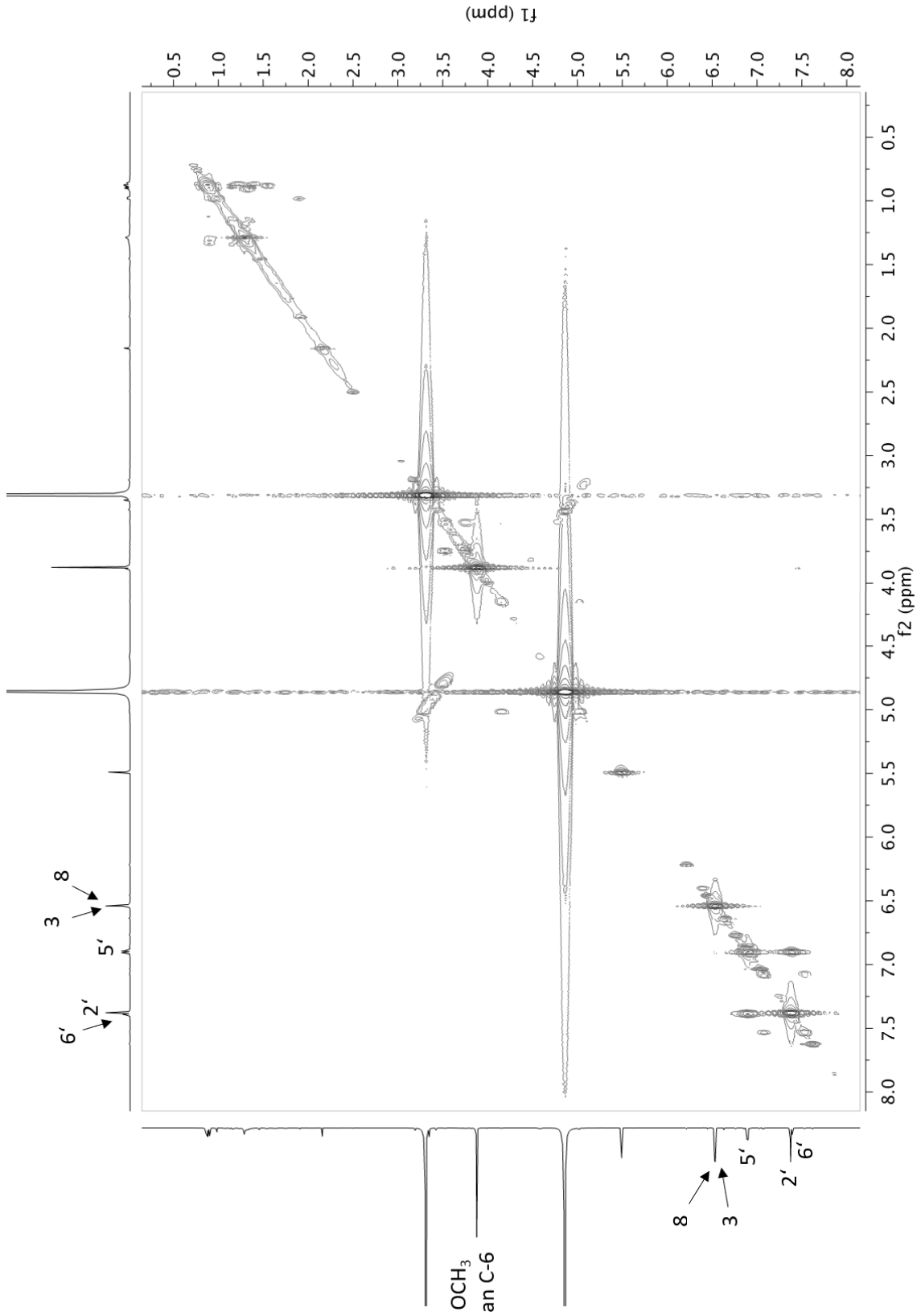


Abbildung 2.97: 2D-COSY-Spektrum von 7 (600 MHz in CD_3OD)

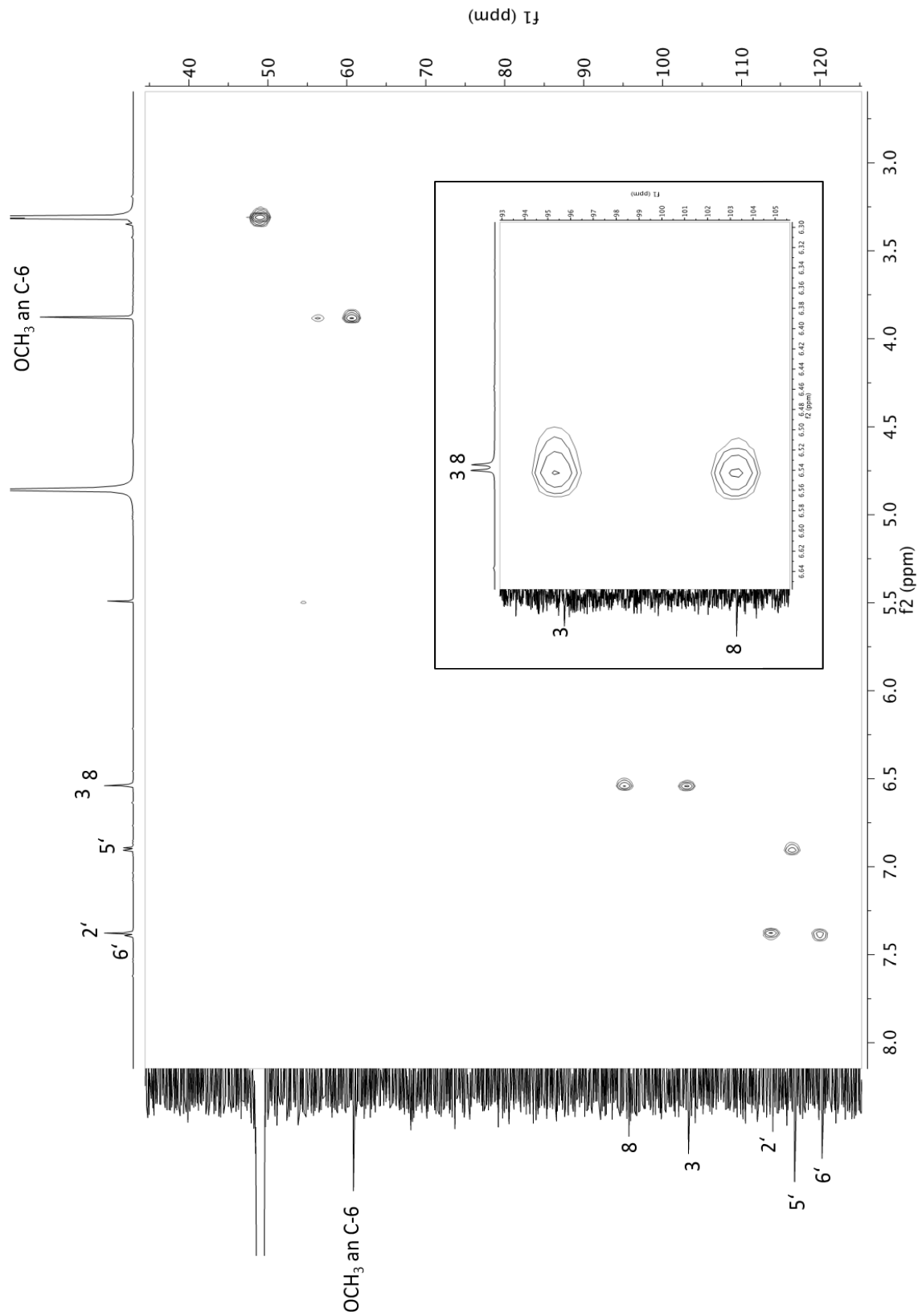


Abbildung 2.98: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 7 (600 MHz in CD₃OD)

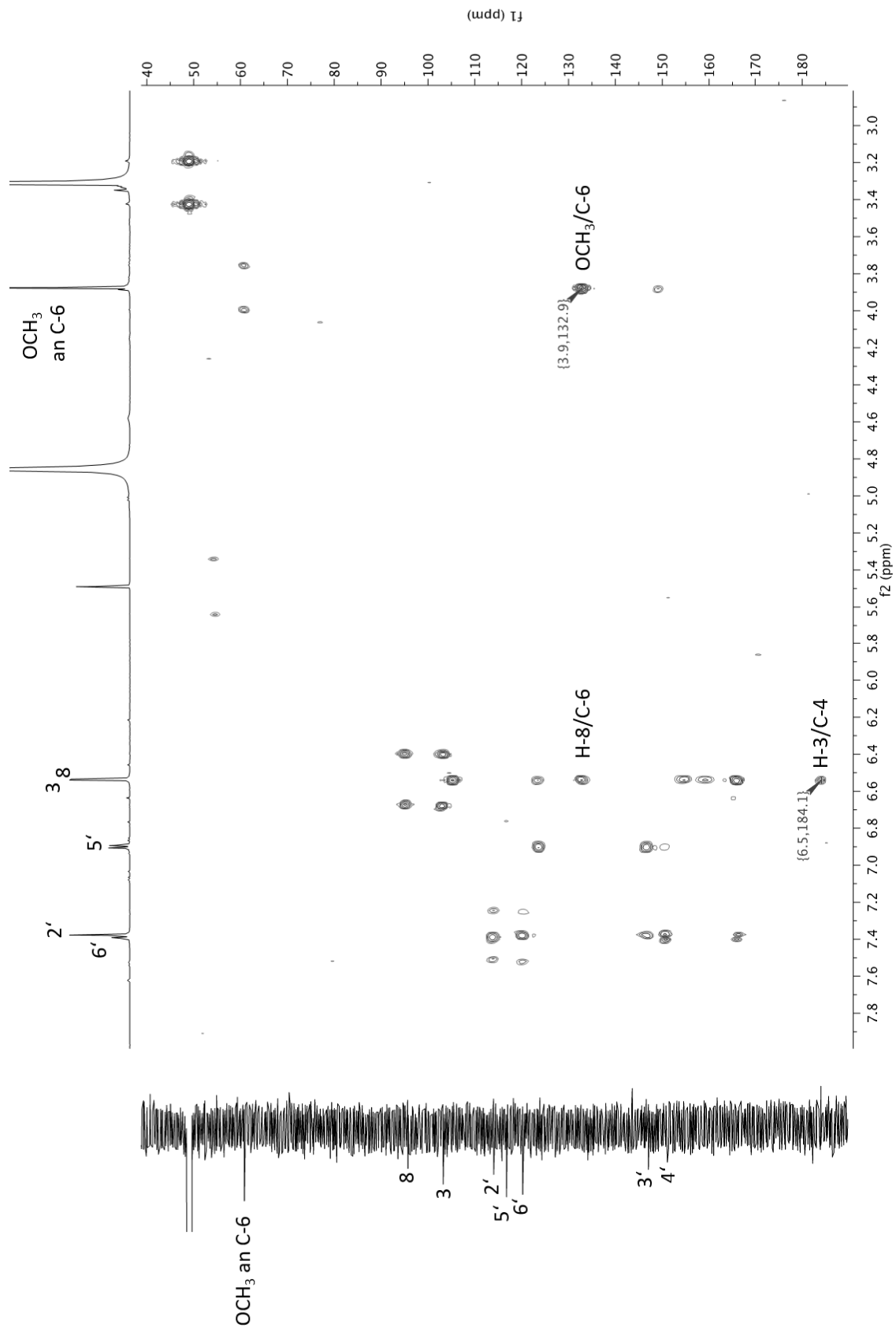


Abbildung 2.99: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 7 (600 MHz in CD_3OD)

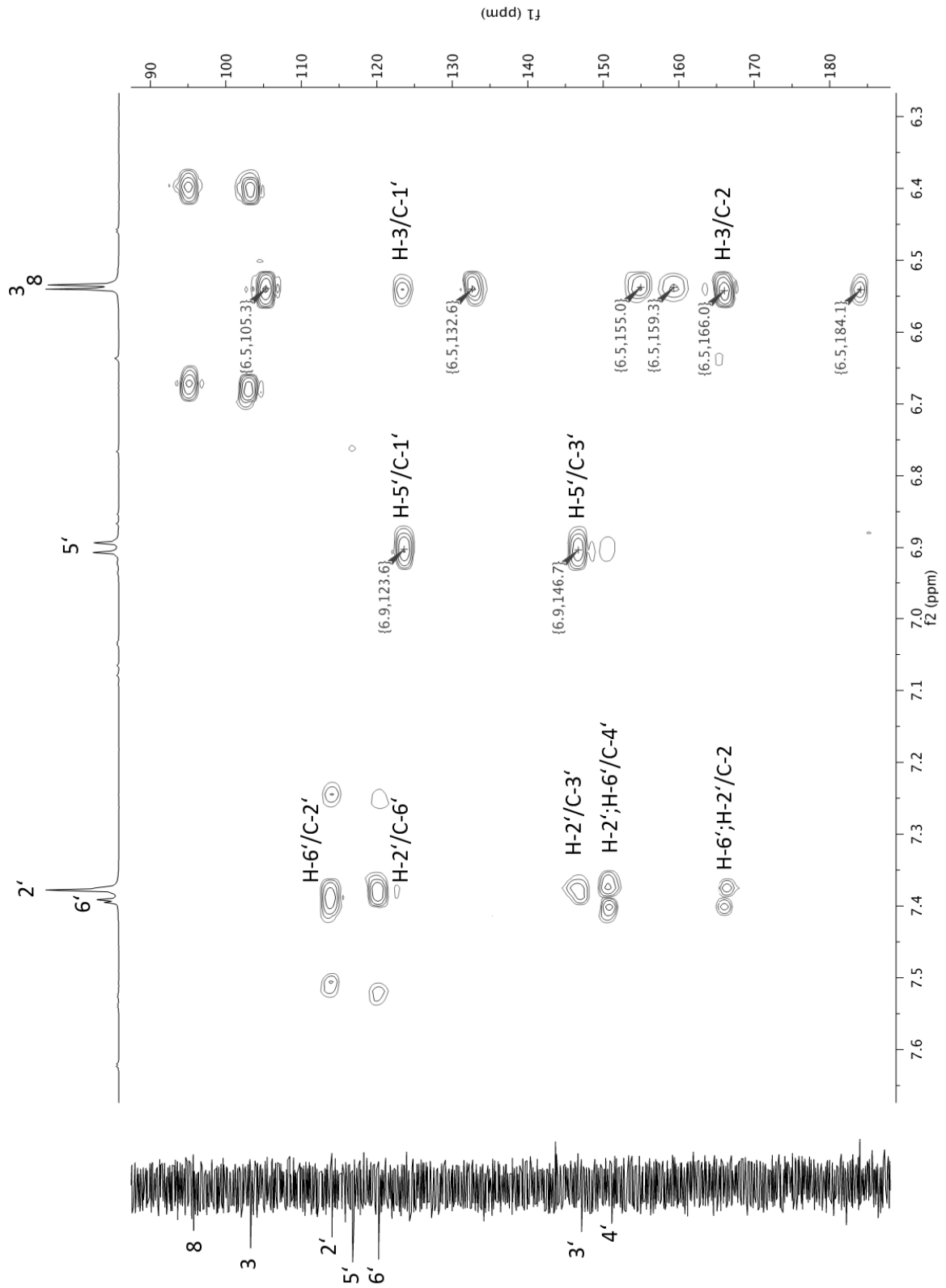


Abb 2.100: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 7 (600 MHz in CD₃OD)

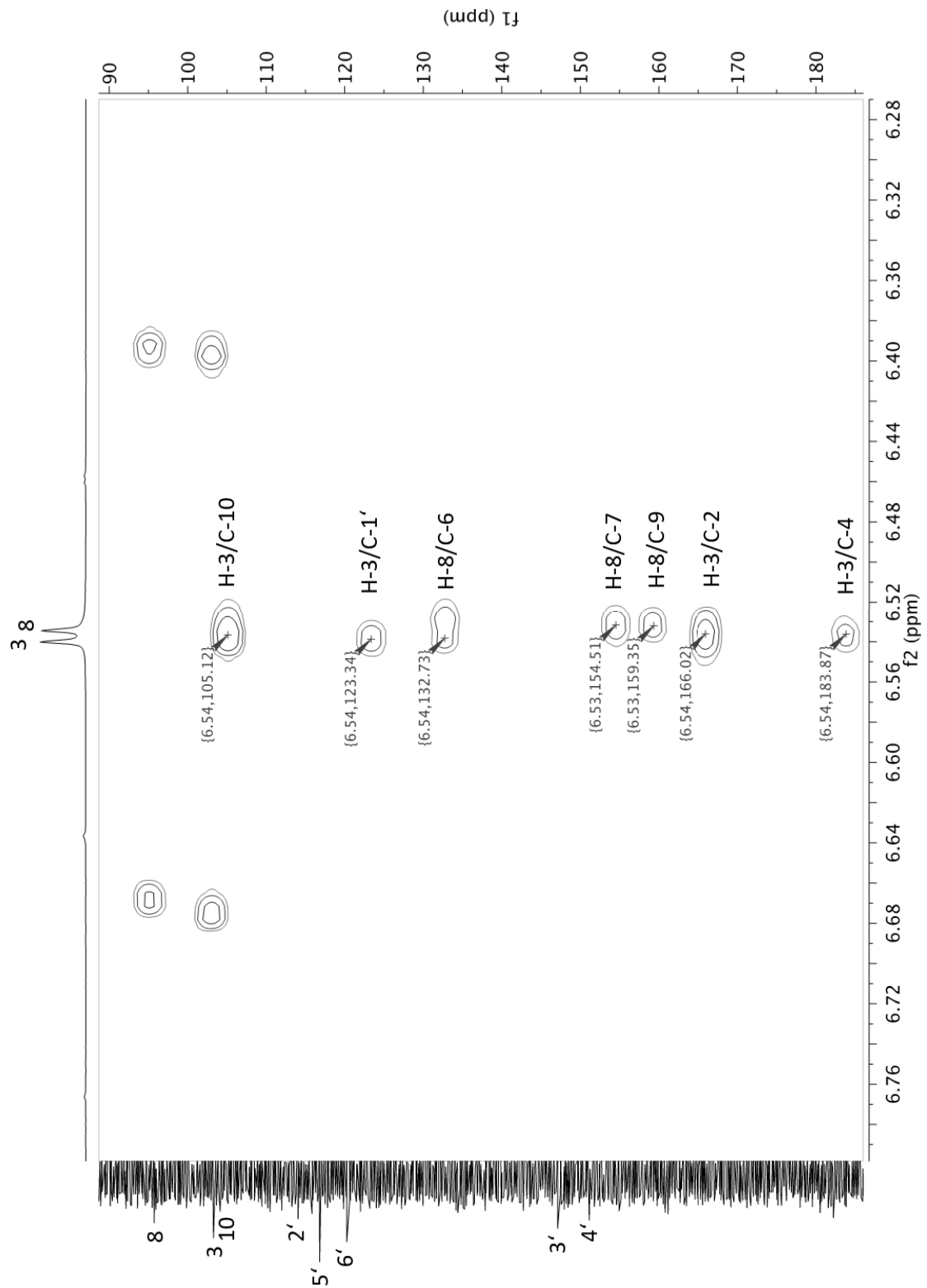
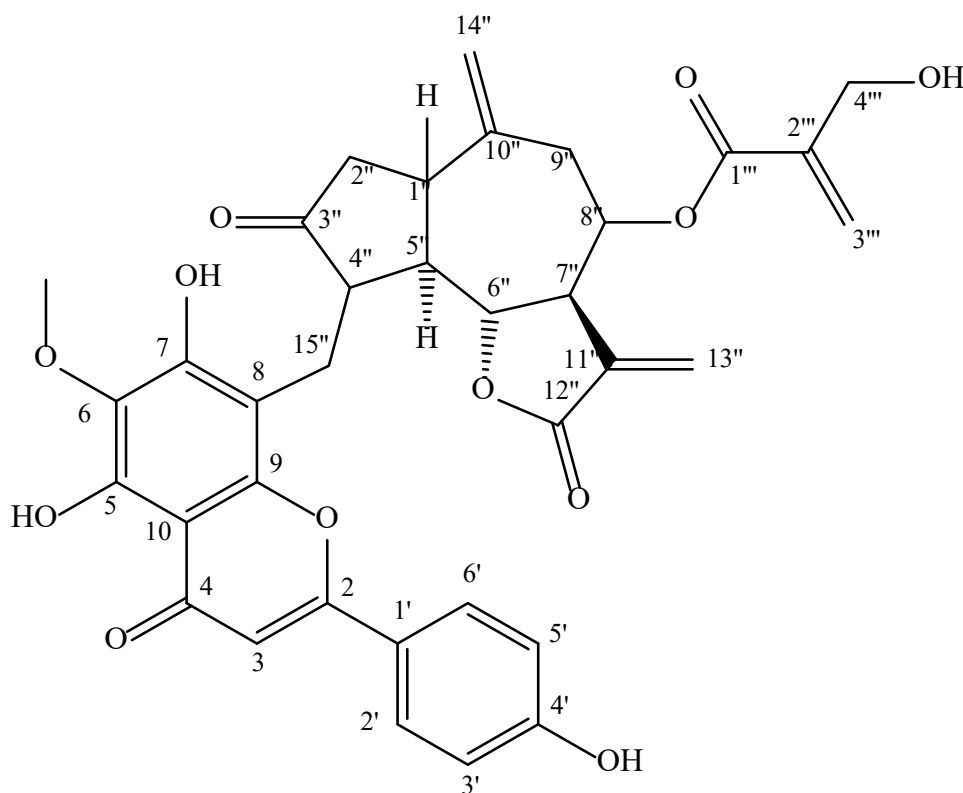


Abb. 2.101: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 7 (600 MHz in CD₃OD)

Auch das Eupafolin gehört zu den häufiger in der Natur gefundenen Flavonoiden. Es ist jedoch nicht so stark verbreitet, wie das Hispidulin (Verbindung **6**), aber die Chemical Abstracts (www.scifinder.cas.org) listen immer noch 539 Literaturstellen zum Stichwort Eupafolin. Die älteste Veröffentlichung stammt von Naokata Morita (1960), der diese Verbindung als Inhaltsstoff der Sesamblätter beschreibt.

In der Art *Volutaria boranensis* (Cufod.) Wagenitz wurde diese Verbindung noch nicht gefunden. Eine Literaturrecherche ergab, dass Eupafolin weder in der Gattung *Volutaria* noch in der Gattung *Amberboa* gefunden wurde. In der Gattung *Centaurea*, zu der einige *Volutaria* Arten früher gehörten (Gadeschi et al, 1989) wurde dieses Flavonoid bereits häufiger gefunden.

2.2.7. Verbindung 8 (Boranensisflavon)



Im Dünnschichtchromatogramm der Fraktion V.b.D.10.F.10 (s. Exp. Teil S., Kap. 5.2.1) fiel Verbindung **8** durch ein bisher nicht beobachtetes Verhalten auf. Nach Entwicklung des DCs (Fließmittelsystem DC1, s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1) zeigte **8** nach dem Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd dunkelgelbe Farbe bei $R_f = 0,34$, ähnlich den Substanzen **4** und **5**, die als Sesquiterpenlactone identifiziert wurden. Nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz zeigte **8** eine gelbe Färbung und beim Betrachten im UV-Licht (366 nm) eine gelbe Fluoreszenz. Dabei zeigte **8** Ähnlichkeiten zu den Flavonoiden **6** und **7**. Die nachfolgenden Reinigungsschritte, die zur Isolierung von 2,55 mg der Verbindung **8** führten, konnten an dieser Tatsache jedoch nichts ändern. Auch im HPLC wurde nur ein Substanzpeak bei einer Retentionszeit von 27,79 min. detektiert. Das gleichzeitig aufgenommene UV-Spektrum zeigte Maxima bei 278 und 336 nm, was für das Vorliegen eines Flavonoids sprach.

Im HRESI-MS mit hochauflösender Massenmessung zeigte **8** das Quasimolekülion $[M+H]^+$ bei $m/z = 645.1964$, woraus sich die Summenformel $C_{35}H_{32}O_{12}$ ableiten lässt (Abb.2.102, S.164). Da die Molekulargewichte der hier isolierten Flavonoide **6** und **7** bei 300 bzw. 316 lagen, war

das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse sehr überraschend. Sowohl **6** als auch **7** besitzen ein 15 Kohlenstoffe umfassendes Grundgerüst mit einer zusätzlichen Methoxygruppe in Position 6. Bei einem so genannten Biflavonoid, einer Gruppe von in Asteraceen seltenen vorkommenden Flavonoiden (Bohm und Stuessy, 2001), die hauptsächlich in Gymnospermen und in *Ginkgo biloba* gefunden wurden (Menezes und Diederich, 2021), käme man in die Nähe eines solchen Molekulargewichtes. In Abb. 2.103 (S.166) ist das aus der Asteraceae *Eupatorium suhastatum* isolierte 4',4"-Dimethylcupressuflavanone abgebildet und zwei davon ausgehend theoretisch mögliche Strukturen auf Grundlage der Struktur von Hispidulin (**6**) oder Eupafolin (**7**). Wenn man sich die Summenformel des theoretisch möglichen Biflavonoids aus Hispidulin (s. 2.103, S.167) anschaut, dann stimmt die Anzahl der Sauerstoffe mit der Summenformel von **8** überein, es fehlen aber 3 Kohlenstoffe und 10 Wasserstoffe. Bei der Einführung von drei Methoxygruppen hätte man auch hinsichtlich der Kohlenstoffe die gleiche Anzahl erreicht, aber es würden 4 Wasserstoffe fehlen, so dass es sich nicht um ein Biflavonoid handeln konnte.

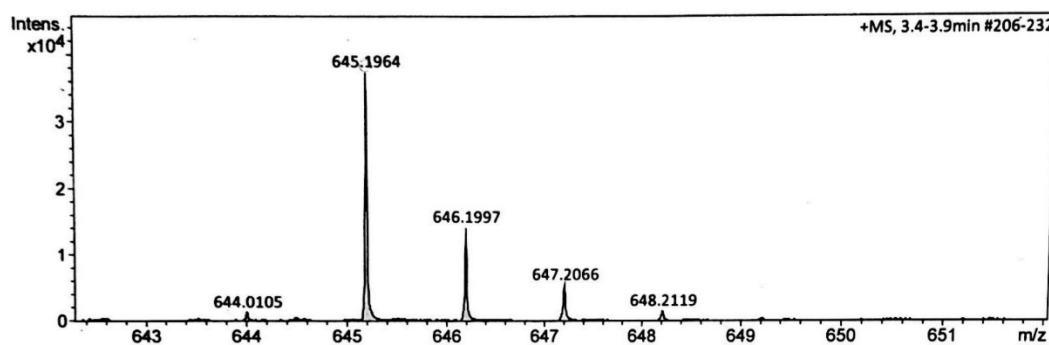
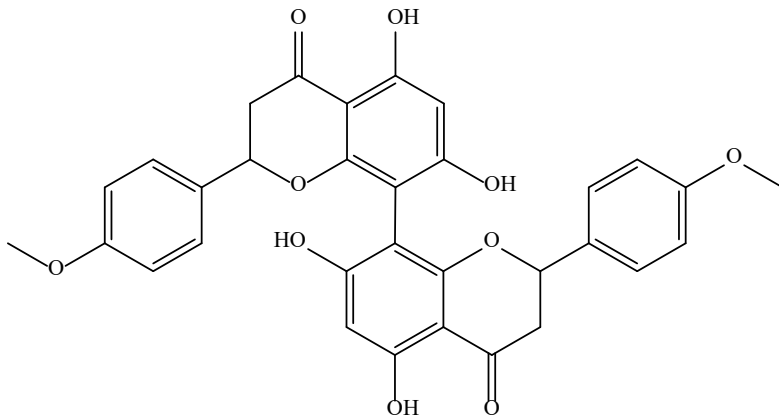


Abbildung 2.102: HRESI-Massenspektrum von Verbindung **8**

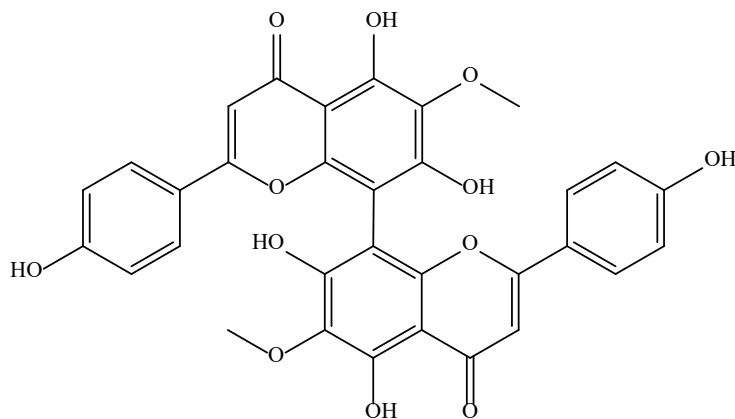
Zur vollständigen Aufklärung der Struktur von **8** wurden zunächst ein- und zweidimensionale Spektren in CD₃OD aufgenommen (s. Abb. 2.104 bis 2.110, S. 172 bis 182 und Tab. 2.12, S.169). Das Protonenspektrum (s. Abb. 2.104, S.172) von **8** zeigt insgesamt 19 Signale, von denen eines bei $\delta = 5.5$ ppm durch eine Verunreinigung mit Dichlormethan verursacht wurde (Wenzel, T. J.,1987).

Die restlichen 17 Signale repräsentieren 28 Protonen, die aufgrund der im heteronuklearen 2D-HSQC-Spektrum (s. Abb. 2.108, S.176) erkannten Korrelationen an elf Methin-, sieben Methylen und einem Methylkohlenstoff gebunden sind. Letzter wurde aufgrund der chemischen Verschiebung ($\delta_{\text{H}} = 3.88$, $\delta_{\text{C}} = 61.63$ ppm) als Methylether erkannt. Daraus folgt, dass Verbindung **8** neben 19 protonierte, 16 quartäre Kohlenstoffe enthalten muss. Im Tieffeldbereich des ^1H -NMR fallen zwei Signale bei $\delta = 7.91$ und 6.96 ppm auf, die jeweils mit einer Kopplungskonstanten $J = 8.4$ Hz zum Dublett aufspalten und deren Integral erkennen lässt, dass sie je zwei Protonen repräsentieren (s. Abb. 2.104). Aufgrund der Lage im Spektrum und den vorher beschriebenen Verdacht, dass es sich um ein Flavonoid handeln sollte, wurden diese Signale dem B-Ring eines eines Flavonoides mit monohydroxyliertem B-Ring zugeordnet. Das zugrundeliegende Spinsystem (AA'BB'-System) wurde zuvor bei Hispidulin (**6**) beschrieben. Darüber hinaus fielen bei $\delta = 5.61$ und 6.06 zwei breite Singulets einer Methylengruppe auf, die aufgrund der Lage der Signale vermuten ließen, dass es sich dabei um die exocyclischen Methylenprotonen eines Sesquiterpenlactons handeln könnte. Der zugehörige Kohlenstoff fand sich bei $\delta = 122.8$ im ^{13}C -NMR-Spektrum bei einem für α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen typischen Shiftwert (Heywood et al, 1977).

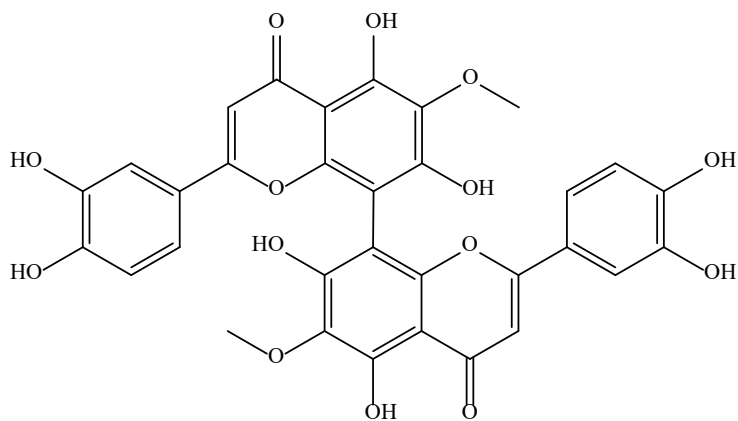


4',4''-Dimethylcuppressuflavanone

(C₃₂H₂₆O₁₀), m/z = 570



(C₃₂H₂₂O₁₂) m/z = 598



(C₃₂H₂₂O₁₄) m/z = 630

Abbildung. 2.103: 4',4''-Dimethylcuppressuflavanone aus *Eupatorium subhastatum* und mögliche Biflavonoide ausgehend von Hispidulin und Eupafolin

Dieses C-Atom war von einem zweiten Signal begleitet ($\delta = 126.1$ ppm), dessen Methylenprotonen ihre Signale bei $\delta = 5.96$ und 6.29 ppm zeigten. Durch das ebenfalls vorhandene Singulett-Signal für zwei Protonen bei $\delta = 4.29$ im ^1H -NMR-Spektrum und die Kohlenstoffsignale bei $\delta = 166.4$, 141.8 und 61.63 konnte ein 2-Methylenhydroxymethacrylsäureester erkannt werden. Die im Spektrum von **8** gefundenen Shiftwerte stimmen dabei genau mit den bei Verbindung **5** ermittelten Daten überein (s. Tab. 2.9, S.137). Zusammen mit den Exomethylenprotonen eines Sesquiterpenlactons und den B-Ring Protonen eines Flavonoids konnte daher vermutet werden, dass es sich bei Verbindung **8** um eine Substanz handelt, die eine Kombination aus einem Sesquiterpenlacton und einem Flavonoid darstellt. Da es sich bei **8** demnach um eine Hybridsubstanz aus zwei wichtigen Naturstoffklassen handelt, stellt sich die Frage, welche Grundstruktur man für die Bezeichnung der Protonen und Kohlenstoffe als Grundmolekül ansehen sollte. Da prenylierte Flavonoide, mit einem an verschiedenen Kohlenstoffen des Grundgerüsts angeknüpften C_5 -Rest (Hemiterpen), bereits häufiger gefunden worden sind (Chen, 2014.) und es auch einige Funde von Flavonoiden gibt, die mit Sesquiterpenen verknüpft sind (Porzel et al, 2000) haben wir uns dazu entschlossen, Verbindung **8** als ein substituiertes Flavonoid aufzufassen. Die Nummerierung ist daher analog zur Bezifferung der Kohlenstoffe von Flavonoiden durchgeführt worden (Tab 2.9).

Die Zuordnung aller Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR Spektrum gelang über die in den zweidimensionalen COSY, HSQC und HMBC-Spektren registrierten Kreuzsignale. Ausgehend von den beiden Dubletts für je zwei Protonen ($\text{H}-2'/6'$ und $\text{H}-3'/\text{H}-5'$) des AA'BB'-Systems der B-Ring-Protonen des zugrundeliegenden Flavonoids, konnten zunächst die zugehörigen Kohlenstoffsignale bei $\delta = 129.6$ ($\text{C}-2'/6'$) und 117.2 ($\text{C}-3'/5'$) zugeordnet werden. Diese beiden Signale repräsentieren jeweils zwei Kohlenstoffe und sind die dominierenden Peaks im ^{13}C -NMR-Spektrum (s. Abb. S: 2.106, S. 174). Ausgehend von den Protonensignalen von $\text{H}-3'/\text{H}-5'$ und $\text{H}-2'/6'$ findet man im long-range HMBC-Spektrum (s. Abb. 2.109, S. 177) eine ^3J -Korrelationen zu den quartären Kohlenstoffen $\text{C}-1'$ bei $\delta = 123.5$ ppm bzw. $\text{C}-4'$ bei $\delta = 162.8$ ppm. Das $\text{C}-1'$ des B-Rings koppelt zusätzlich über drei Bindungen mit einem Methinproton bei $\delta = 6.61$ ppm, das aufgrund der Lage im Spektrum als das H-3 eines Flavons erkannt wurde (s. Abb. 2.109). Das Signal des zugehörigen Kohlenstoffs findet sich im ^{13}C -NMR bei einem Shiftwert von $\delta = 103.4$ ppm, wie bei Verbindung **4**. Die meta-ständigen B-Ring-Protonen an $\text{C}-2'$ und $\text{C}-6'$ zeigen neben der Kopplung mit $\text{C}-4'$ eine weitere ^3J -Kopplung zum Kohlenstoffsignal bei $\delta = 166.1$, welches zum $\text{C}-2$ des α,β -ungesättigten Pyran-

4-on Rings (C-Ring) gehört. Diese Zuordnung wird durch die ebenfalls vorhandene 2J -Korrelation mit dem H-3 bei $\delta = 6.61$ ppm bestätigt. Das an C-3 gebundene Proton zeigt insgesamt 4 Kopplungen zu Kohlenstoffsignalen. Neben den Kopplungen zu C-1' und C-2, treten zwei weitere Kopplungen zu den Kohlenstoffsignalen bei $\delta = 105.4$ und 184.5 ppm, bei denen es sich um das C-10 und das C-4 eines Flavons handeln muss. Wie ein Vergleich zu den NMR-Daten von Verbindung **6** zeigt, treten alle bisher zugeordneten 1H - und ^{13}C -NMR Signale von **8** bei identischen bzw. sehr ähnlichen Shiftwerten auf. Wie bei Verbindung **6** finden sich auch in den Spektren von **8** die Signale für eine aromatisch gebundene Methoxygruppe bei $\delta_C = 61.6$ ppm und $\delta_H = 3.88$ ppm als Singulett für drei äquivalente Protonen. Über den Crosspeak zum Kohlenstoffsignal bei $\delta = 132.9$ ppm findet man im HMBC den zugehörigen Kohlenstoff des Aromaten, an dem die Methoxygruppe gebunden ist. Da in 1H -NMR Spektrum von **8** das Signal von H-3, nicht wie in den Spektren von **6** und **7** von einem zweiten aromatischen Protonensignal begleitet ist (H-8 in **6** und **7**), kann die Methoxygruppe an C-6 oder C-8 gebunden sein. Da das mit den Methoxyprotonen koppelnde Kohlenstoffsignal beim exakt gleichen Shiftwert wie das entsprechende Signal im Spektrum von **7** auftritt (s. Tab. 2.11, S.153), sollte man davon ausgehen, dass der Flavonoidteil in Verbindung **8** ebenfalls ein 4'-Hydroxy-6-Methoxyflavon darstellt. Die übrigen quartären Kohlenstoffe des Flavonoidteils lassen sich aufgrund fehlender Korrelationen zunächst nicht zuordnen.

Beim Sesquiterpenteil gelingt die Zuordnung der Signale ausgehend von den beiden Protonen der Exomethylengruppe am γ -Lactonring. Da es sich hier um den Sesquiterpensubstituenten am Flavon handelt, erhält der Kohlenstoff die Bezeichnung C-13''. Die Signale von H-13''a bei $\delta_H = 5.61$ ppm und H-13''b bei $\delta_H = 6.06$ ppm zeigen im HSQC jeweils einen Crosspeak bei $\delta_C = 122.8$ ppm, was diesen Kohlenstoff als Methylenkohlenstoff ausweist. Beide Protonensignale, insbesondere aber das H-13''b, zeigen zwei Kreuzsignale zu Kohlenstoffen bei $\delta_C = 48.6$ und 170.3 ppm, bei letzterem handelt es sich, aufgrund der typischen Lage im Spektrum, um den Carbonylkohlenstoff des γ -Lactonrings (C-12''). Der zweite über drei Bindungen koppelnde Kohlenstoff ist das C-7''. Das Signal dieses Kohlenstoffs liegt hier allerdings nicht sichtbar unter dem Lösungsmittelsignal des Methanols. Die Ermittlung der chemischen Verschiebung war daher nur über den Crosspeak möglich. Zur Position dieses Kohlenstoffs gibt es auch im HSQC eine Kopplung. Das an diesem C-Atom gebundene Proton findet sich im Signal bei $\delta_H = 3.19$ ppm. Das Aufspaltungsmuster von H-7'' ist leider nicht eindeutig zu erkennen, da es von zwei weiteren Protonen einer Methylengruppe überlagert ist (H-15'').

Tabelle 2.12: NMR Daten der Verbindung **8** (600 MHz in CD₃OD; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H NMR		¹³ C NMR	
	8	Verb. 7	8	Verb. 7
2		-	166.1	166.4
3	6.61 s	6.59 s	103.4	103.4
4	-	-	184.5	184.3
5	-	-	152.5*	154.7
6	-	-	132.9	132.9
7	-	-	156.7	158.8
8	-	6.56 s	105.6	95.3
9	-	-	152.3*	154.0
10	-	-	105.4	105.8
1'	-	-	123.5	123.3
2'	7.91 d (8.4)	7.84 d (8.2)	129.6	129.5
3'	6.96 d (8.4)	6.93 d (8.5)	117.2	117.0
4'	-	-	162.8	162.8
5'	6.96 d (8.4)	6.93 d (8.5)	117.2	117.0
6'	7.91 d (8.4)	7.84 d (8.2)	129.6	129.5
OCH ₃	3.88 s	3.88 s	61.6	60.9
		Verb. 5		Verb. 5
1''	3.54 m	3.34 ddd (8.3 u. 6.4 u. 4.0)	44.0	41.6
2''	2.52 m	2.52 dd (17.4 u. 5.0) 2.55 dd (17.4 u. 8.8)	42.8	43.9
3''	-	-	n.d	221.3
4''	2.85 m	2.40 dd (7.6 u. 2.2)	43.9	48.0
5''	2.55 m	2.42 m	52.5	52.3
6''	4.25 t (10.3 u. 9.9)	4.28 dd (9.8 u. 8.7)	79.8	83.6
7''	3.19 m	3.55 ddt (10.4 u. 8.7 u. 3.2)	48.6	47.5
8''	5.10 m	5.14 ddd (10.8 u. 8.3 u. 6.1)	75.5	75.9
9''	2.38 d (14.6) 2.77 dd (14.1 u. 4.4)	2.37 dd (13.2 u. 8.0) 2.96 dd (13.2 u. 5.8)	37.7	43.1
10''	-	-	143.0	144.5
11''	-	-	139.6	138.5
12''	-	-	170.3	171.2
13''a	5.61 s (br.)	5.82 d (2.9)	122.8	124.4
13''b	6.06 s (br.)	6.20 d (3.4)		
14''a/14''b	4.95 s / 5.03 s	4.91 s / 5.11 s	118.8	116.9
15''a/15''b	3.23 m / 3.15 m	1.23 d (6.9)	25.6	15.3
1'''	-	-	166.4	166.3
2'''	-	-	141.8	141.8
3'''a	5.96 s (br.)	6.00 d (1.5)	126.1	126.2
3'''b	6.29 s (br.)	6.34 d (1.3)		
4'''	4.29 s	4.32 s	61.6	61.7

n.d.: nicht detektiert *Zuordnung vertauschbar

Im Protonen-Protonen-Korrelationsspektrum (COSY, s. Abb. 2.107, S. 175) findet man ausgehend von H-7“ die Kreuzsignale für die allylische Kopplung mit den beiden Exomethylenprotonen an C-13“ und die Kopplungen zu den Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 4.25$ ppm (H-6“) und 5.10 ppm (H-8“). Die zugehörigen Kohlenstoffe finden sich bei $\delta_{\text{C}} = 75.5$ (C-8“) und 79.8 ppm (C-6“). H-6 spaltet zum Dublett von Dublett mit Triplethhabitus auf. Aus dem Signal lassen sich zwei Kopplungskonstanten in Höhe von 10.3 und 9.9 Hz entnehmen, woraus folgt, dass die Protonen H-5“, H-6“ und H-7“ zueinander trans-konfiguriert vorliegen und Verbindung **8**, wie die Sesquiterpenlactone **1-5** ein trans-Lacton darstellt. Der zweite Kopplungspartner von H-6“ lässt sich über den zweiten Crosspeak dieses Signals im COSY-Spektrum lokalisieren. Das Proton an C-6“ koppelt dabei mit dem linken Teil ($\delta_{\text{H}} = 2.55$) ppm eines Multipletts für insgesamt 3 Protonen. Der zugehörige Kohlenstoff findet sich bei $\delta_{\text{C}} = 52.5$ ppm. ES handelt sich dabei um das C-5“, das bei Verbindung **5** bei einem fast identischen Shiftwert gefunden wurde. Der rechte Teil des Shiftbereiches in dem H-5“ gefunden wurde, gehört zu zwei Protonen (H-2“), die zu einer Methylengruppe gehören ($\delta_{\text{C}} = 42.8$ ppm), und gemeinsam mit H-5“ eine Kopplung zum Protonensignal bei 3.54 ppm (H-1“) zeigen. Eine weitere, schwächere Kopplung führt zum Multiplett des Protons an C-4“ bei $\delta = 2.85$ und dem zugehörigen δ_{C} bei 43.9 ppm. Wie bei den Verbindungen **1-5** gibt es auch in den Spektren von **8** eine Kopplung zwischen dem H-8 und den Methylenprotonen H-9“a ($\delta_{\text{H}} = 2.38$ ppm) und H-9“b ($\delta_{\text{H}} = 2.77$ ppm). Diese beiden Protonen zeigen keinen weiteren Kopplungspartner im COSY-Spektrum, so dass der auf das C-9“ ($\delta_{\text{C}} = 37.7$) folgende Kohlenstoff des Cycloheptanrings (C-10“) ein quartäres C-Atom sein muss. Dieser Kohlenstoff trägt, wie bei **1-5** eine exocyclische Methylengruppe (C-14“), deren Signale bei $\delta_{\text{C}} = 118.8$ und $\delta_{\text{H}} = 4.95$ und 5.03 ppm gefunden wurden. Die Protonensignale zeigen im HMBC Korrelationen zu den Kohlenstoffsignalen von C-1“ und C-9“, was die Position von C-14“ bestätigt. Im Gegensatz zu den Spektren von **4** und **5** besitzt Verbindung **8** keine Methylgruppe am Cyclopentanring. Die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 1.23$ und $\delta_{\text{C}} = 15.26$ fehlen. Stattdessen findet sich ein Signal bei $\delta_{\text{C}} = 25.7$ ppm in ^{13}C -NMR, das mit den Protonensignalen bei $\delta_{\text{H}} = 3.15$ und 3.23 ppm korreliert ist. Leider sind die beiden Signale von H-7 überlagert, so dass sich keine eindeutigen Kopplungskonstanten ermitteln lassen. Leider fehlt im Spektrum der Nachweis der Ketogruppe C-3“, da das Spektrum unglücklicherweise nur bis 200 ppm aufgenommen wurde. Da alle Positionen bis auf C-3 eindeutig zugeordnet werden konnten, sollte die Verbindung zwischen dem Sesquiterpenlacton- und den Flavonoidteil von **8** zwischen C-15“ und dem C-8 bestehen. Leider konnten keine Korrelationen zwischen H-4“ bzw. H-14“ und den Kohlenstoffen C-7,

C-8 und C-9 im HMBC-Spektrum gefunden werden, wodurch der Beweis geführt werden könnte. Wegen des Fehlens des Signals von C-3 und der Problematik der Zuordnung der quartären Kohlenstoffe des A-Rings des Flavonoidteils, wurde ein weiterer Satz Spektren in DMSO-d₆ aufgenommen (s. Abb. 2.111 bis 2.119, S.182 bis 190).

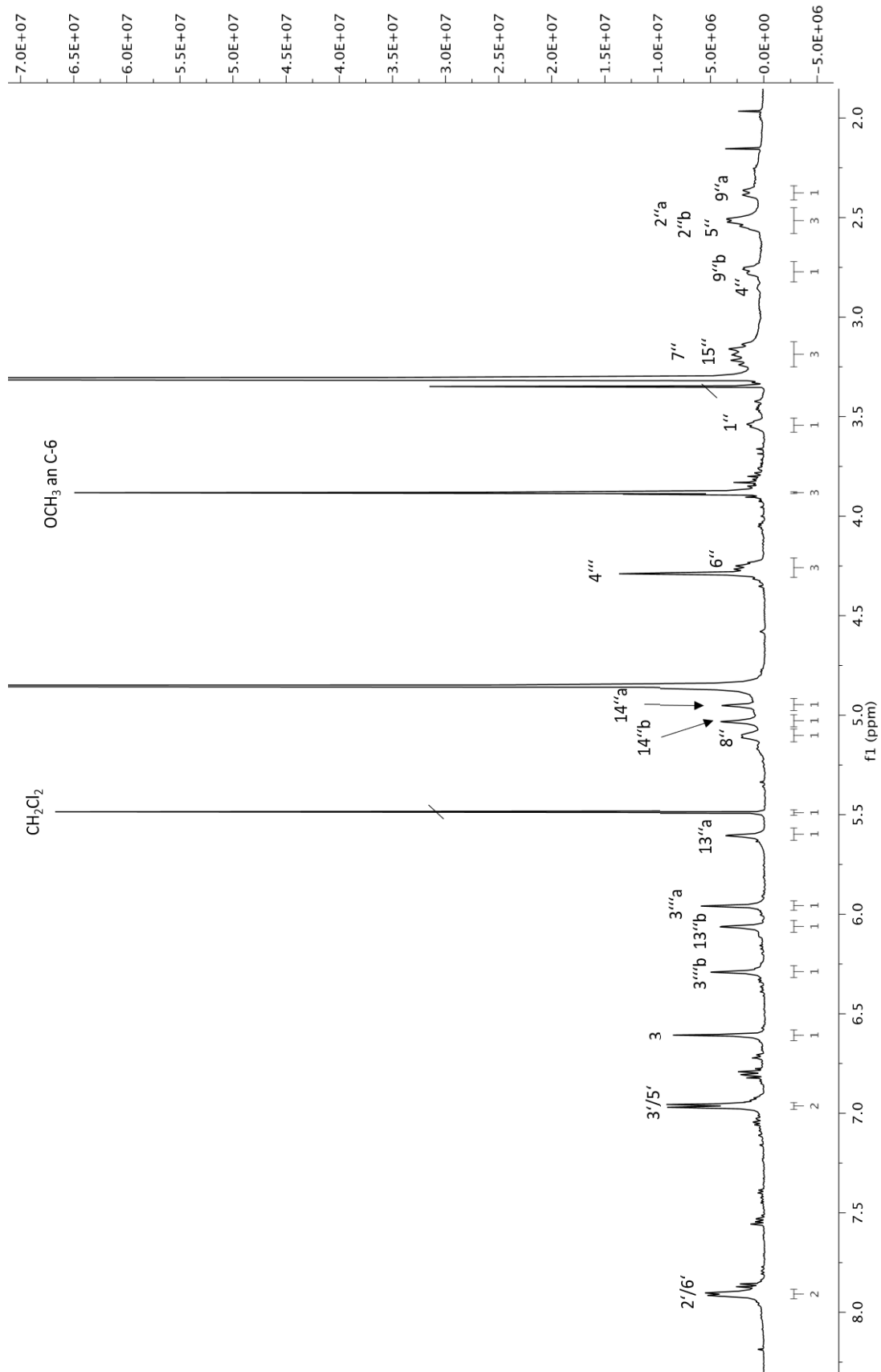


Abbildung 2.104: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung **8** (600 MHz in CD_3OD)

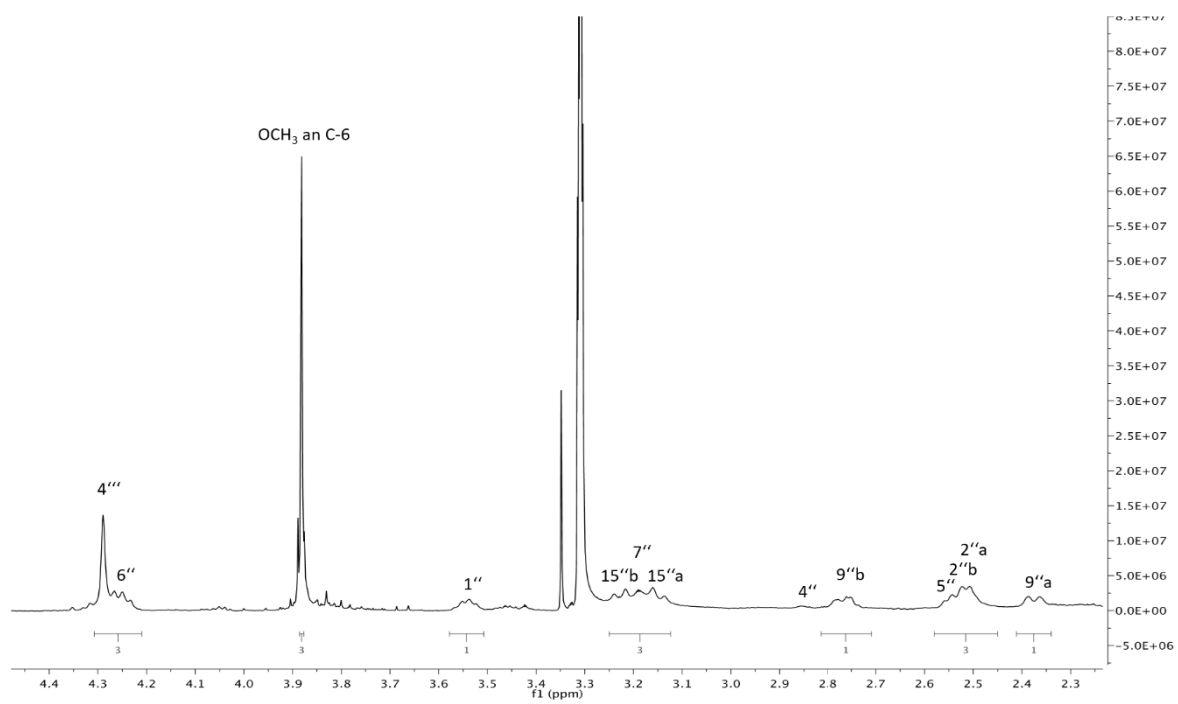
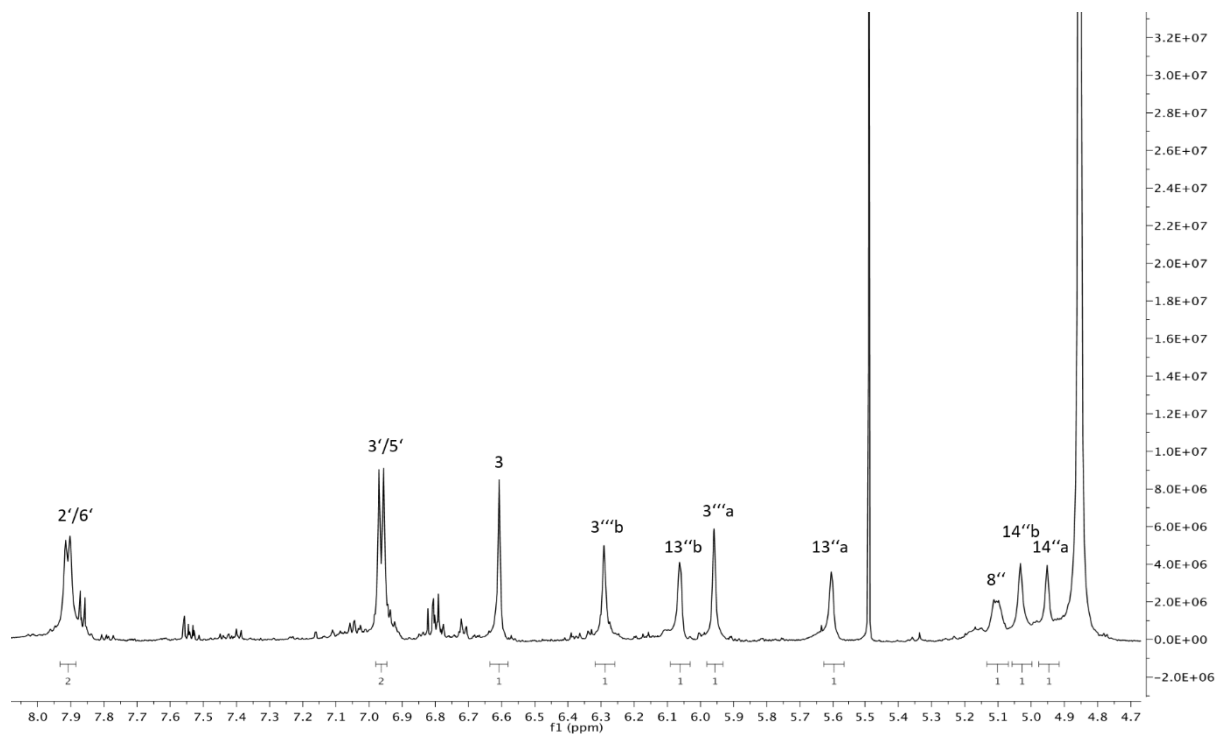


Abbildung 2.105: ^1H -NMR Spektrum (gespreizt) von Verbindung **8** (600 MHz in CD_3OD)

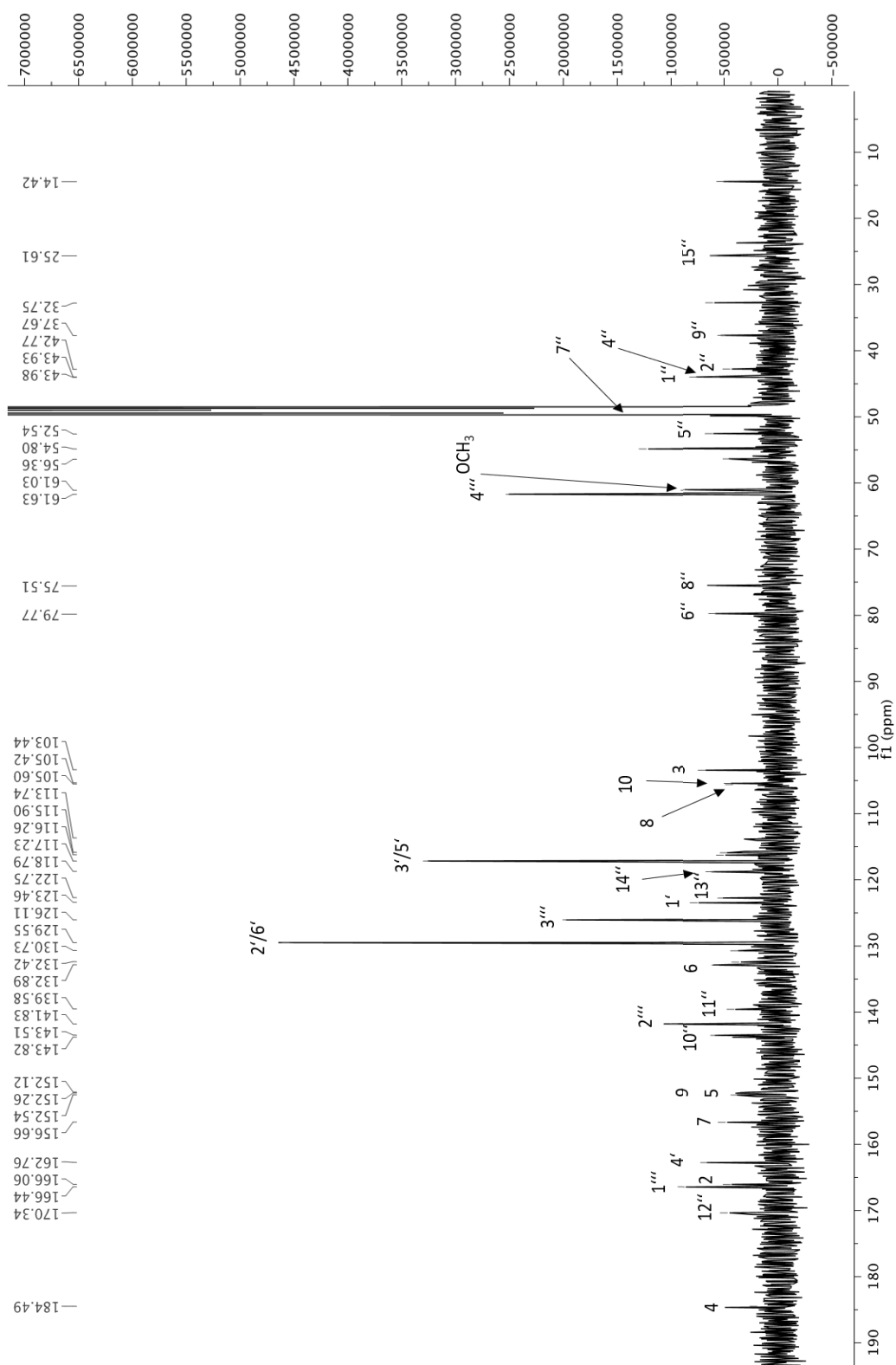


Abbildung 2.106: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **8** (150 MHz in CD_3OD)

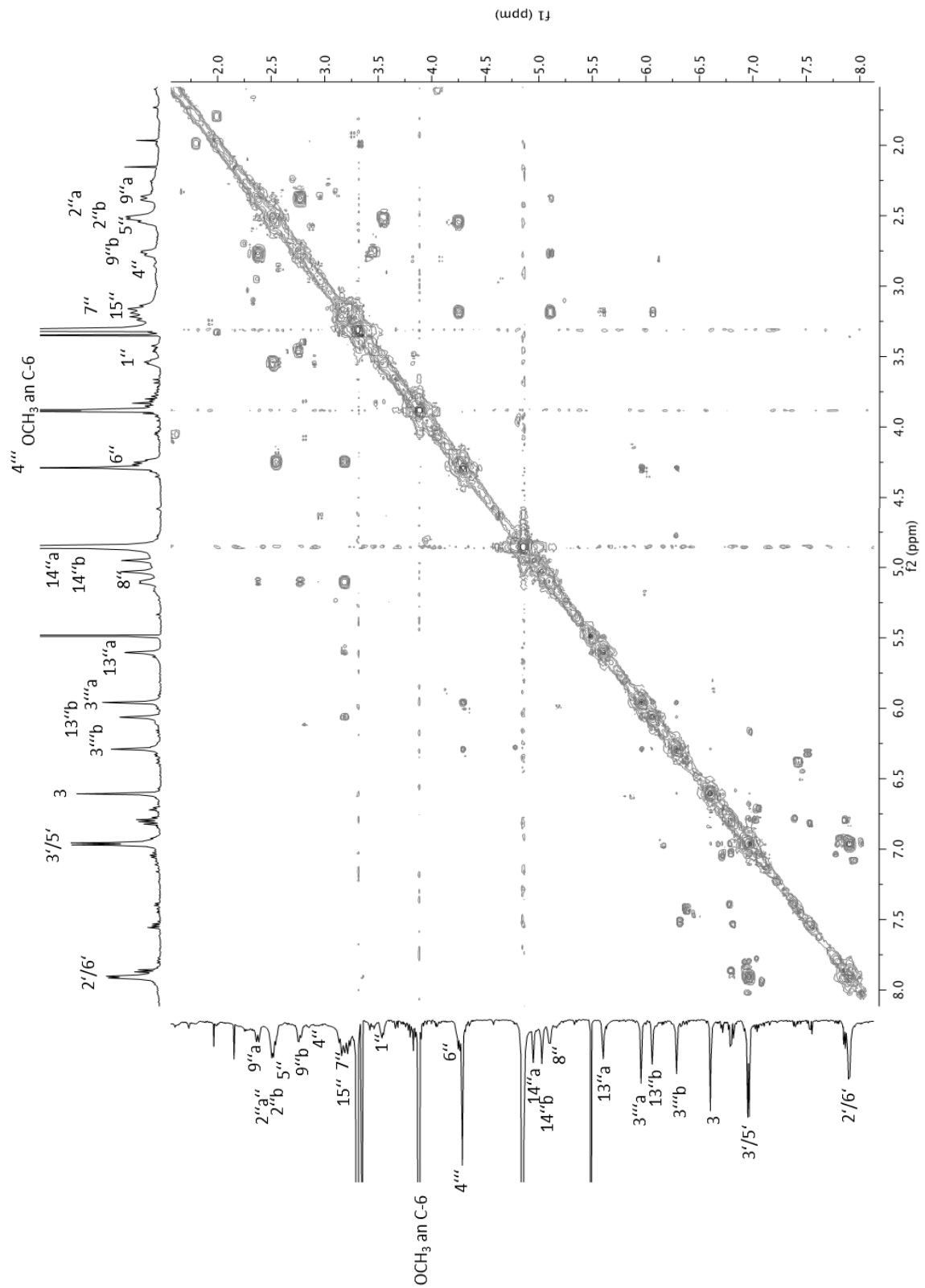


Abbildung 2.107: 2D-COSY-Spektrum von **8** (600 MHz in CD₃OD)

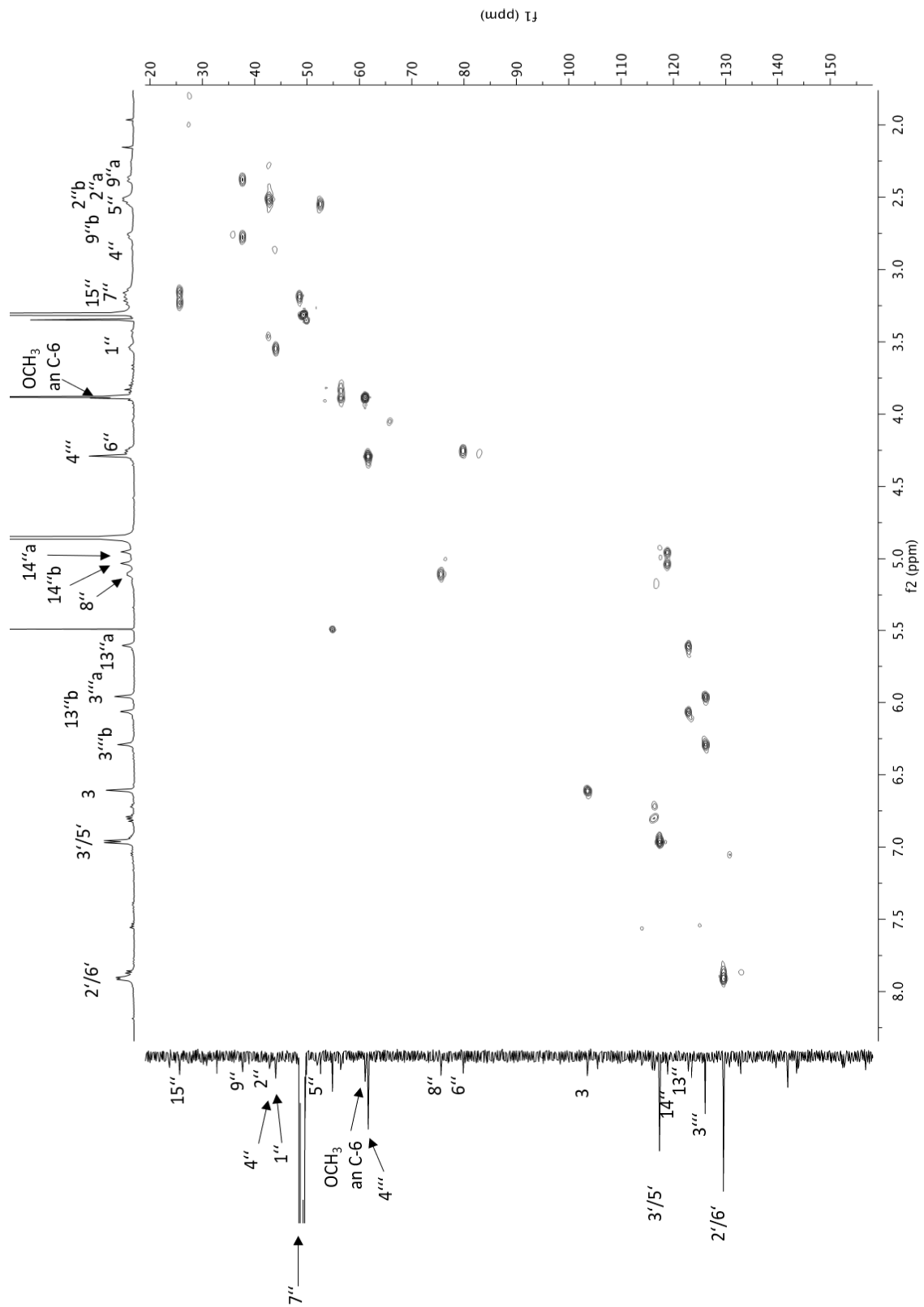


Abbildung 2.108: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **8** (600 MHz in CD₃OD)

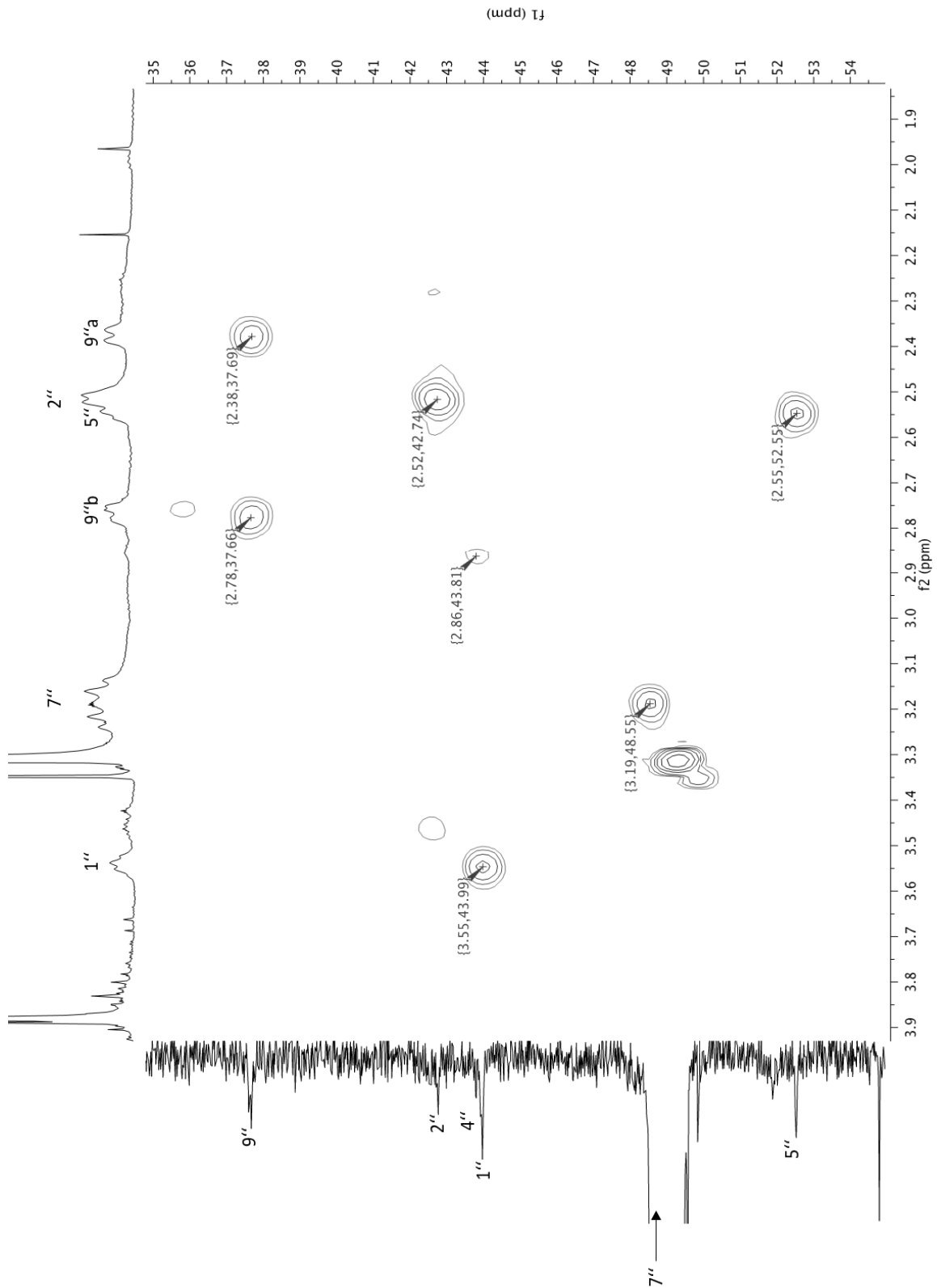


Abbildung. 2.109: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Verbindung **8** (600 MHz in CD_3OD)

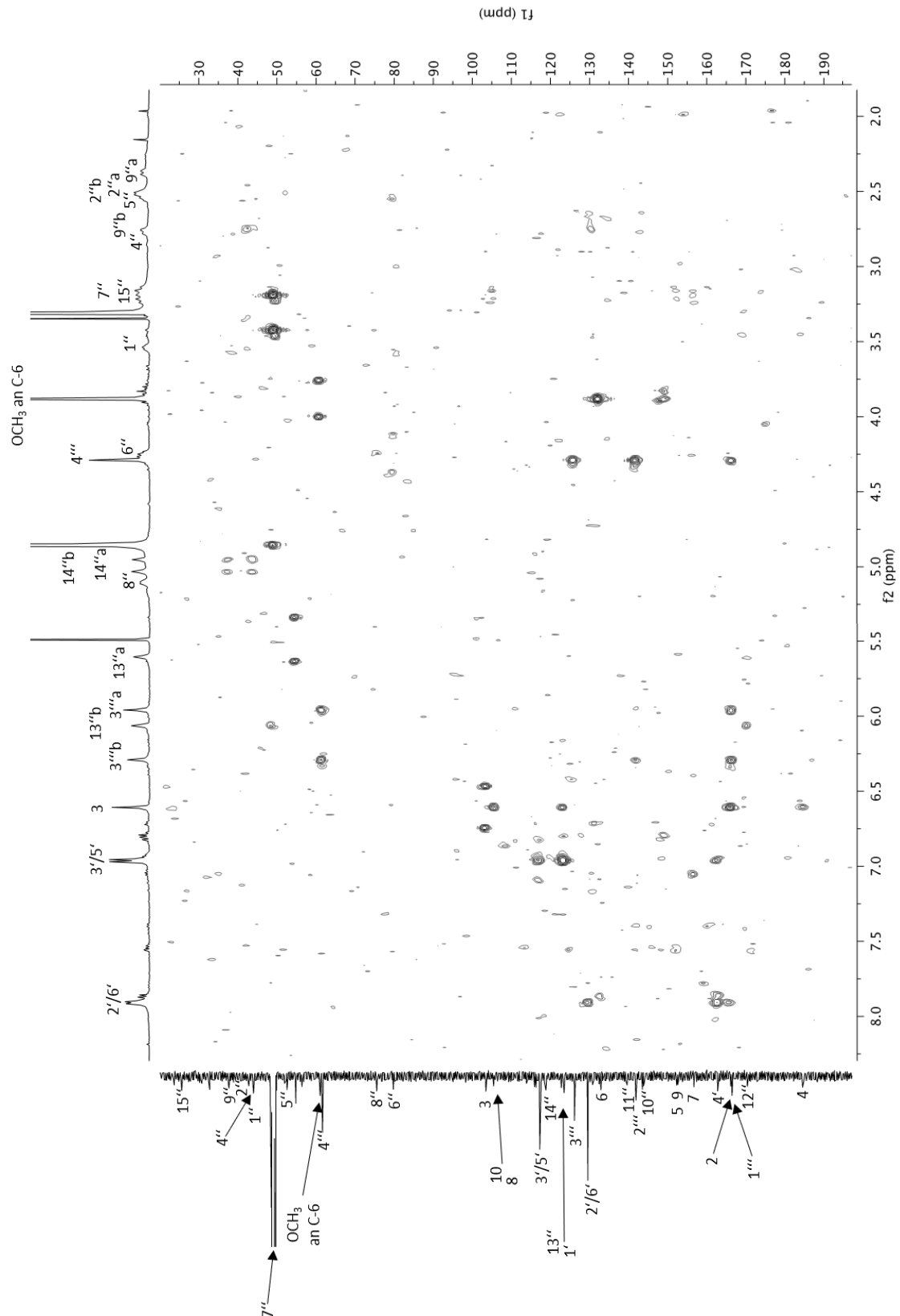


Abbildung 2.110: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **8** (600 MHz in CD₃OD)

Tabelle 2.12 zeigt die Zuordnung aller ^1H - und ^{13}C -NMR Signale aus den Spektren in Abb. 2.104 und 2.106. Alle bereits bei den CD_3OD -Spektren beschriebenen Konnektivitäten finden sich auch in diesem Lösungsmittel wieder. Im ^{13}C -NMR tritt bei $\delta = 217.0$ ppm das Signal eines quartären Carbonylkohlenstoffs auf, der den C-3 des Sesquiterpenlactons zugeordnet werden konnte. Aufgrund der Shiftwerte der Nachbaratome konnte diese ja auch bei der Auswertung des CD_3OD -Spektrums vermutet werden, das Signal fehlte jedoch im Spektrum. In DMSO-d_6 , in dem Hydroxylprotonen nicht durch Deuterium ausgetauscht werden können, findet sich im ^1H -NMR-Spektrum nun zusätzlich das Singulettsignal der Hydroxylgruppe an C-5 des im Molekül vorhandenen Hispidulinteils (s. Abb. 2.116, S.187) erwartungsgemäß bei $\delta = 13.15$ ppm. Durch die ^2J - und ^3J -Kopplungen zum Signal dieser phenolischen OH-Gruppe im HMBC-Spektrum können die Kohlenstoffe bei $\delta = 131.5$ (C-6), 150.5 (C-5) und 103.7 (C-10) gut zugeordnet werden. Während das C-5 keine weitere Korrelation zu anderen Protonen zeigt, kann die Zuordnung des Signals von C-10 über eine Korrelation mit dem H-3 des C-Rings zusätzlich bestätigt werden (s. Abb. 2.117, S.188). Das Signal von C-6 zeigt eine zusätzliche Korrelation mit den Methylprotonen der Methoxygruppe, wodurch deren bereits vermutete Bindung am C-6 des B-Rings eindeutig nachgewiesen werden konnte. Im COSY-Spektrum (s. Abb. 2.115, S.186) ist die Korrelation zwischen H-4'' bei $\delta = 2.75$ ppm mit dem Signal für die Methylenprotonen an C-15'' ($\delta = 3.07$) deutlich zu erkennen. Der zugehörige Kohlenstoff (C-15'') findet sich über den Crosspeak im HSQC-Spektrum (s. Abb. 2.115, S.186) bei $\delta = 24.2$ ppm im ^{13}C -NMR (s. Abb. 2.112, S.189). Durch das zusätzlich aufgenommene ^{13}C -DEPT-Spektrum wird bestätigt, dass es sich bei C-15 um einen der insgesamt sieben im Molekül vorhandenen Methylenkohlenstoffe handelt (s. Abb. 2.114, S.185). Das Signal von H-15'', das leider auch in DMSO-d_6 von H-7'' überlagert ist, zeigt im in DMSO-d_6 aufgenommenen HMBC-Spektrum wichtige Korrelationen, mit deren Hilfe die Verbindung des Sesquiterpenlactons mit dem Flavonoid belegt werden konnte. Abbildung 2.117 und 2.118 (siehe S.188 u.189) zeigen Ausschnittsvergrößerungen aus dem HMBC-Spektrum von Verbindung **8**. Das Signal von H-15'' besitzt Kreuzsignale mit dem Kohlenstoff C-5'' bei $\delta = 50.7$ ppm und dem C-3'' bei 217.0 ppm, das auch eine ^2J -Kopplung mit H-4'' zeigt. H-15'' zeigt darüber hinaus Konnektivitäten zu den Kohlenstoffen C-8 bei $\delta = 103.9$ ppm sowie C-7 und C-9 des Hispidulinteils, die ein gemeinsames Signal bei $\delta = 150.9$ ppm besitzen. Das Sesquiterpenlacton ist somit über das C-15 am C-8 des Flavonoids gebunden.

Beim Flavonoid handelt es sich um das Flavon Hispidulin (**5**), dessen Isolierung aus den hier untersuchten Extrakten bereits beschrieben wurde. Da es sich bei Flavonen um planare Moleküle handelt, spielt die Stereochemie bei diesem Teil von **8** keine Rolle, anders sieht es beim Sesquiterpenteil aus.

Tabelle 2.13: NMR-Daten der Verbindung **8** (600 MHz in DMSO-d₆; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H		¹³ C NMR		
	8	Verb. 7	8	DEPT	Verb. 7
2	-	-	163.6		163.7
3	6.81 s	6.77 s	102.3	CH	102.3
4	-	-	182.6		182.1
5	-	-	150.5		152.7
6	-	-	131.5		131.4
7	-	-	150.9		157.5
8	-	6.58 s	103.9		94.3
9	-	-	150.9		152.2
10	-	-	103.7		103.8
1 [•]	-	-	121.2		121.2
2 [•]	7.98 d (J=8.5 Hz)	7.92 d (8.9)	128.5	CH	128.4
3 [•]	6.95 d (J=8.8 Hz)	6.92 d (8.9)	116.1	CH	116.0
4 [•]	-	-	161.2		161.2
5 [•]	6.95 d (J=8.8 Hz)	6.92 d (8.9)	116.1	CH	116.0
6 [•]	7.98 d (J=8.5 Hz)	7.92 d (8.9)	128.5	CH	128.4
OCH ₃		3.75 s	60.2	CH ₃	60.0
OH an C-5	13.15 s	13.07 s			
		Verb. 5			Verb. 5
1 ^{••}	3.58 m	3.29 dd (8.2 u. 5.7)	42.4	CH	40.1
2 ^{••}	2.37 m 2.49 m	2.34 m 2.49 m	41.1	CH ₂	42.4
3 ^{••}	-	-	217.0		218.6
4 ^{••}	2.75 m	2.26 m	50.4	CH	46.0
5 ^{••}	2.44 m	2.38 m	50.7	CH	50.2
6 ^{••}	4.37 t (10.1)	4.33 dd (10.4 u. 8.5)	77.3	CH	81.1
7 ^{••}	3.11 m	3.51 ddt (10.6 u. 8.6 u. 3.1)	46.3	CH	45.5
8 ^{••}	5.04 m	5.06 ddd (10.6 u. 7.6 u. 5.9)	73.5	CH	73.9
9 ^{••}	2.23 d (14.6) 2.74 dd (14.9 u. 5.5)	2.29 m 2.83 dd (13.1 u. 5.8)	35.3	CH ₂	40.9
10 ^{••}	-	-	142.2		143.0
11 ^{••}	-	-	138.4		137.3
12 ^{••}	-	-	168.3		168.9
13 ^{••a} 13 ^{••b}	5.46 d (J=3.0 Hz) 5.95 d (J=3.4 Hz)	5.67 d (2.8) 6.08 d (3.3)	121.4	CH ₂	122.7
14 ^{••a} 14 ^{••b}	4.85 s 4.96 s	4.86 s 5.02 s	118.0	CH ₂	116.2
15 ^{••a} 15 ^{••b}	3.07 m	1.11 d (7.2)	24.2	CH ₂	14.7
1 ^{•••}			164.9		164.7
2 ^{•••}			140.8		140.8
3 ^{•••a} 3 ^{•••b}	5.89 d (J=2.1 Hz) 6.15 d (J=1.7 Hz)		124.4	CH ₂	124.6
4 ^{•••}	4.15 s		59.6	CH ₂	59.6

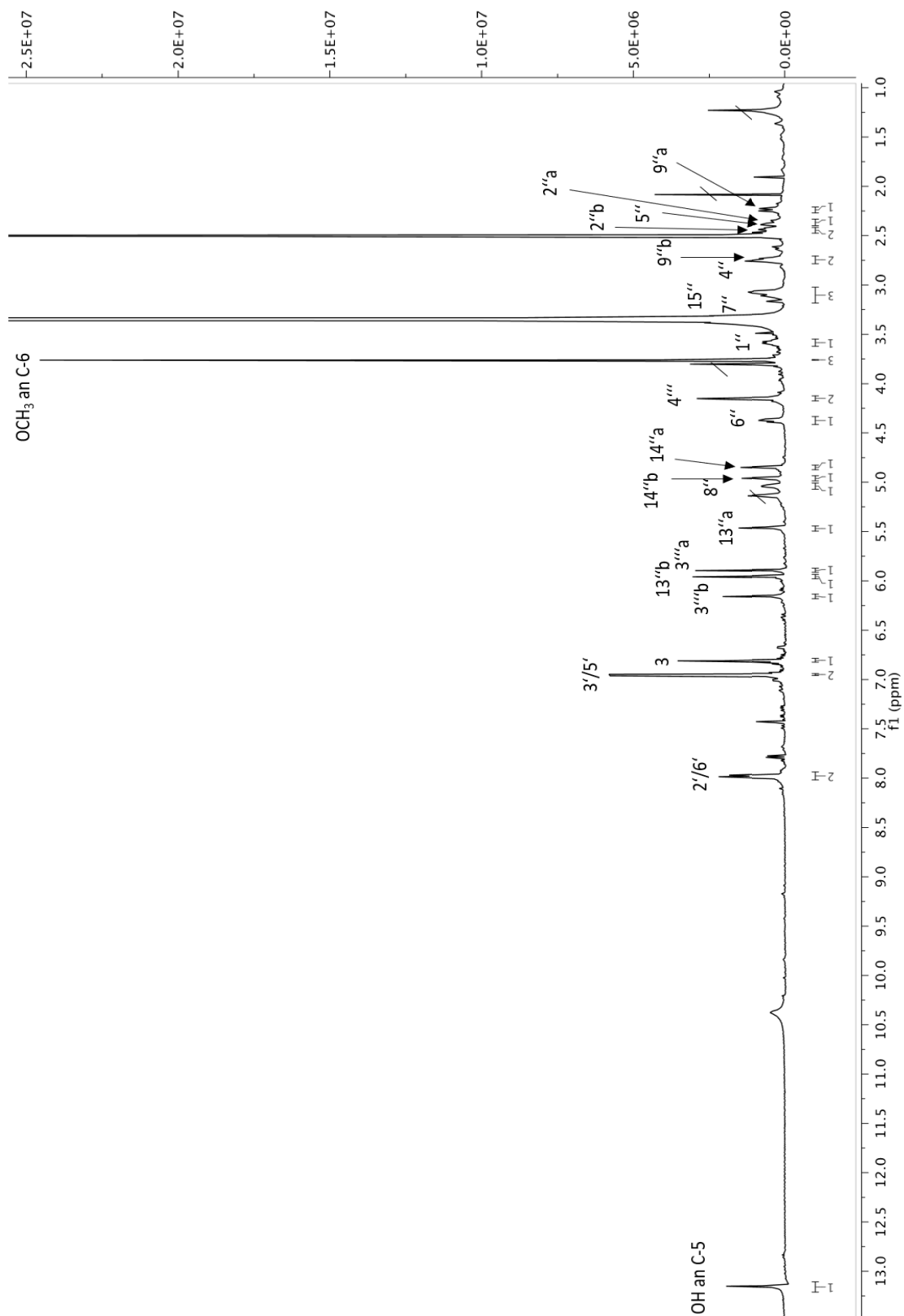


Abbildung 2.111: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **8** (600 MHz in DMSO-d_6)

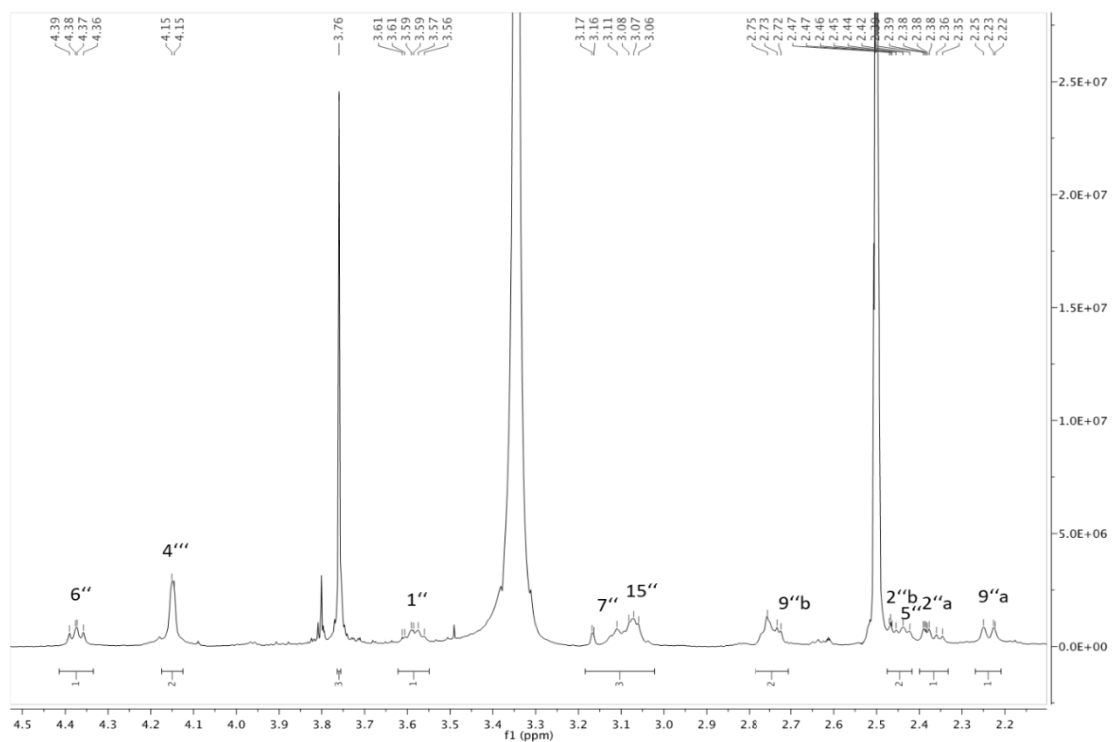
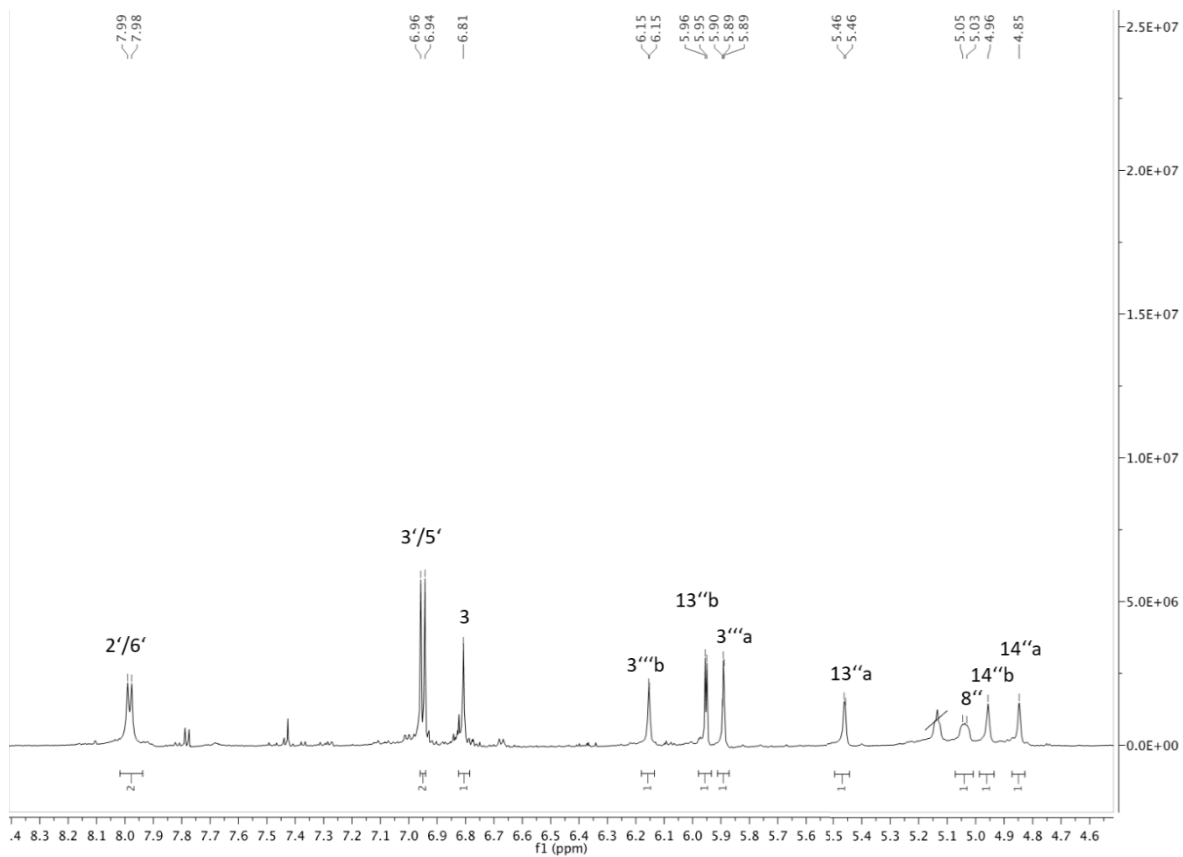


Abbildung 2.112 : ^1H -NMR Spektrum (gespreizt) von Verbindung **8** (600 MHz in DMSO-d_6)

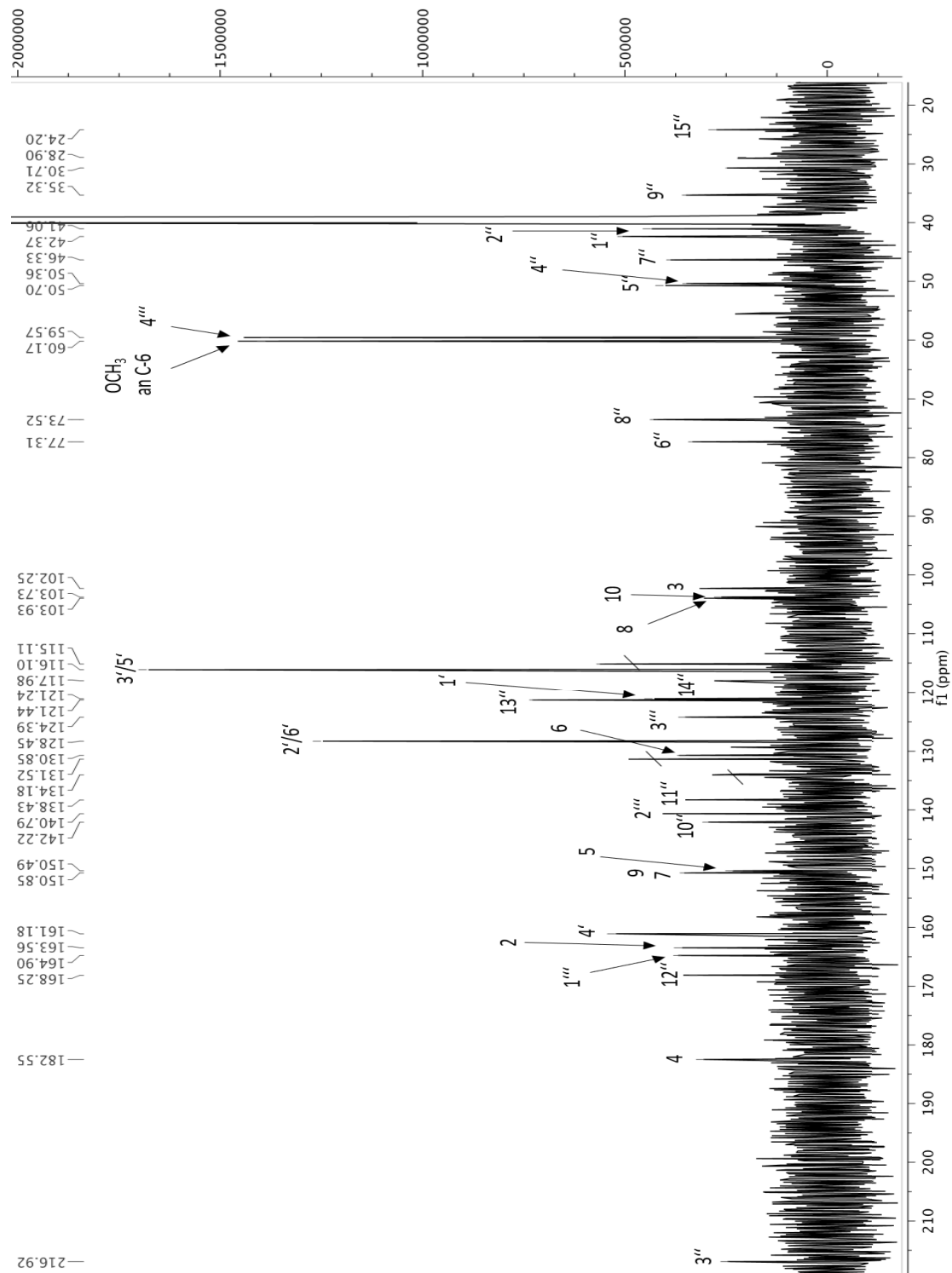


Abbildung 2.113: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **8** (150 MHz in DMSO-d_6)

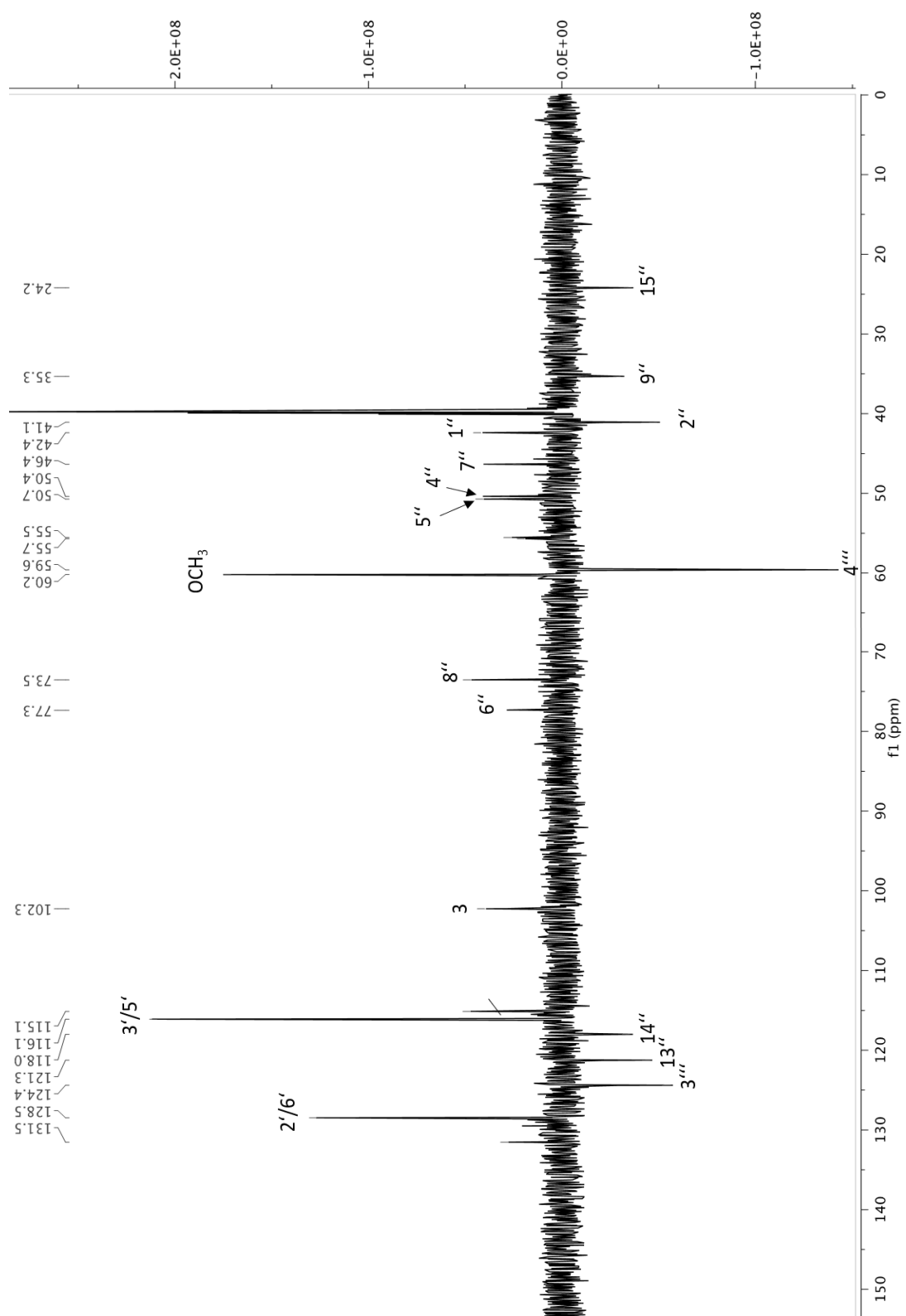


Abbildung 2.114: ^{13}C -NMR DEPT Spektrum von **8** (150 MHz in DMSO- d_6)

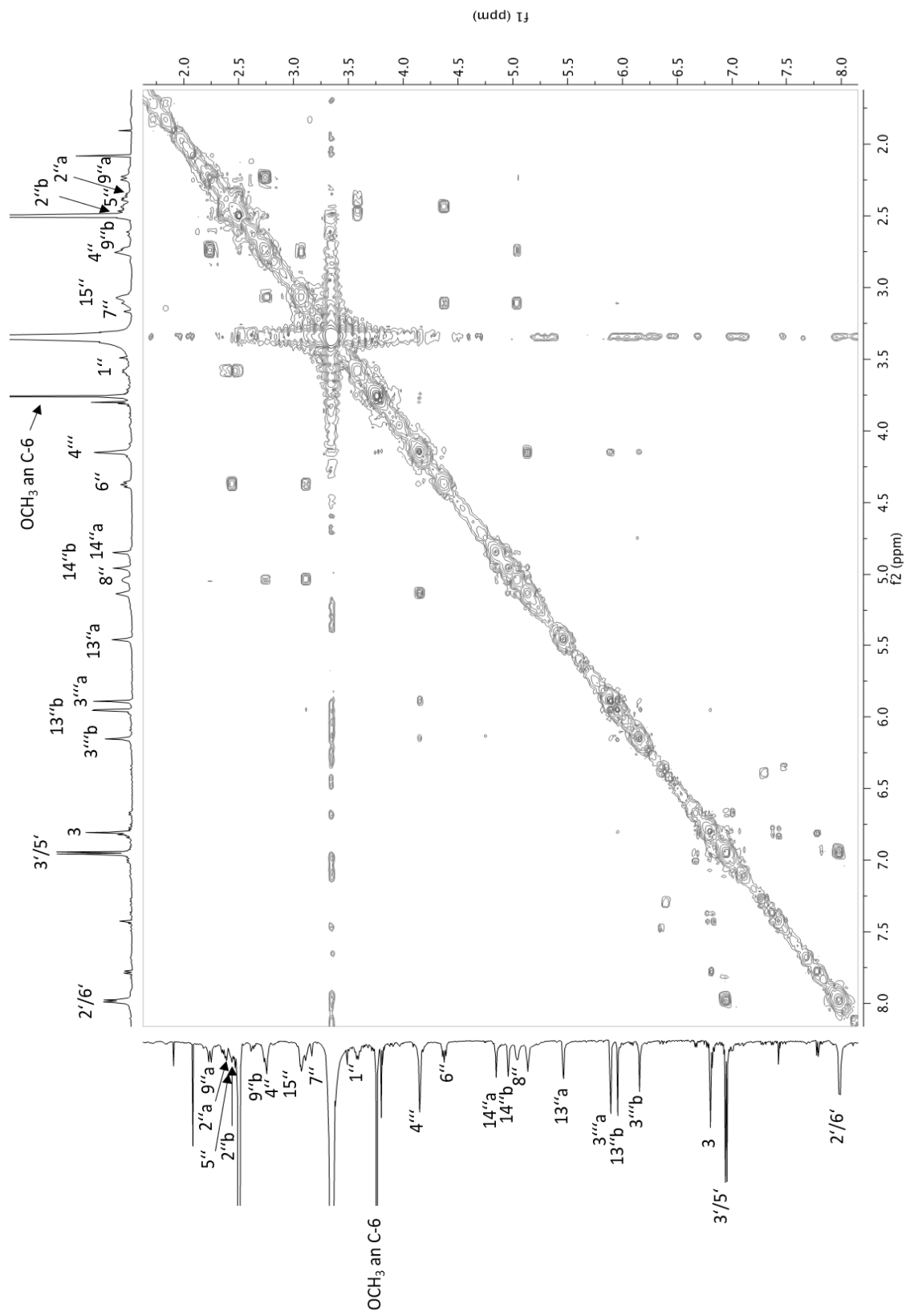


Abbildung 2.115: 2D-COSY-Spektrum von **8** (600 MHz in DMSO-d₆)

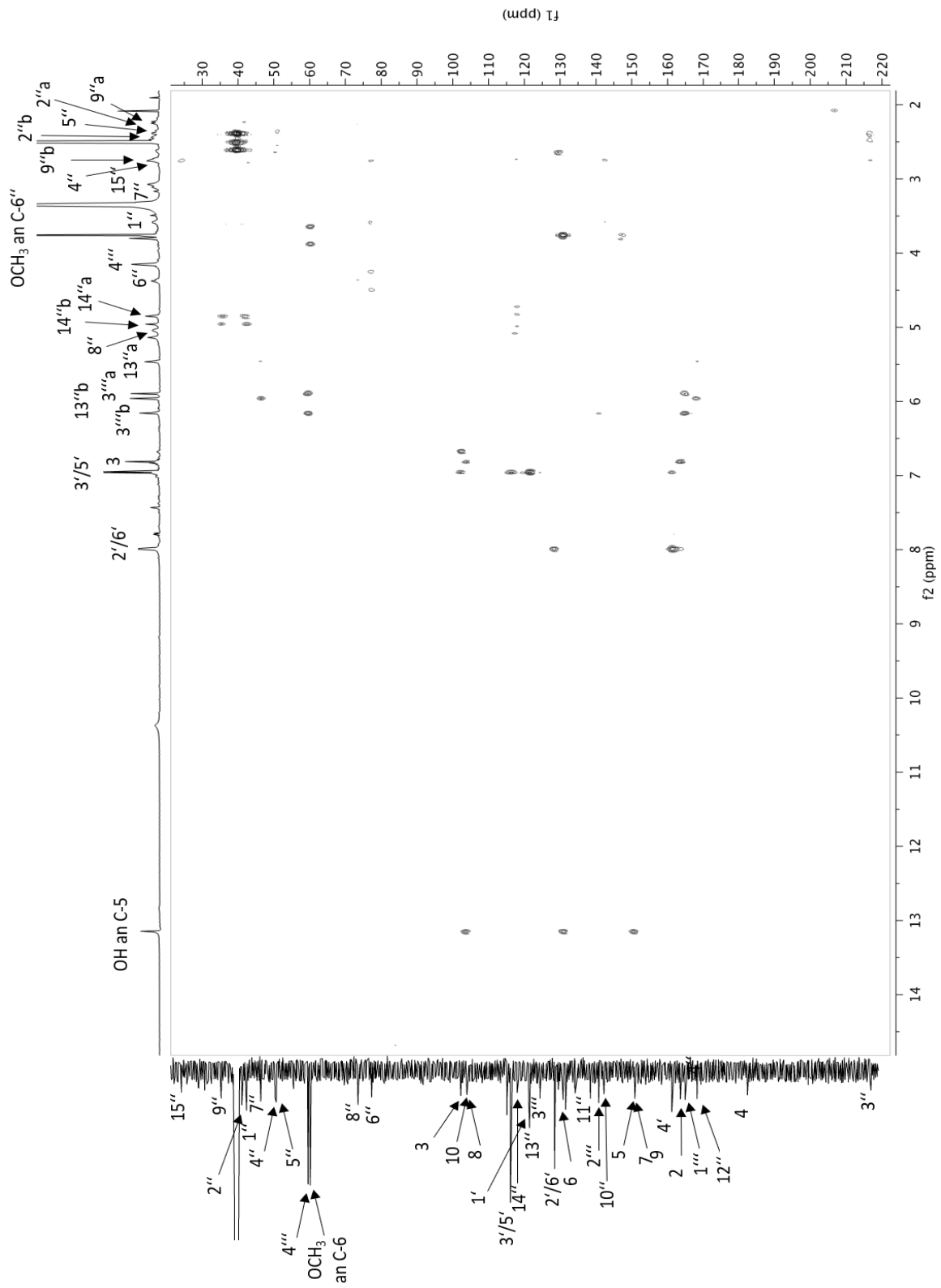


Abbildung 2.117: 2D-HMBC-Spektrum von **8** (600 MHz in DMSO- d_6)

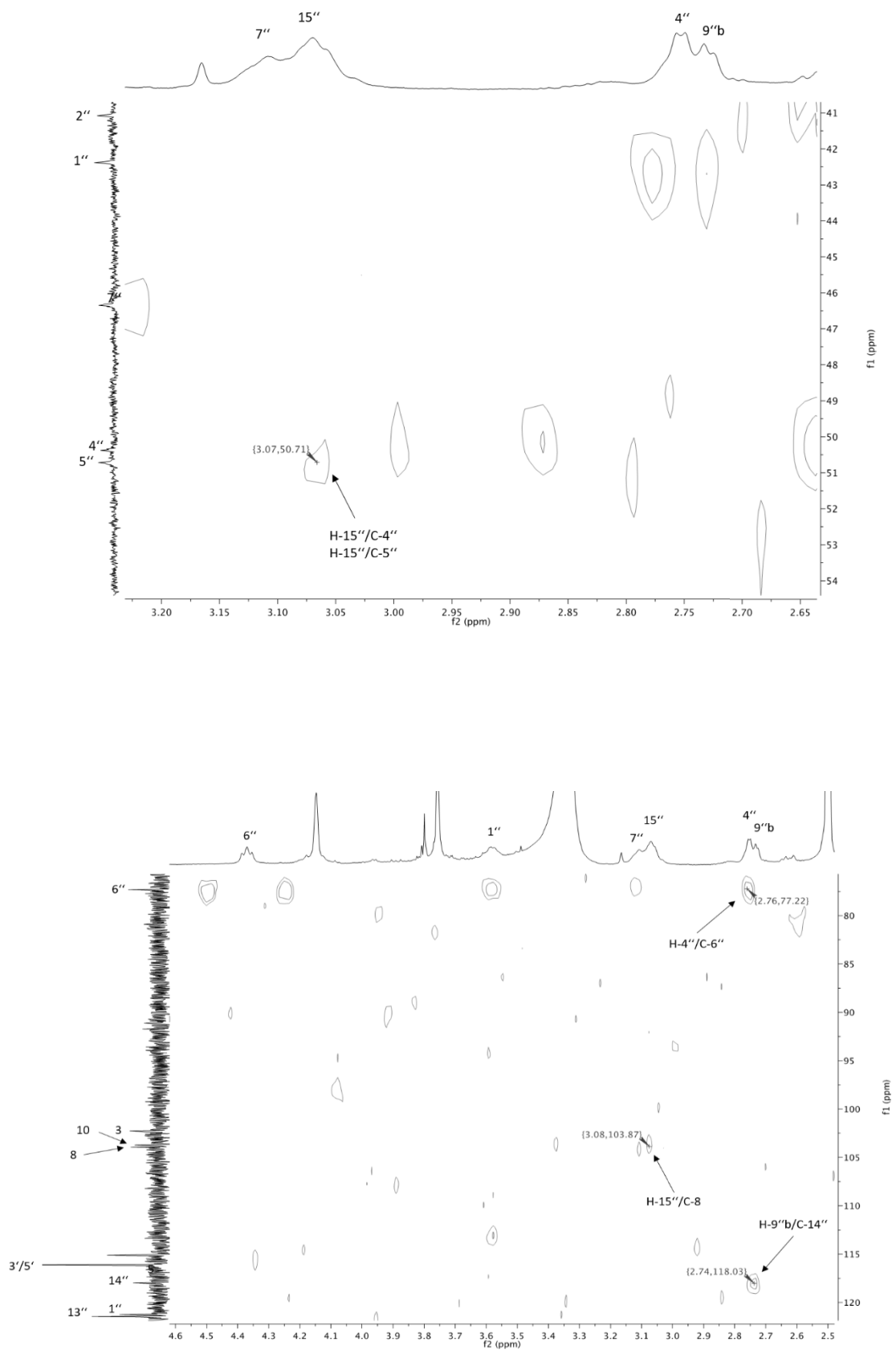


Abbildung 2.118: Ausschnitte aus dem 2D-HMBC-Spektrum von **8** (600 MHz in DMSO-d₆)

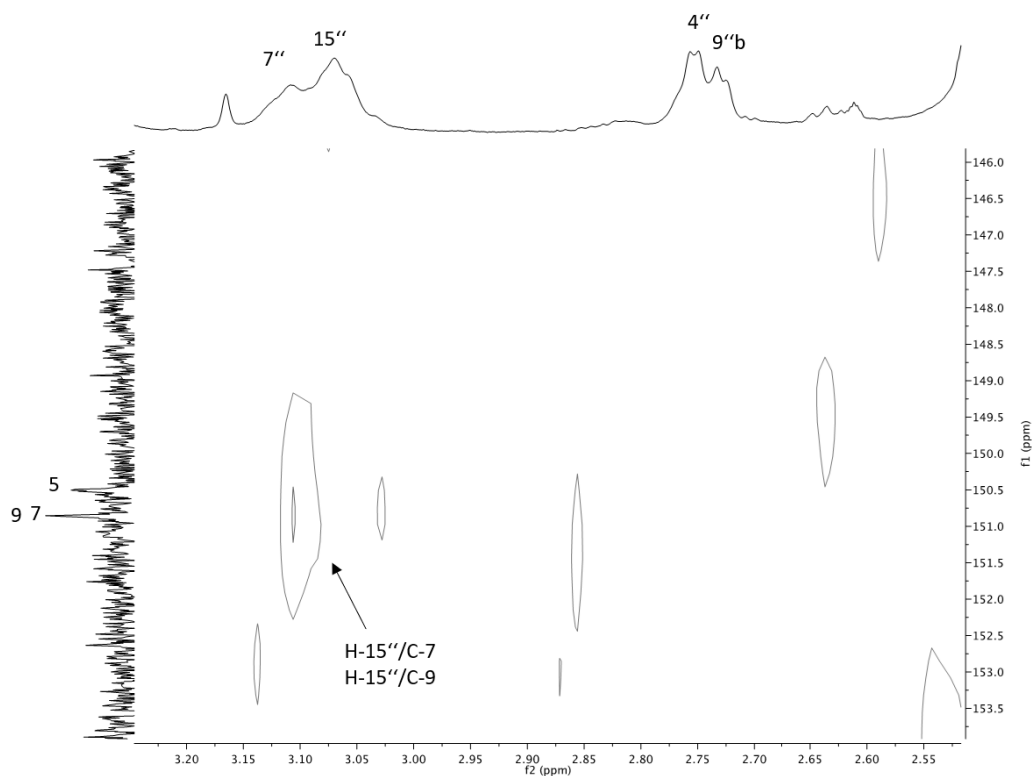


Abbildung. 2.119: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von **8** (600 MHz in DMSO- d_6)

Beim an das Hispidulin gebundenen Sesquiterpenlacton handelt es sich vermutlich um Verbindung **4** oder **5**. Aufgrund der sich überlagernden Signale, bleibt die Stereochemie in einigen Bereichen auch nach Auswertung der DMSO- d_6 Spektren unklar. Aufgrund der Kopplungskonstanten in Höhe von 10.1 Hz, die man aus den Dublett von Dublett mit Tripletthabitus des H-6'' entnehmen kann, ist H-6'', ausgehend von der, wie bei allen Guaianoliden vorhandenen, α -Stellung des H-7'', β -orientiert. Dementsprechend muss H-5'' α -ständig angeordnet sein. Aufgrund einer schwachen Kopplung zwischen C-1'' des 2-Hydroxymethylacrylsäureesters und dem H-8'', muss dieser wie bei den Sesquiterpenlactonen zuvor an der sekundären Hydroxylgruppe an C-8 gebunden sein. Da sowohl H-7'' als auch H-8'' nur als Multipllett auftreten, kann die relative Stereochemie an C-8'' leider nicht eindeutig geklärt werden. Da sowohl H-9a als auch H-7 und die zugehörigen Kohlenstoffe etwas verschoben auftreten, kann auch der Shiftwert von C-8, der bei 75.5 ppm im Spektrum von **8** und 75.9 ppm im Spektrum von **5** bei nahezu identischem Wert gefunden wurde, nicht zur Klärung der Position der Hydroxylgruppe an C-8 herangezogen werden. Es ist zwar

anzunehmen, dass die Flexibilität des Cyclopentanrings, der aufgrund der Substitution an C-4“ in eine andere Position gezwungen wird, der Grund für die Verschiebung von C-9 und C-7 ist und sich der Ester an C-8, wie bei den anderen Verbindungen in der α -Position befindet, mit Sicherheit sagen, lässt sich das jedoch nicht. Ebenso problematisch ist die Stellung des Flavonoidteils an C-4“. Auch dort kann die Position wegen des Multipllettcharakters der Protonensignale H-4“ und H-15“, bzw. der Überlagerung durch H-7“ und H-9“b, nicht geklärt werden. Ausgehend von der Tatsache, dass **8**, wie Verbindung **5**, getrennte Signale für C-2 und C-9 im in Methanol- d_4 aufgenommenen ^{13}C -NMR Spektrum besitzt (s. Tab. 2.13, S.181), kann angenommen werden, dass das H-4“ α -ständig und die CH_2 -Gruppe (C-15) β -orientiert ist. Wegen des großen Substituenten ist es aber auch möglich, dass die Substitution von C-15 in **4** zu einem solchen Effekt führt, so dass offen bleiben muss, welches der beiden Epimere an C-4 hier Teil des Moleküls ist.

Während einfache mit einem C_5 -Rest substituierte Prenylflavonoide häufig sind (Barron&Ibrahim, 1994 ; Chen et al, 2004), wurden mit Sesqui- oder Diterpenen verbundene Flavonoide bisher nur sehr selten in der Natur gefunden. Beispiele für solche Verbindungen (Abb. 2.120) sind die Fissistigmatine A-D zu nennen, die aus der vietnamesischen Arzneipflanze *Fissistigma bracteolatum* (Annonaceae) isoliert wurden (Porzel et. al, 2000) oder das Denticulaflavonol aus der Euphorbiaceae *Macaranga denticulata* (Sutthivaiyakit et al., 2002).

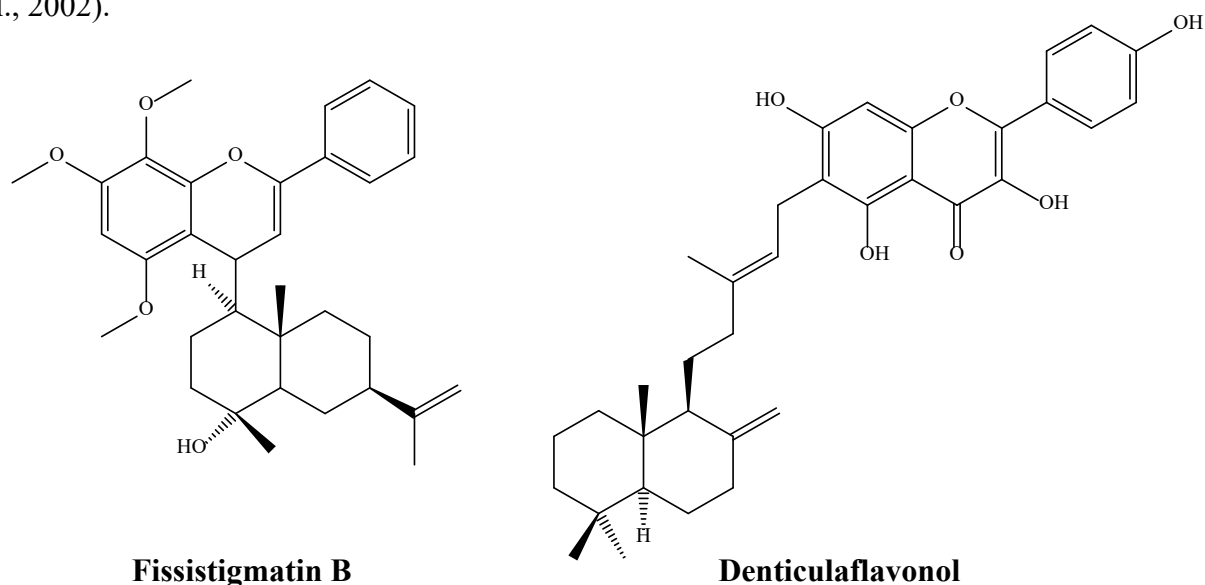
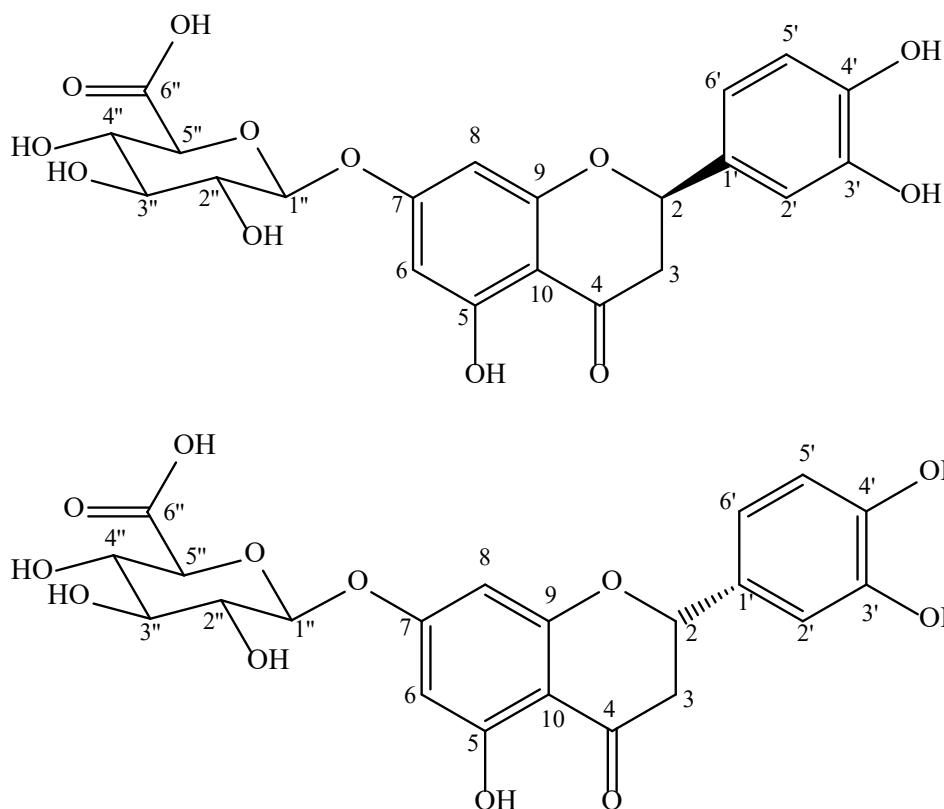


Abbildung 2.120.: Sesqui- und Diterpenoide Flavonoide

Mit einem Sesquiterpenlacton verknüpfte Flavonoide sind bisher noch nicht in der Natur gefunden worden. Bei Verbindung **8** handelt es sich demnach um einen neuen Naturstoff, dessen Stereochemie hier aufgrund der geringen Menge leider nicht eindeutig geklärt werden konnte.

2.2.8 Verbindung 9 und 10 (2(S)- und 2(R)-Eriodictyol 7-O-glucuronid)



Die Verbindungen **9** und **10** fielen bei der Aufarbeitung von Fraktion V.b.M.7.1.sp3 des Methanolextraktes als Gemisch an (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.4). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Substanz aufgrund ihres einheitlichen Verhaltens für eine einzelne Verbindung gehalten. Im Dünnschichtchromatogramm zeigte sie das typische Verhalten von Flavonoiden. Nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz färbte sich ihre Substanzzone bei $R_f = 0,61$ (DC3, s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1) gelb. Im HPLC fand sich ein Peak bei $R_t = 16,74$ min, so dass auch nach dieser Untersuchung zunächst von einer Verbindung ausgegangen wurde. Das UV- Spektrum zeigte Maxima bei λ 284 und 328nm, so dass es sich um ein Flavonoid handeln sollte, wobei es, aufgrund des chromatographischen Verhaltens, ein Flavonoidglykosid sein sollte.

Das mit Hilfe der Elektrosprayionisation im Negativ-Modus aufgenommene Massenspektrum (s. Abb. 2.121, S.194) zeigt das Quasimolekülion $[M-H]^+$ bei $m/z = 463,3$, ein Massenbereich, der für Flavonoidglykoside spricht.

Die anschließend durchgeführte hochauflösende Massenspektrometrie (HRESI, s. Abb. 2.122, S.194) ergab eine genaue Masse von $m/z = 465.1020$ aus sich die Summenformel $C_{21}H_{20}O_{12}$ ableiten lässt.

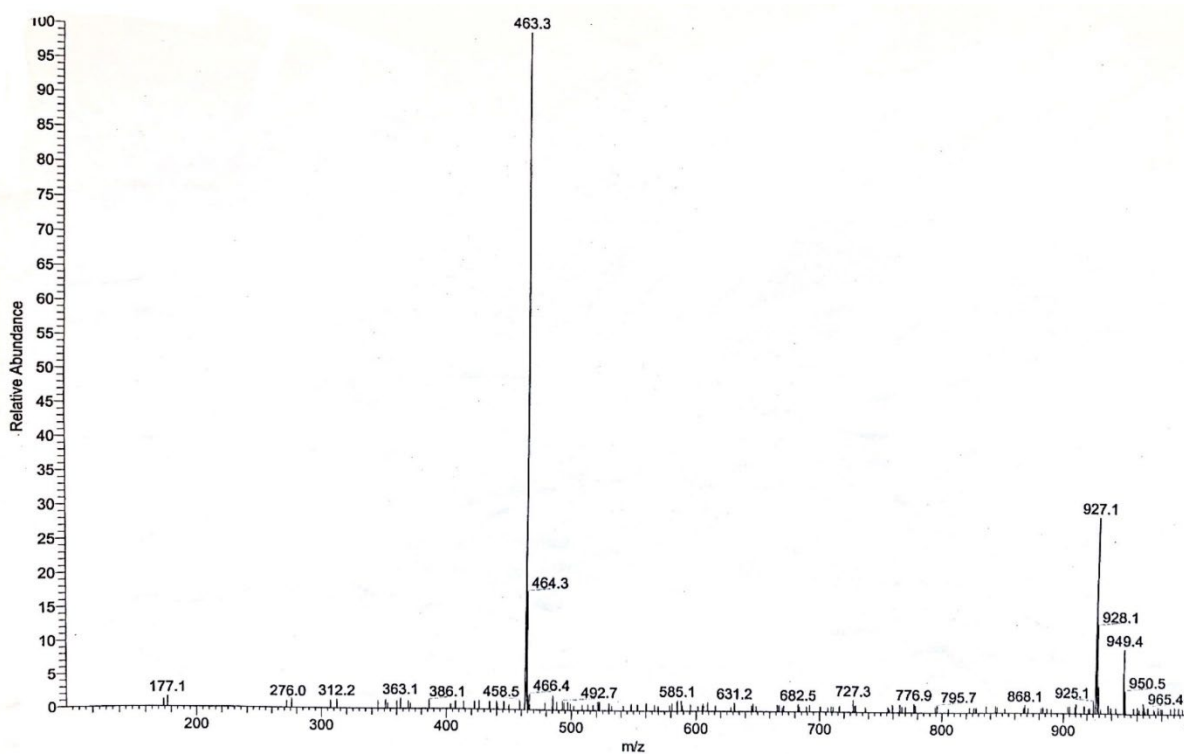


Abbildung 2.121: Massenspektrum des Gemisches von 9 und 10 (ESI)

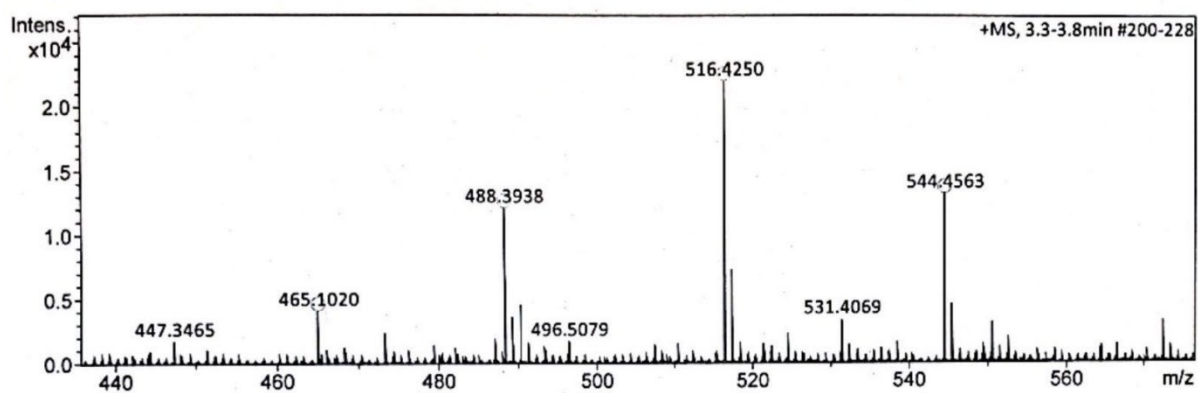


Abbildung 2.122: HRESI-Massenspektrum des Gemisches von 9 und 10

Zur vollständigen Aufklärung der Struktur wurden ein- und zweidimensionale Spektren in CD₃OD aufgenommen (s. Abb. 2.123 bis 2.134, S.200 bis 213 und Tab. 2.14, S.196). Auf den ersten Blick wirken die Spektren so, als ob sie zu einer einheitlichen Verbindung gehören würden. Insbesondere das ¹³C NMR Spektrum (s. Abb. 2.127, S. 207), lässt bei oberflächlicher Betrachtung diesen Schluss zu.

Im Kohlenstoffspektrum finden sich erwartungsgemäß die Signale für 21 Kohlenstoffe, von denen insgesamt elf aufgrund der C-H-Korrelation im HSQC als Signale von Methinkohlenstoffen erkannt wurden. Nur ein Signal bei $\delta_C = 44.22$ ppm repräsentiert einen Methylenkohlenstoff, dessen zugehörige Protonen bei $\delta_H = 2.76$ und 3.13 ppm in Protonenspektrum (s. Abb. 2.123) auftreten. Beide Protonen zeigen neben der geminalen Kopplung eine vicinale Kopplung mit dem Proton bei $\delta_H = 5.4$ ppm, das am nächsten Kohlenstoff gebunden ist ($\delta_C = 80.71$ ppm). Aufgrund der Lage der Signale im ¹H- und ¹³C-NMR Spektrum sollte es sich um die beiden protonierten Kohlenstoffe C-2 und C-3 des C-Rings eines Flavan-4-ons handeln (Esatbeyoglu et al, 2017).

Der zugehörige Ketonkohlenstoff tritt bei $\delta_C = 198.56$ ppm im ¹³C-NMR auf und zeigt eine starke ²J-Kopplung zu den Methylenprotonen an C-3 im heteronuklearen multiple-bond Korrelationsspektrum (HMBC, s. Abb. 2.132-134). Die Integration der Protonensignale ließe dabei den Schluss zu, dass es sich bei den Signalen von H-2, H-3A und H-3B jeweils um ein Protonensignal handeln kann. Anhand des Aufspaltungsmusters ist jedoch leicht zu erkennen, dass sich im Shiftbereich des H-2 bei ca. 5.3 ppm, zwei nebeneinander liegende Dubletts vom Dublett bei $\delta_H = 5.34$ und 5.33 ppm befinden (s. Abb. 2.124). Dies trifft auch für das H-3A zu. Auch dort befinden sich zwei Dubletts vom Dublett bei $\delta_H = 2.76$ und 2.75 ppm dicht nebeneinander. Bei der Integration dieser einzelnen Protonensignale stellt man fest, dass sich die Konzentration der beiden Verbindungen nur zu etwa 10 Prozent voneinander unterscheidet. Beim zweiten Signal der Protonen an C-2 unterscheiden sich die beiden Verbindungen nicht so stark, die Signale treten hier etwas überlagert auf, sind aber dennoch gut zu unterscheiden. Das Signal zeigt insgesamt sieben Peaks, die von den beiden sich überlagernden Dubletts vom Dublett der H-3B der beiden Verbindungen stammen. Nach Analyse der Kopplungskonstanten konnte das Aufspaltungsmuster in diesem Bereich aufgeklärt werden (s. Abb. 2.123).

Tabelle 2.14: NMR Daten der Verbindung **9** und **10** (a und b) (600 MHz in CD₃OD; δ in ppm, (J in Hz)

	¹ H NMR		Literatur (Esatbeyoglu et al, 2017)	¹³ C NMR		Literatur (Esatbeyoglu et al, 2017)
	a	b		a	b	
2	5.34 (12.6 u. 3.2)	5.33 dd (12.8 u. 3.0)	5.36 dd (12.8 u. 2.9)	80.71	80.65	80.7
3 A	2.76 dd (17.1 u. 3.1)	2.75 dd (17.2 u. 3.0)	2.79 dd (17.2 u. 3.0)	44.22	44.18	44.2
3 B	3.13 dd (17.1 u. 12.8)	3.12 dd (17.1 u. 12.7)	3.16 dd (17.2 u. 12.8)			
4	-	-	-	198.56	198.53	198.6
5	-	-	-	164.60	164.57	164.9
6	6.18 d (2.1)	6.18 d (2.1)	6.23 s	96.97	96.94	97.0
7	-	-	-	166.90	166.84	167.0
8	6.22 d (2.2)	6.22 (2.2)	6.27 s	98.00	97.99	98.1
9	-	-	-	164.94	164.90	164.6
10	-	-	-	105.02	105.01	105.0
1^c	-	-	-	131.57	131.55	131.6
2^c	6.93 s (br.)	6.93 s (br.)	6.97 s (br.)	114.76	114.71	114.8
3^c	-	-	-	146.53	146.53	147.0
4^c	-	-	-	146.97	146.94	146.5
5^c	6.788 m	6.788 m	6.83 s (br.)	116.25	116.25	119.3
6^c	6.793 dd (5.8 u. 1.9)	6.793 dd (5.8 u. 1.9)	6.86 s (br.)	119.30	119.26	116.3
1^d	5.04 d (6.8)	5.03 (6.8)	5.05 d (6.7)	101.11	101.07	101.1
2^d	3.49 m	3.49 m	3.52 m	74.40	74.40	74.4
3^d	3.50 m	3.50 m	3.52 m	77.40	77.40	77.5
4^d	3.56 d (8.8)	3.56 t (8.8)	3.84 m	73.19	73.19	73.4
5^d	3.90 d (9.6)	3.90 d (9.6)	n.d.	76.65	76.65	77.5
6^d	-	-	-	170.67	170.67	n.d

In den anderen Bereichen des Spektrums sind derartig getrennte Signale nicht zu erkennen, weshalb man davon ausgehen kann, dass es sich bei **9** und **10** um C-2-epimere Flavanone handelt, deren B-Ring an C-2 α - bzw. β -ständig ist. Wenn man jedes einzelne Signal des ^{13}C -NMR spreizt, dann erhält man für 13 der 21 Kohlenstoffsignale dicht nebeneinanderliegende Pärchen, was das Vorhandensein zweier isomerer Verbindungen bestätigt (s. Abb. 2.128 und 2.129, S. 208 u. 209 und Tabelle 2.14, S.196). Die Signale sind entsprechend den Positionen durchnummeriert und jeweils mit „a“ und „b“ gekennzeichnet.

Ausgehend von den Protonen- und Kohlenstoffsignalen von C-2 und C-3 des C-Rings gelang die Zuordnung der Protonen und Kohlenstoffe des B-Rings über das HMBC-, HSQC- und das COSY-Spektrum (s. Abb. 2.130 – 2.134, S.210 – S. 213). Das C-2 ($\delta_{\text{C}} = 80.71$ (a) bzw. 80.65 (b)) zeigt eine Korrelation zu den Protonensignalen bei ca. $\delta_{\text{H}} = 6.9$ und 6.8 ppm. Die Integrale dieser Signale zeigen, dass das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 6.93$ zwei und das Signal bei 6.8 ppm vier Protonen repräsentiert. Aufgrund der Lage im Spektrum muss es sich hierbei um die sechs B-Ring-Protonen der beiden Verbindungen handeln. Wie bereits zuvor bei den Flavonoiden Hispidulin und Eupafolin ausgeführt, treten bei Flavonoiden mit drei Protonen am B-Ring charakteristische ABX-Systeme auf, deren Protonen zu einem Dublett mit großer, ortho-Kopplung, einem Dublett mit kleiner, meta-Kopplung und einem Dublett vom Dublett aufspalten. Bei einem 3',4'-hydroxylierten B-Ring, wie bei Verbindung **7**, sind das die Protonen H-2' (Dublett, kleine Kopplung), H-5' (Dublett, große Kopplung) und H-6' (Dublett vom Dublett). Aufgrund der Tatsache, dass hier ein Gemisch von zwei isomeren Verbindungen **9** und **10** vorliegt, sind die Signale teilweise überlagert. Wie bei Verbindung **7** liegt auch hier das Signal von H-2' am weitesten im tiefen Feld ($\delta_{\text{H}} = 6.93$ ppm) und tritt nur als verbreitertes Singulett auf. Das Dublett vom Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 6.793$ ist von den Signalen der beiden Protonen an C-5' von **9** und **10** überlagert. Trotzdem konnten die Kopplungskonstanten in Höhe von 5.8 und 1.9 Hz ermittelt werden. Die Signale der zugehörigen Kohlenstoffe befinden sich nach Auswertung des HSQC-Spektrums bei $\delta_{\text{C}} = 114.76$ und 114.71 ppm (C-2' a+b), 116.25 ppm (C-5' a+b) und 119.30 und 119.26 ppm (C-6' a+b). Die Shiftwerte der übrigen drei quartären Kohlenstoffe des B-Ring konnten über das HMBC-Spektrum. Das C-1' bei $\delta_{\text{C}} = 131.57$ ppm zeigt long-range Korrelationen zu H-5' und H-6' und zu H-3B, die Kohlenstoffe C-3' und C-4' wurden über die Konnektivitäten zu H-2', H-5' und H-6' lokalisiert, wobei das C-4' Korrelationen zu allen drei B-Ring Protonen zeigt (s. Abb. 2.133).

Bei $\delta_H = 6.18$ und 6.22 ppm finden sich die Signale für je zwei weitere aromatische Protonen, bei denen es sich aufgrund der Lage im Spektrum und im Vergleich zu anderen Flavonoiden (Mabry, 1975) und die Protonen an C-6 und C-8 des A-Rings handelt. Auch wenn es sich um verbreiterte Singulett handelt, ist die Kopplung zwischen diesen Protonen im COSY-Spektrum zu erkennen. Die zugehörigen Kohlenstoffe befinden sich bei $\delta_C = 97.97$ und 96.94 (C-6 a+b) sowie 98.00 und 97.99 ppm (C-8 a+b). Beide Protonensignale zeigen im HMBC einen Crosspeak der $3J$ -Kopplung mit dem jeweils anderen Kohlenstoff (H-6 \Rightarrow C-8; H-8 \Rightarrow C-6). Aufgrund der long-range Korrelationen im HMBC-Spektrum lassen sich die übrigen Kohlenstoffsignale des A-Rings ausgehend von diesen Protonen ebenfalls lokalisieren (s. Abb. 2.132). Sowohl H-6 als auch H-8 zeigen eine Kopplung zu den Kohlenstoffpaaren bei $\delta_C = 105.0$ und 166.9 ppm. Letztere Signale liegen im Bereich aromatischer Kohlenstoffe mit einem Sauerstoffsubstituenten. Bei regulär substituierten Flavonoiden sind das beim A-Ring die Kohlenstoffe C-5, C-7 und C-9, die in diesem Frequenzbereich zur Resonanz kommen. Von diesen drei Möglichkeiten befindet sich nur das C-7 ($\delta_C = 166.9$ ppm) im long-range Kopplungsbereich beider Protonen (2J -Kopplung). Das andere Signalpaar ($\delta_C = 105.02$ und 105.01 ppm) ist daher dem C-10 zuzuordnen. Die beiden übrigen Kohlenstoffe, C-5 und C-9 lassen sich über die $2J$ -Kopplungen mit H-6 bzw. H-8 lokalisieren. Auch diese beiden Signale treten paarweise auf. Das C-5 findet sich bei $\delta_C = 164.60$ und 164.57 ppm und das C-9 bei $\delta_C = 164.94$ und 164.90 ppm. Da es keine Methoxysignale im Spektrum gibt, handelt es sich bei den hier isolierten Verbindungen **9** und **10** um die Derivate des 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-4H-chromen-4-ons, ein Flavanon, das unter dem Trivialnamen Eriodictyol bekannt ist. Im Gegensatz zu den Flavononen Hispidulin (**6**) und Eupafolin (**7**), besitzen Flavanone ein asymmetrisches C-Atom, sie sind also optisch aktiv.

Eriodictyol kommt daher in der 2(S)- und der 2(R)-Konfiguration vor. Die hier isolierten Verbindungen sind allerdings mit einem Zuckerderivat verbunden, dessen Protonensignale im Shiftbereich von 3.49 bis 5.04 ppm auftreten. Es handelt sich dabei um insgesamt 4 Signale, die bezogen auf beide Verbindungen (**9** und **10**) insgesamt 10 Protonen entsprechen. In besonders exponierter Lage befindet sich ein Signal mit Tripletthabitus, das den zwei Dubletts für die anomeren Protonen (H-1'') eines jeweils über den Aldehyd des Zuckermoleküls gebildeten Vollacetals zugeordnet werden kann (Bonner et al, 1975; Sadozai et al 1996). Das zugehörige Kohlenstoffpaar (C-1'') befindet sich im typischen Shiftbereich solcher Acetale bei $\delta_C = 101.11$ und 101.07 ppm.

Im COSY findet man ein Kreuzsignal zwischen diesen Protonen und einem Protonensignal bei ca. 3.5 ppm, das dem H-2“ zuzuordnen ist. Das Integral dieses Signals repräsentiert insgesamt 4 Protonen und zeigt im HSQC die Crosspeaks zu zwei Kohlenstoffsignalen bei $\delta_C = 74.40$ und 77.40 ppm. Über die Zentren dieser Kreuzsignale lässt sich erkennen, dass es sich um zwei sich überlagernde Protonensignale handelt ($\delta_H = 3.49$ und 3.50 ppm), wobei $\delta_H 3.49$ zu $\delta_C 74.40$ und $\delta_H 3.50$ zu $\delta_C 77.40$ ppm gehört.

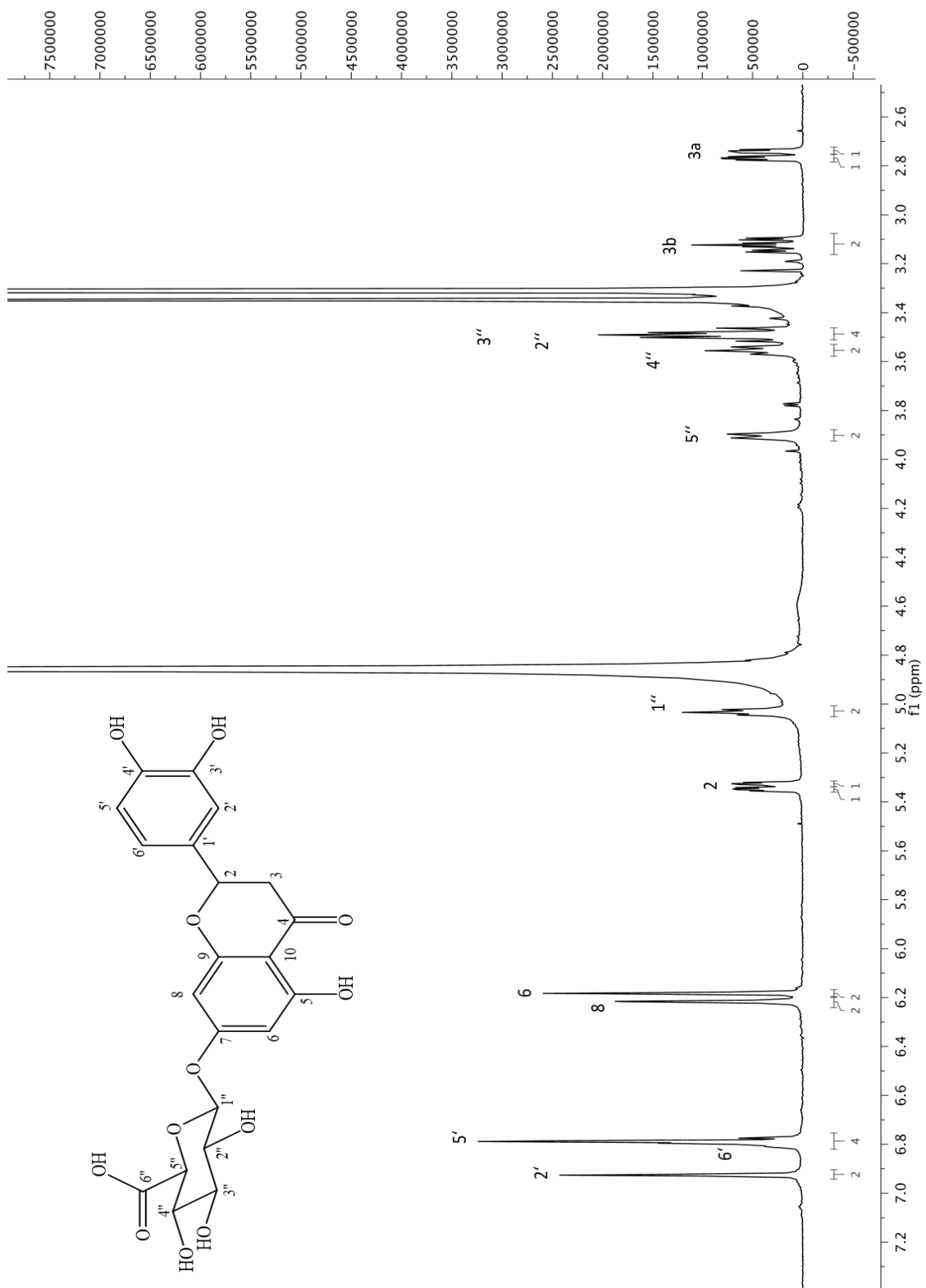


Abbildung 2.123: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung 9 und 10 (600 MHz in CD₃OD)

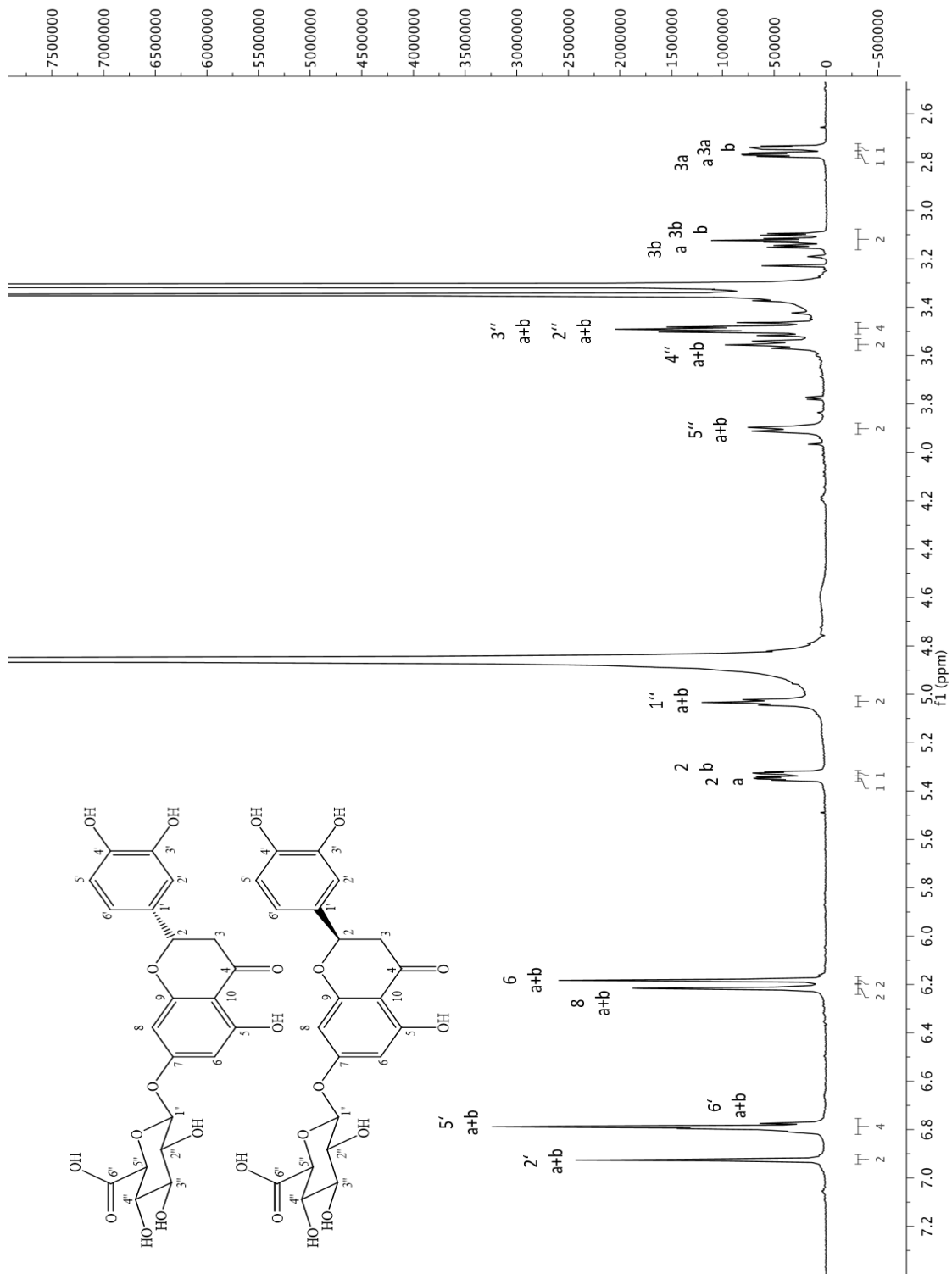


Abbildung 2.124: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung **9** und **10** (600 MHz in CD_3OD) mit Kennzeichnung der Signale für die Diastereomeren (a bzw. b)

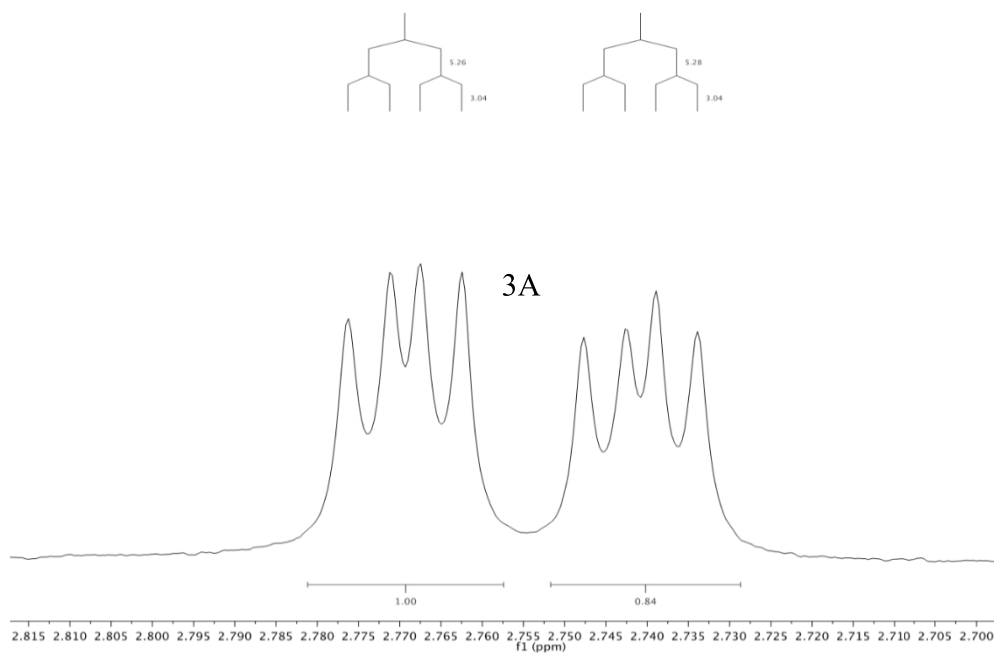
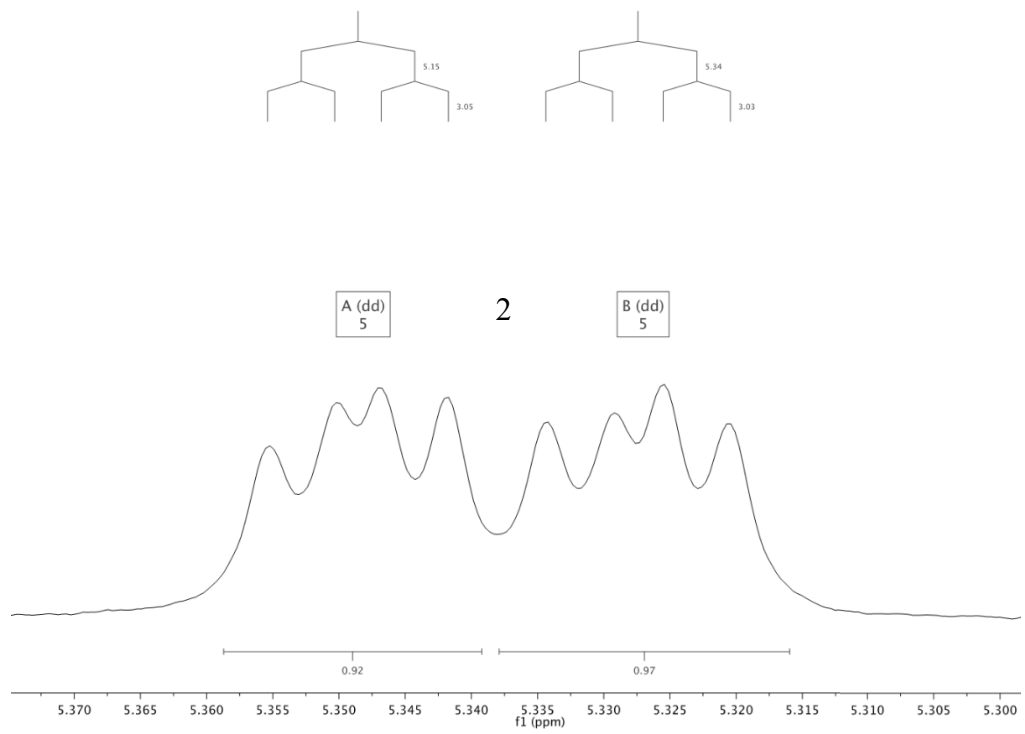


Abbildung 2.125: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR Spektrum von **9** und **10**

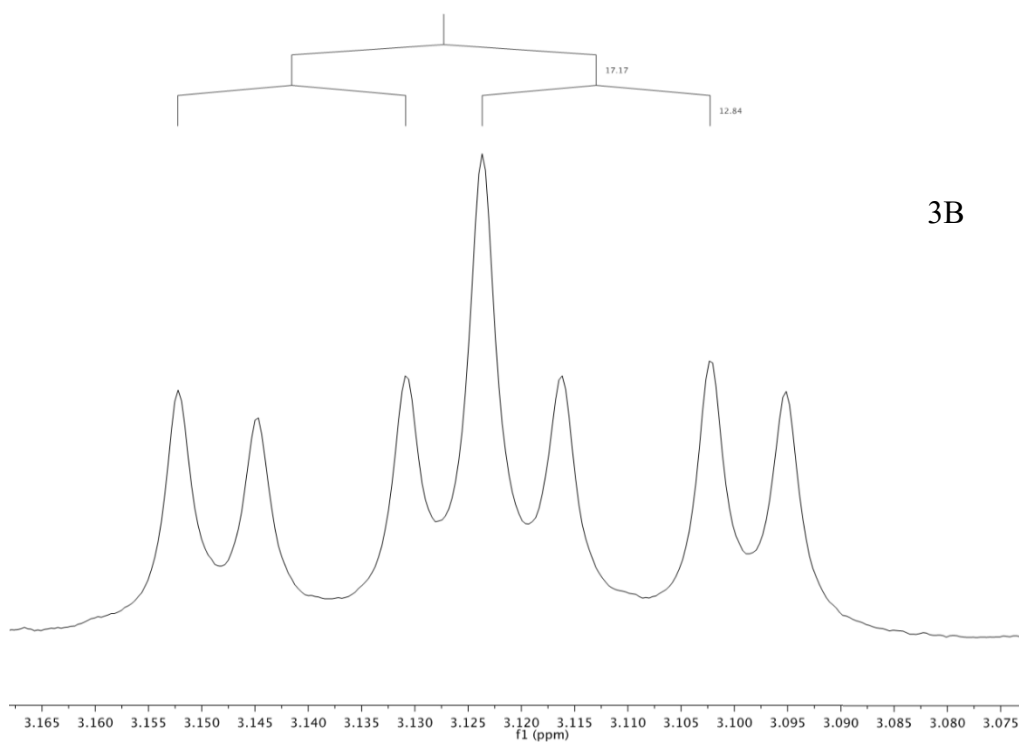
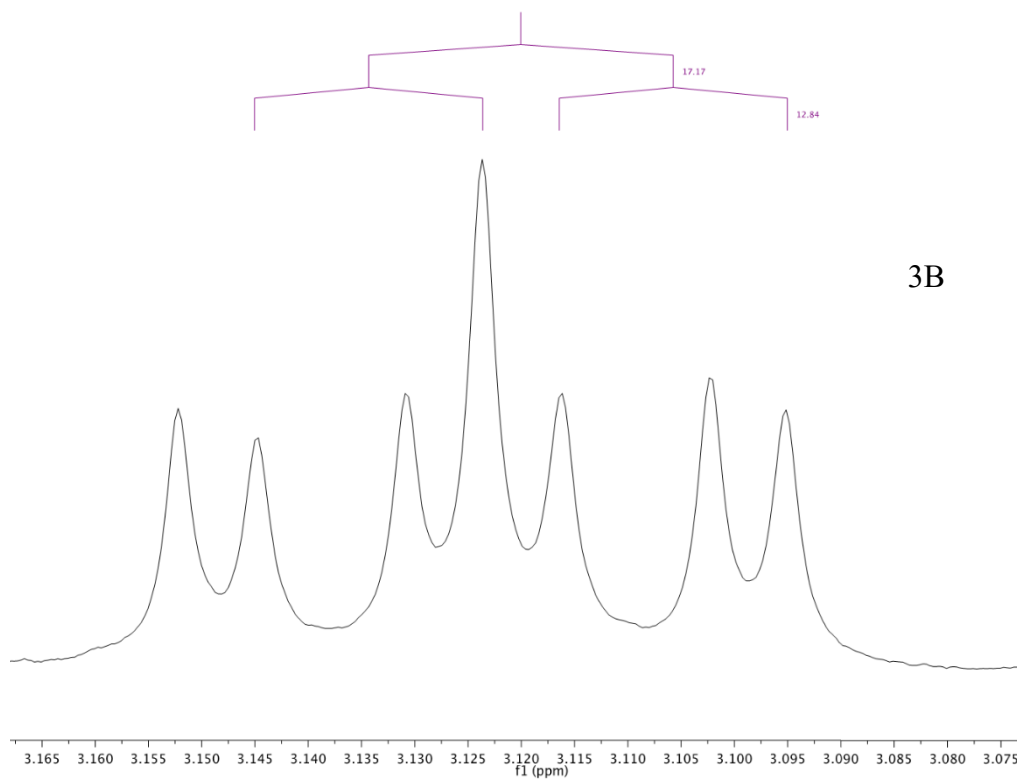


Abbildung 2.126: ^1H NMR-Signale von H-3 (3B von **9** oben, 3B von **10** unten)

Im HMBC (s. Abb. 2.132-2.134, S. 212-213) kann man aufgrund der Korrelationen zu den Kohlenstoffsignalen bei $\delta_C = 101.11$ (C-1'') und 79.65 ppm (C-5'') erkennen, dass es sich bei den Signalen bei δ_H 3.49 und δ_C 74.40 um das H-2'' bzw. C-2'' handelt und sich das Signal des H-3'' direkt daneben bei δ_H 3.50 ppm im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum befindet (δ_C 77.40). Ausgehend von H-3'' findet sich dann die Kopplung zu H-4'' (δ_H 3.56; δ_C 73.19), das wiederum mit dem H-5'' bei $\delta_H = 3.90$ koppelt ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Aufgrund der genauen Massenmessung, bei der eine Masse von $m/z = 465.1020$ und die Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ ermittelt wurde, lässt sich sagen, dass **9** und **10** jeweils eine Hexose gebunden haben müssen. Da es sich beim Aglykon um das Eriodictyol mit der Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ handelt, sollte der Zucker die Summenformel $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$ besitzen. Diese beiden Moleküle reagieren dann unter Wasserabspaltung zu den hier gefundenen Eriodictyolglykosiden. Somit sind fünf der sechs Kohlenstoffe des Glykosidteils der Verbindungen **9** und **10** nachgewiesen. Zum sechsten, noch fehlenden Kohlenstoffsignal findet sich leider keine Korrelation in den zweidimensionalen Spektren. Da bereits alle Protonensignale zugeordnet sind, muss es sich beim sechsten Kohlenstoff um ein quartäres C-Atom handeln.

Bei den bisher in der Natur gefundenen, an Flavonoide gebundenen Hexosen handelt es sich entweder um Zucker der D-Reihe, wobei besonders häufig Glucose und Galactose mit der Summenformel $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ gefunden wurden. Da der hier gebundene Zucker einen Sauerstoff mehr und 2 Protonen weniger als die Glucose oder Galactose besitzt, muss es sich um eine Zuckersäure handeln, deren an C-5 gebundene CH_2OH -Gruppe zur Carboxylgruppe aufoxidiert ist. Es muss sich daher entweder um die Glucuronsäure oder die Galacturonsäure handeln. Die beiden Zuckersäuren unterscheiden sich nur durch die OH-Gruppe am C-4, die bei der Glucose equatorial und bei der Galactose axial angeordnet ist. Der Vergleich mit anderen Galacturoniden und Glucuroniden, ergab, dass es sich bei **9** und **10** um Derivate der Glucuronsäure handelt (Kamiya, 2001). Dies steht im Einklang mit dem Aufspaltungsmuster der Signale von H-4'' und H-5'' die nicht überlagert sind. H-4'' spaltet zum Triplett auf und zeigt dabei zu den Protonen an C-3'' und C-5'' jeweils eine Kopplung in Höhe von 8.8 Hz. Dies bedeutet, dass H-4'' zu H-3'' und H-5'' trans-angeordnet sein sollte, was die equatoriale Anordnung der OH-Gruppe an C-4'' belegt. H-5'' besitzt mit H-4'' nur einen Kopplungspartner. Das noch fehlende Kohlenstoffsignal (C-6'') der Carboxylgruppe an C-5'' findet sich bei $\delta_C = 170.67$ ppm.

Tab. 2.15: NMR Daten von 2(S)- und 2(R)-Eriodictyol in CD₃OD (δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H NMR		¹³ C NMR	
	2-(S)	2-(R)	2-(S)	2-(R)
2	5.29 dd (12.9 u. 3.0)	5.17 dd (12.5 u. 3.0)	79.5	80.4
3ax 3eq	3.08 dd (17.1 u. 12.9) 2.71 dd (17.1 u. 3.0)	2.96 dd (17.0 u. 12.5) 2.61 dd (17.0 u. 3.0)	43.1	44.0
4	-	-	196.8	197.7
5	-	-	164.4	165.4
6	5.89 d (2.1)	5.79 d (2)	95.1	97.0
7		-	167.3	168.3
8	5.91 d (2.1)	5.80 d (2)	96.1	96.2
9		-	163.8	164.8
10		-	102.3	103.3
1'		-	130.8	131.7
2'	6.93 s	6.83 s (br.)	113.7	114.7
3'		-	145.9	146.4
4'		-	145.5	146.8
5'	6.80 d (1.2)	6.68-6.71 m	115.2	116.2
6'	6.80 d (1.2)	6.68-6.71 m	118.2	119.2

(Zhang et al, 2006; Junior et al, 2008)

Abschließend bleibt noch zu klären, an welcher der vier im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen die Glucuronsäure gebunden ist. Aufschluss darüber gibt die ³J-Kopplung des anomeren Protons H-1'', das über den Sauerstoff mit dem die OH-Gruppe tragenden Kohlenstoff im HMBC-Spektrum koppelt.

Das Signal von H-1“ bei $\delta_H = 5.03$ bzw. 5.04 zeigt dabei ein Kreuzsignal mit dem Kohlenstoffpaar bei $\delta_C = 166.84$ bzw. 166.90 ppm (s. Abb. 2.132 - 2.134). Diese beiden Kohlenstoffsignalen gehören zu den Kohlenstoffen C-7 von **9** und **10**, bei denen es sich demnach um die 7-O-glucuronide des 2(S)- und 2(R)- Eriodictyols handelt. Bei 2(S)- und 2(R)- Eriodictyol handelt es sich um Enantiomere mit einem asymmetrischen C-Atom C-2. Diese beiden Verbindungen sind bereits aus mehreren Pflanzen isoliert worden. In Tab 2.15 (siehe S. 206) sind die in CD₃OD aufgenommenen NMR-Daten der in zwei neueren Publikationen veröffentlichten Daten aufgeführt. Die Messfrequenzen und auch die Geräte waren dabei unterschiedlich (Zhang et al, 2006; Junior et al, 2008, S. Tab. 2.15, S. 205). Grundsätzlich dürften sich Enantiomere im NMR nicht unterscheiden, die Daten weichen dennoch ein klein wenig voneinander ab, möglicherweise bedingt durch die unterschiedlichen Bedingungen. Bei den beiden Eriodictyol 7-O-glucuroniden handelt es sich nicht um Enantiomere, sondern um Diastereomere, die sich in Bezug auf die asymmetrischen C-Atome C-2, C-1“, C-2“, C-3“, C-4“ und C-5“ nur an der Position C-2 unterscheiden. Die Konfiguration am Zucker ist bei beiden Verbindungen jeweils gleich, weshalb auch die NMR-Daten der Protonen und Kohlenstoffe bis auf C-1“/H-1“ in diesem Bereich gleich sind. Die übrigen NMR-Daten unterscheiden sich demnach. Ein solches Diastereomeregemisch wurde auch aus dem Farn *Davallia mariesii* isoliert (Cui et al, 1990). Die Autoren beschreiben, dass sie die viele Protonen und Kohlenstoffe als Doppellinien gefunden haben, so wie auch bei uns in den Abbildungen zu sehen. Auch damals war die Trennung der beiden Diastereomeren nicht erfolgreich. Auch in der Arbeitsgruppe von Brigitte Kopp in Wien (Ringl et al., 2007) wurde ein untrennbares Diastereomeregemisch des 2(S)- und 2(R)-Eriodictyol 7-O-glucuronid isoliert. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den Kohlenstoff- und Protonensignalen, ließ sich dort, genauso wie bei uns, keine Zuordnung der Signale zu dem einen oder anderen Diastereomer treffen. Eryodictyol 7-glucuronid wurde erstmals von Bohm und Gottlieb aus der Gattung *Stephanomeria* (Asteraceae) beschrieben, die ersten NMR-Daten stammen von Cui et. al (1990).

In den Gattungen *Volutaria* und *Amberboa* wurden **9** und **10** bisher noch gefunden, es ist der erste Fund eines Flavanons in *Volutaria boranensis*. Innerhalb der Gattung *Centaurea* gibt es einen Fund in *Centaurea urvillei* (Guelcernal et al., 2010).

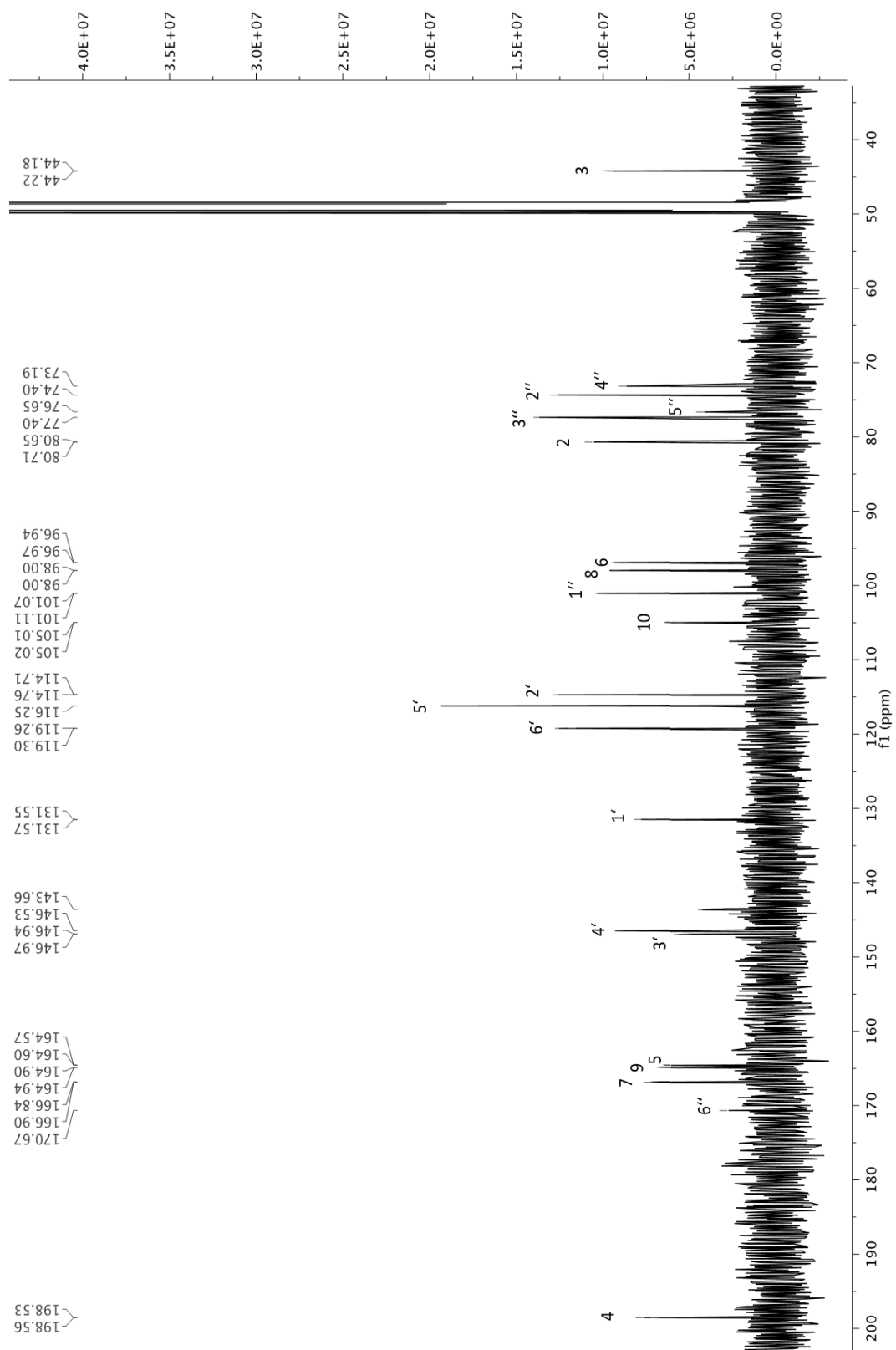


Abbildung 2.127: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **9** und **10** (150 MHz in CD_3OD)

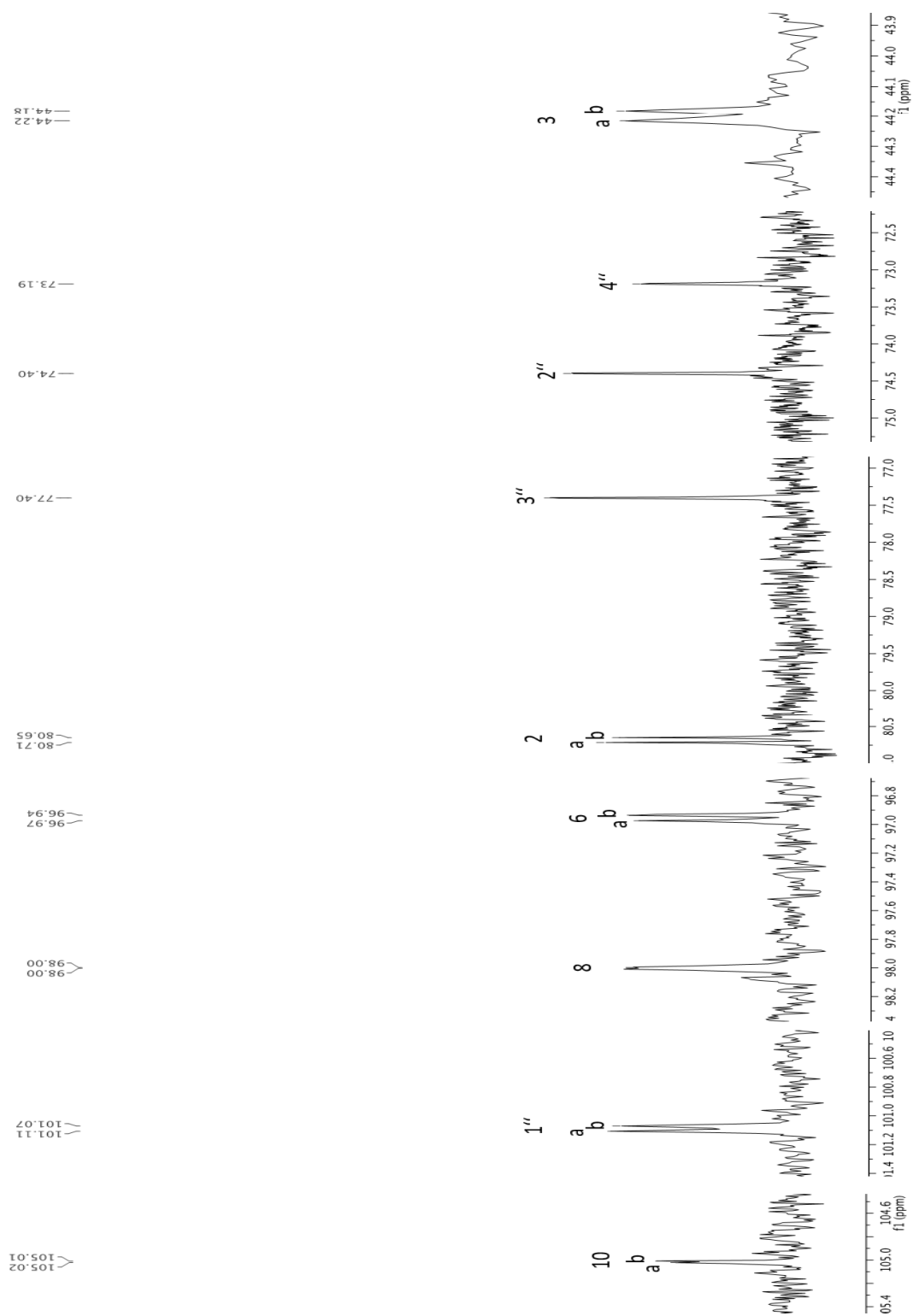


Abbildung 2.128: Signale des ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **9** und **10** (150 MHz in CD_3OD) gespreizt

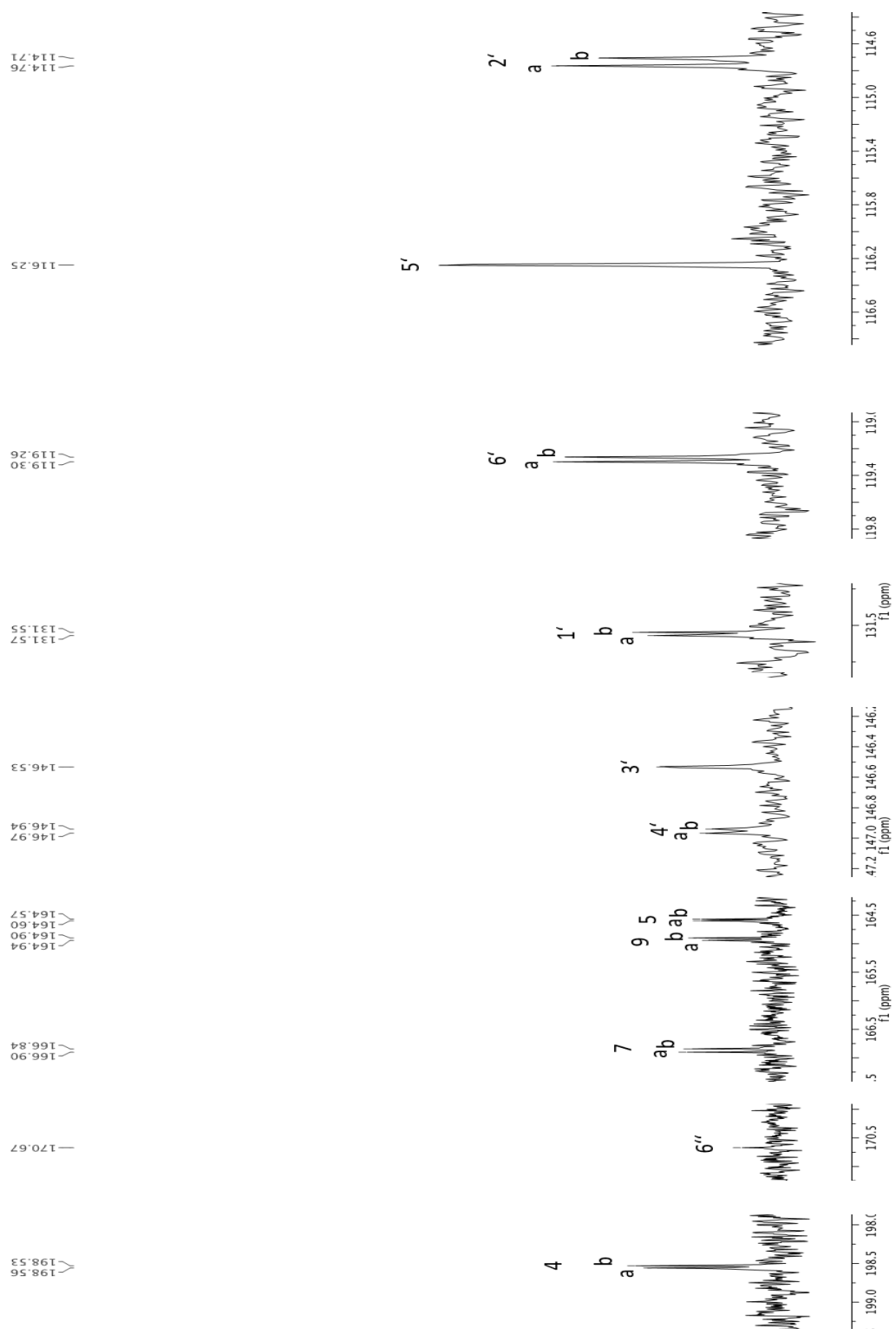


Abbildung 2.129: Signale des ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **9** und **10** (150 MHz in CD_3OD) - gespreizt

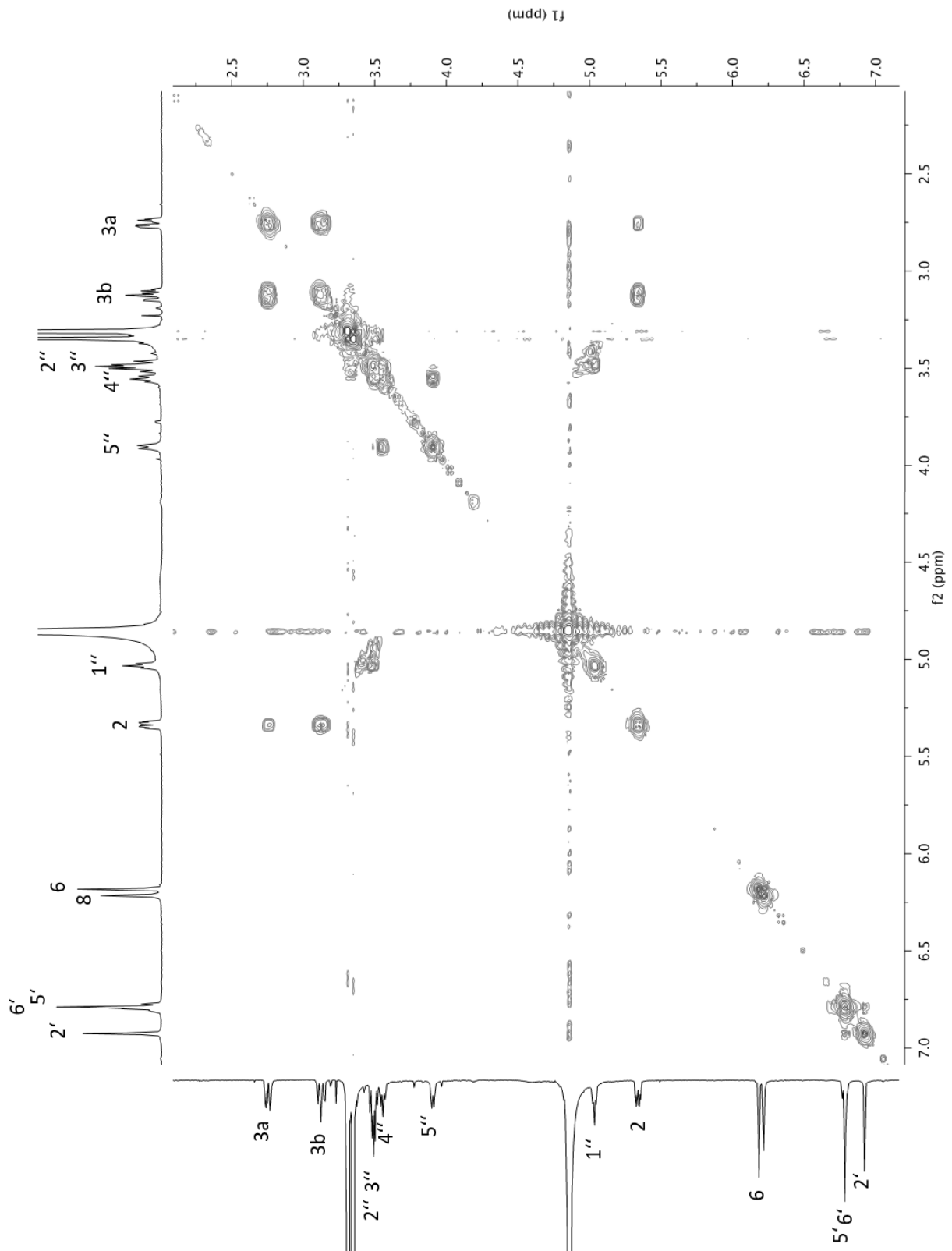


Abbildung 2.130: 2D-COSY-Spektrum von **9** und **10** (600 MHz in CD₃OD)

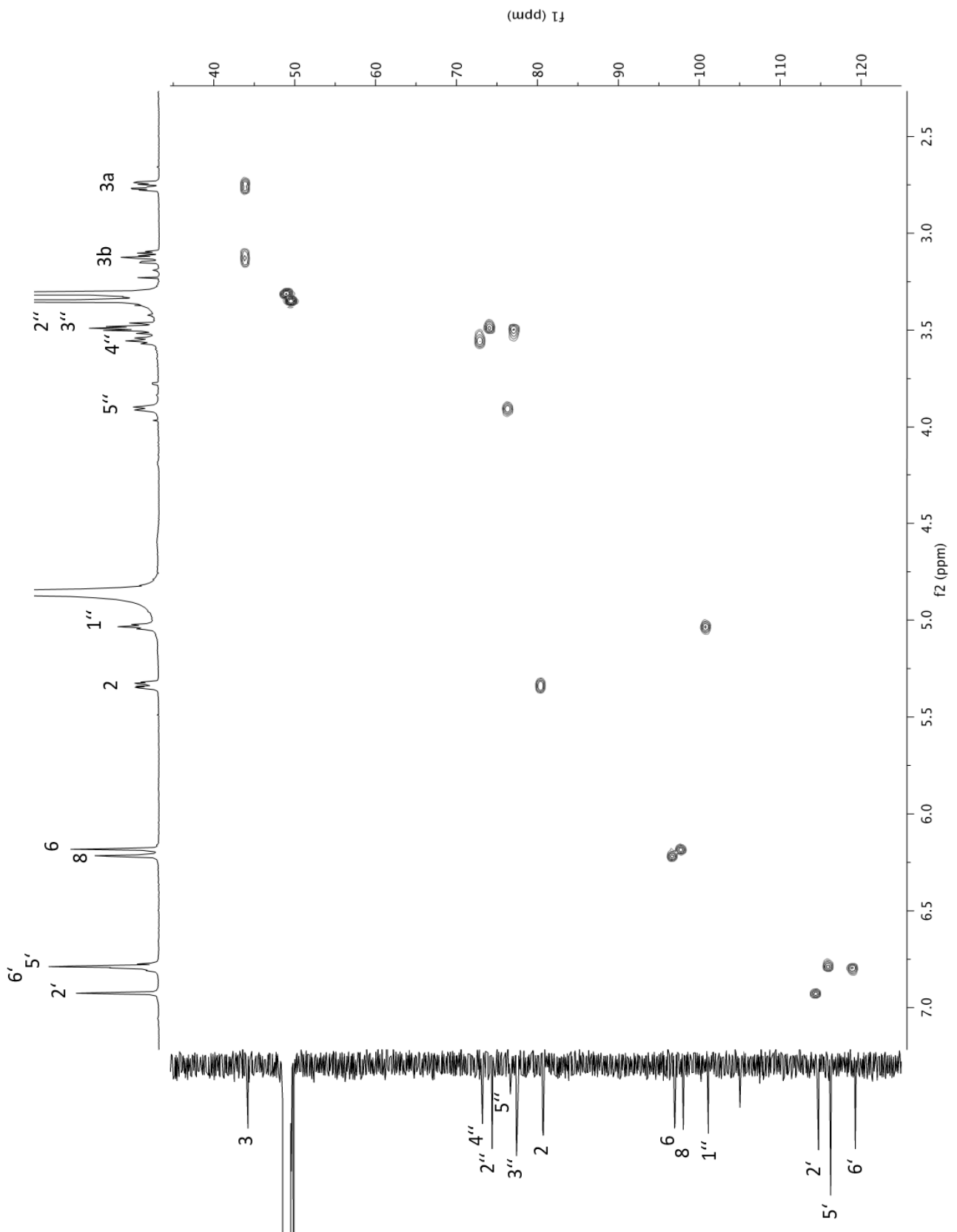


Abbildung 2.131: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 9 und 10 (600 MHz in CD_3OD)

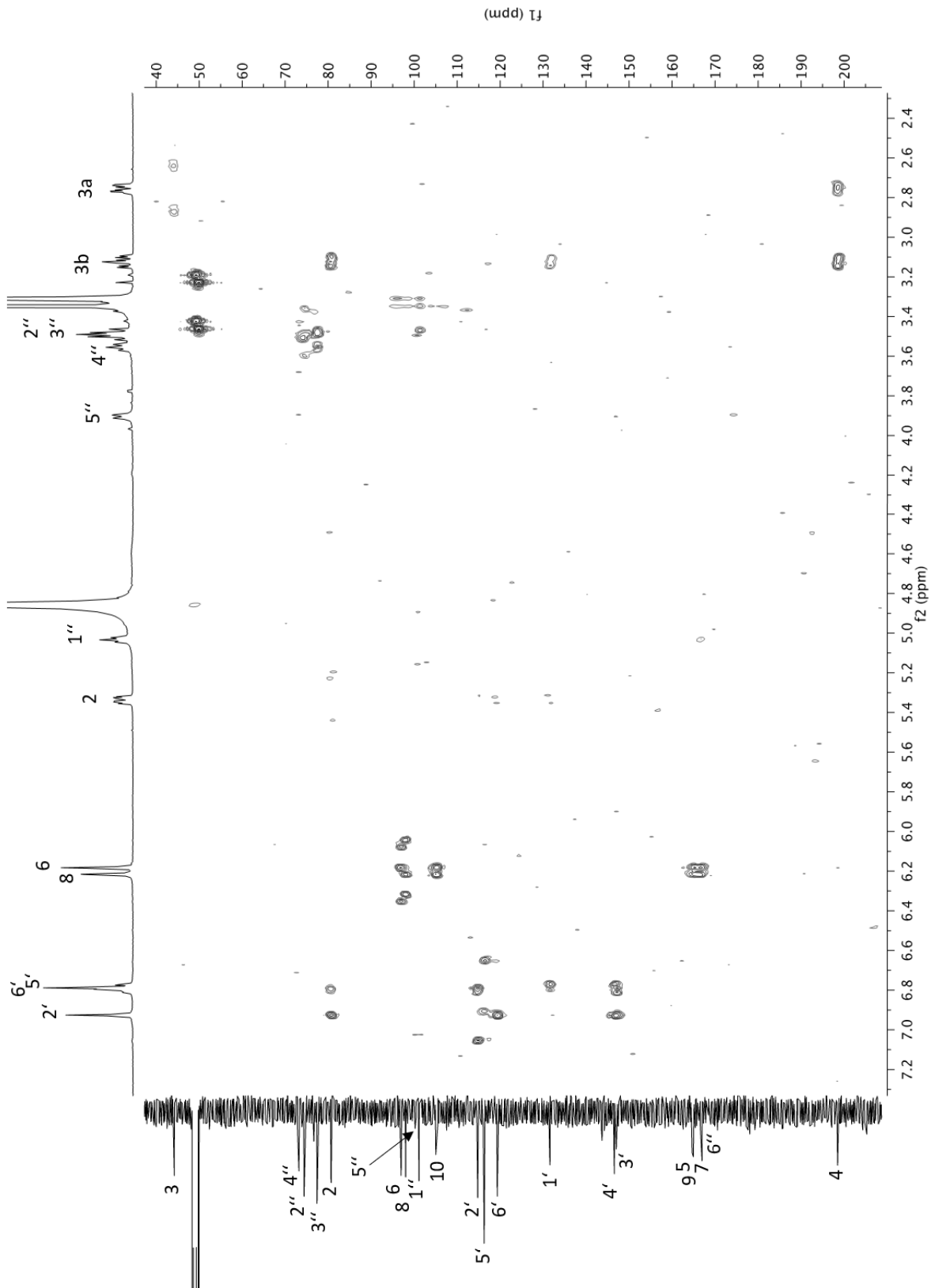


Abbildung 2.132: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **9** und **10** (600 MHz in CD₃OD)

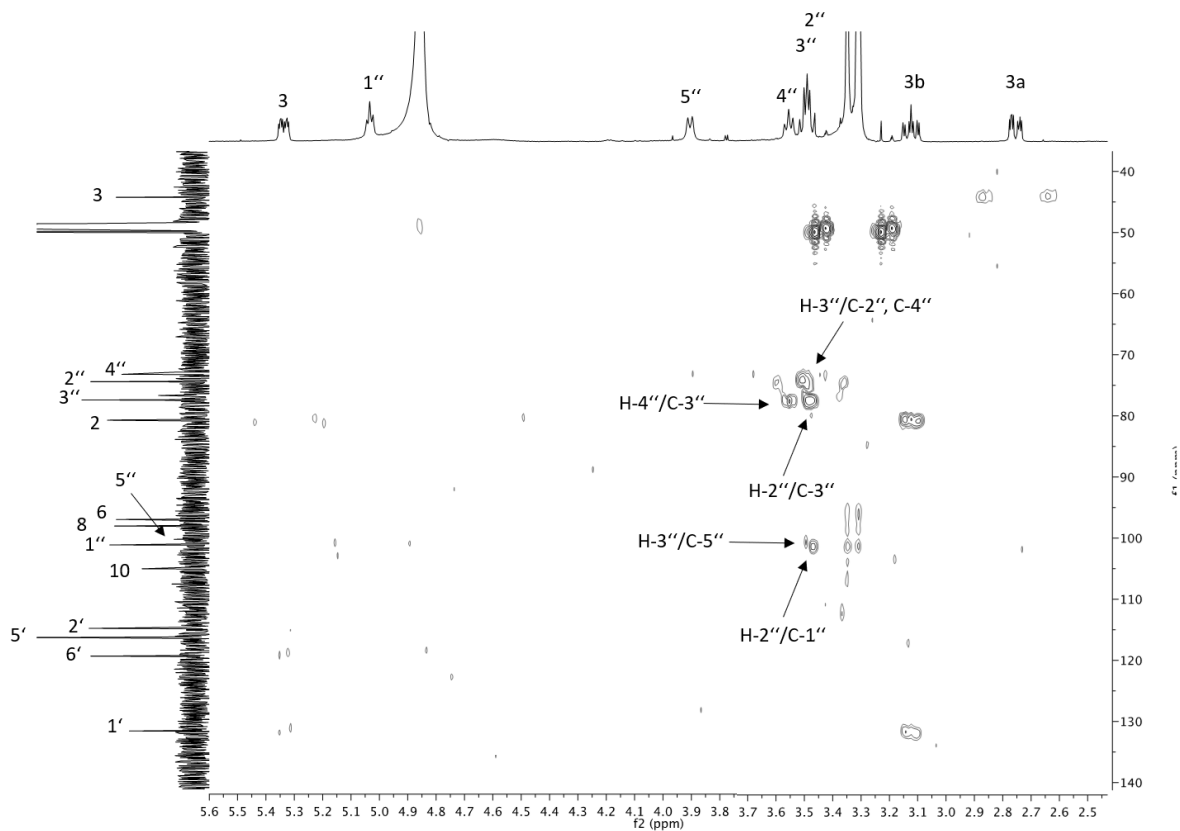


Abbildung 2.133: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **9** und **10** (600 MHz in CD₃OD)

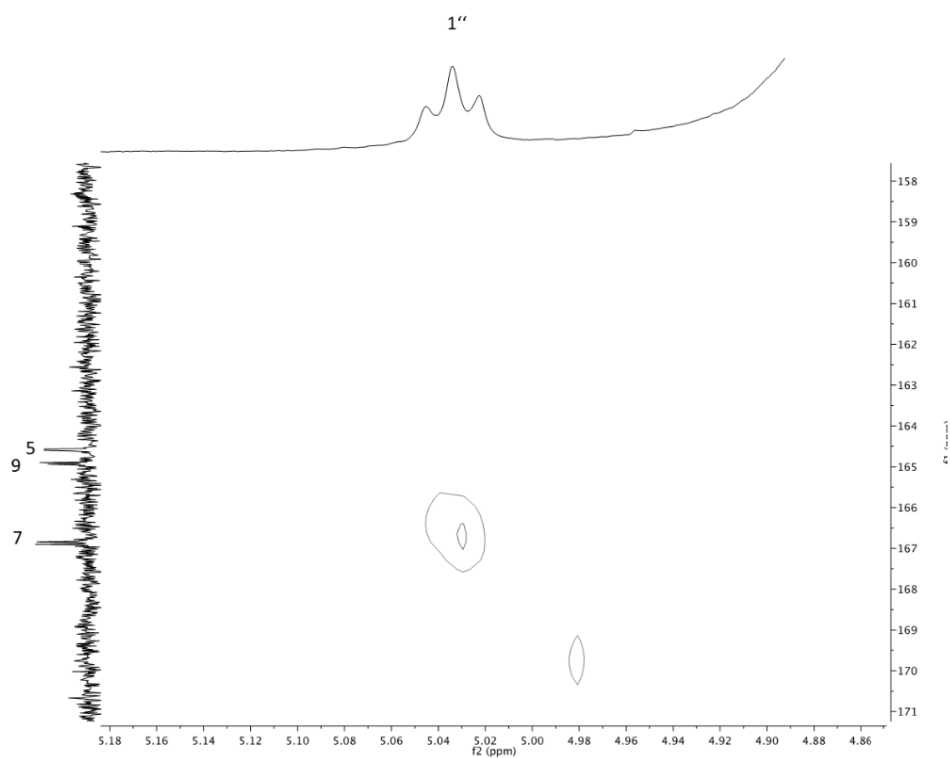
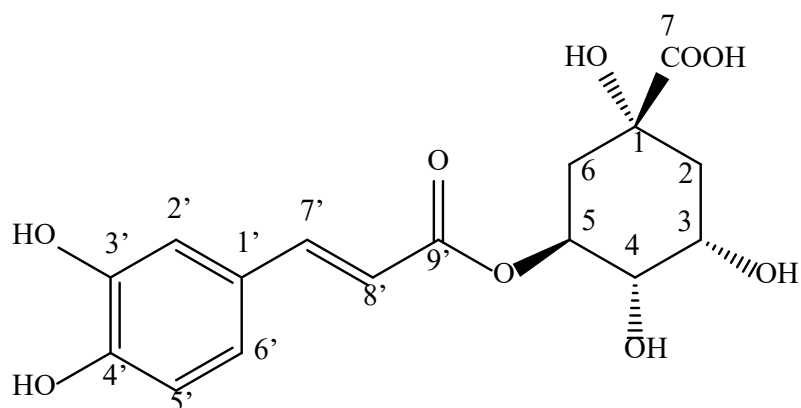


Abbildung 2.134: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **9** und **10** (600 MHz in CD₃OD)

2.2.9. Verbindung 11 (Chlorogensäure)



Verbindung **11** fiel bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung verschiedener Fraktionen aufgrund ihrer hellblauen Fluoreszenz auf. Bereits im Studium wurde eine solch auffällige Substanzzone in vielen Pflanzenextrakten beobachtet. Sehr wahrscheinlich sollte es sich demnach auch in den Extrakten von *Volutaria lippii* um die relativ ubiquitär vorkommende, so genannte Chlorogensäure oder eine sehr ähnliche Verbindung handeln. Die Reindarstellung gelang mit Hilfe der semipräparativen HPLC (s. Experimenteller Teil, Kap.5.2.5) aus Fraktion 6 des Methanolextraktes in einer Ausbeute von 5,27 mg (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.4).

Im UV zeigte **11** Maxima bei $\lambda = 239$ und 325nm , ihr HRESI-Massenspektrum weist einen Molekülpeak bei $m/z = 355,1020$ auf (s. Abb. 2.135)

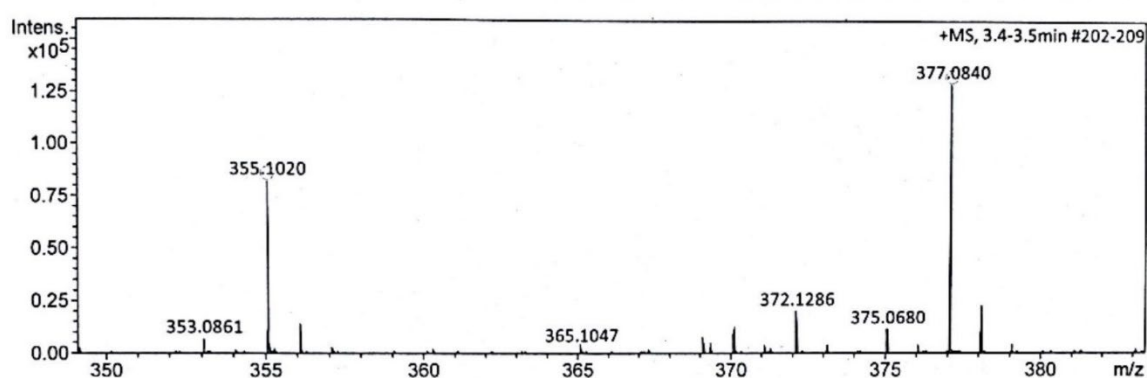
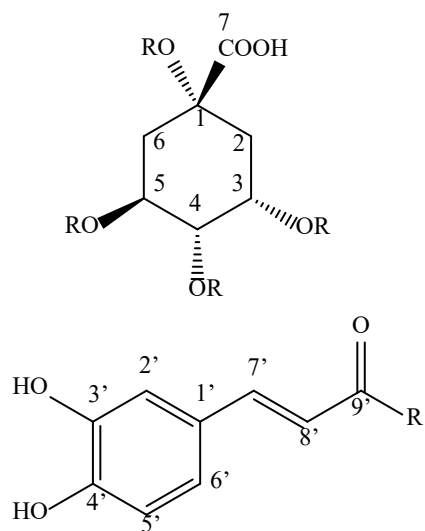


Abbildung 2.135: HRESI-Massenspektrum von **11**

Tabelle 2.16: ^1H -NMR Daten der Verbindung **11** (600 MHz in CD_3OD ; δ in ppm, (J in Hz)) im Vergleich zu den vier möglichen Caffeylchinasäureestern



	^1H				
	11	1-OR ^a	3-OR ^b	4-OR ^b	5-OR ^b
1	-	-	-	-	-
2a	2.04 m	1.96 dd (13.3;9.9)	2.04 m	2.04 m	2.04 m
2b	2.17 m	2.45 d (br.) (13)	2.17 m	2.17 m	2.17 m
3	4.17 s (br.)	4.17 dd (4.2;3.3)	5.33 td (10.0;4.8)	4.29 q (br.) (3.8)	4.09 td (10;4.8)
4	3.72 dd (9.3;3.0)	3.52 (8.2,3.1)	3.80 dd (9.9;3.2)	4.89 dd (8.4;3.0)	3.75 dd (9.9;3.2)
5	5.35 s (br.)	4.09 ddd (10;8;4.2)	4.21 q (br.) (3.1)	4.21 q (br.) (3.1)	5.33 td (10;4.8)
6a	2.04 m	2.20 dd (14.8;3.0)	2.04 m	2.04 m	2.04 m
6b	2.17 m	2.57 dd (br.) (14.8;3.1)	2.17 m	2.17 m	2.17 m
7	-	-	-	-	-
1'	-	-	-	-	-
2'	7.04 d (br.) (2.1)	7.05 d (1.7)	7.15 d (2.1)	7.17 d (2.0)	7.14 d (2.0)
3'	-	-	-	-	-
4'	-	-	-	-	-
5'	6.77 d (8.1)	6.79 d (8.1)	6.87 d (8.4)	6.87 d (8.4)	6.89 d (8.4)
6'	6.95 dd (8.3;2.1)	6.96 dd (8.1;1.7)	7.05 dd (8.4,2.0)	7.08 dd (8.4;2.0)	7.05 ddd (8.4;2.0)
7'	7.56 d (15.9)	7.56 d (15.9)	7.60 d (15.9)	7.66 d (15.9)	7.60 d (15.9)
8'	6.27 d (15.9)	6.28 d (15.9)	6.36 d (15.9)	6.44 d (15.9)	6.41 d (15.9)
9'	-	-	-	-	-

^a Sefkow et al (2001), ^b Choi et al (2006)

Zur endgültigen Aufklärung der Struktur wurden ein- und zweidimensionale NMR-Spektren in deuteriertem Methanol aufgenommen (s. Abb. 2.136 – 2.141, S. 218-223)). Das ^1H NMR zeigt die Signale für insgesamt zwölf Protonen, von denen fünf im Bereich aromatischer Protonen, bzw. olefinischer Protonen zur Resonanz kommen. Über die Auswertung der Kreuzsignale im H,H-COSY-Spektrum, können die drei Signale bei $\delta = 7.04$ (Dublett, $J = 2.1$ Hz), 6.95 (Dublett vom Dublett, $J = 8.3$ und 2.1 Hz) und 6.77 (Dublett, $J = 8.1$ Hz) als typisches ABX-System eines 1,3,4-trisubstituierten Aromaten erkannt werden (Morrison et al, 1978). Die beiden anderen Tieffeldsignale treten bei $\delta = 7.56$ und 6.27 als Dubletts mit einer Kopplungskonstanten in Höhe von 15.9 Hz auf und sollten zu Protonen an einer trans-konfigurierten Doppelbindung zugeordnet werden. Aufgrund der Lage der Protonen- und Kohlenstoffsignale, die über das HSQC-Spektrum zugeordnet werden konnten (s. Abb. 2.139 und 2.140, S.221-222 und Tab. 2.16, S. 215), der Größe der Kopplungen und der im HMBC-Spektrum auftretenden Cross-Peaks zwischen den Doppelbindungsprotonen und dem C-1' des aromatischen Ringsystems und dem Quartären Carbonylkohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 168.85$ ppm (C-9'), konnten alle Protonen und Kohlenstoffe in diesem Bereich einem Zimtsäureester zugeordnet werden. Über die Korrelation der aromatischen Protonen H-2', H-6' und H-5' ($\delta_{\text{H}} = 7.04, 6.95$ und 6.77 ppm) ließen sich die beiden, die ortho-Dihydroxygruppen tragenden C-Atome C-3' und C-4' bei $\delta_{\text{C}} = 146.80$ und 149.56 ppm erkennen. Es handelt sich demnach erwartungsgemäß um eine Kaffeesäure, die bei der vermuteten Struktur der Chlorogensäure an die Chinasäure gebunden sein muss. Bei der Chinasäure, die erstmals aus der Chinarinde isoliert worden ist, handelt es sich um die $1\alpha,3\alpha,4\alpha,5\beta$ -Tetrahydroxycyclohexancarbonsäure. Der substituierte Cyclohexanring wird von einem quartären Kohlenstoff (C-1), der die Carboxylgruppe (C-7) und eine Hydroxylgruppe trägt, zwei Methylen- (C-2 und C-6) und drei hydroxylierten Methinkohlenstoffen (C-3, C-4 und C-5) gebildet. Die Signale der Protonen der sekundären Alkohole finden sich im entsprechenden Shiftbereich bei $\delta_{\text{H}} = 5.35, 4.17$ und 3.72 ppm. Die beiden Tieffeldsignale treten beide als breite Singuletts auf, sie zeigen aber beide Kopplungen zum Protonensignal bei $\delta_{\text{C}} = 3.72$ ppm, das als Dublett vom Dublett mit den Kopplungskonstanten $J = 9.3$ und 3.0 Hz auftritt. Bei diesem Proton muss es sich um das hydroxylierte H-4 der Chinasäure handeln, das mit H-3 und H-5 koppelt. Sowohl H-3 als auch H-5 zeigen Kopplungen zu zwei Multiplettsignalen im hohen Feld bei $\delta = 2.04$ und 2.17, die je von einem der Protonen an C-2 und C-6 gebildet werden.

Die zugehörigen Kohlenstoffe wurden über die Korrelationen im HSQC und HMBC zugeordnet. Der Kohlenstoff der Carboxylgruppe findet sich bei $\delta_C = 178.48$ ppm im ^{13}C NMR-Spektrum. Problematisch ist die Zuordnung des Kohlenstoff C-1, zu dem es leider keine Korrelation gibt.

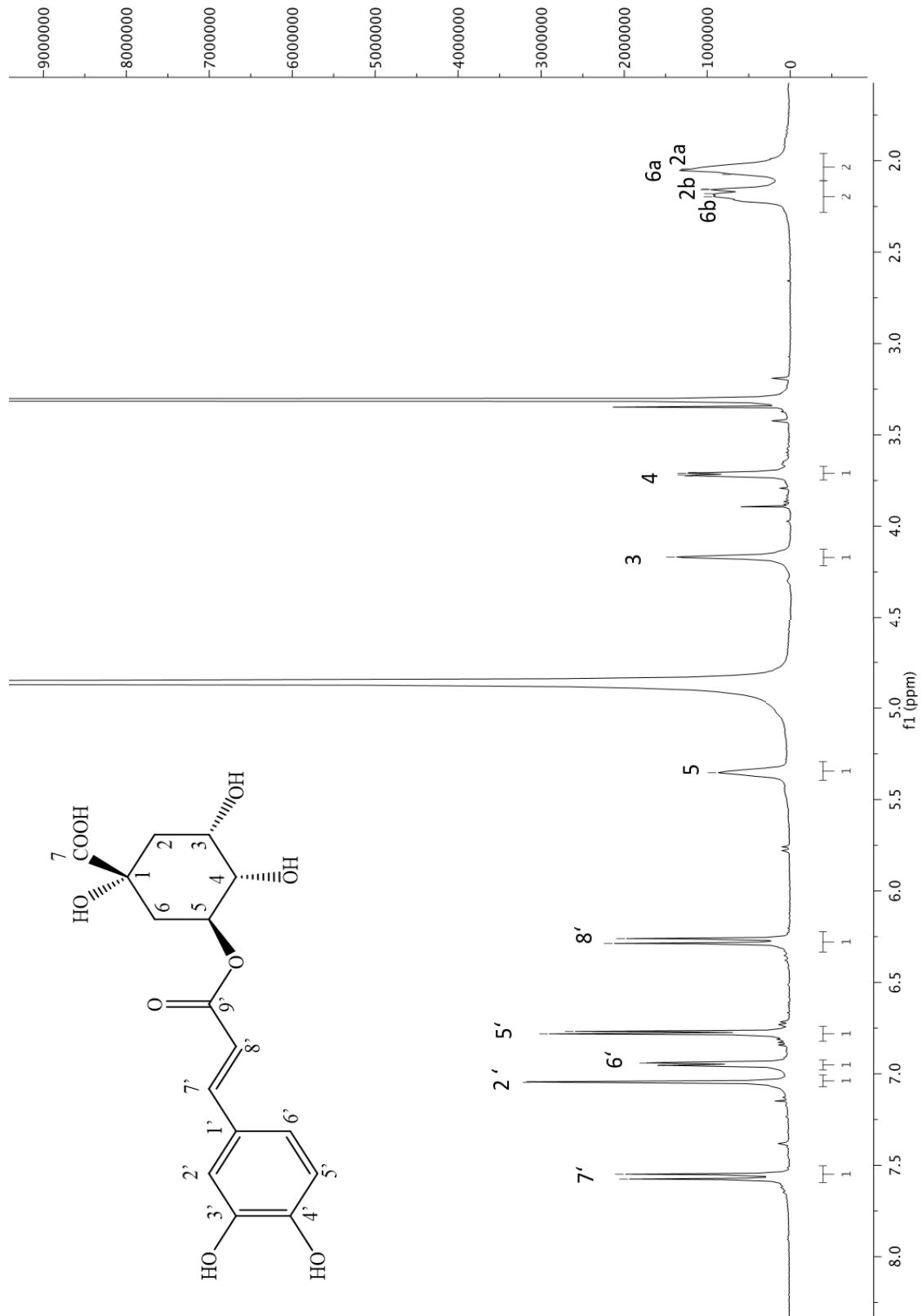


Abbildung 2.136: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung 11 (600 MHz in CD₃OD)

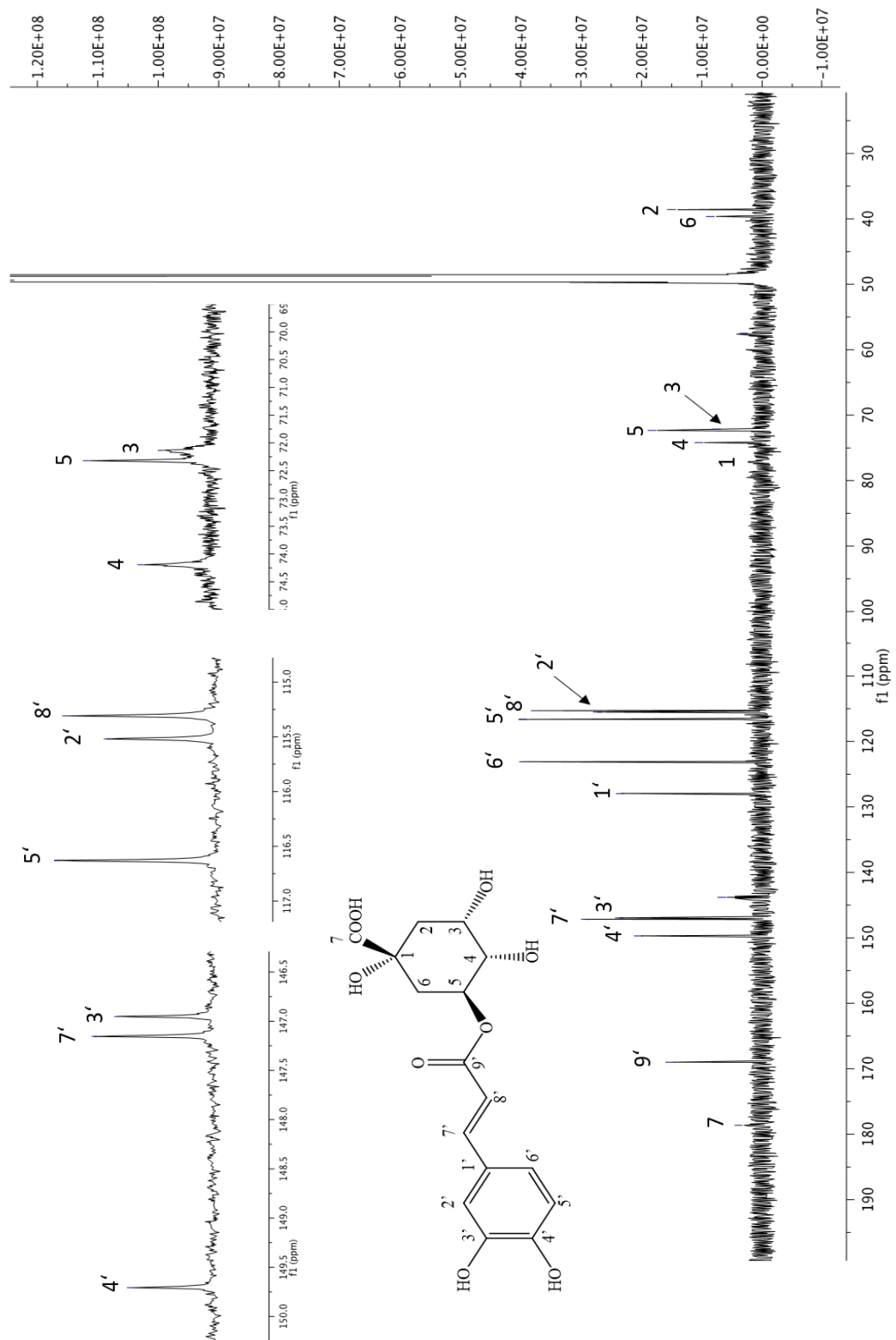


Abbildung 2.137: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 11 (150 MHz in CD_3OD)

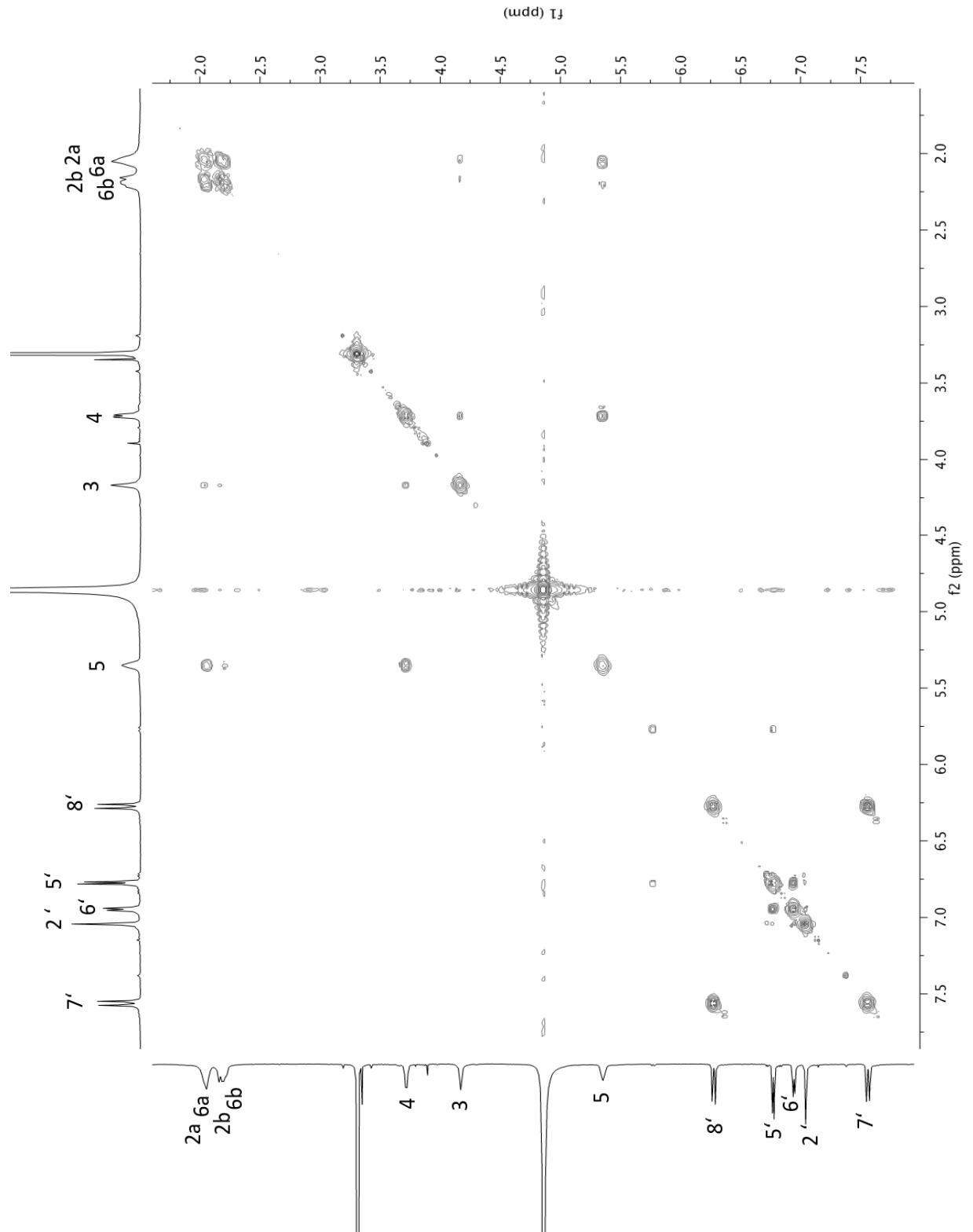


Abbildung 2.138: 2D-COSY-Spektrum von **11** (600 MHz in CD₃OD)

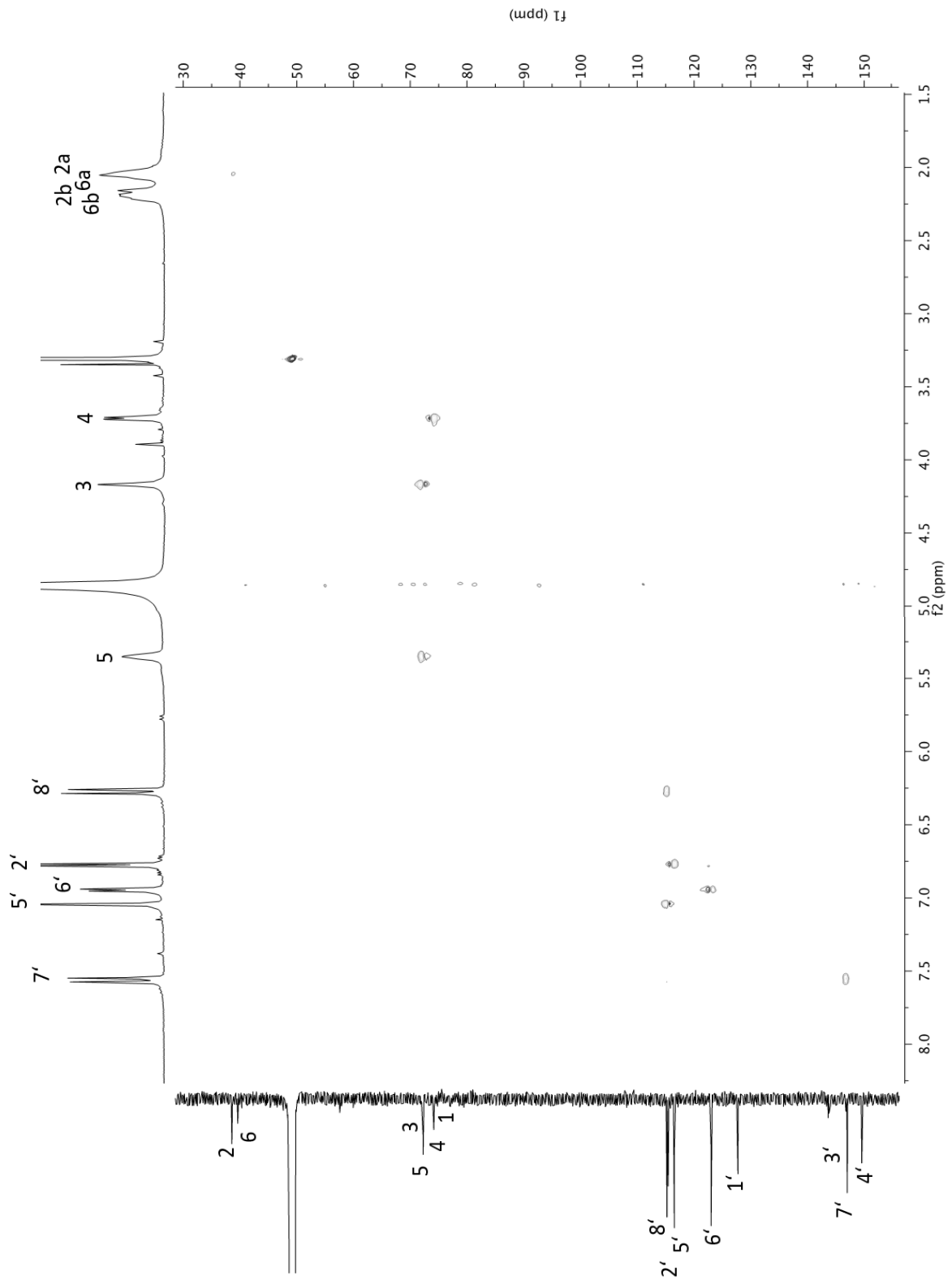


Abbildung 2.139: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 11 (600 MHz in CD_3OD)

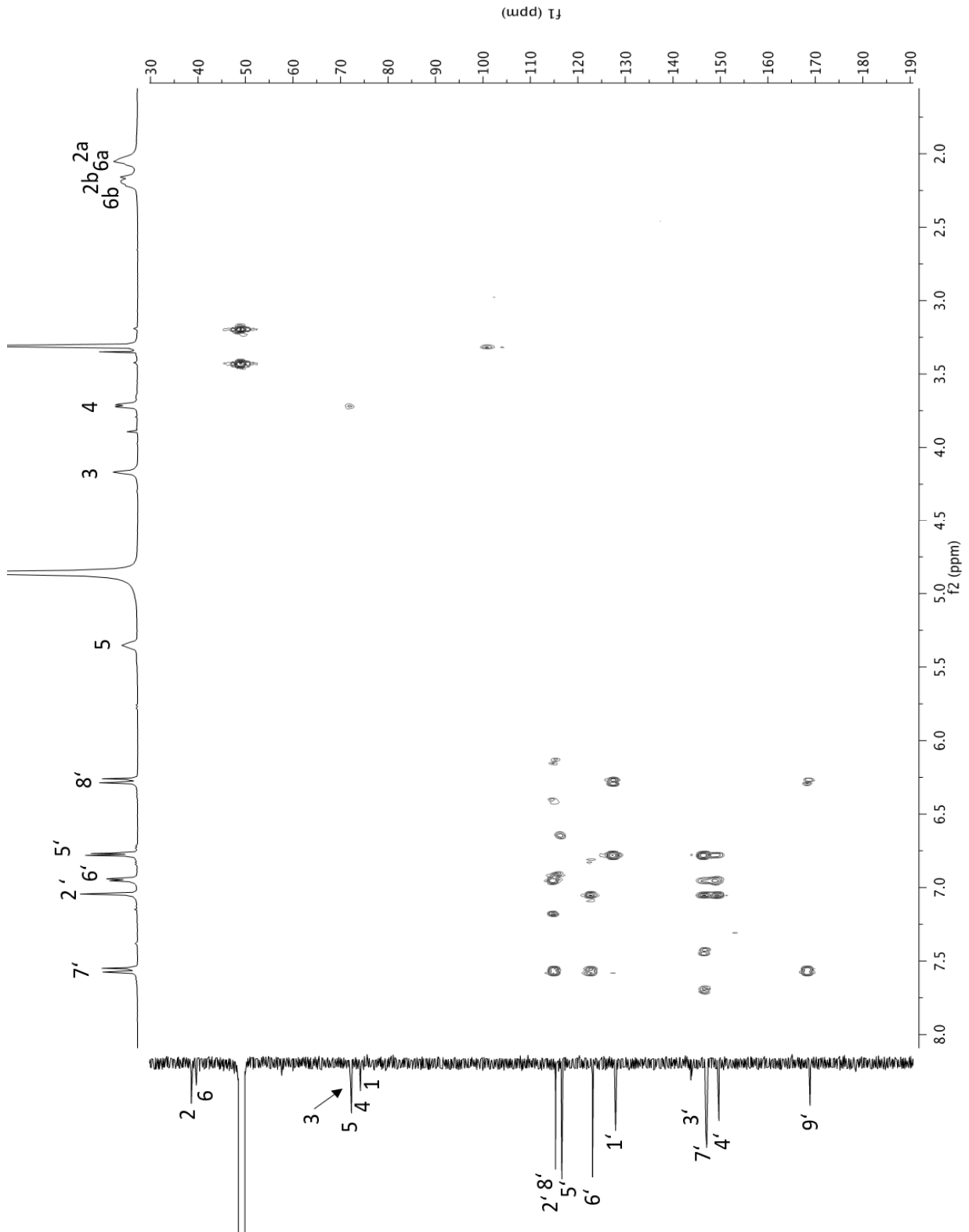


Abbildung 2.140: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **11** (600 MHz in CD₃OD)

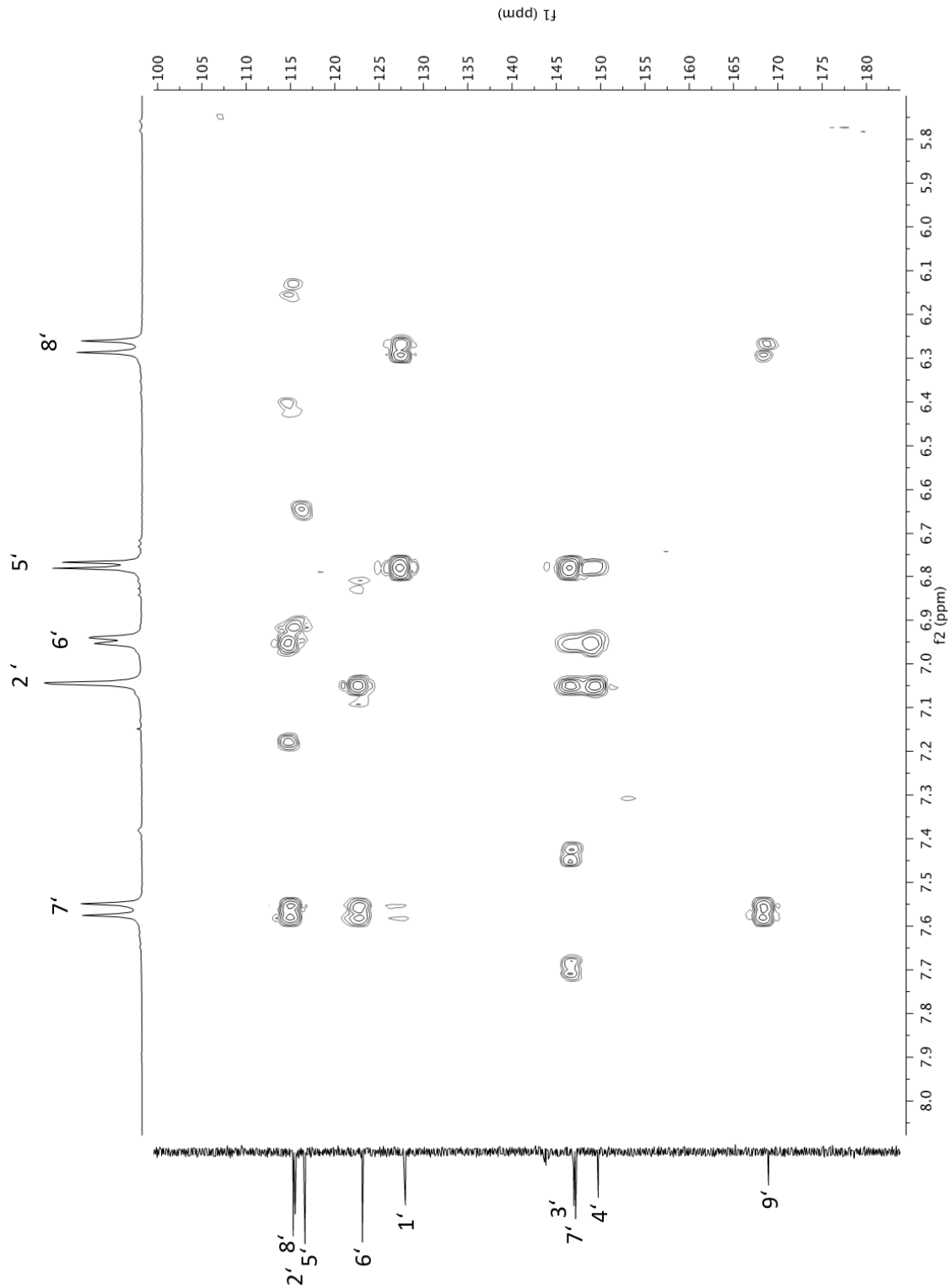


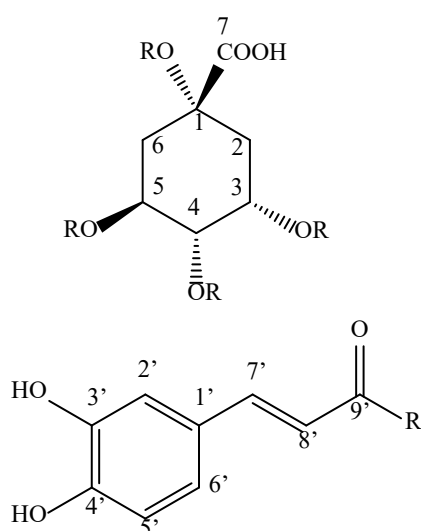
Abbildung 2.141: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **11** (600 MHz in CD₃OD)

Der Vergleich mit Literaturdaten, fand sich im im Shiftbereich zwischen 75 und 80 ppm bei $\delta_C = 76.9$ ppm ein gering intensives Signal, das dem C-1 zugeordnet werden kann.

Damit ist eindeutig belegt, dass Verbindung **11** einen Ester der Chinasäure mit der Kaffeesäure darstellt. Abschließend ist die Frage zu klären, an welcher der Hydroxylgruppen der Chinasäure die Kaffeesäure tatsächlich gebunden ist. Leider findet sich im HMBC-Spektrum kein Kreuzsignal zwischen dem H-5 der Chinasäure und dem C-9' des Kaffesäurerestes, mit dessen Hilfe die Position des Kaffeesäureesters am C-5 der Chinasäure und damit die Identität der Substanz als Chlorogensäure eindeutig belegt wäre. Wir haben daraufhin einen Vergleich mit den Literaturdaten der möglichen Ester zwischen China- und Kaffeesäure durchgeführt. Leider ist es oftmals schwierig Literaturdaten für relativ ubiquitäre Verbindungen, die schon sehr lange bekannt sind zu finden. Die Chemical Abstracts listen bei der online-Suche unter www.scifinder.cas.org 31.000 Literaturstellen zum Stichwort „chlorogenic acid“, bei der Suche nach experimentellen Spektren findet man nur 20 Quellen. Zusätzlich erschwert wird die Suche nach geeigneten Vergleichsdaten durch die unterschiedlichen zur Messung verwendeten Lösungsmittel, die in manchen Publikationen überraschenderweise sogar bei Protonen- und Kohlenstoffspektren unterschiedlich sind. In Tabelle 2.17 (siehe S. 225) sind die $^1\text{H-NMR}$ -Daten der verschiedenen Caffeoyl-chinasäuren (1-OR bis 5-OR) aus unterschiedlichen Publikationen aufgeführt. Bei den NMR-Daten der 1-Caffeoylchinasäure handelt es sich um die Daten nach Synthese der Verbindung, die Protonen wurden dabei nicht von den Autoren zugeordnet. Wenn man die Shiftwerte der Protonen H-3, H-4 und H-5 der vier möglichen Verbindungen mit den Daten von Verbindung **11** vergleicht, ist festzustellen, dass die 3-O- und die 5-O-Caffeoylchinasäure sowie Verbindung **11** jeweils drei Protonensignale δ_H bei etwa 5.3, 4.2 und 3.7 aufweisen. Die 1-O- und 4-O-Caffeoylchinasäuren scheiden demnach aus. Da die Signale der Protonen C-3 und C-5 in unseren Spektren nur als breite Singulets auftreten, lässt sich aufgrund der Kopplungskonstanten keine eindeutige Zuordnung durchführen, so dass zunächst unklar bleibt, ob es sich bei **11** um die 3-O- oder 5-O-Caffeoylchinasäure handelt. Ein Vergleich der ^{13}C NMR Daten (s. Tab. 2.17) lässt jedoch eine Differenzierung zu. Im HSQC von **11** findet man die Kohlenstoff / Wasserstoff-Signalpaare δ_C 71.95/ δ_H 4.17, δ_C 74.04/ δ_H 3.72 und δ_C 72.17/ δ_H 5.35, wobei letzteres Pärchen, aufgrund der Lage des entsprechenden Protons im Spektrum, entweder dem C-3/H-3 der 3-O-Caffeoylchinasäure oder dem C-3/H-3 der 5-O-Caffeoylchinasäure zugeordnet werden muss. Hillebrand (2004) gibt für den Kohlenstoff des veresterten, sekundären Alkohols (C-3) der 3-O-Caffeoylchinasäure einen

Shiftwert von $\delta_C = 68.3$ ppm an, ein Shiftwert, der zu keinem der oxigenierten Kohlenstoffe bei 11 passen kann. Für die 5-O-Caffeoylchinasäure finden sich für den veresterten Kohlenstoff C-5 jedoch bei Hillebrand (2004) und Esatbeyoglu et al. (2017) jedoch übereinstimmend Werte über 72 ppm, in letztgenannter Veröffentlichung wurde mit 72.1 ppm ein fast identischer Wert für C-5 gefunden.

Tabelle 2.17: ^{13}C NMR Daten der Verbindung **11** (600 MHz in CD_3OD ; δ in ppm, (J in Hz)) im Vergleich zu den vier möglichen Caffeoylchinasäureestern

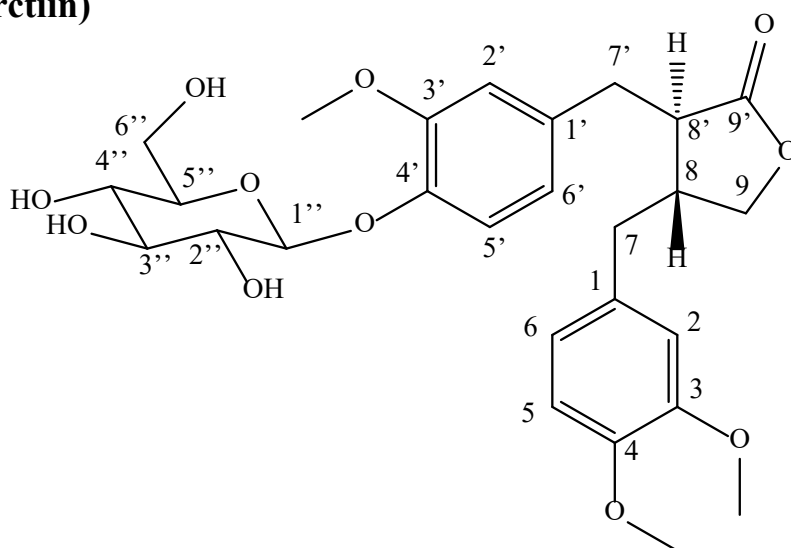


	^{13}C			
	11	3-O- ^a	5-O- ^a	5-O- ^b
1	76.90	75.4	76.2	76.3
2	38.45	36.8	38.3	38.3
3	71.95	68.3	71.4	71.5
4	74.04	74.8	72.0	73.7
5	72.17	73.1	73.6	72.1
6	39.49	41.6	38.9	39.0
7	178.48	177.0	177.0	177.2
1'	127.81	128.1	127.9	127.9
2'	115.37	115.8	115.4	115.4
3'	146.80	146.8	146.8	146.9
4'	149.56	149.4	149.5	149.6
5'	116.48	116.5	116.5	116.6
6'	122.95	122.9	123.0	123.0
7'	147.00	n.r.	147.1	147.1
8'	115.16	115.3	115.3	115.3
9'	168.85	168.7	168.7	168.8

^a Hillebrand, 2004; ^b Esatbeyoglu, T. et al. (s. Eriodictyol)
n.r.: not reported

Somit handelt es sich bei Verbindung **11**, wie eingangs bereits vermutet, um die Chlorogensäure, die bereits von Gorter (1907) erwähnt wurde. Weder in der Gattung *Volutaria* noch in der Gattung *Amberboa* wurde das Vorkommen der Chlorogensäure beschrieben. In der Gattung *Centaurea*, die wesentlich mehr Species umfasst und besser untersucht ist, wurde die Chlorogensäure bereits häufig gefunden.

2.2.10 Verbindung 12 (Arctiin)



Verbindung **12** wurde bei der chromatographischen Aufarbeitung der Fraktion 8.24 mit Hilfe der Säulenchromatographie (s. Exp. Teil, Kapitel 5.2.3) und in einer Ausbeute von 14,50 mg (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3) isoliert. Bei der durchgeführten HPLC (s. Exp. Teil Kap. 5.2.4) wurde die Substanz bei einer Retentionszeit von 14,94 Minuten registriert. Das bei der Detektion aufgenommene UV-Spektrum zeigte Maxima bei $\lambda = 235\text{nm}$ und 275nm . Im hochauflösenden HRESI-Massenspektrum wurde ein Quasimolekülion bei $m/z = 552.2437$ gefunden. Aus dieser Masse lässt sich die Summenformel $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{11} [\text{M}+\text{NH}_4]^+$ errechnen (Abb. 2.142). Verbindung **12** besitzt demnach die Summenformel $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$.

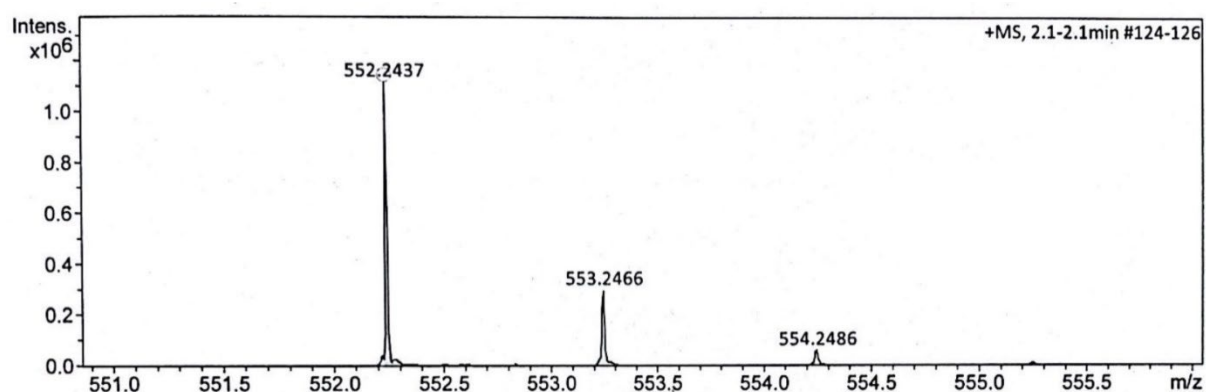


Abbildung 2.142: HRESI-Massenspektrum von **12**

Tabelle 2.18: NMR Daten der Verbindung **12** (600 MHz in CDCl₃; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H NMR in ppm		DEPT	Tokar & Klimek (2004) in CDCl ₃ /CD ₃ OD		Rahman et al. (1990) in DMSO/D ₂ O
1	-	130.48		-	130.30	-
2	6.50 d (2.0)	112.10	CH	6.57 d (1.7)	111.88	6.66 s (br.)
3	-	149.16		-	149.22	-
4	-	148.02		-	147.80	-
5	6.76 (8.2)	111.59	CH	6.74 d (8.2)	111.37	6.83 d (8.1)
6	6.56 dd (8.2; 2.0)	120.82	CH	6.48 d (1.6)	120.61	6.60 dd (8.2, 1.8)
7a 7b	2.55 m 2.66 dd (13.9; 6.4)	38.12	CH ₂	2.84 s	37.94	v.
8	2.47 m	41.26	CH	2.47 d (6.4)	41.06	v.
9a 9b	3.84 m 4.12 t (9.1)	71.38	CH ₂	4.11 dd (8.7, 7.8)	71.15	4.10 dd (8.8, 7.1) 3.87 dd (8.3, 8.4)
1'	-	133.29		-	132.92	
2'	6.65 d (1.9)	113.41	CH	6.62 d (1.8)	113.18	6.78 d (1.6)
3'	-	149.40		-	148.97	-
4'	-	145.16		-	145.01	-
5'	6.94 d (8.3)	117.25	CH	6.90 d (8.1)	116.84	6.99 d (8.3)
6'	6.60 dd (8.3; 1.8)	122.07	CH	6.55 dd (8.3, 1.6)	121.79	6.67 dd (8.5, 1.7)
7'	2.85 m	34.47	CH ₂	2.84 s	34.31	ca. 2.8 m
8'	2.55 m	46.57	CH	2.54 d (8.2)	46.37	v.
9'	-	178.92		-	178.66	-
OCH₃ an C-3	3.79 s	56.04	CH ₃	3.69 s *	55.86	3.72 *
OCH₃ an C-4	3.82 s	56.07	CH ₃	3.78 s *	55.86	3.71 *
OCH₃ an C-3'	3.72 s	56.12	CH ₃	3.81 s *	55.86	3.71 *
1''	4.81 d (7.1)	102.07	CH	4.80 d (7.4)	101.74	4.84 d (7.2)
2''	3.67 m	73.39	CH	3.50 – 3.75 (4H)	73.11	
3''	3.66 m	76.23	CH		75.86	
4''	3.69 m	69.55	CH		69.25	
5''	3.42 m	76.04	CH		76.05	
6''	3.85 m	61.61	CH ₂		61.36	

*) Signale nicht zugeordnet

v.) Signale verdeckt durch Lösungsmittel

Die endgültige Aufklärung der Struktur von **12** gelang mit Hilfe der 1D- und 2D-NMR Spektroskopie (s. Abb. 2.143 – 2.153, S. 232-244 und Tab. 2.18, S.227). Das ^{13}C -NMR-Spektrum (s. Abb. 2.145, S. 235) zeigt die Signale für 27 Kohlenstoffe, von denen vier von Methylen- und sechzehn von Methin- und Methylkohlenstoffen verursacht wurden, wie die Auswertung des ^{13}C -DEPT-Spektrums (s. Abb. 2.146) ergab. Die restlichen sieben, im DEPT nicht repräsentierten Signale mussten quartären Kohlenstoffen zugeordnet werden (s. Tab. 2.18). Das Protonenspektrum zeigt im tiefen Feld zwischen $\delta = 6.4$ bis 7.0 ppm die Signale von sechs aromatischen Protonen, die aufgrund des typischen Aufspaltungsmusters und der im 2D-COSY (s. Abb. 2.147 bis 2.149) gefundenen Korrelationen zu zwei ABX-Systemen gehören. Die Protonen H-2, H-5 und H-6 eines 1,3,4-trisubstituierten Aromaten finden sich als Dublett bei $\delta = 6.50$ ($J = 2.0$ Hz), 6.76 ($J = 8.2$ Hz) und als Dublett vom Dublett bei $\delta = 6.56$ ($J = 8.2$; 2.0 Hz), begleitet von der zweiten Gruppe H-2', H-5' und H-6' bei $\delta = 6.65$, 6.94 und 6.60 ppm, mit annähernd identischen Kopplungskonstanten, die zu einem zweiten ebenfalls 1,3,4-trisubstituierten Phenylring gehören. Über das HSQC (s. Abb. 2.150) wurden die zugehörigen Kohlenstoffe eindeutig zugeordnet (s. Tab. 2.18). Die jeweils drei quartären Kohlenstoffe der beiden trisubstituierten Aromaten findet man durch die Kreuzsignale der aromatischen Protonen im HMBC Spektrum (s. Abb. 2.152) bei $\delta = 130.48$ und 133.29 (C-1, C-1'), 149.16 und 149.40 (C-3, C-3') sowie 148.02 und 145.16 (C-4, C-4'). Die Zuordnung der Kohlenstoffe zu den jeweiligen Positionen gelingt durch die unterschiedliche Korrelation zu den Protonen H-2, H-5 und H-6 bzw. H-2', H-5' und H-6' des jeweiligen Aromaten. In Tabelle 2.19 sind die Kreuzsignale in HMBC aufgelistet. Die Kohlenstoffe C-3, C-4 und C-3' besitzen einen zusätzlichen Crosspeak zu je einem drei Protonen-Singulett bei $\delta = 3.79$, 3.82 und 3.79 ppm, bei denen es sich aufgrund der Lage im Protonenspektrum und der zugehörigen Kohlenstoffe (s. Abb. 2.152 und Tab. 2.19, S. 230) um die Signale dreier Methylether handeln muss. Das C-4' hingegen zeigt ein Kreuzsignal mit einem Dublett bei $\delta = 4.81$ ppm. Der zugehörige Kohlenstoff liegt bei $\delta = 102.07$ ppm, was ihn als Acetal-Kohlenstoff ausweist. Es sollte sich bei den beiden Signalen daher um das anomere Proton H-1'' und das zugehörige C-1'' eines Zuckers handeln. Das Signal von H-1'' spaltet durch die Kopplung mit dem Proton an C-2'' zum Dublett auf ($J = 7.1$ Hz). Das Protonensignal von H-2'' findet sich als überlagertes Multipllett bei $\delta = 3.76$ ppm. In diesem Bereich liegen auch zwei weitere Protonen des Zuckermoleküls (H-3'' und H-4''), was durch die Kopplungen zueinander im 2D-COSY und durch die zugehörigen Kohlenstoffe C-2'', C-3'' und C-4'' ($\delta_{\text{C}} = 73.39$, 76.23 und 69.55 ppm) gezeigt werden kann. H-4'' koppelt dann mit H-5'' bei $\delta = 3.43$ ppm und dieses wiederum mit

dem Signal von H-6“ bei $\delta = 3.85$ ppm. Während das über das HSQC-Spektrum zugeordnete C-5“, genauso wie C-1“, C-2“, C-3“ und C-4“ im ^{13}C -DEPT-Spektrum als Methinkohlenstoff erkannt wurde, handelt es sich beim C-6“ ($\delta_{\text{C}} = 61.61$) um einen hydroxylierten Methylenkohlenstoff. Das Multiplettsignal des H-6“ bei 3.85 ppm repräsentiert allerdings drei Protonen, so dass bei dieser Frequenz ein weiteres Proton des Moleküls zur Resonanz kommt. Ein Vergleich mit den Literaturdaten verschiedener Glykoside in CDCl_3 zeigt eindeutig, dass es sich bei dem an C-4‘ von 12 gebundenen Zucker um eine β -D-Glucose handelt. Verbindung **12** besitzt daher zwei substituierte 3,4-Hydroxyphenylgruppen, die dimethyliert bzw. monomethyliert und glykosidiert vorliegen.

Ausgehend von den aromatischen Protonen H-2 und H-6 sowie H-2‘ und H-6‘ findet man die Signale eines an C-1 bzw. C-1‘ gebundenen Kohlenstoffs einer Seitenkette (C-7 und C-7‘). Bei beiden Kohlenstoffen, deren Signale bei $\delta = 38.12$ (C-7) und 34.47 ppm (C-7‘) auftreten, handelt es sich um Methylenkohlenstoffe. Die Protonensignale non H-7a und H-7b finden sich bei $\delta = 2.55$ und 2.66 ppm, H-7‘a und H-7‘b kommen bei 2.83 und 2.87 ppm zur Resonanz. Während das Signal von H-7a durch andere Protonensignale überlagert ist, kann man bei den anderen drei Signalen, die jeweils zum Dublett von Dubletts aufspalten, sehen, dass Sie neben der geminalen Kopplung in Höhe von ca. 14 Hz eine weitere vicinale Kopplung zu einem Proton am nächsten Kohlenstoff zeigen. Diese Protonen am C-8 und C-8‘ ($\delta_{\text{C}} = 41.26$ und 46.57 ppm) finden sich bei $\delta = 2.47$ und 2.55 ppm. Während das Signal von 8‘ mit H-7a zusammenfällt und daher kein Aufspaltungsmuster zu erkennen ist, tritt H-8 als Dublett vom Triplet mit Kopplungskonstanten in Höhe von 15.6 und 7.8 Hz auf. Abgesehen von den Kopplungen von H-8 und H-8‘ mit den jeweiligen Protonen an C-7 und C-7‘, koppeln die beiden Protonen auch miteinander, so dass die Kohlenstoffe C-8 und C-8‘ miteinander verbunden sein müssen. Dieser Befund legt im Zusammenhang mit den beiden trisubstituierten Phenylringen die Vermutung nahe, dass es sich bei Verbindung **12** um ein Lignan, ein dimeres Phenylpropan, handeln könnte (Lüdemann & Nimz, 1974). Die beiden noch fehlenden, endständigen Kohlenstoffe der C_3 -Seitenkette der Phenylpropanteile finden sich aufgrund der Korrelationen im COSY- und HMQC-Spektrum. H-8 koppelt dabei mit den zwei Protonen bei $\delta = 3.84$ und 4.12 ppm, die am Methylenkohlenstoff C-9 gebunden sind, H-8‘ besitzt neben den Protonen am C-7 keinen weiteren Kopplungspartner, so dass das C-9‘ ein quartärer Kohlenstoff sein sollte. Im HMBC findet sich Kreuzsignale zwischen H-7‘ (^3J) und H-8‘ (^2J) mit dem Kohlenstoffsignal bei $\delta = 178.92$ ppm, bei dem es sich aufgrund der Lage im Spektrum um den

Carbonylkohlenstoff eines Esters oder Lactons handeln sollte (Budesinsky & Saman, 1995). Zu diesem Kohlenstoff gibt es auch eine ^3J -Korelation zu dem Proton an C-8 und zum H-9b, sowie eine schwächere Korrelation zu H-9a. Diese beiden Protonen gehören zu einem hydroxylierten Kohlenstoff, der mit der Carbonsäure an C-8' verestert ist, wodurch ein pentacyclischer Lactonring entsteht. Die Protonen an C-9 zeigen daher ein 3J Korrelation über den Ringsauerstoff des Lactons zum Carbonylkohlenstoff C-9'.

Tabelle 2.19: Wichtige H,C-HMBC (^3J -Kopplungen) von Verbindung **12**

H-2 => C-4; C-6; C-7 und C-1 (^2J)	H-2' => C-4'; C-6'; C-7' und C-1' (^2J)
H-5 => C-1; C-3 und C-4 (^2J)	H-5' => C-1'; C-3' und C-4' (^2J)
H-6 => C-2; C-4; C-7	H-6' => C-2'; C-4'; C-7'
H-7a,b => C-2; C-6; C-9; C-8' und C-1 (^2J); C-8 (^2J).	H-7' => C-2'; C-6'; C-9'; C-8 und C-1 (^2J); C-8' (^2J).
H-8 => C-1; C-7'; C-9' und C-7 (^2J); C-9 (^2J); C-8' (^2J)	H-8' => C-1'; C-7; C-9 und C-7' (^2J); C-9' (^2J); C-8 (^2J)
H-9a,b => C-7; C-8'; C-9'	
OCH_3 an C-3 => C-3	OCH_3 an C-3' => C-3'
OCH_3 an C-4 => C-4	
	H-1'' => C-4';

Lignane von Dibenzylbutyrolactontyp sind bereits mehrfach in der Natur gefunden worden. Eine Substanz mit dieser Struktur ist unter dem Namen Arctiin bekannt. Diese Verbindung ist am C-8 und C-8' jeweils (R)-konfiguriert. Das H-8 ist daher β - und das H-8' α -ständig, wodurch diese beiden Protonen zueinander trans-ständig sind.

Grundsätzlich gibt es bei Phenylbutyrolignanen vier mögliche Stereoisomere am C-8 und C8', die Enantiomerenpaare 8(R),8'(R)- und 8(S),8'(S)- sowie 8(R),8'(S)- und 8(S),8'(R)-, Wenn, wie bei **12** eine Glucose gebunden ist, die bei Naturstoffen immer als D-Glucose vorkommt, gibt es keine 8,8'-Enantiomeren mehr, sondern nur noch Diastereomere. In einer 1982 veröffentlichten Arbeit von Harmatha et. al. (1982) wird bereits beschrieben, dass die trans-konfigurierten Benzylbutyrolactonderivate relativ schlecht aufgelöste NMR-Spektren zeigen,

bei denen die Protonen H-8 und H-8' mit dem Methylenprotonen H-7a und H-7b als 4 Protonenmultiplett im Bereich von $\delta = 2.5 - 2.6$ ppm auftreten und auch die beiden Protonen an C-7' ein gemeinsames Multiplett bei $\delta = 2.9$ ppm zeigen. Die ringständigen Methylenprotonen (H-9a und H-9b) zeigen bei den am Furan-2-on-Ring trans-konfigurierten Phenylbutyrolignanen allerdings Signale bei unterschiedlichen Shiftwerte bei $\delta = 3.9$ und 4.2 ppm.

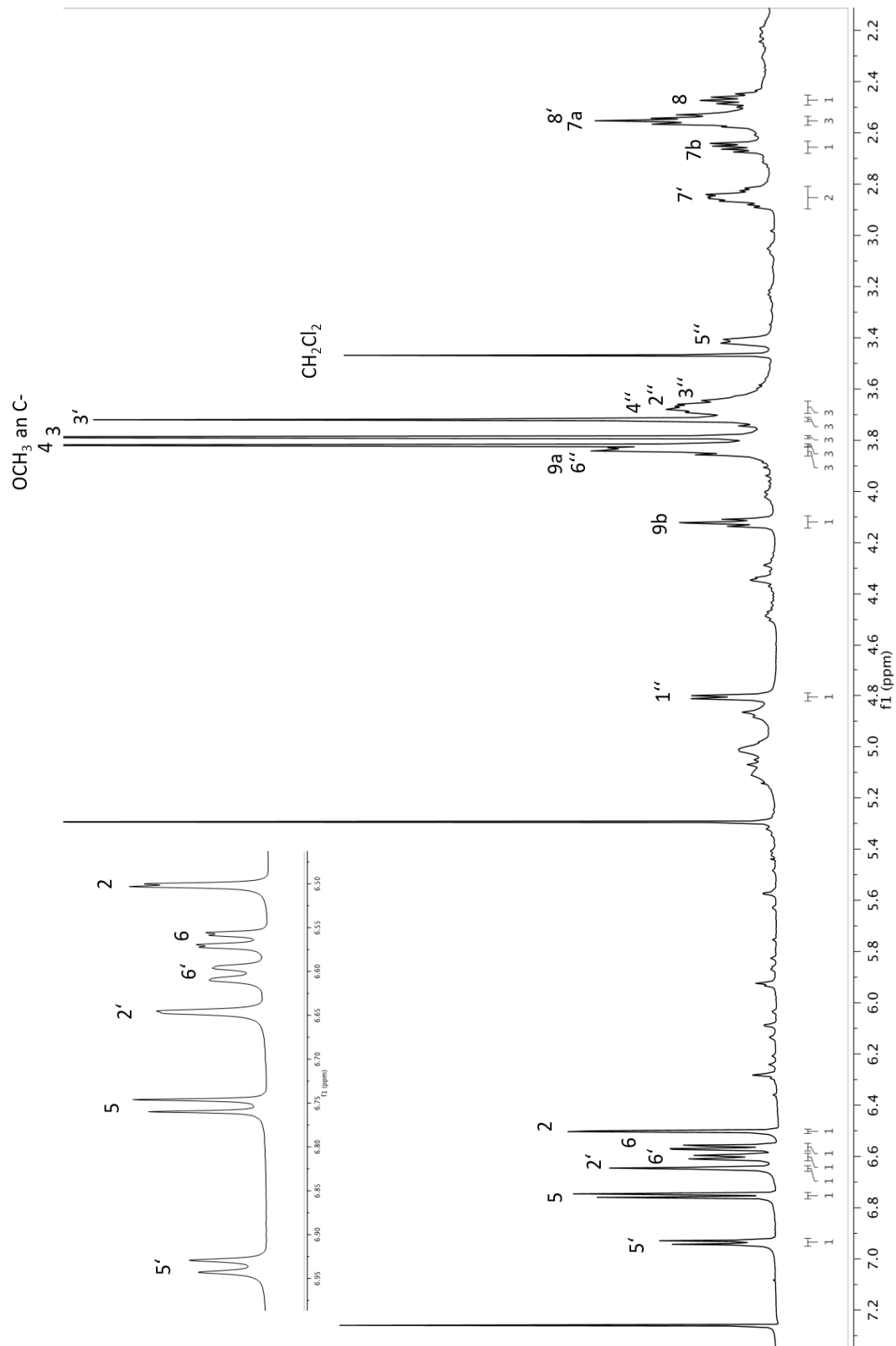


Abbildung 2.143: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung 12 (600 MHz in CDCl₃)

Bei cis-konfigurierten Butyrolignanen sind die Protonensignale von H-8 und H-8' sowie H-7a,b und H-7'a,b in einem relativ breiten Shiftbereich von 2.3 – 3.3 ppm gut aufgelöst. Die beiden Protonen am C-9 kommen bei einer cis-konfigurierten Substanz gemeinsam bei $\delta = 4.0\text{-}4.1$ ppm zur Resonanz. Diese Beziehungen wurden von Li et al. (2003) bestätigt.

Da sich die Signale der Protonen H-9a und H-9b im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **12** deutlich getrennt bei $\delta = 3.84$ und 4.12 ppm, und damit genau im von Harmatha et al. (1982) angegebenen Shiftbereich, zuordnen lassen und die Signale H-7'a und H-7'b als Multipllett bei 2.85 ppm auftreten, sollte es sich bei **12** um ein trans-konfiguriertes Phenylbutyrolacton handeln. Die Signale der vier anderen Protonen H-7a und H-7b sowie H-8 und H-8' treten hier zwar nicht als ein Multipllett für 4 Protonen auf, sondern als ein Dublett vom Dublett bei $\delta = 2.66$ ppm für H-7b, ein Multipllett bei $\delta = 2.55$ ppm für H-7a und H-8' und ein Multipllett bei $\delta = 2.47$ für H-8, die Signale liegen aber immer noch eng zusammen in Bereich von 2.4 – 2.85 ppm und nicht wie von Harmatha et al (1982) beschrieben breit gestreut zwischen 2.3 und 3.3 ppm.

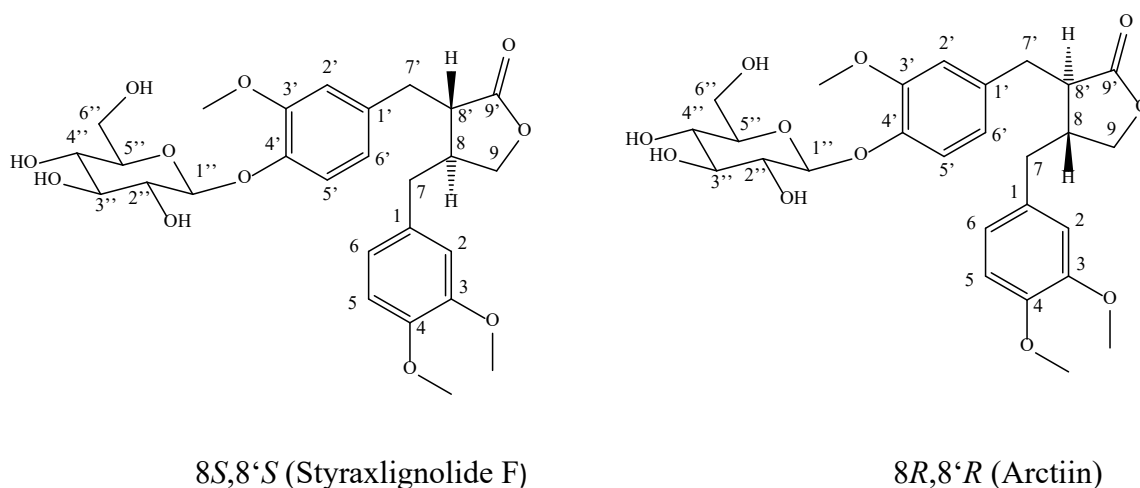


Abbildung 2.144: Mögliche trans-konfigurierte Isomere von Verbindung **12**

Die im zweidimensionalen NOESY -Spektrum (s. Abb. 2.153 und 2.154) gefundenen Kontakte zwischen den Signalen der Methoxyprotonen bei $\delta = 3.79$ (OCH_3 an C-3) mit dem Dublett bei $\delta = 6.50$ (H-2), $\delta = 3.82$ (OCH_3 an C-4) mit dem Dublett bei $\delta = 6.76$ (H-5) und $\delta = 3.72$ (OCH_3 an C-3') mit dem Dublett bei $\delta = 6.76$ (H-2') bestätigen die Position der Methoxygruppen an den beiden Aromaten.

Das Signal des anomeren Protons der Glucose zeigt erwartungsgemäß einen starken Crosspeak mit dem H-5' und einen schwächeren mit den weiter entfernten H-6'. Ausgehend von H-1' findet man noch ein weiteres Kreuzsignal im Spektrum, das leider auch nicht zur Differenzierung der beiden diastereomeren Strukturen in Abb. 2.144 (S. 233) herangezogen werden kann, aber die trans-Konfiguration der Protonen an C-8 und C-8' bestätigt. Das Proton am C-1 der Glucose (H-1') koppelt mit dem H-8 des Butyrolactonrings, was nur dann möglich ist, wenn das Proton an C-8 und der glykosidierte Benzylrest zueinander cis-angeordnet sind.

Harmatha et al. (1982) untersuchten in Ihrer Arbeit auch die optische Drehung bekannter und stereoselektiv synthetisierter Lignane. Dabei stellten Sie fest, dass linksdrehende Derivate 8*R*,8'*R*-konfiguriert sind, während rechtsdrehende Verbindungen eine 8*S*,8'*S*-Konfiguration aufweisen. Da Verbindung **12** linksdrehend ist, ihr Drehwert beträgt -3.75° , kann die absolute Konfiguration als 8*R*,8'*R* zugeordnet werden. Es handelt sich bei Verbindung **12** demnach um (3*R*,4*R*)-3-[(3,4-Dimethoxyphenyl)methyl]-4-[[4-(β-D-glucopyranosyloxy)-3-methoxyphenyl]methyl]dihydro-2(3*H*)-furanone.

Diese Verbindung ist unter dem Trivialnamen Arctiin bereits häufiger beschrieben worden. Verbindung **12** ist allerdings das erste Lignan, das in der Gattung *Volutaria* gefunden wurde. Arctiin ist aus verschiedenen *Centaurea*-Arten bereits isoliert worden.

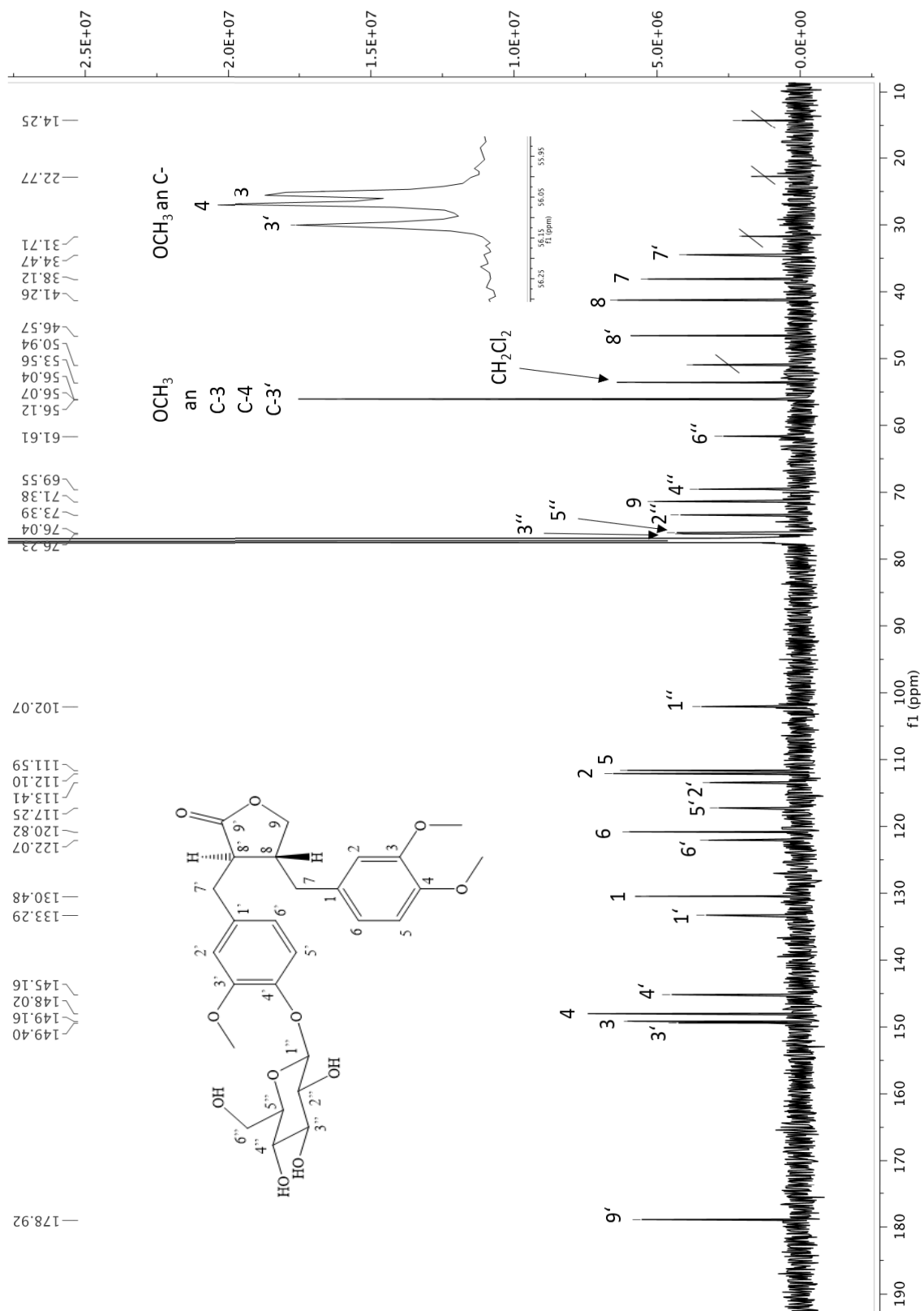


Abbildung 2.145: ¹³C-NMR Spektrum von Verbindung 12 (150 MHz in CDCl₃)

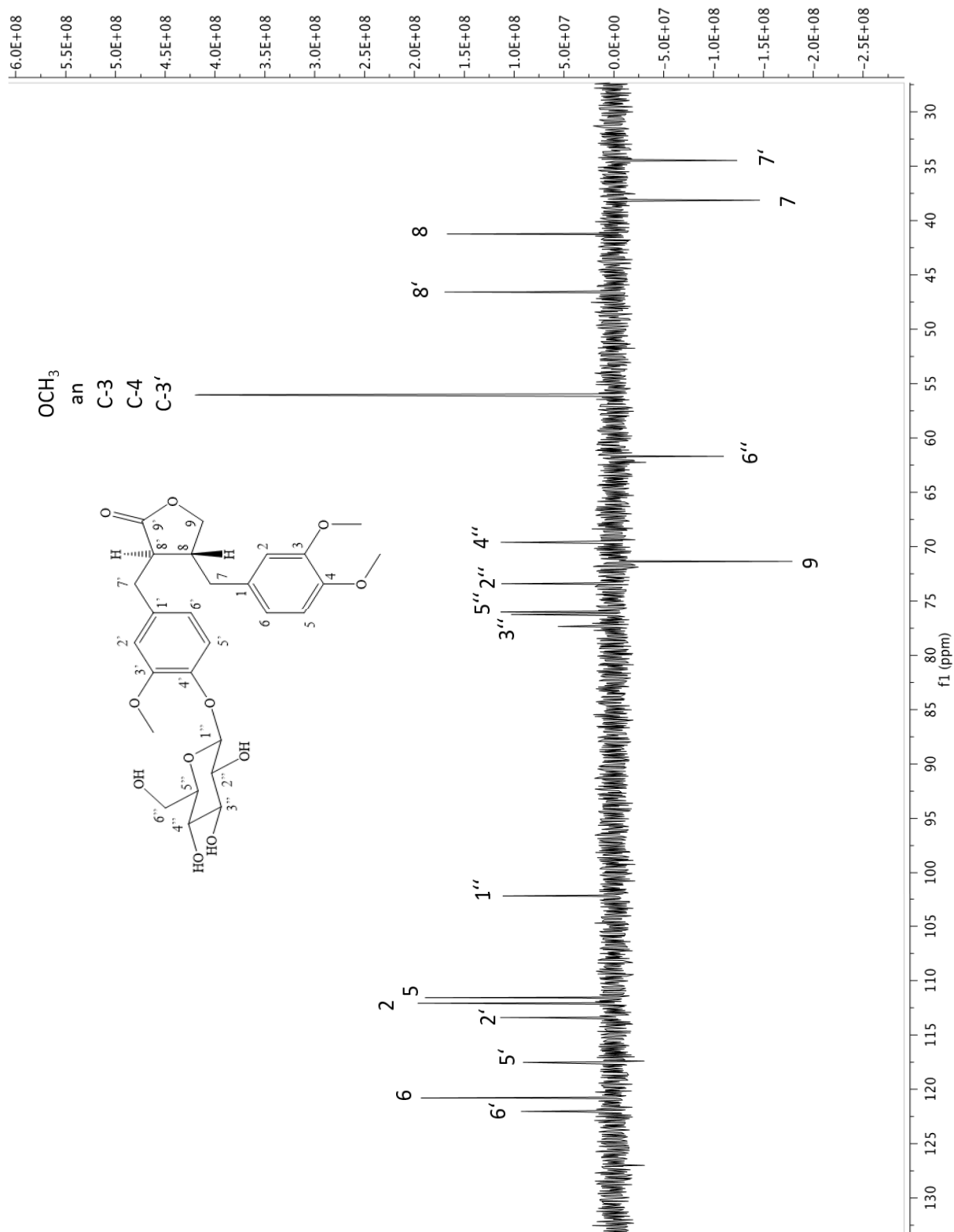


Abbildung 2.146: $^{13}\text{C-NMR DEPT}$ Spektrum von Verbindung **12** (150 MHz in CDCl_3)

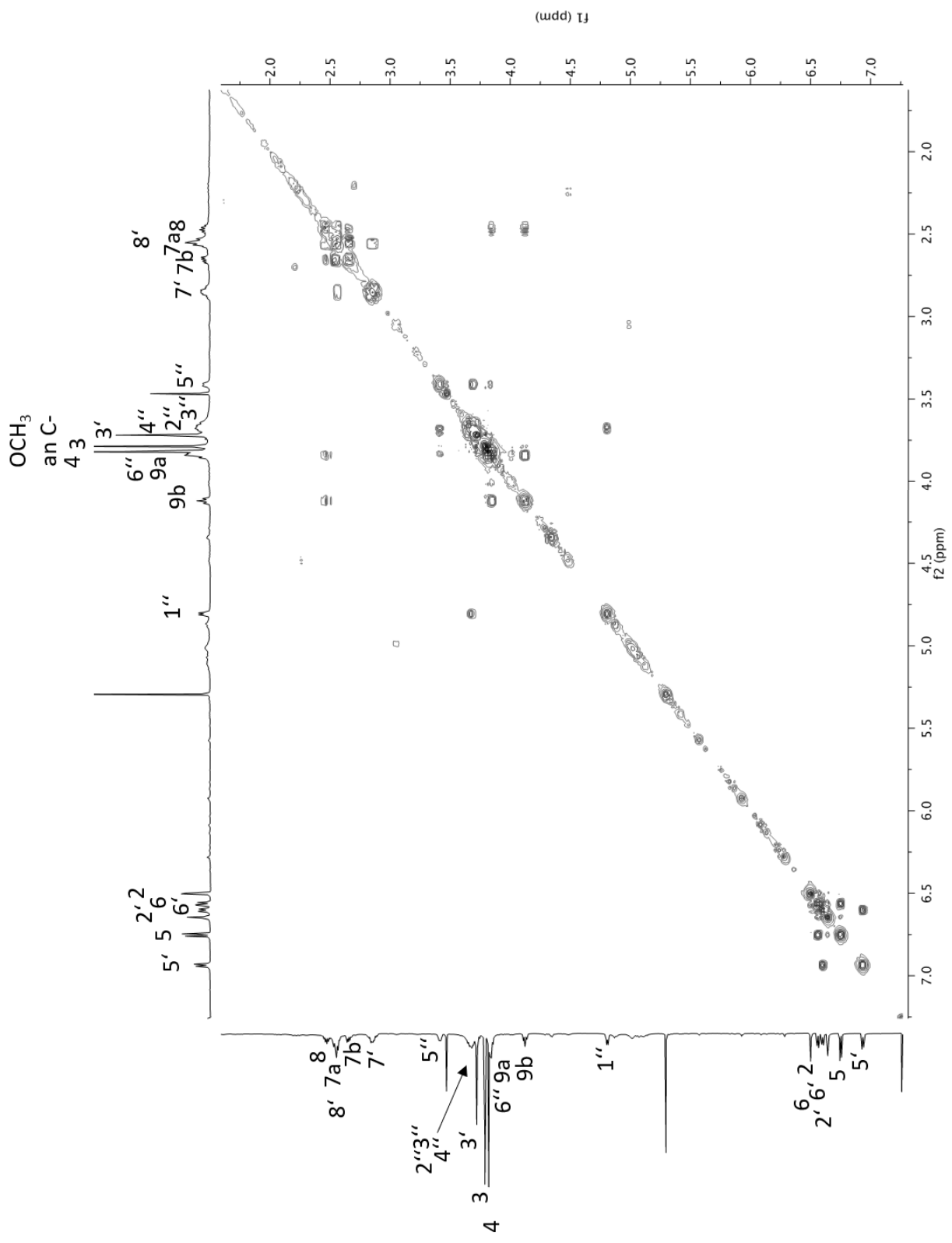


Abbildung 2.147: 2D-COSY-Spektrum von **12** (600 MHz in CDCl_3)

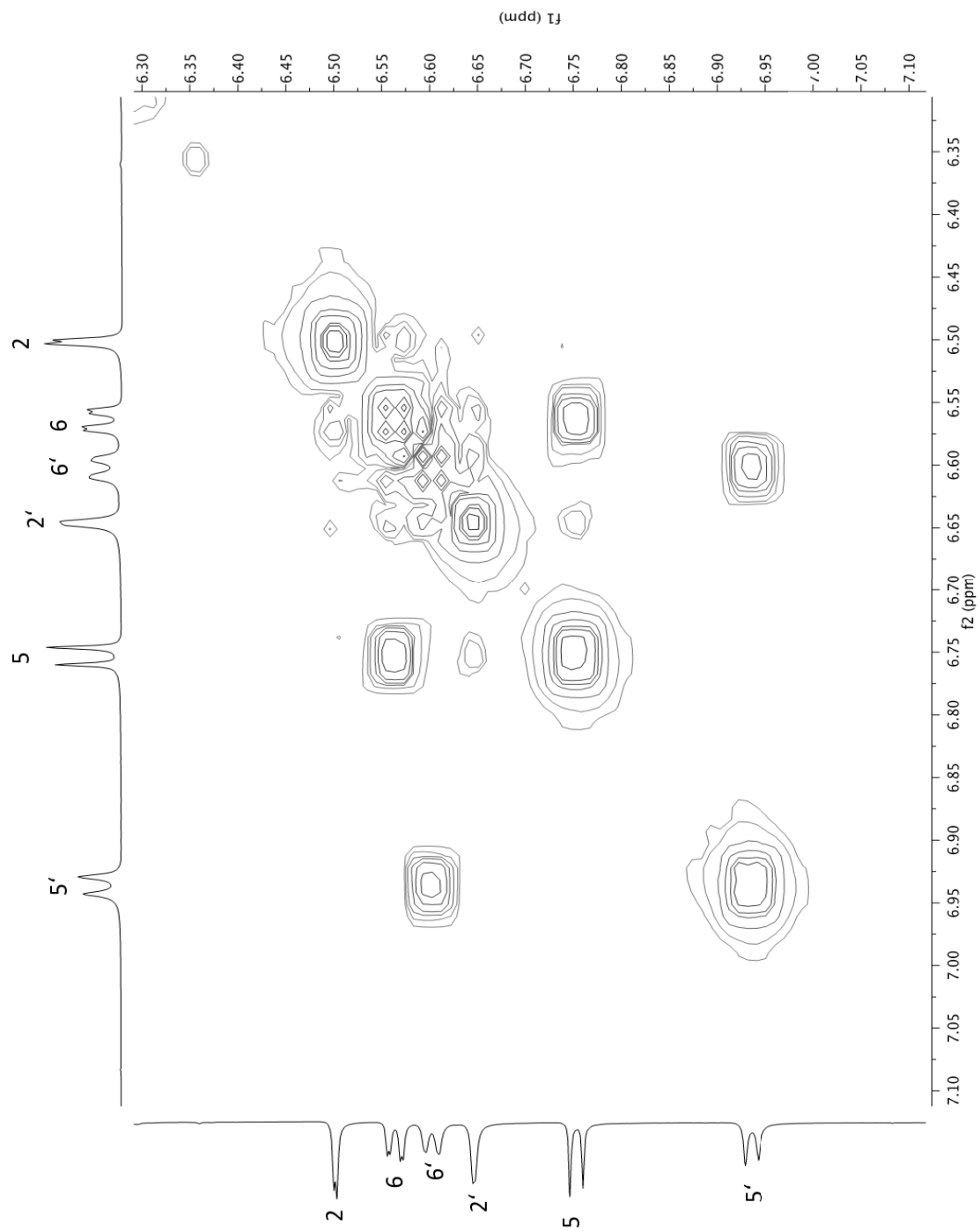


Abbildung 2.148: Ausschnitt aus dem 2D-COSY-Spektrum von **12** (600 MHz in CDCl_3)

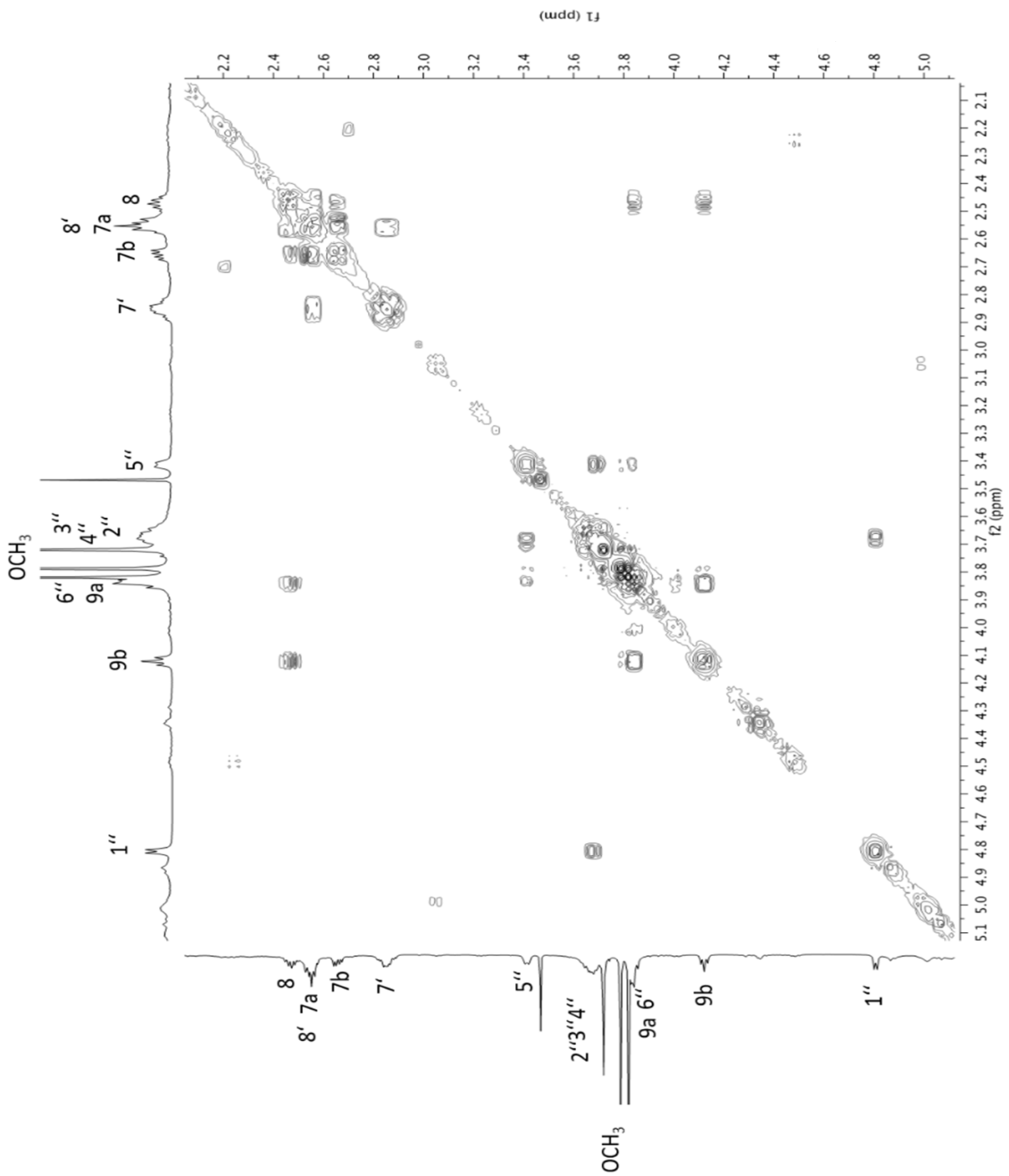


Abbildung 2.149: Ausschnitt aus dem 2D-COSY-Spektrum von **12** (600 MHz in CDCl₃)

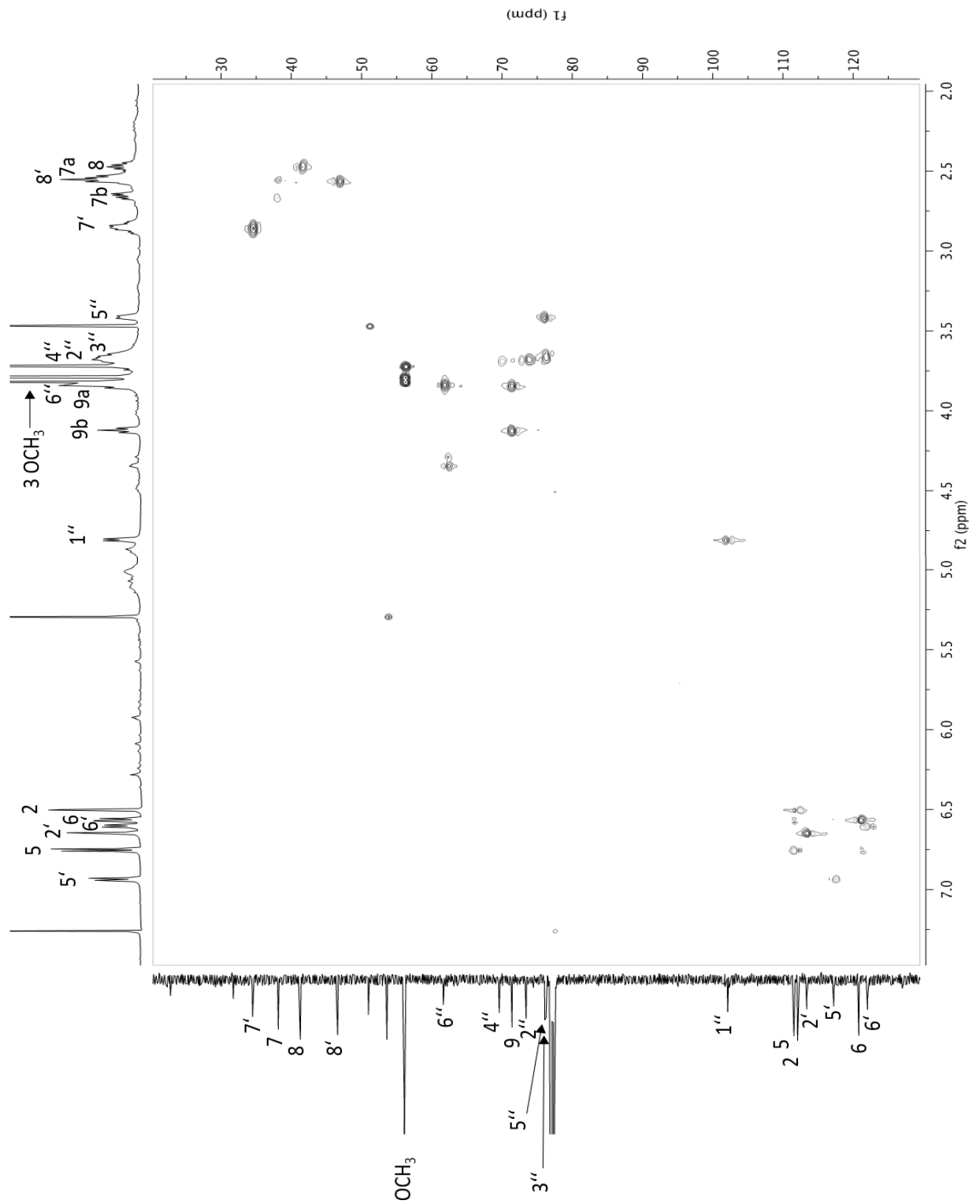


Abbildung 2.150: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 12 (600 MHz in CDCl_3)

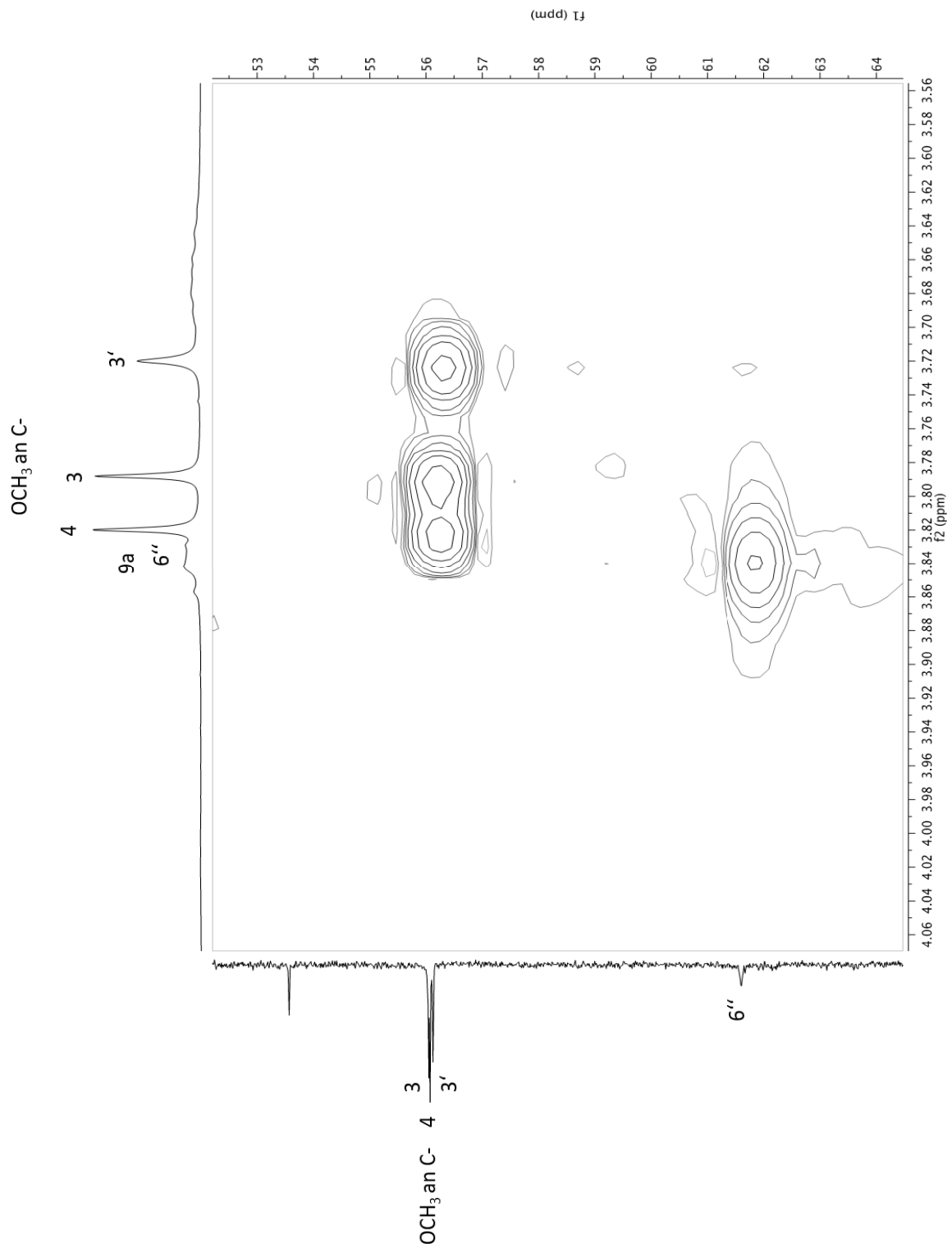


Abbildung 2.151: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **12** (600 MHz in CDCl_3)

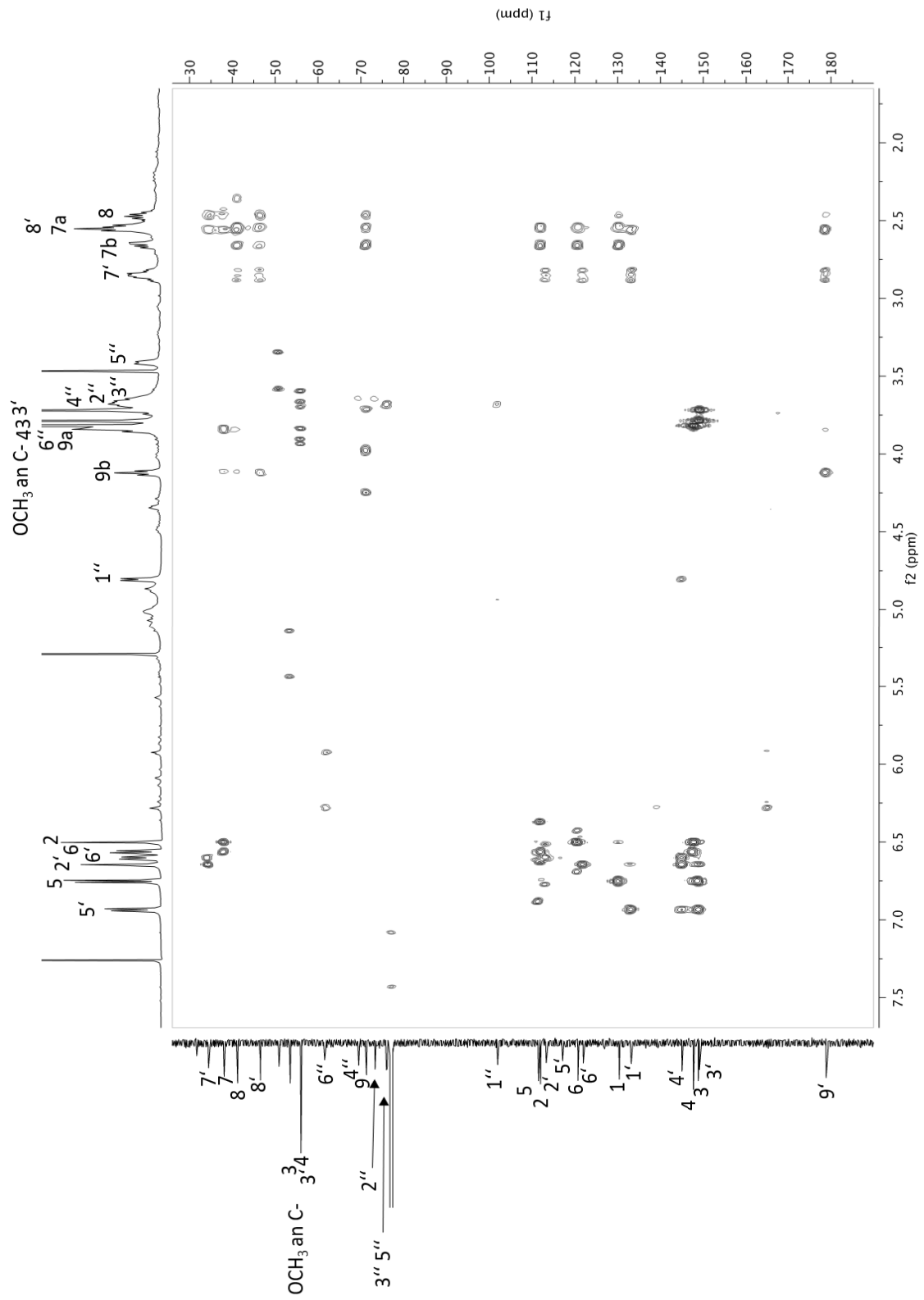


Abbildung 2.152: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **12** (600 MHz in CDCl₃)

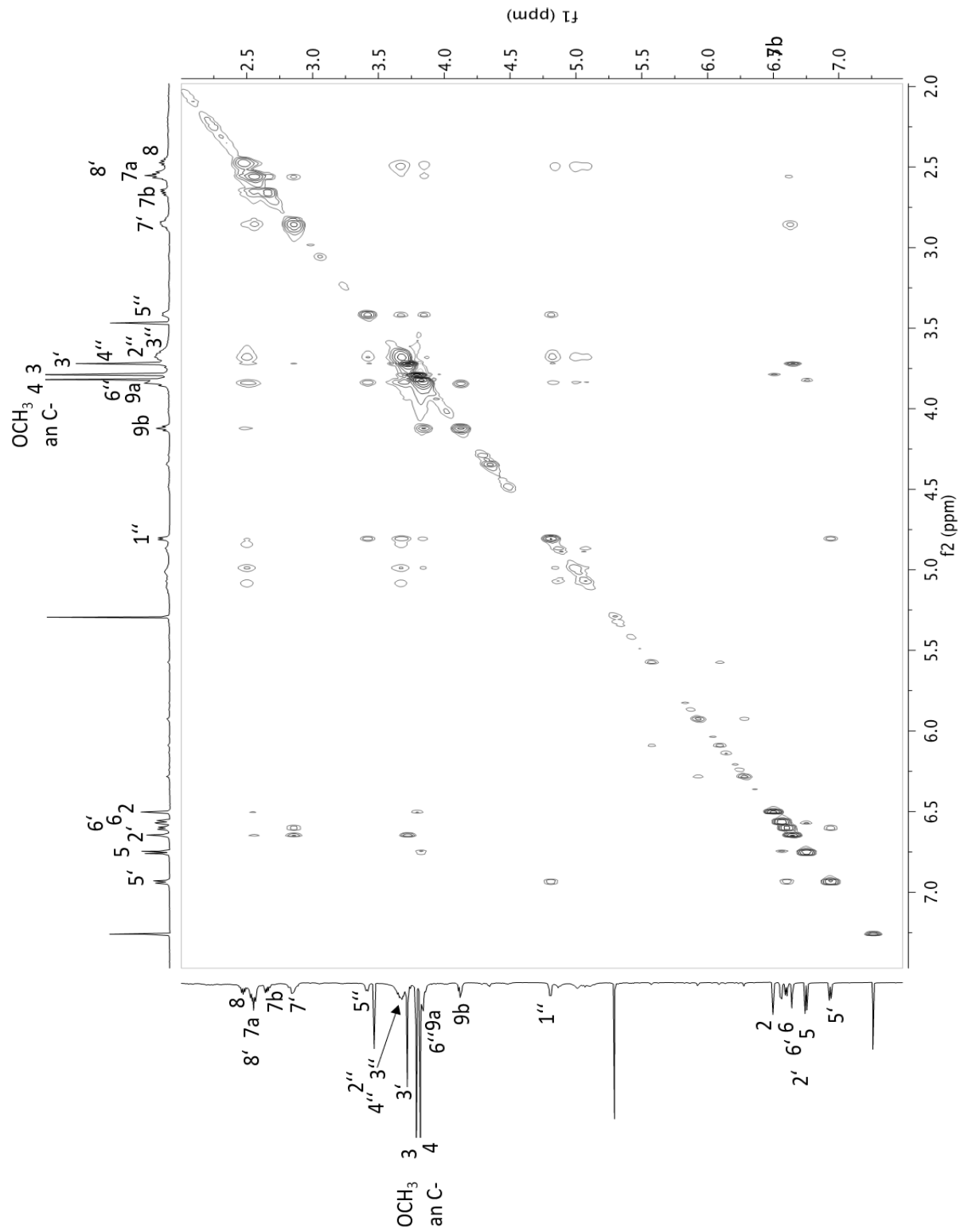


Abbildung 2.153: 2D-NOESY-Spektrum von Verbindung **12** (600 MHz in CDCl_3)

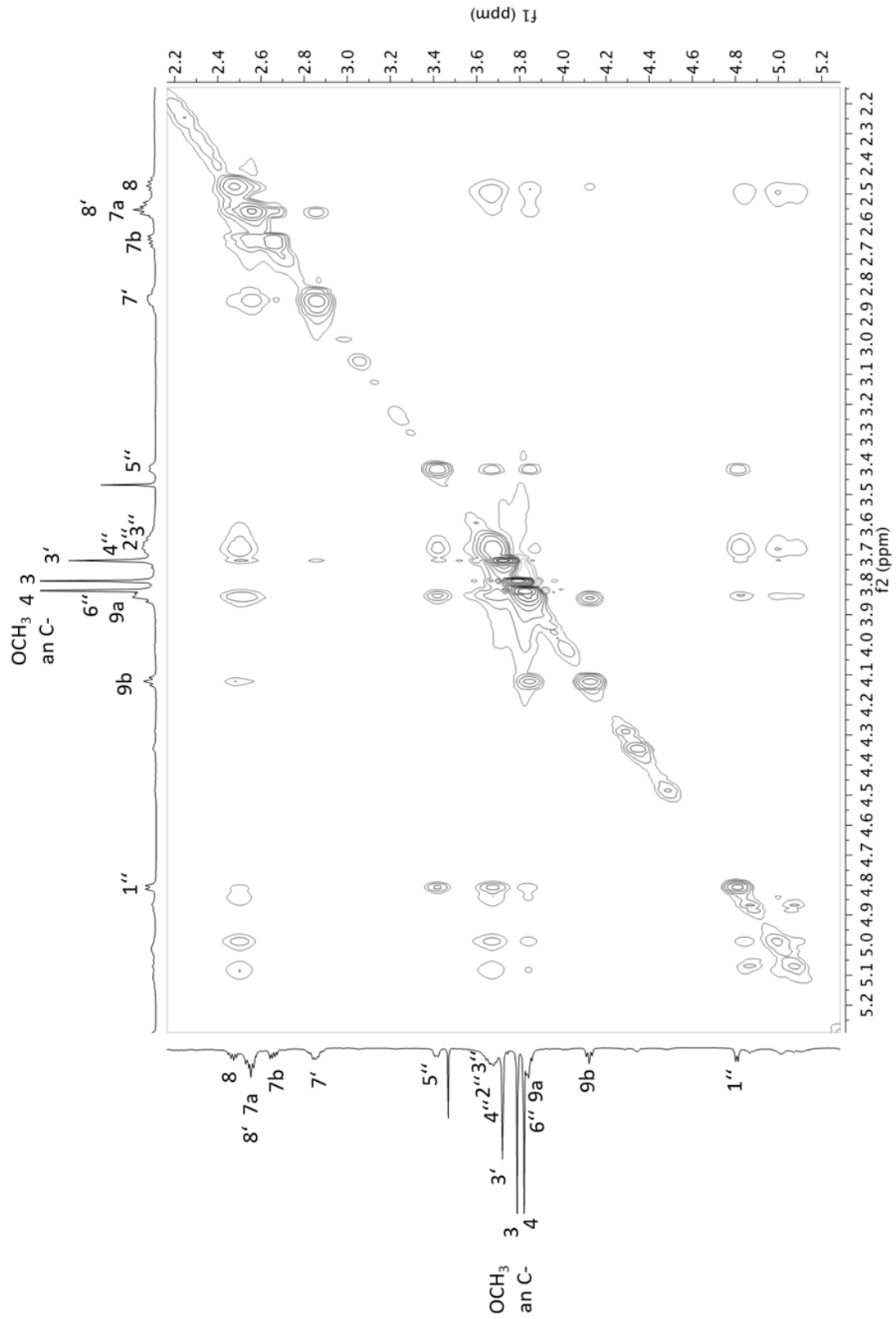
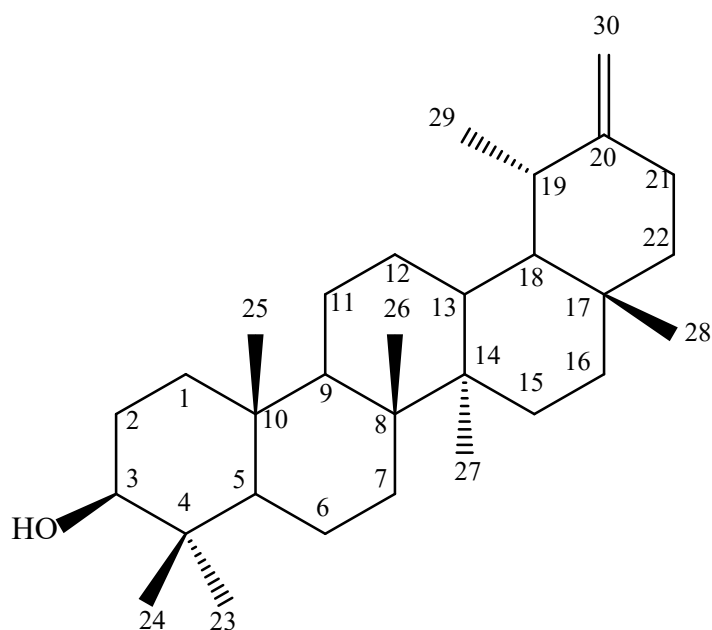


Abbildung. 2.154: Ausschnitt aus dem 2D-NOESY-Spektrum von **12** (600 MHz in CDCl_3)

2.2.11 Verbindung 13 (Taraxasterol)



Verbindung **13** wurde aus der Fraktion V.b.8 durch Auskristallisation mit einer Ausbeute von 22,5 mg (s. Exp. Teil Kap. 5.4.3) gewonnen. Im DC (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1) zeigte Verbindung **13** keine Löschung des Fluoreszenzindikator, so dass es sich nicht um eine Verbindung mit vielen π -Elektronen, wie z.B. aromatischen Strukturelementen oder α,β -ungesättigten Carbonylstrukturen in den Verbindungen **1-12**, handeln sollte. Die Retentionszeit von **13** im HPLC betrug 36,80 Min. im HPLC (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.4), im dabei aufgenommenen UV-Spektrum zeigte **13** nur ein Maximum bei $\lambda = 202\text{nm}$. Das im Direkteinlass unter Elektronenimpact aufgenommene Massenspektrum (s. Abb. 2.155, S. 246) ließ das Molekülion bei $m/z = 426$ erkennen. In Verbindung mit den intensiven Fragmenten bei $m/z = 207$ und 189 war anzunehmen, dass es sich bei **13** um ein Triterpen handeln sollte (Ayatollahi et al., 2011).

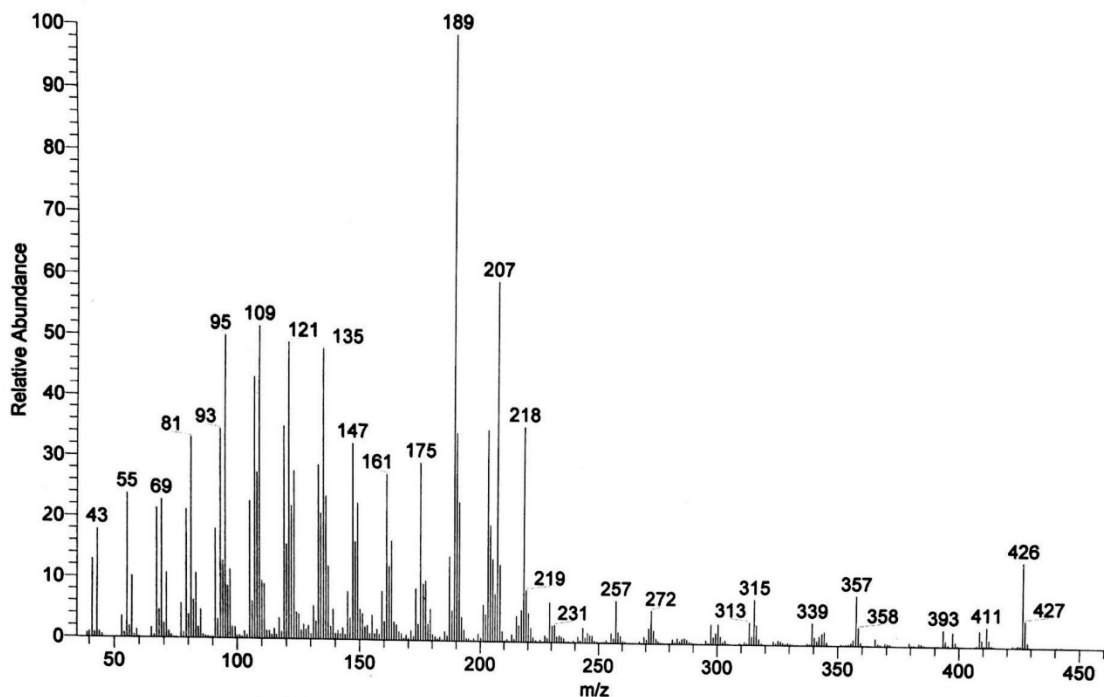


Abbildung 2.155: EI-Massenspektrum von **13**

Zur Strukturaufklärung von **13** wurden 1D- und 2D-NMR-Spektren in Chloroform- d_4 aufgenommen (s. Abb. 2.157 – 2.173, S. 252– 268 und Tab. 2.20, S 249). Das ^{13}C -NMR-Spektrum (s. Abb. 2.160, S. 255) zeigt 29 Kohlenstoffsignale. Wie sich später herausstellte, fielen die Signale der Kohlenstoffe C-4 und C-22 auf den ersten Blick zusammen. Bei der Spreizung des Signals konnte man dann erkennen, dass es sich um zwei ganz dicht nebeneinander liegende Signale bei $\delta = 39.02$ und 39.03 handelte (s. Abb. 2.161 und Tab. 2.20). Somit konnten die Signale für 30 Kohlenstoffe gefunden werden, was die Annahme, dass es sich bei **13** um ein Triterpen handelt, bestätigen konnte. Über die Kreuzsignale im HSQC-Spektrum konnten 24 dieser 30 Kohlenstoffsignale als Signale von protonierten Kohlenstoffen erkannt werden (s. Abb. 2.165 – 2.168). Die sechs restlichen Signale stammen von quartären Kohlenstoffen.

Bei häufig gefundenen, pflanzlichen Triterpenen unterscheidet man tetracyclische und pentacyclische Verbindungen, von denen letztere häufiger gefunden wurden. In Abbildung 2.156 (siehe S. 247) sind die vier wichtigsten Grundgerüste dargestellt. Alle diese Verbindungen besitzen eine Hydroxylgruppe am C-3 des Grundgerüsts und ohne Einführung von weiteren Sauerstoffsubstituenten oder Doppelbindungen besitzen sie fünf quartäre

Kohlenstoffe. Da bei Verbindung **13** ein zusätzlicher quartärer Kohlenstoff registriert wurden, muss eine Substitution oder eine Doppelbindung vorliegen. Das $^1\text{H-NMR}$ (s. Abb. 2.157) zeigt die Signale der Protonen von **13**, die sich wie bei allen Triterpenen in vielen Bereichen stark überlagern. Das am weitesten ins tiefe Feld verschoben finden sich zwei dicht nebeneinander liegende Triplets für je ein Proton bei $\delta = 4.60$ und 4.62 ppm. Aufgrund der im HSQC-Spektrum (s. Abb. 2.165) auftretenden Korrelation mit nur einem Kohlenstoffsignal bei $\delta = 107.28$, handelt es sich hier um die Protonen an einer Doppelbindung, die entweder endständig in der Seitenkette oder exocyclisch lokalisiert sein muss. Aufgrund dieses Befunds kann kein Triterpen vom Oleanan-Typ vorliegen, weil die Anordnung der Methylgruppen eine solche Struktur nicht ermöglichen kann (s. Abb. 2.156).

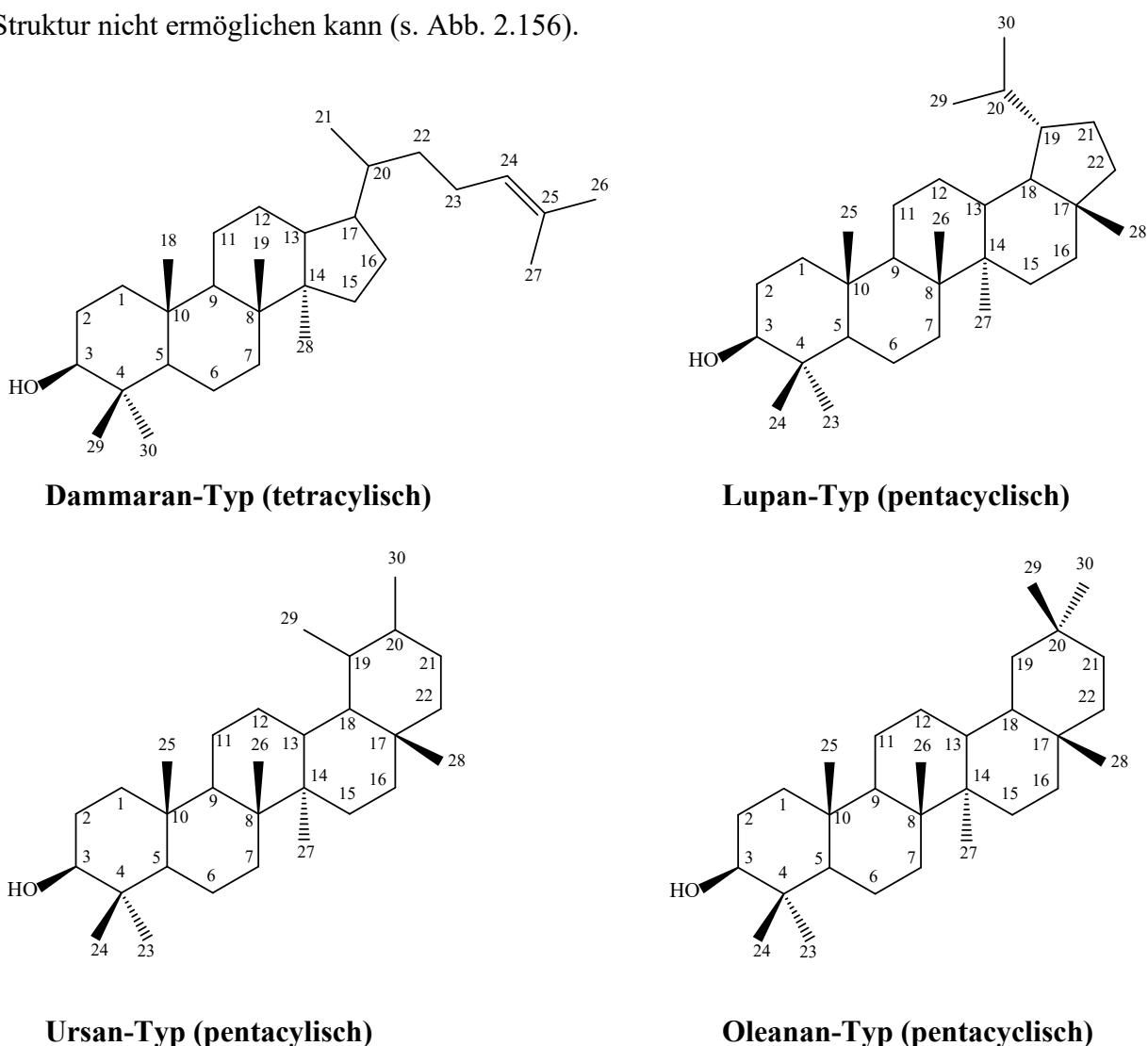


Abbildung 2.156: Grundgerüste häufig vorkommender Triterpene

Ein weiteres Signal bei $\delta = 3.20$ ppm tritt als Dublett vom Dublett in Erscheinung und korreliert mit dem Kohlenstoffsignal bei $\delta = 79.18$ ppm. Hierbei handelt es sich um das Methinproton des hydroxylierten Kohlenstoffs C-3 (Khalilov et al, 2003). Da keine weiteren Signale von ungesättigten bzw. oxygenierten Strukturelementen auftreten, kann auch kein tetracyclisches Triterpen vorliegen.

Sowohl beim Lupan- als auch beim Ursan-Typ besteht die Möglichkeit, dass einer Methylgruppe gemeinsam mit dem bindenden Methinkohlenstoff ein Wasserstoffäquivalent entzogen wurde. Bei Triterpenen vom Ursan-Typ kann die Doppelbindung zwischen C-19 und C-29 bzw. zwischen C-20 und C-30 angeordnet sein, bei Lupanen ist dies nur in der Isopropylseitenkette zwischen C-20 und C-29 bzw. C-30 möglich. Bei Lupanen führt das dazu, dass alle im Molekül vorhandenen Methylgruppen an quartären Kohlenstoffen gebunden sind, wodurch ihre Protonensignale als Singulets für drei Protonen auftreten müssen. Bei den Ursanen hingegen bleibt bei Einführung einer Doppelbindung eine der Methylgruppen an C-19 oder C-20 zusammen mit einem Wasserstoff am Ringkohlenstoff gebunden, wodurch sie zum Dublett aufspalten muss.

Tabelle 2.20: NMR Daten der Verbindung **13** (600 MHz in CDCl₃; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H NMR	¹³ C NMR	Taraxasterol (Choi, 2004)		Taraxasterol (Ma, 2008)	
1	0.94 m 1.72 m	38.92		38.8		38.82
2	1.59 m 1.62 m	27.55		27.4		26.90
3	3.20 dd (11.5;4.8)	79.18	3.21 d (br.) (10.5)	79.0	3.21 dd (11.2;4.4)	79.20
4	-	39.03		38.9		38.88
5	0.70 dd (11.0;1.8)	55.51		55.4		55.51
6	1.37 m 1.52 m	18.45		18.3		17.98
7	1.38 m	34.22		34.1		33.78
8	-	41.05		41.0		39.92
9	1.30 m	50.64		50.5		50.10
10	-	37.29		37.2		37.18
11	1.27 m 1.54 m	21.60		21.5		21.42
12	1.10 m 1.68 m	26.34		25.6		26.78
13	1.59 m	39.33		38.9		38.76
14	-	42.19		42.1		42.22
15	0.94 m 0.97 m	26.81		26.7		26.89
16	1.15 m 1.23 m	38.46		39.2		38.70
17	-	34.69		34.5		33.22
18	0.96 m	48.81		48.7		48.64
19	2.09 m	39.53		38.3		39.45
20	-	154.81		154.6		154.55
21	2.19 ddd (15.4;10.4;5.1) 2.44 m	25.77		25.5		35.42
22	1.35 m 1.41 m	39.02		39.4		38.76
23	0.970 s	28.13	0.98 s	28.0		27.95
24	0.767 s	15.53	0.78 s	15.4		15.59
25	0.850 s	16.43	0.86 s	15.9		16.81
26	1.019 s	16.04	1.03 s	16.3		16.08
27	0.930 s	14.91	0.94 s	14.8		14.63
28	0.854 s	19.63	0.86 s	26.2		19.26
29	1.017 d (6.7)	25.65	1.03 d (6.5)	19.5		25.42
30	4.60 t (2.4) 4.62 t (2.4)	107.28	4.62 s (br.) 4.60 s (br.)	107.1	4.54 4.66	107.12

Tabelle 2.21: Wichtige H,C-HMBC (^3J -Kopplungen) von Verbindung **13**

H-1 \Rightarrow C-3 u. C-2 (^2J) u. C-5 u. C-9 u. C-10 (^2J) u. C-25
H-2 \Rightarrow C-3 (^2J) u. C-10
H-3 \Rightarrow C-1 u. C-2 (^2J) u. C-5 u. C-23 u. C-24
H-5 \Rightarrow C-6 (^2J) u. C-7 u. C-9 u. C-23 u. C-24 u. C-25
H-6 \Rightarrow C-5 u. C-8 u. C-10
H-7 \Rightarrow C-6 (^2J) u. C-26
H-9 \Rightarrow C-1 u. C-5 u. C-7 u. C-8 (^2J) u. C-11 (^2J) u. C-12 u. C-14 u. C-25 u. C-26
H-11 \Rightarrow C-8 u. C-13
H-12 \Rightarrow C-9 u. C-11 (^2J) u. C-13 (^2J) u. C-14
H-13 \Rightarrow C-8 u. C-11 u. C-15 u. C-27
H-15 \Rightarrow C-13 u. C-17 u. C-27
H-16 \Rightarrow C-14 u. C-22 u. C-28
H-18 \Rightarrow C-12 u. C-14 u. C-22 u. C-28 u. C-29
H-19 \Rightarrow C-13 u. C-18 (^2J) u. C-20 (^2J) u. C-21 u. C-30
H-21 \Rightarrow C-17 u. C-19 u. C-30 u. C-20 (^2J)
H-22 \Rightarrow C-20 u. C-21 (^2J) u. C-28
H-23 \Rightarrow C-3 u. C-4 (^2J) u. C-5 u. C-24
H-24 \Rightarrow C-3 u. C-4 (^2J) u. C-5 u. C-23
H-25 \Rightarrow C-1 u. C-5 u. C-9 u. C-10 (^2J)
H-26 \Rightarrow C-7 u. C-8 (^2J) u. C-9 u. C-14
H-27 \Rightarrow C-8 u. C-13 u. C-14 (^2J) u. C-15
H-28 \Rightarrow C-22
H-29 \Rightarrow C-19 (^2J) u. C-20 u. C-30 (^4J)
H-30 \Rightarrow C-19 u. C-21

Im Protonenspektrum von **13** finden sich im Hochfeldbereich die Signale für sieben Methylgruppen. Trotz teilweiser Überlagerung der Signale durch andere Protonen, lassen sich sechs Signale bei $\delta = 0.767$ (H-24), 0.850 (H-25), $0,854$ (H-28), 0.970 (H-23) und 1.019 (H-26) als Singulett für drei Protonen an einer Methylgruppe erkennen. Die zugehörigen Kohlenstoffe ließen sich aufgrund der Korrelationen im HSQC eindeutig zuordnen (s. Abb. 2.165). Das Protonensignal der siebten Methylgruppe tritt als Dublett bei 1.017 ppm auf, die Kopplungskonstante beträgt 6.7 Hz. Bei Verbindung **13** muss es sich daher um ein Triterpen vom Ursan-Typ handeln. Die Positionen der exocyclischen Methylengruppe bzw. der Methylgruppe an C-19 oder C-20 kann aus den Kreuzsignalen im COSY- und HMBC-

Spektrum (s. Abb. 2.157 und 2.169) abgeleitet werden. Wenn die exocyclische Methylengruppe an C-19 gebunden wäre, müsste man ^3J -Kopplungen im HMBC-Spektrum zu den Methinkohlenstoffen C-18 und C-20 finden, an letzterem wäre dann die Methylgruppe gebunden. Im Spektrum von **13** findet man ausgehend von den Methylenprotonen zwei Crosspeaks zu den Kohlenstoffen bei $\delta = 25.77$ und 39.53 ppm. Das erste der beiden Signale koppelt im HSQC mit zwei Protonen bei $\delta = 2.19$ und 2.44 ppm, es handelt sich demnach um eine Methylengruppe, zu der die exocyclischen Methylenprotonen über drei Bindungen koppeln. Damit kann diese nicht an C-19 gebunden sein, sie befindet sich daher am C-20, wodurch klar wird, dass die zum Dublett aufspaltenden Methylprotonen (H-29, $\delta_{\text{H}} = 1.017$; $\delta_{\text{C}} = 25.65$) mit dem H-19 koppeln ($\delta_{\text{H}} = 2.09$; $\delta_{\text{C}} = 39.53$). Ausgehend vom Protonensignal von H-3 ($\delta_{\text{H}} = 3.20$) lassen sich die Methylkohlenstoffe C-23 ($\delta_{\text{H}} = 0.97$; $\delta_{\text{C}} = 28.13$) und C-24 ($\delta_{\text{H}} = 0.767$; $\delta_{\text{C}} = 14.91$) sowie C-1 ($\delta_{\text{H}} = 0.94$; $\delta_{\text{C}} = 38.92$) lokalisieren. Tatsächlich ist es möglich auf diese Art und Weise alle Protonen- und Kohlenstoffsignale von Verbindung **13** zuzuordnen (s. Tab. 2.21 und Abb. 2.157 – 2.173).

Bei Verbindung **13** handelt es sich um das Taraxasterol, das bereits häufig in der Natur gefunden wurde. Die Verbindung wurde zum ersten Mal im Jahre 1912 von Power und Browning als Inhaltsstoff der Löwenzahnwurzel von *Taraxacum officinale*, Asteraceae beschrieben. Auch vom Taraxasterol ist es nicht leicht, geeignete NMR Daten zum Vergleich zu finden. In Tabelle 2.20 sind die Daten von Choi et al. (2004) und Ma et al. (2008) gelistet. Beide haben nur wenige Protonendaten angegeben und die Zuordnung der Kohlenstoffsignale ist unterschiedlich. Wie man im Vergleich zu unserer, durch die Korrelationen abgesicherten Zuordnung der Kohlenstoff- und Protonensignale sehen kann, stimmen die Daten insgesamt sehr gut überein. Wir können daher erstmals die korrekt zugeordneten Daten angeben.

Taraxasterol ist bisher weder in der Gattung *Volutaria* noch in der Gattung *Amberboa* gefunden worden. Als Inhaltsstoff von *Centaurea*-Arten ist die Substanz häufiger beschrieben worden (Gonzalez et al, 1983).

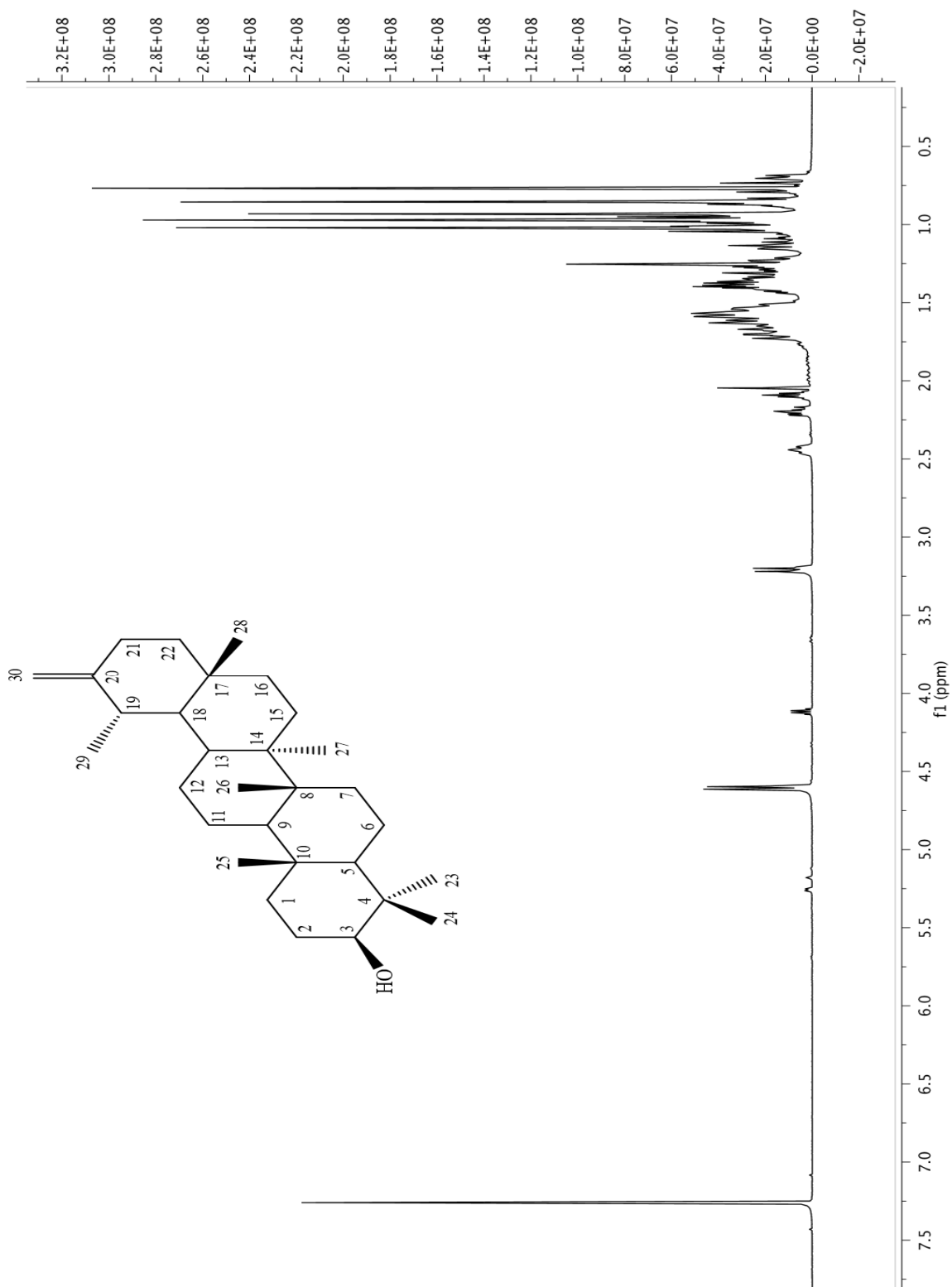


Abbildung 2.157: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung 13 (600 MHz in CDCl_3)

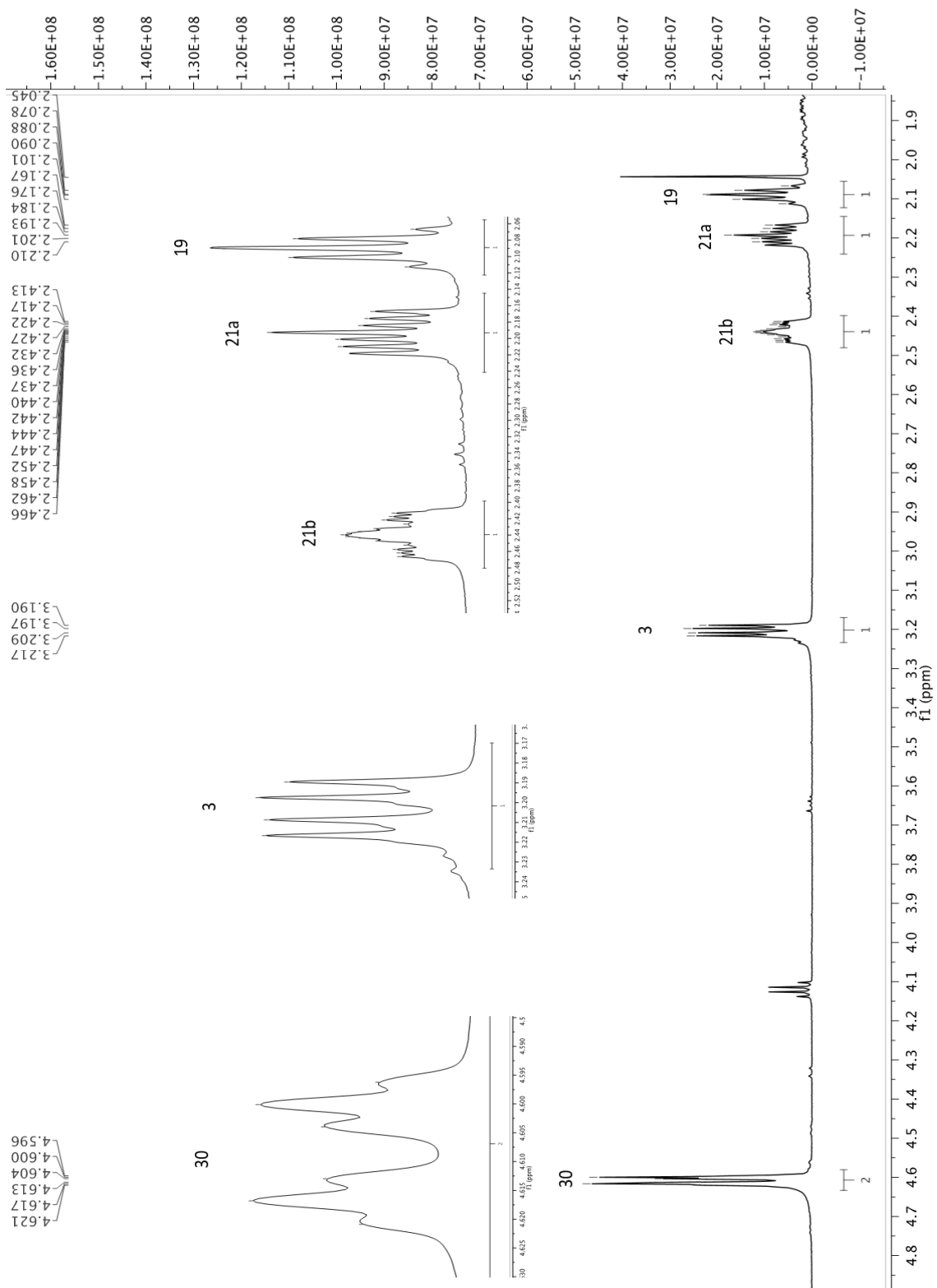


Abbildung 2.158: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung 13
(600 MHz in CDCl_3)

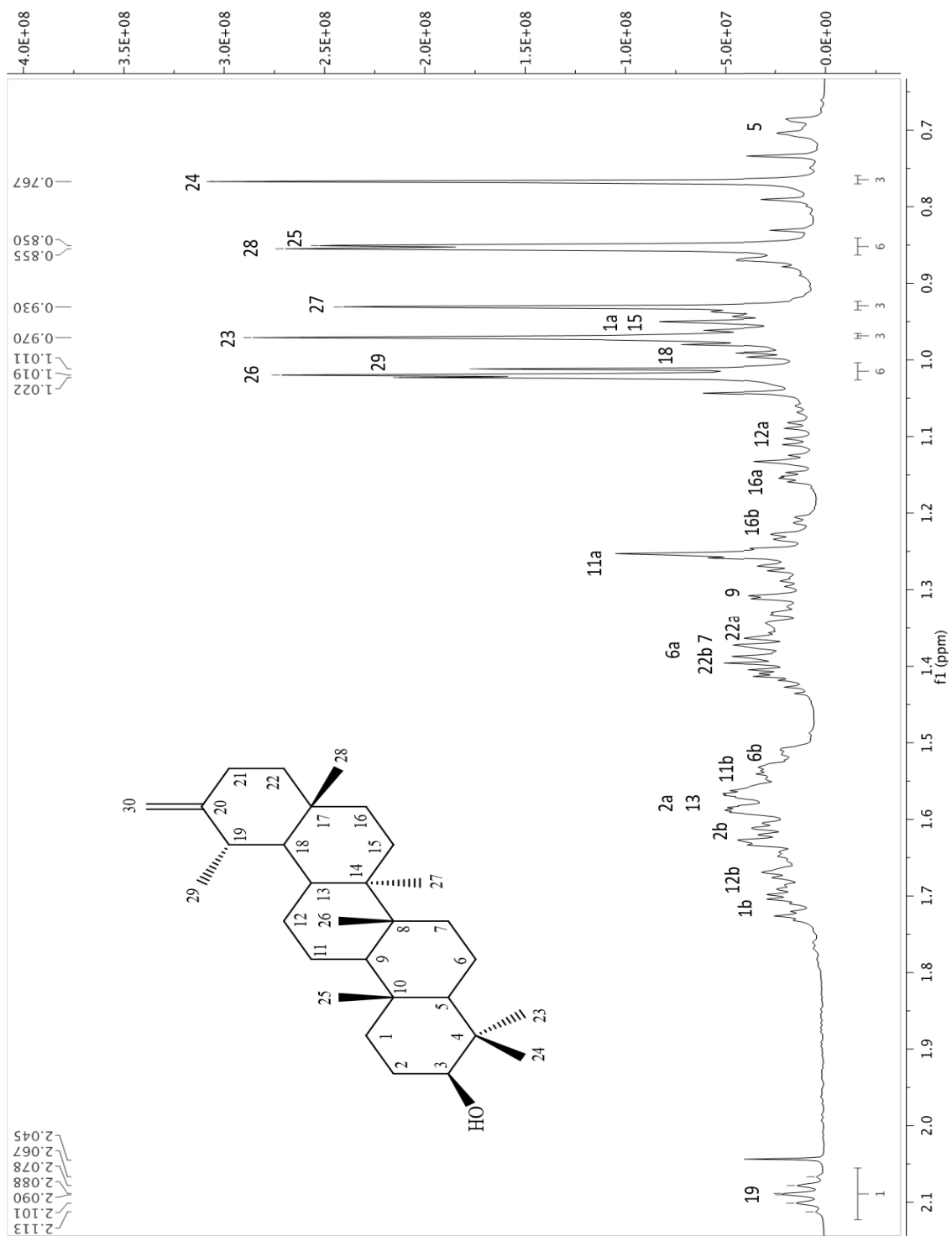


Abbildung 2.159: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR Spektrum von Verbindung **13**
(600 MHz in CDCl₃)

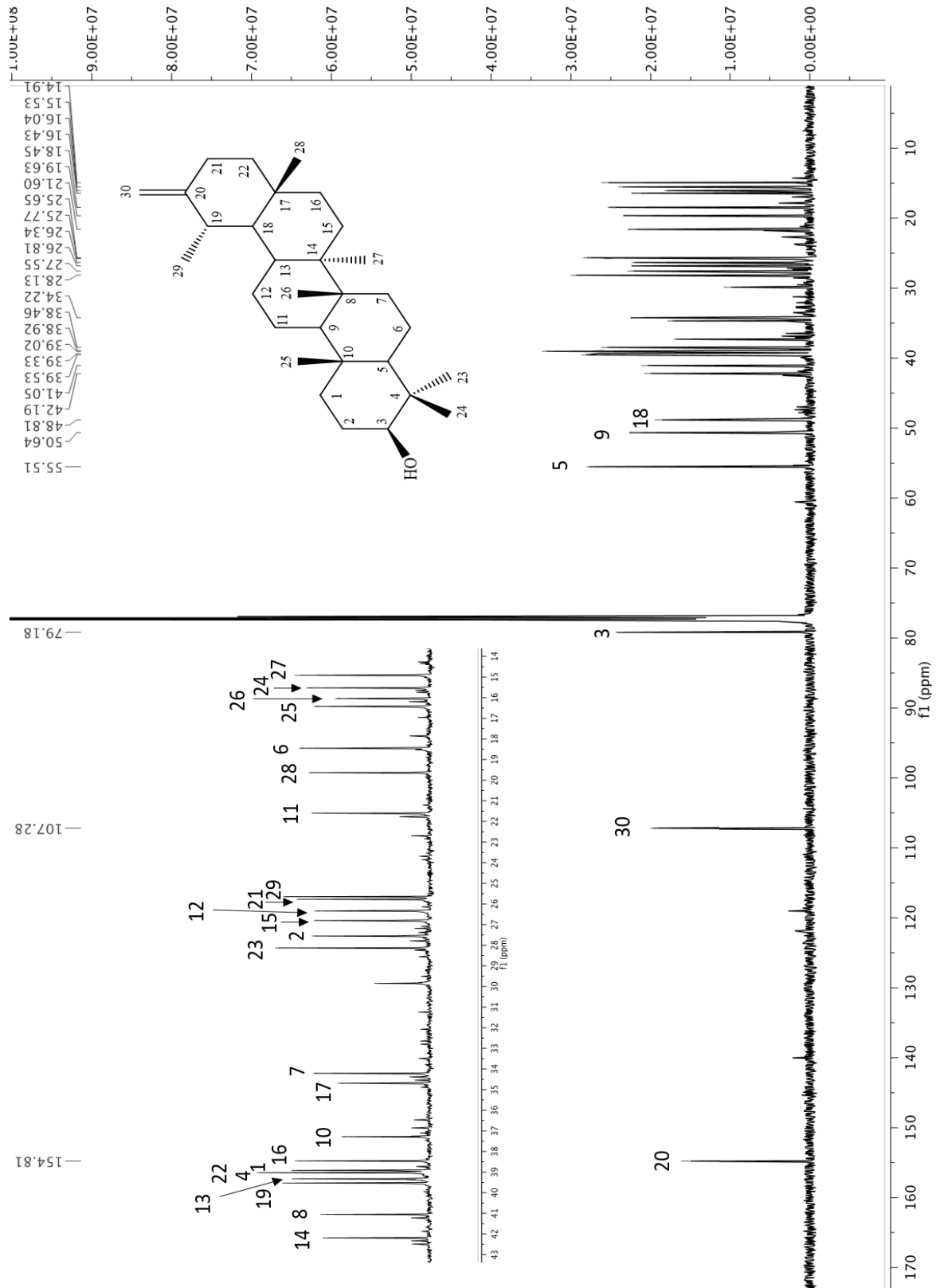


Abbildung 2.160: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **13** (150 MHz in CDCl_3)

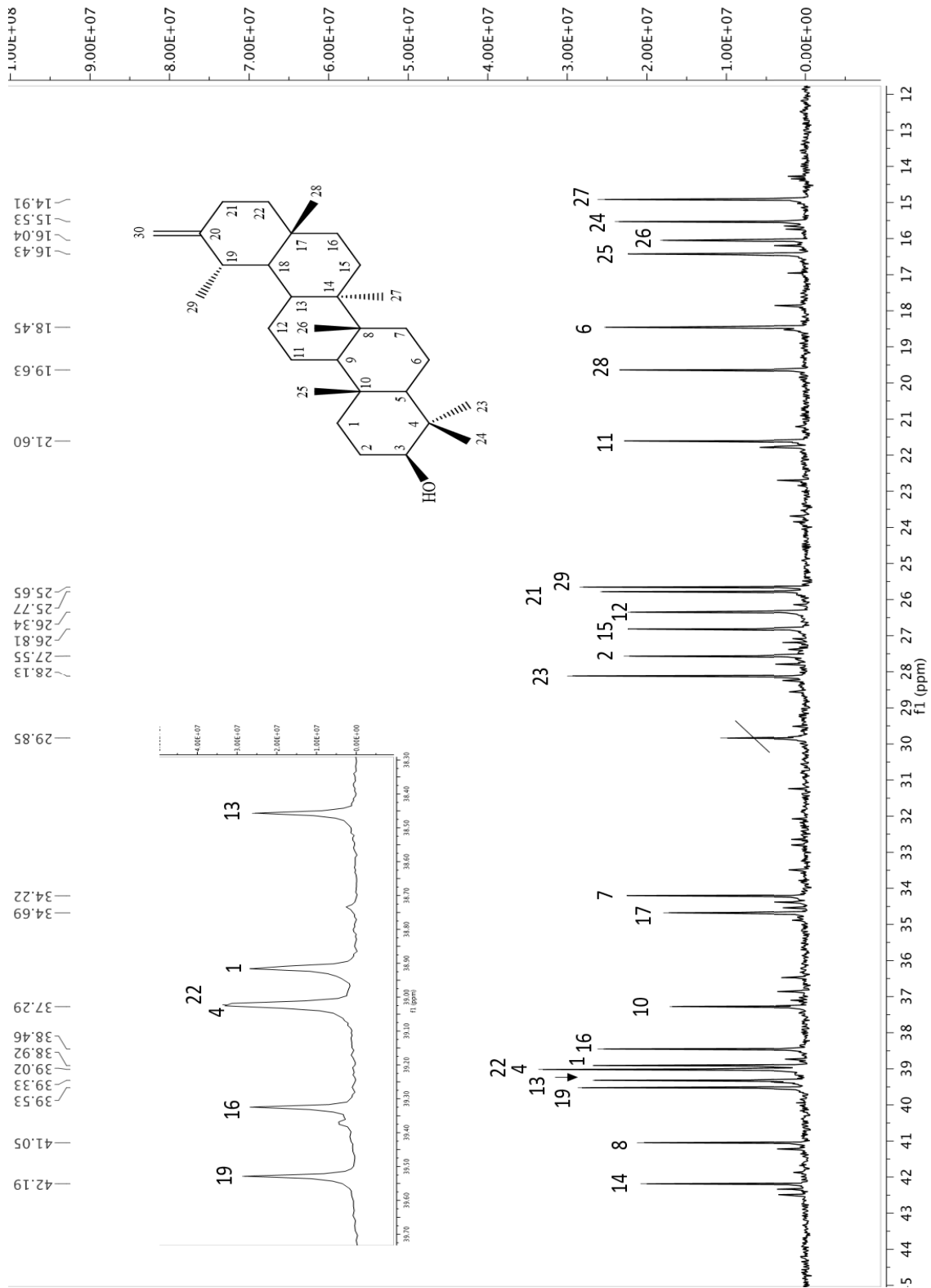


Abbildung 2.161: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 13
(150 MHz in CDCl_3)

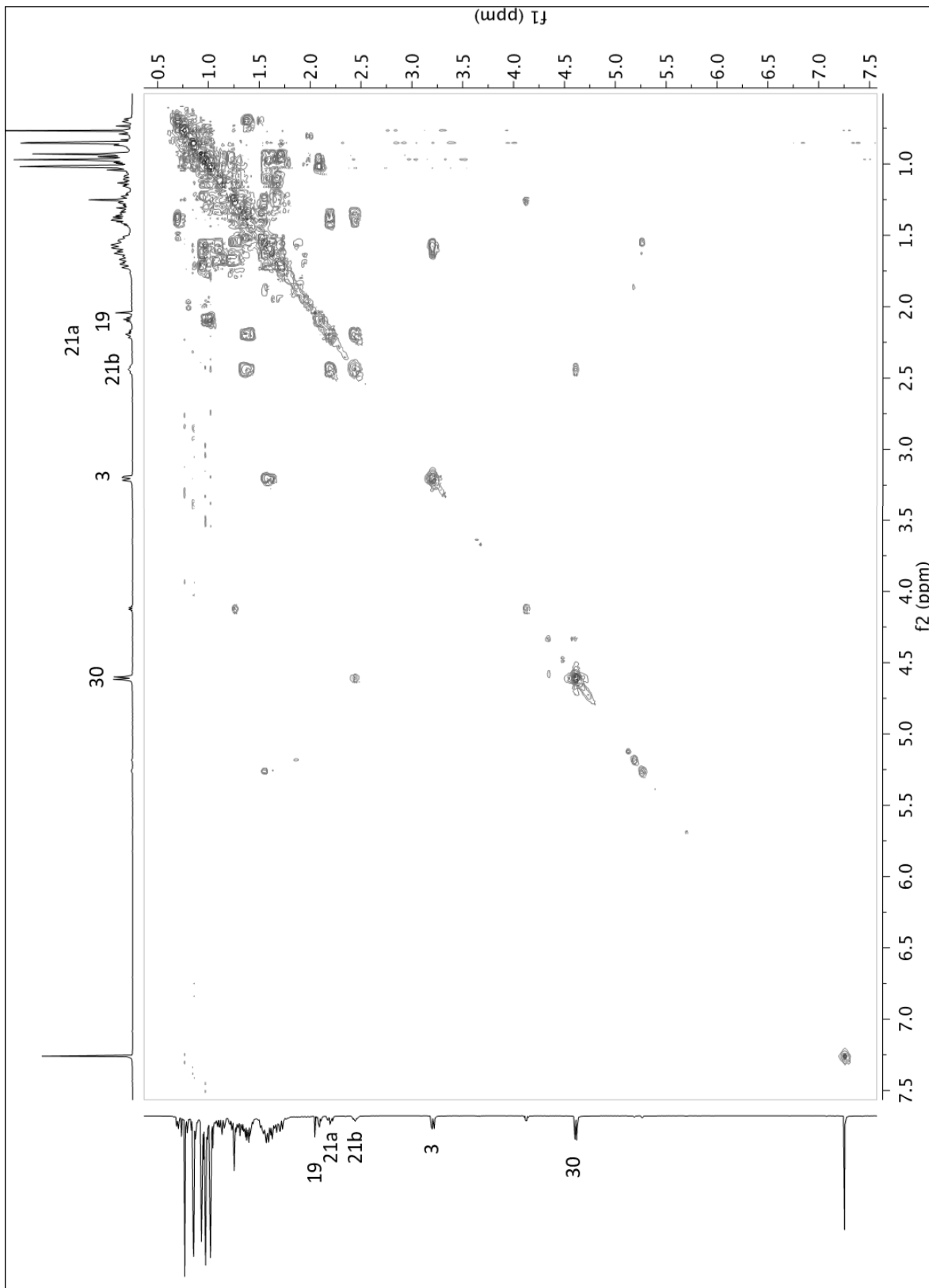


Abbildung 2.162: 2D-COSY-Spektrum von **13** (600 MHz in CDCl₃)

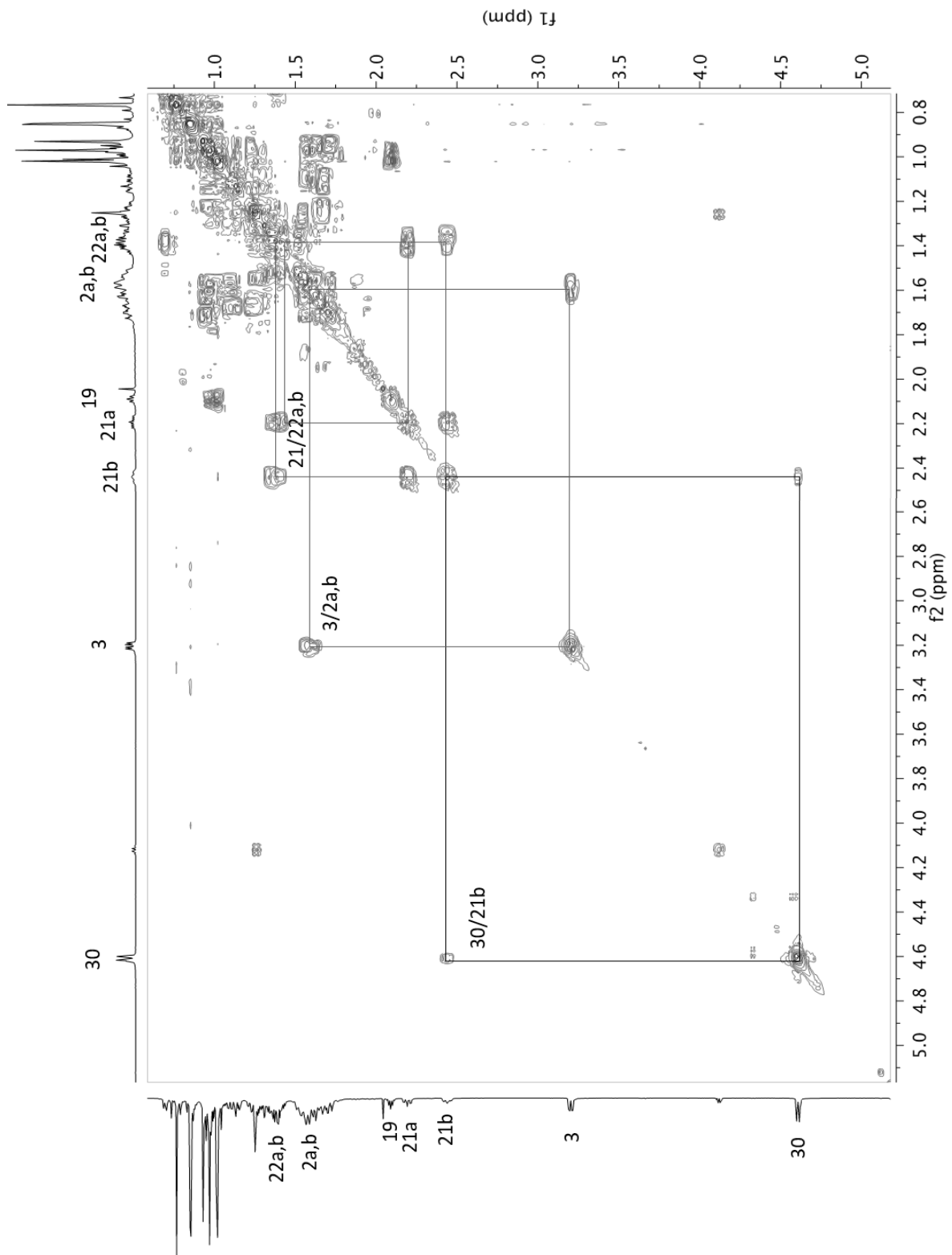


Abbildung: 2.163: Ausschnitt aus dem 2D-COSY-Spektrum von **13** (600 MHz in CDCl_3)



Abbildung 2.164: Ausschnitt aus dem 2D-COSY-Spektrum von **13** (600 MHz in CDCl_3)

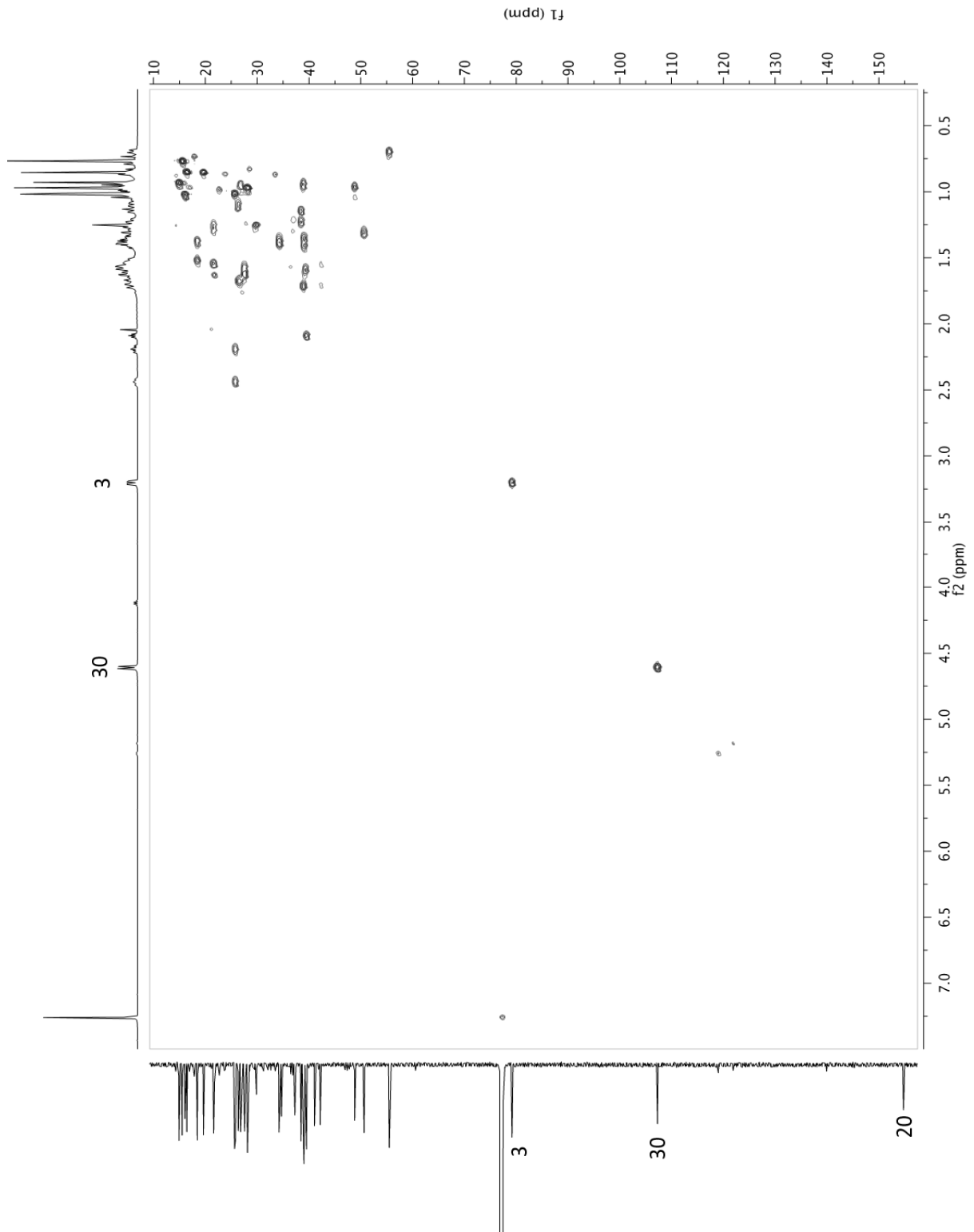


Abbildung 2.165: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 13 (600 MHz in CDCl_3)

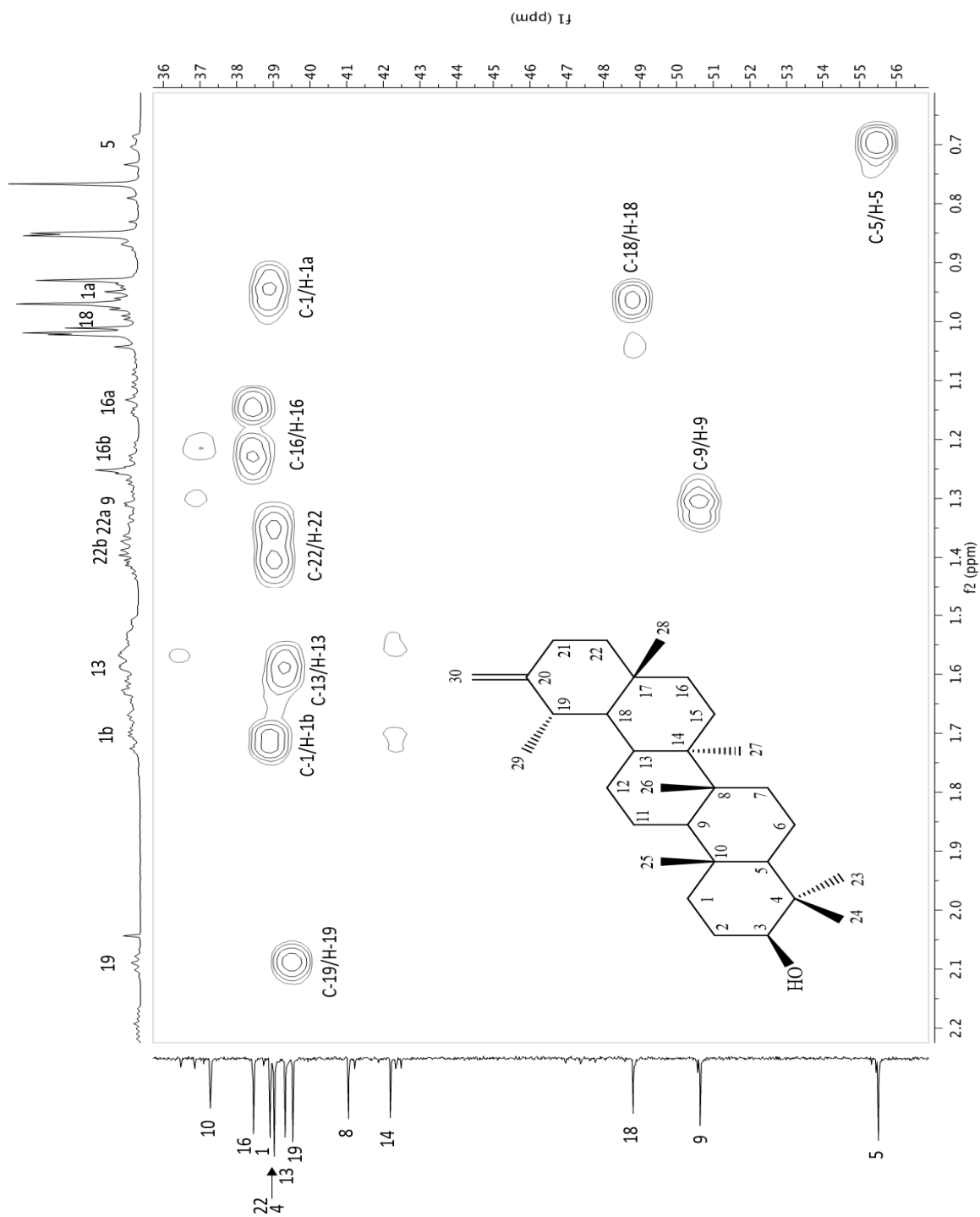


Abbildung 2.166: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **13** (600 MHz in CDCl_3)

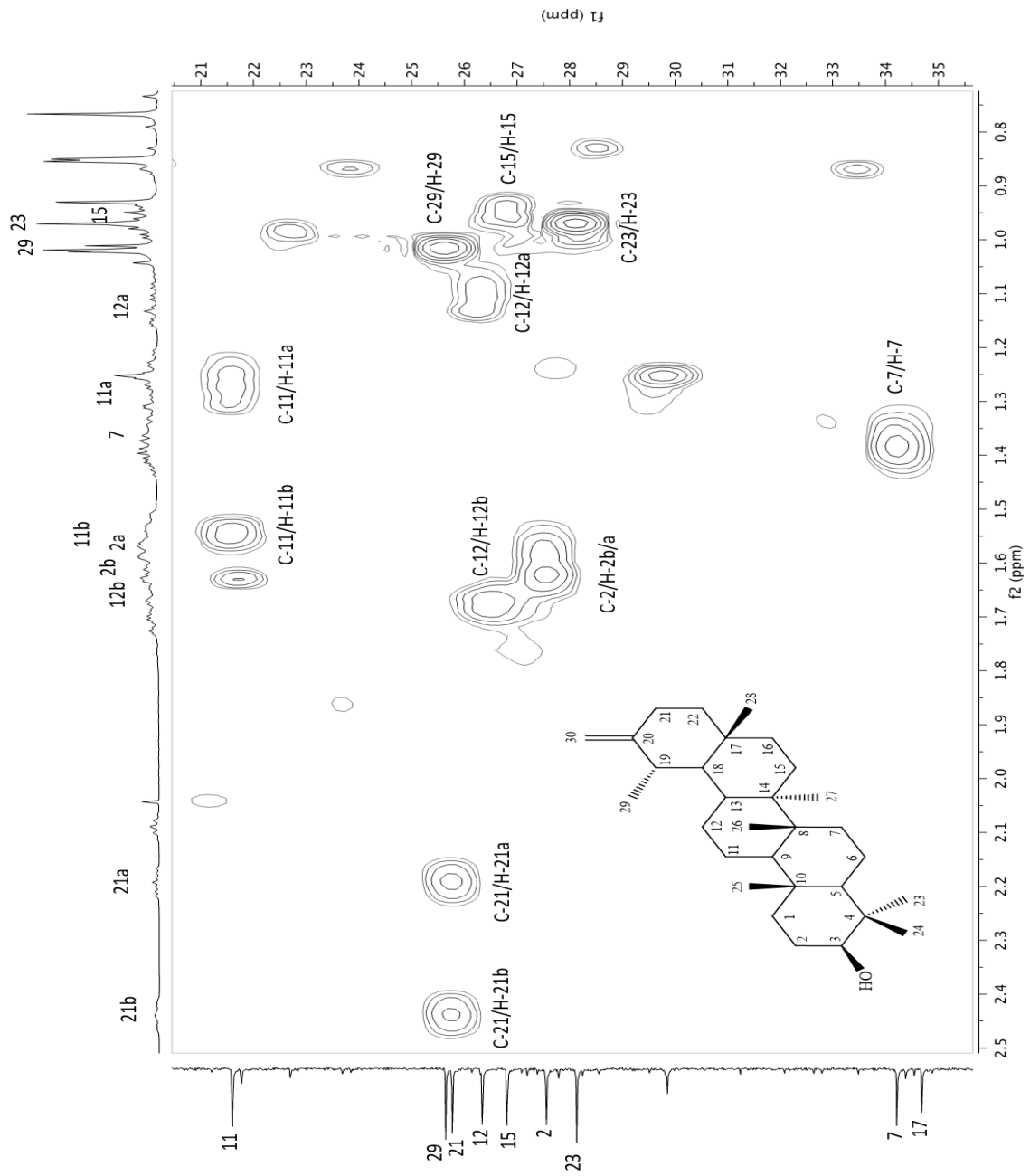


Abbildung 2.167: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 13
(600 MHz in CDCl_3)

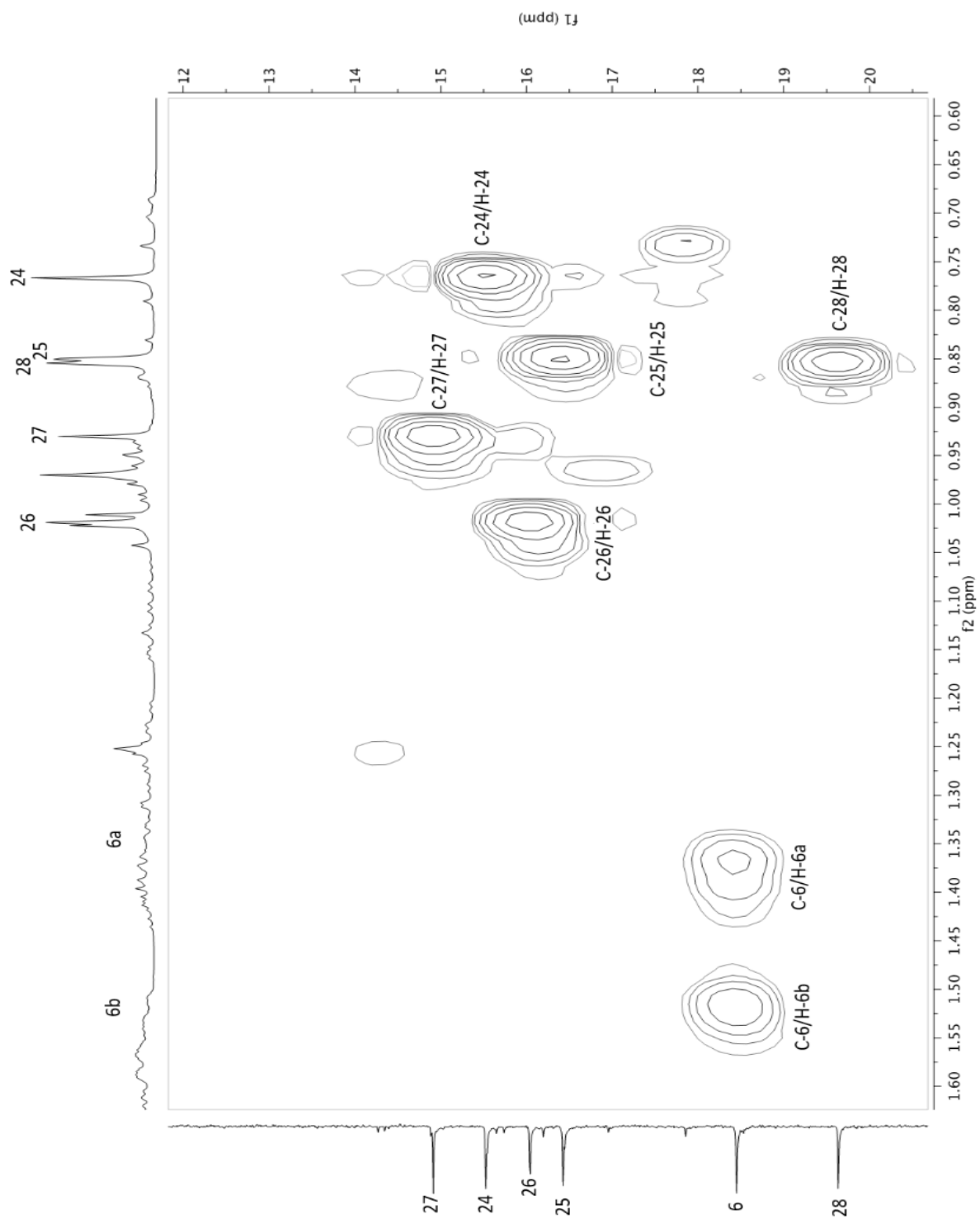


Abbildung 2.168: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **13** (600 MHz in CDCl_3)

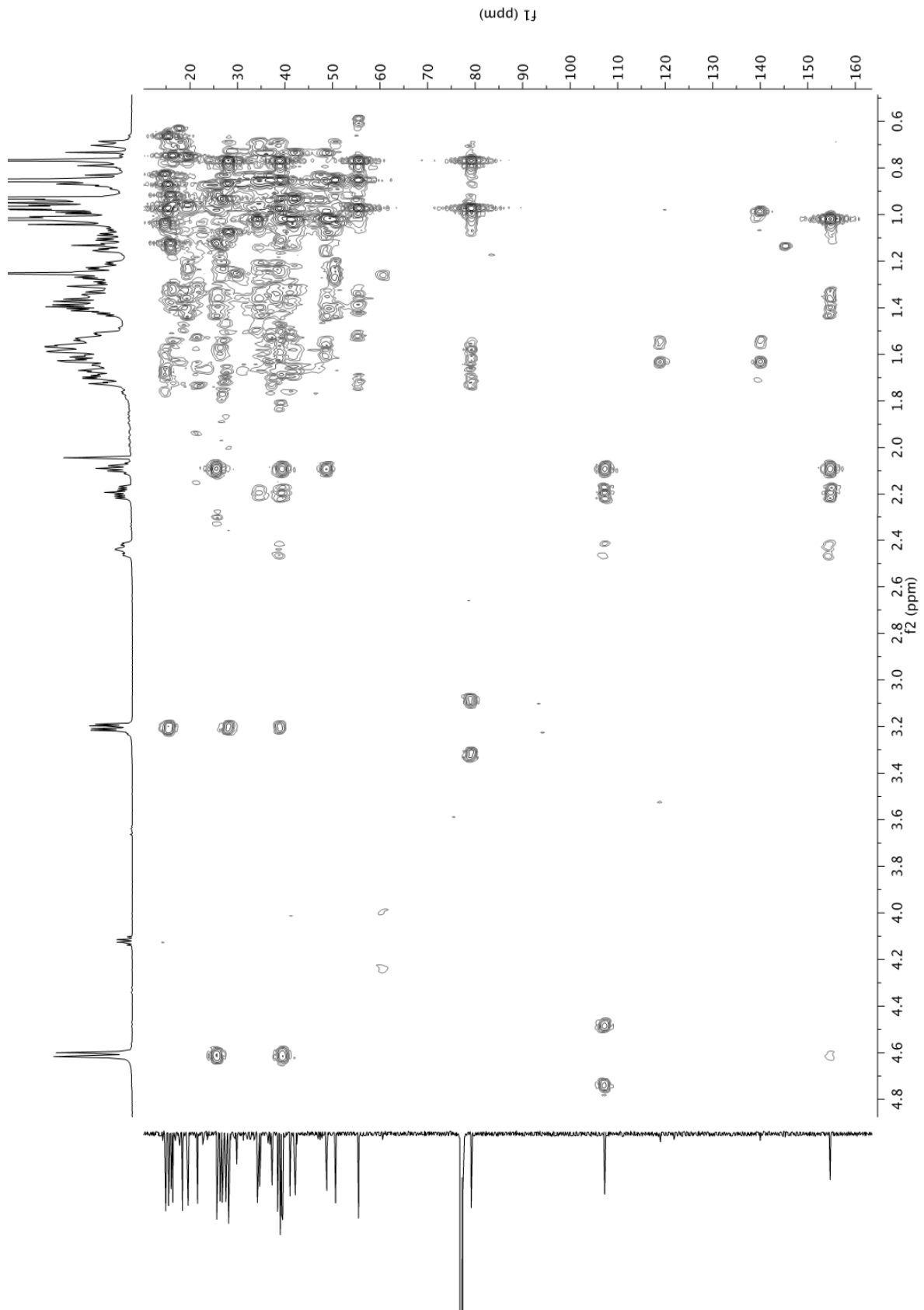


Abbildung 2.169: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 13 (600 MHz in CDCl₃)

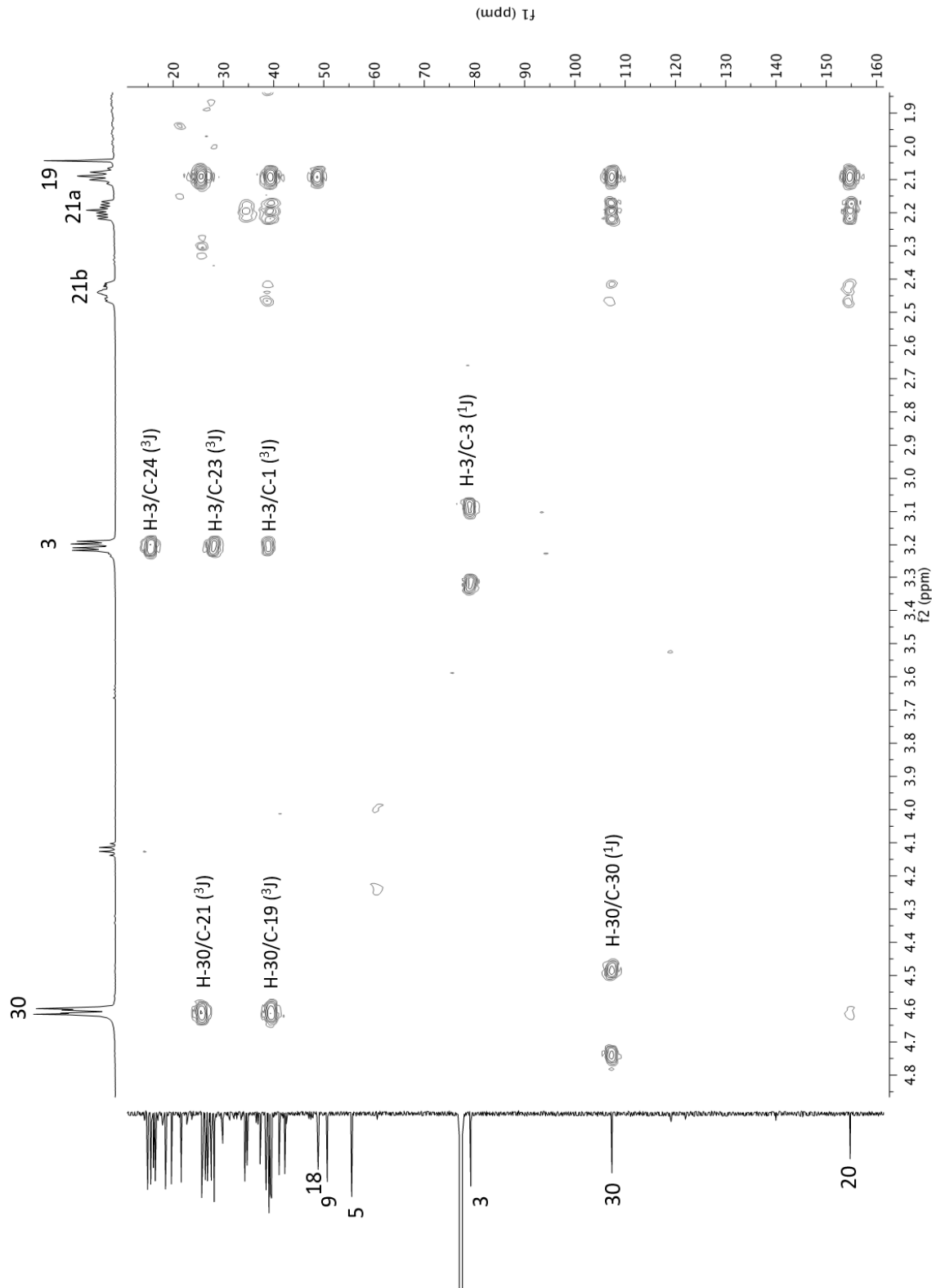


Abbildung 2.170: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **13** (600 MHz in CDCl_3)

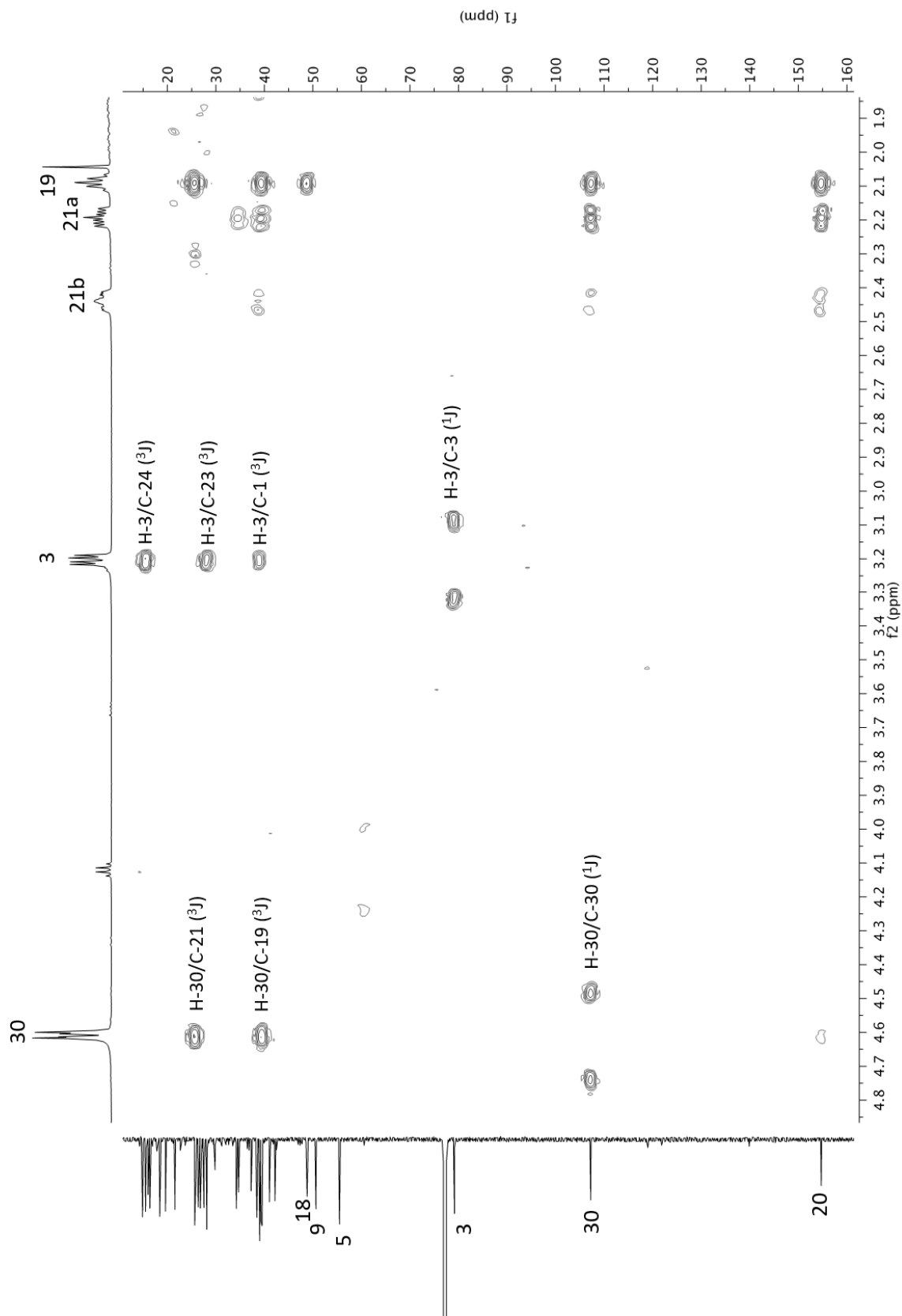


Abbildung 2.171: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 13 (600 MHz in CDCl_3)

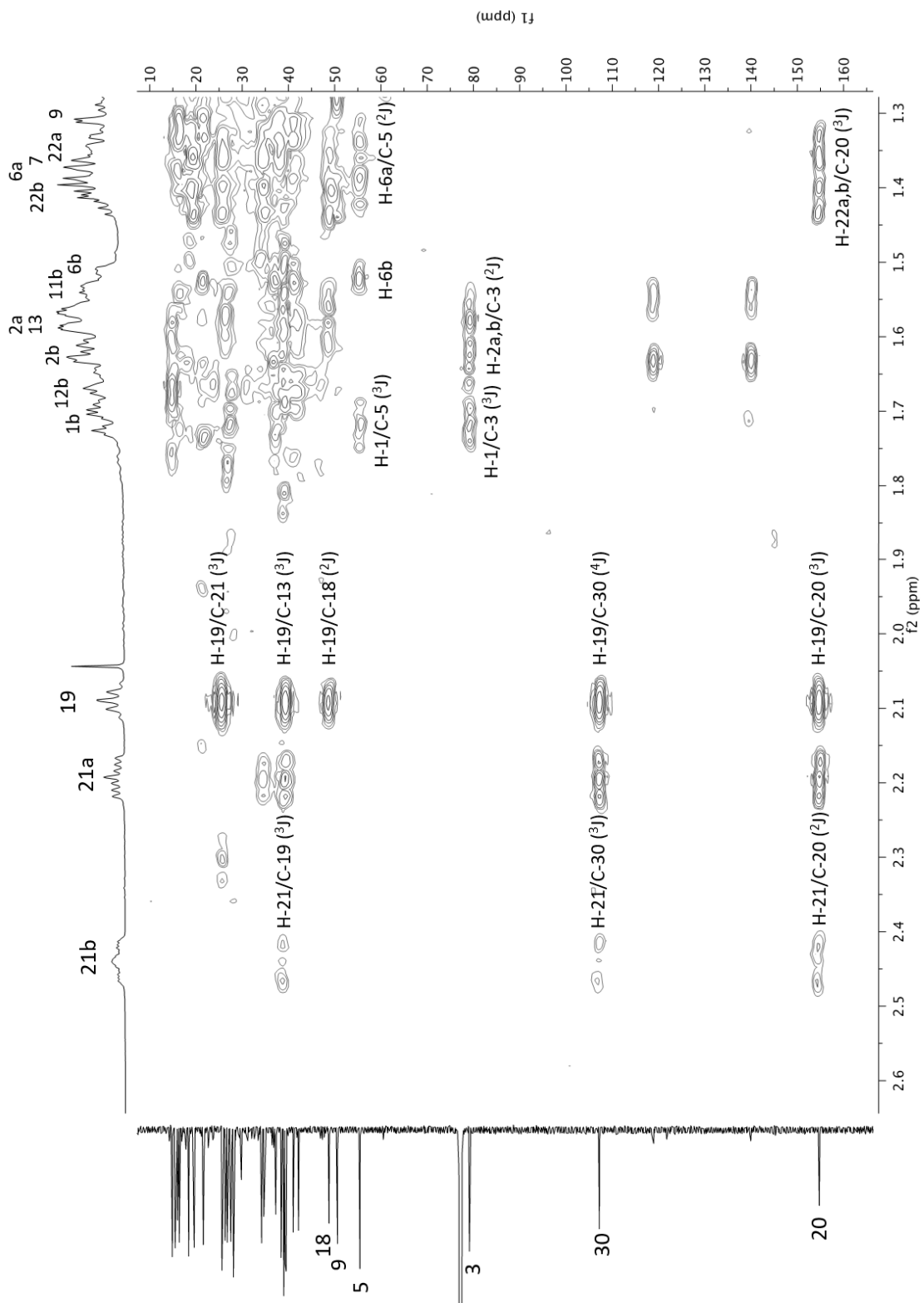


Abbildung 2.172: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **13** (600 MHz in CDCl_3)

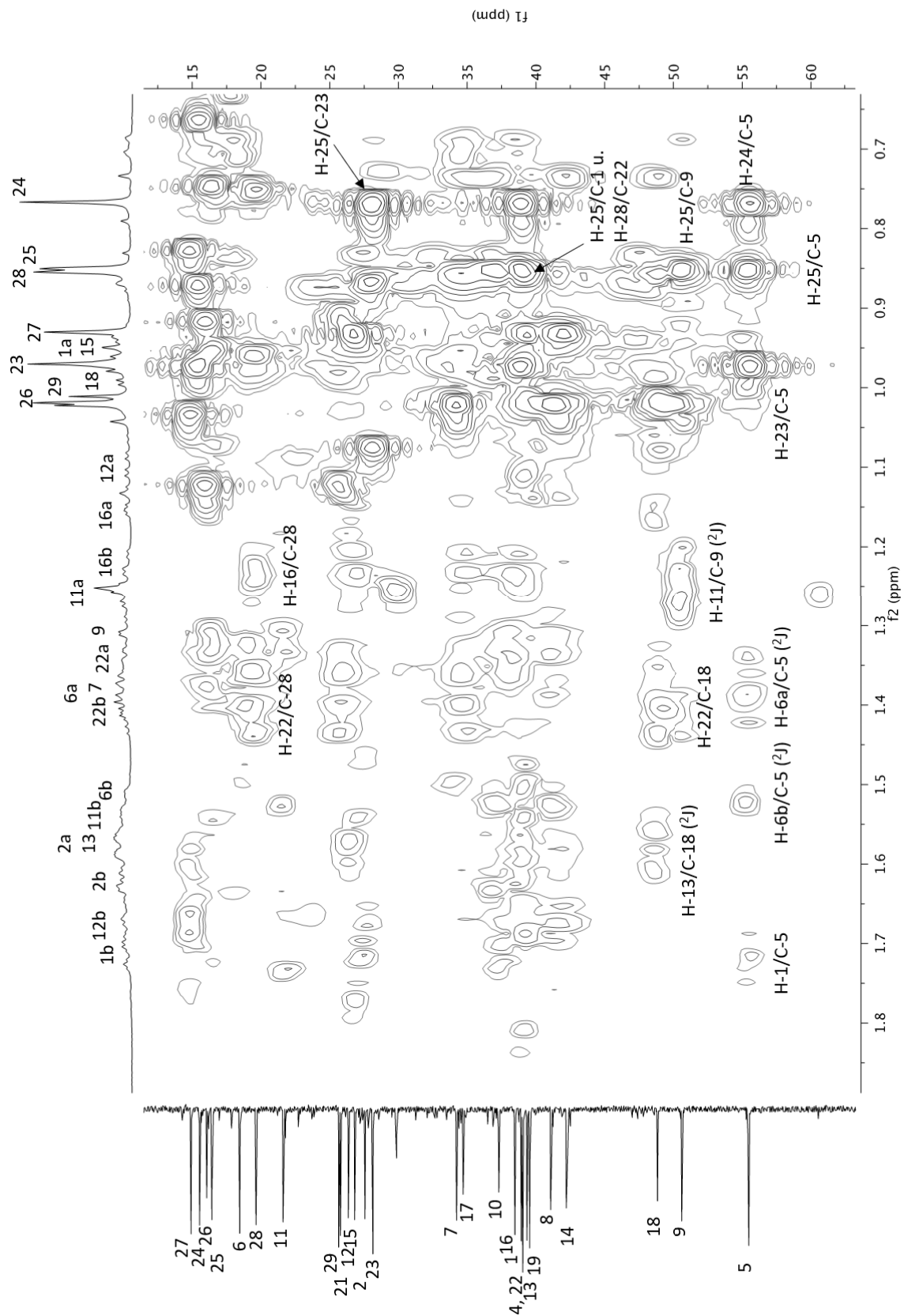
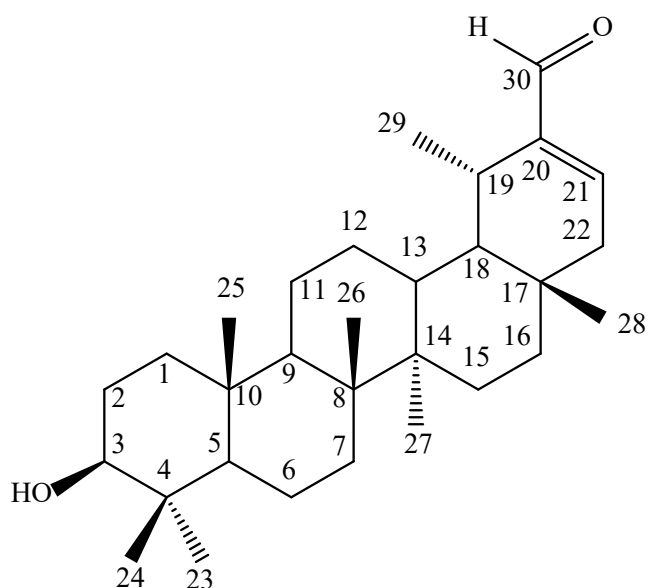


Abbildung 2.173: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 13 (600 MHz in CDCl_3)

2.2.12 Verbindung 14 (Pseudotaraxasterol-30-aldehyd)



Verbindung **14** fiel in Fraktion V.b.8.9.K wegen der Ähnlichkeiten im Detektionsverhalten im Vergleich zu Verbindung **13** auf. Durch Auskristallisation konnten 7,4 mg (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3) gewonnen werden. Im HPLC betrug die Retentionszeit von **14** 37,96 min. (s. Exp. Teil Kap. 5.2.4). Das bei der HPLC aufgenommene UV-Spektrum zeigte ein Maximum bei $\lambda = 209$. Abbildung 2.174 (S. 270) zeigt das EI-Massenspektrum von **14** mit dem Molekülion bei $m/z = 440$ erkennen. In Analogie zum Massenspektrum von **13** kann aufgrund der intensiven Fragmente bei $m/z = 207$ und 189 angenommen werden, dass es sich auch bei **14** um ein Triterpen handelt. Das Molekulargewicht von Verbindung **14** ist um vierzehn Masseneinheiten höher als das von Taraxasterol (**13**). Eine solche Massendifferenz würde beispielsweise bei der Methylierung der OH-Gruppe an C-3 entstehen, oder durch oxidative Einführung eines weiteren Sauerstoffatoms unter Entfernung eines Wasserstoffäquivalents (16-2). Da Methylether von Oleananen oder Ursanen bisher noch nicht gefunden wurden, ist die Oxidation eines Triterpens ausgehend von der Masse von Taraxasterol eher wahrscheinlich.

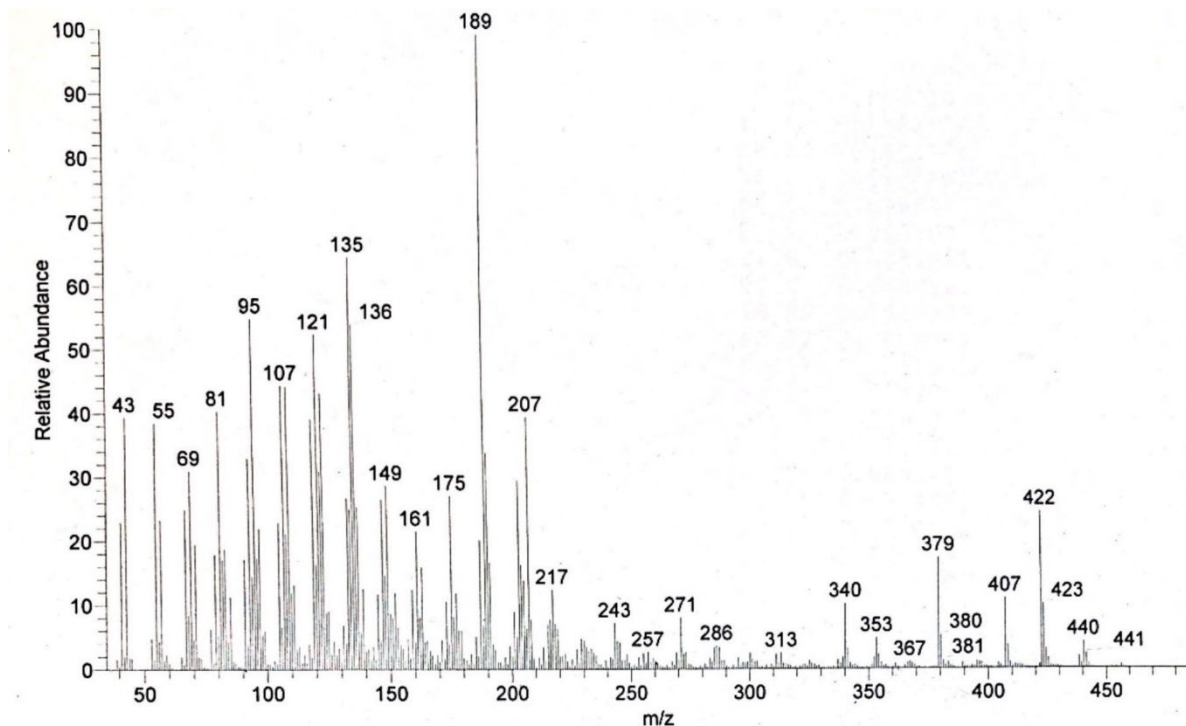


Abbildung 2.174: EI-Massenspektrum von **14**

Auch von **14** wurden 1D- und 2D-NMR-Spektren in Chloroform- d_4 aufgenommen (s. Abb. 2.175 - 2.189, S. 275 - 289). Im ^{13}C -NMR-Spektrum (s. Abb. 2.178) fällt ein sehr weit ins tiefe Feld verschobenes Signal bei $\delta = 194.44$ ppm auf, dessen Kopplung mit dem Proton bei $\delta = 9.37$ ppm man im HSQC-Spektrum sehen kann (s. Abb. 2.184). Aufgrund der Lage der Signale lässt sich vermuten, dass diese von einem Aldehyd verursacht wurden, was die zuvor bei Auswertung des Massenspektrums gemachten Überlegungen unterstützt. Das hier zusätzlich aufgenommene ^{13}C -DEPT-Spektrum zeigt die Signale für neun Methylen- und vierzehn Methin- bzw. Methylkohlenstoffe. Da sich keine Signale im Bereich von Methylethern in den Spektren finden und die Aldehydsignale auf die Oxidation einer Methylgruppe hindeuten, sollte **14** ebenfalls 30 Kohlenstoffe besitzen, so dass in dieser Verbindung sieben quartäre C-Atome enthalten sein müssen. Im Vergleich zum Taraxasterol (**13**) besitzt Verbindung **14** einen quartären Kohlenstoff mehr und zwei Methylengruppen weniger. Ein Vergleich der ^{13}C -NMR Spektren von **13** und **14** zeigt, dass es keine exocyclische Methylengruppe an C-20 gibt, weil im Spektrum von **14** keine Signale bei $\delta_{\text{C}} = 107.28$ und $\delta_{\text{H}} = 4.6$ ppm vorhanden sind.

Tabelle 2.22: NMR Daten der Verbindung **14** (600 MHz in CDCl₃; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H	¹³ C	DEP T	Literaturwert (Triana et al., 2011)		Literaturwert (Reynolds,W.F. et al 1986)	
1	0.94 m 1.72 m	38.90	CH ₂	0.88-0.92 m 1.70-1.74 m	38.7	0.95 t 1.73 d	38.77
2	1.59 m 1.65 m	27.43	CH ₂	1.60-1.68	27.4	1.58 q 1.64 d	27.41
3	3.20 dd (11.6;4.7)	79.16	CH	3.22 dd (11.1;5.4)	79.0	3.19 dd	78.98
4	-	39.01	C		38.8	-	39.86
5	0.69 m	55.46	CH	0.70-0.75	55.3	0.70 d	55.31
6	1.38 m 1.53 m	18.43	CH ₂	1.35-1.39 1.51-1.61	18.2	1.35 q 1.52 d	18.31
7	1.39 m	34.35	CH ₂	1.40-1.42	34.2	1.37 m 1.41 m	34.25
8	-	41.18	C		40.9	-	41.08
9	1.29 m	50.45	CH	1.28-1.30	50.3	1.30 d	50.43
10	-	37.26	C		37.1	-	37.10
11	1.26 m 1.55 m	21.58	CH ₂	1.28-1.32	21.4	1.26 q 1.58 d	21.56
12	1.25 m 1.62 m	27.55	CH ₂	1.28-1.32 1.73-1.77	27.2	1.23 q 1.62 d	27.64
13	1.65 m	39.17	CH	1.73-1.77	39.0	1.61 t	39.23
14	-	42.41	C		42.3	-	42.34
15	0.95 m 1.78 dd (13.7;4.6)	27.03	CH ₂	1.07-1.11 1.66-1.69	26.8	1.01 d 1.78 t	27.04
16	1.32 m 1.40 m	36.63	CH ₂	2.04 d (6.1)	29.3	1.21 t 1.31 d	36.71
17	-	34.95	C		34.8	-	34.39
18	1.13 dd (11.0;8.1)	48.36	CH	1.15 dd (10.6;8.1)	48.2	1.04 t	48.72
19	2.26 t (7.1)	29.52	CH	2.25-2.31	29.7	1.57 m	36.32
20	-	148.58	C	-	148.5	-	139.81
21	6.71 dd (7.0;2.6)	149.36	CH	6.73 dd (6.0;3.2)	149.3	5.25 d	118.89
22	2.02 m	43.17	CH ₂	1.35 s	43.0	1.56 d 1.72 d	42.18
23	0.974 s	28.14	CH ₃	0.79 s	28.0	0.98 s	28.00
24	0.77 s	15.53	CH ₃	0.87 s	16.3	0.78 s	15.40
25	0.85 s	16.42	CH ₃	0.99 s	16.0	0.86 s	16.30
26	1.03 s	16.13	CH ₃	1.05 s	15.4	1.04 s	16.06
27	0.969 s	14.87	CH ₃	0.99 s	14.7	0.95 s	14.75
28	0.67 s	17.66	CH ₃	0.69 s	17.5	0.73 s	17.71
29	1.02 d (6.4)	23.32	CH ₃	1.04 d (7.3)	23.1	0.99 d	22.54
30	9.37 s	194.44		9.39 s	194.1	1.64 s	21.66

Tabelle 2.23: Wichtige H,C-HMBC (^3J -Kopplungen) von Verbindung 14

H-1 \Rightarrow C-2 (^2J) u. C-3 u. C-5 u. C-9 u. C-25
H-2 \Rightarrow C-1 (^2J) u. C-3 (^2J) u. C-4
H-3 \Rightarrow C-1 u. C-2 (^2J) u. C-4 (^2J) u. C-23 u. C-24
H-5 \Rightarrow C-1 u. C-4 (^2J) u. C-6 (^2J) u. C-7 u. C-9 u. C-10 u. C-23 u. C-24 u. C-25
H-6 \Rightarrow C-4 u. C-5 (^2J) u. C-7 (^2J) u. C-8 u. C-10
H-7 \Rightarrow C-5 u. C-6 (^2J) u. C-8 (^2J) u. C-9 u. C-26
H-9 \Rightarrow C-7 u. C-8 (^2J) u. C-10 (^2J) u. C-11 (^2J) u. C-12 u. C-14 u. C-25 u. C-26
H-11 \Rightarrow C-8 u. C-10 u. u. C-12 (^2J) u. C-13
H-12 \Rightarrow C-11 (^2J) u. C-18
H-13 \Rightarrow C-12 (^2J) u. C-15 u. C-18 (^2J)
H-15 \Rightarrow C-8 u. C-13 u. C-14 (^2J) u. C-16 (^2J) u. C-27
H-16 \Rightarrow C-14 u. C-15 (^2J) u. C-17 (^2J) u. C-18 u. C-22 u. C-28
H-18 \Rightarrow C-12 u. C-13 (^2J) u. C-14 u. C-17 (^2J) u. C-19 (^2J) C-20 u. C-22 u. C-28 u. C-29
H-19 \Rightarrow C-13 u. C-18 (^2J) u. C-20 (^2J) u. C-21
H-21 \Rightarrow C-17 u. C-19 u. C-30
H-22 \Rightarrow C-16 u. C-18 u. C-17 (^2J) u. C-20 u. C-21 (^2J) u. C-28
H-23 \Rightarrow C-3 u. C-4 (^2J) u. C-5 u. C-24
H-24 \Rightarrow C-3 u. C-4 (^2J) u. C-5 u. C-23
H-25 \Rightarrow C-1 u. C-5 u. C-9 u. C-10 (^2J)
H-26 \Rightarrow C-7 u. C-9 u. C-14
H-27 \Rightarrow C-8 u. C-13 u. C-15
H-28 \Rightarrow C-16 u. C-17 (^2J) C-18 u. C-22
H-29 \Rightarrow C-18 u. C-19 (^2J) u. C-20
H-30 \Rightarrow C-19 u. C-21 u. C-20 (^2J)

Stattdessen findet sich ein verbreitertes Dublett vom Dublett für ein Proton bei $\delta_{\text{H}} = 6.71$ ppm, bei dem es sich um ein Proton an einer Doppelbindung handeln muss (Khalilov, 2003). Der zugehörige Kohlenstoff findet sich bei $\delta_{\text{C}} = 149.36$ ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum. Im HMBC (Abb. 2.187) zeigt dieses Proton eine ^3J -Korrelation mit dem Carbonylkohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 194.44$, so dass die Aldehydgruppe an einer Doppelbindung im Ring angeordnet sein muss. Da nur bei Triterpenen vom Ursantyp die Methylgruppen am E-Ring nicht an quartären Brückenkopfatomen gebunden sind, muss die Aldehydgruppe entweder an C-19 oder C-20 des E-Rings gebunden sein. Im Falle der Oxidation von C-29 zum Aldehyd, könnte die ringständige Doppelbindung nur zwischen C-19 und C-20 oder C-18 und C-19 angeordnet sein. In diesem

Fall wären bei sp²-hybridisierte Kohlenstoffe der Doppelbindung quartär und würden kein Proton gebunden haben. Bei einem an C-20 gebundenen, durch Oxidation von C-30 entstandenen Aldehyd, könnte die Doppelbindung auch zwischen C-20 und C-21 liegen. Bei dem Proton bei $\delta_{\text{H}} = 6.71$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 149.36$ ppm, CH) handelt es sich demnach um das H-21 und die Substanz stellt einen C30-Aldehyd dar. Zwei weitere Korrelationen von H-21 im HMBC-Spektrum zu den Kohlenstoffsignalen bei $\delta_{\text{C}} = 29.52$ (C-19) und 34.95 (C-17) bestätigen die Struktur. Während das C-17 ein quartärer Kohlenstoff ist, an dem eine Methylgruppe (C-28, $\delta_{\text{C}} 17.66$, $\delta_{\text{H}} 0.67$) gebunden ist, handelt es sich bei C-19 um einen Methinhohlenstoff. Das zugehörige Proton (H-19) findet sich bei $\delta_{\text{H}} = 2.26$ ppm. Dieses Proton koppelt wie bei **13** mit der Methylgruppe C-29, deren Protonensignal als einziges Signal der Methylgruppen zum Dublett aufspaltet. Die übrigen sechs Methylgruppen treten als Singulett auf. Ein Vergleich der Protonen- und Kohlenstoffshifts der Methylgruppen von **14** mit den praktisch identischen Werten von Taraxasterol (**13**) zeigt, dass die Struktur der beiden Triterpene, abgesehen von der Aldehydgruppe und der Doppelbindung im E-Ring, weitgehend gleich ist. Wie bei **13** finden sich auch in den Spektren von **14** die Signale für einen sekundären Alkohol in A-Ring (C-3). Ausgehend vom H-3 ($\delta_{\text{H}} = 3.20$ ppm) bzw. C-3 ($\delta_{\text{C}} = 79.16$) lassen sich über die Korrelationen im COSY- und HMBC-Spektrum die Signale beiden Methylgruppen am C-4 (C-23 und C-24) die Protonen an C-2 lokalisieren (s. Abb. 2.181 und 2.187 und Tab. 2.23, S.272). Durch die Auswertung sämtlicher Korrelationen in den Spektren von **14** lassen sich die restlichen Protonen und Kohlenstoffe eindeutig zuordnen (s. Abb. 2.175 – 2.189 und Tab. 2.22, S. 271). Die Signale wurden bereits von Triana et. al. (2011) zugeordnet, allerdings wurde damals kein HMBC Spektrum aufgenommen. Aus diesem Grund ist die damals vorgenommene Zuordnung teilweise falsch, die Daten stimmen aber insgesamt ganz gut überein.

Das Taraxasterol (**13**) besitzt eine exocyclische $\Delta^{20,30}$ -Doppelbindung. Unter der Bezeichnung Pseudotaraxasterol wurde sein Isomer mit ringständiger $\Delta^{20,21}$ -Doppelbindung in die Literatur eingeführt. Bei Verbindung **14** handelt es sich somit um den Pseudotaraxasterol-30-aldehyd. Diese Verbindung, die auch in den Chemical Abstracts (www.scifinder.cas.org) unter den Namen (3 β ,18 α ,19 α)-3-Hydroxyurs-20-en-30-al, 3 β -Hydroxy-20-taraxasten-30-al und ψ -Taraxasterol 30-aldehyde geführt wird, wurde bisher nur selten in der Natur gefunden, in den Chemical Abstracts finden sich nur sechs Zitate. Erstmals gefunden wurde das Triterpen in der Asteraceae *Launaea spinosa*, die genauso wie *Taraxacum officinale* zur Unterfamilie

Cichorioideae gehört (Sarg et al, 1987.). Weitere Funde wurden in der ebenfalls zu dieser Unterfamilie gehörenden Gattung *Ixeris* (Shiojima et al, 1996) der zur Unterfamilie Asteroideae gehörenden Gattung *Pulicaria* (Triana et al., 2011) und der Carduoideae gehörenden Gattung *Saussurea* (Huang et al., 2011) gemacht. Darüber hinaus wurde die Substanz auch aus Euphorbiaceen (Wolfsmilchgewächsen) isoliert (Duarte et al., 2009).

In der Gattung *Volutaria* wurde Pseudotaraxasterol-30-aldehyd bisher noch nicht gefunden.

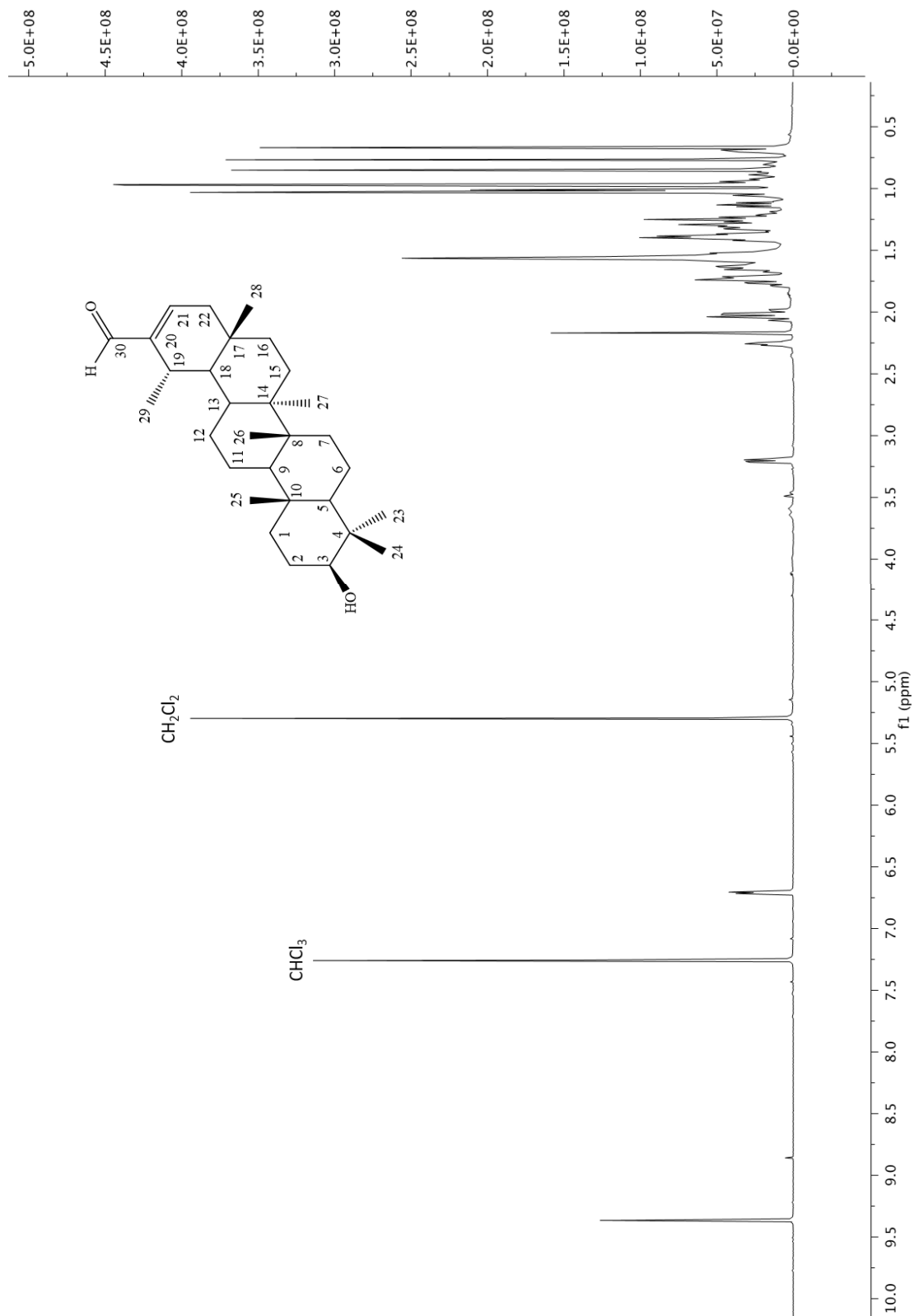


Abbildung 2.175: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung **14** (600 MHz in CDCl_3)

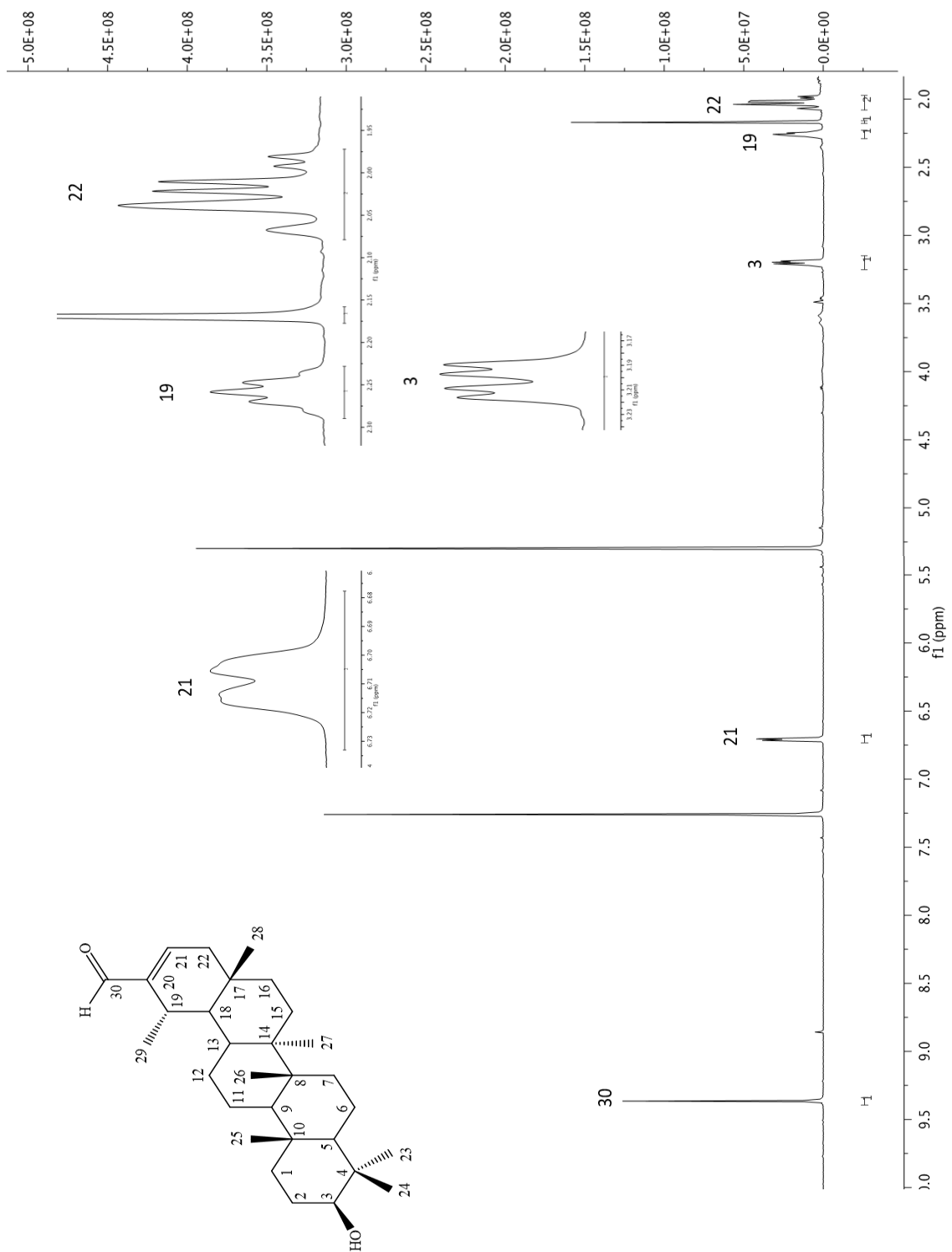


Abbildung 2.176: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung **14** (600 MHz in CDCl_3)

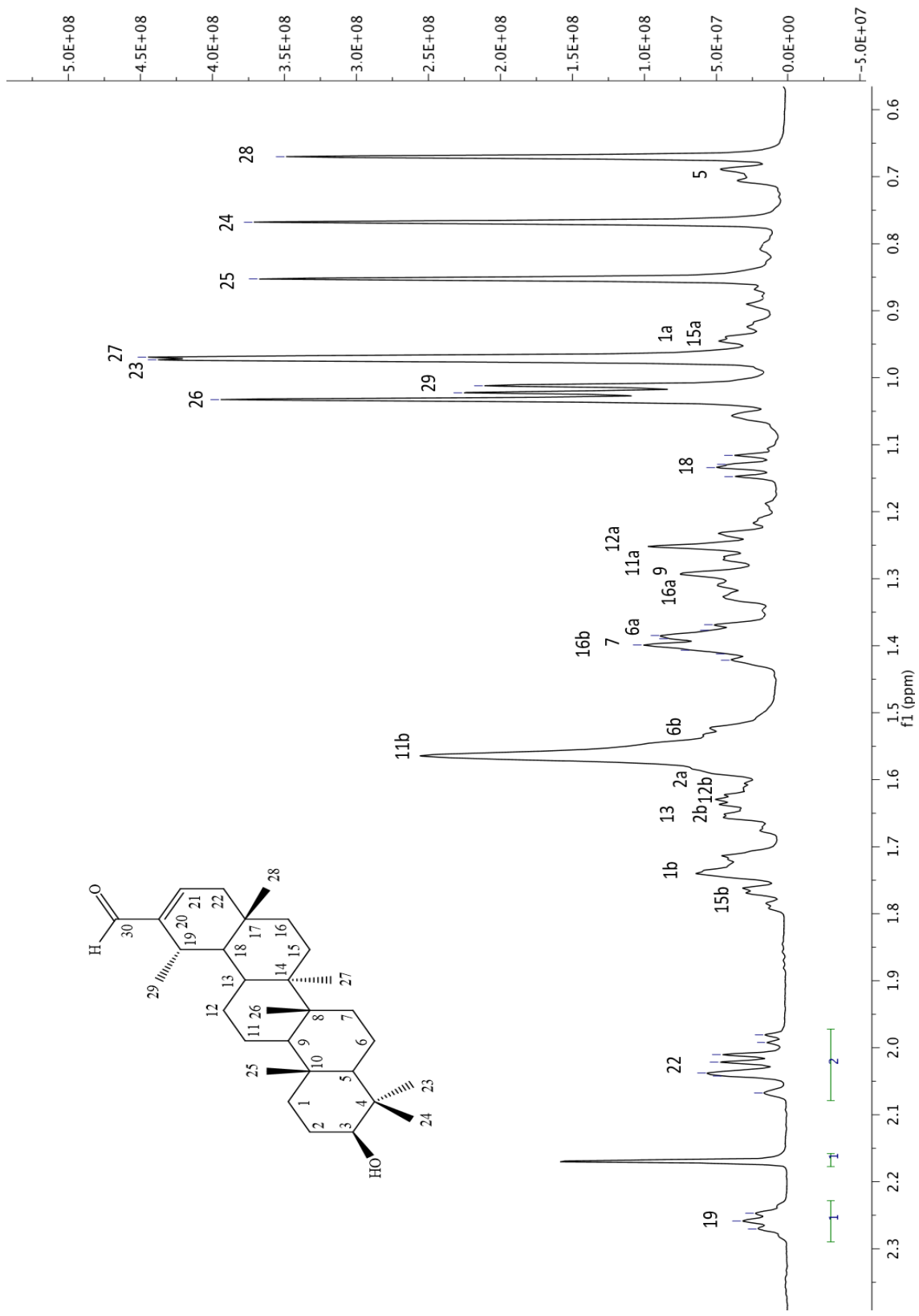


Abbildung 2.177: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in CDCl₃)

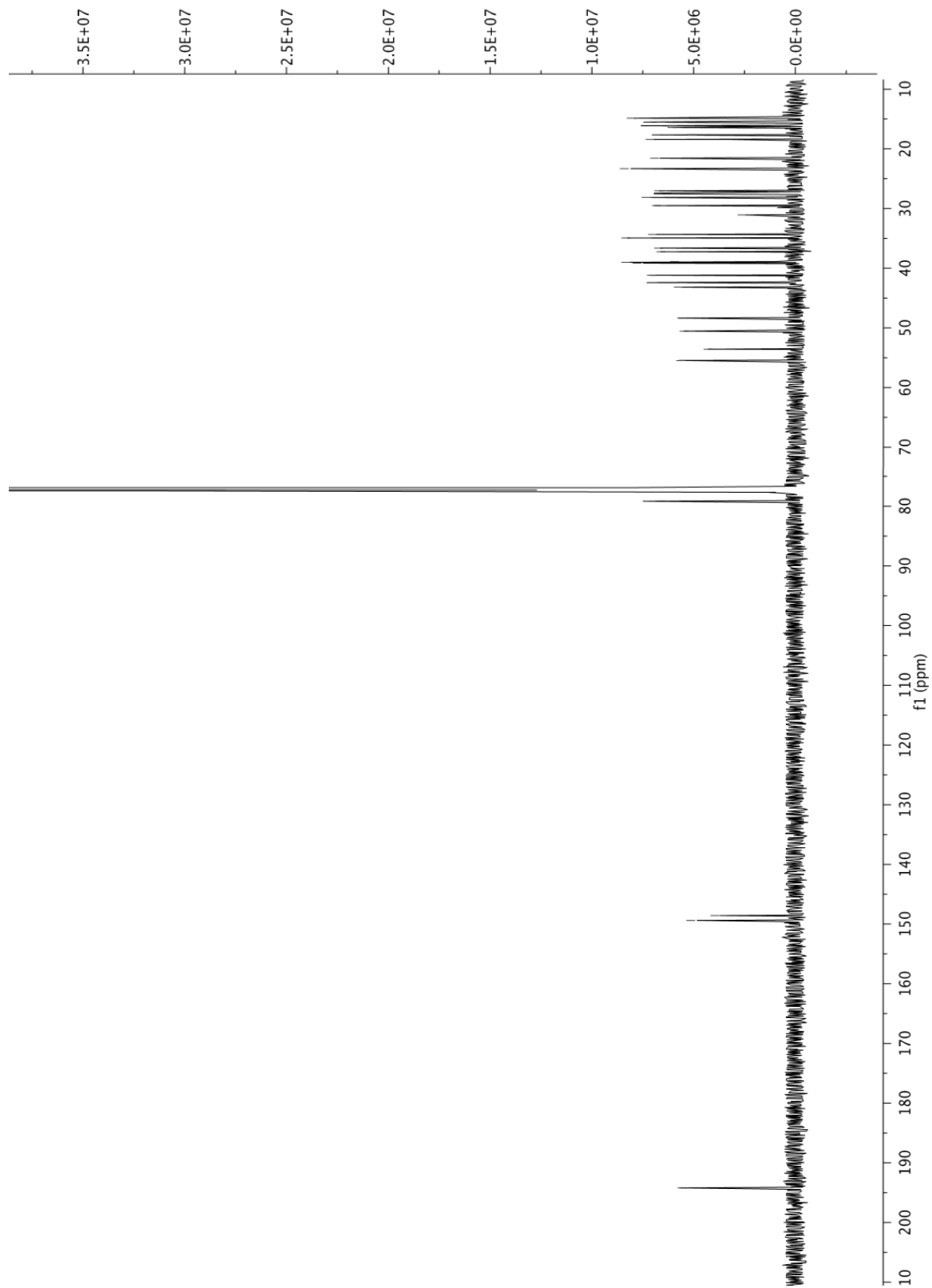


Abbildung 2.178: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **14** (150 MHz in CDCl_3)

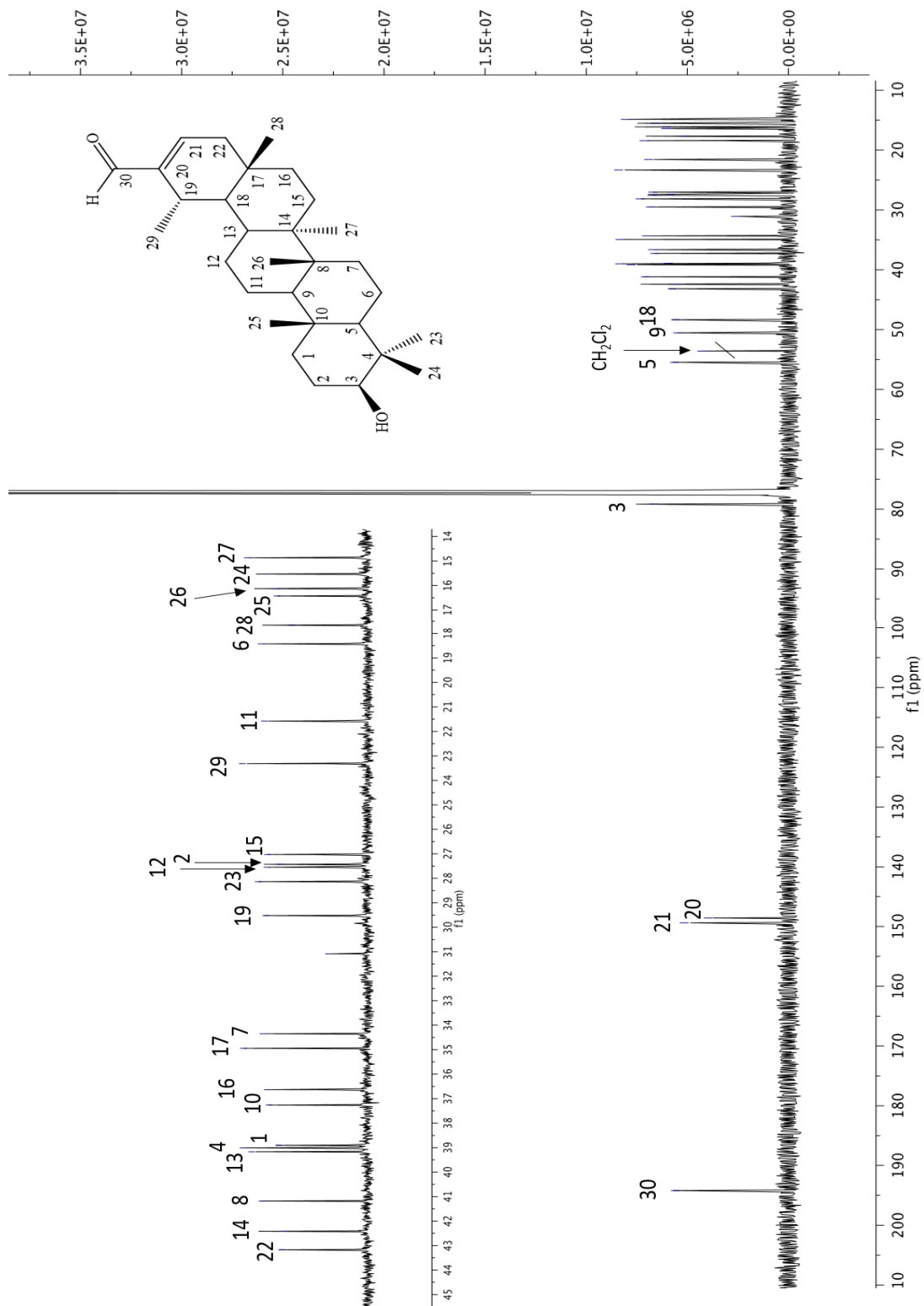


Abbildung 2.179: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **14** (150 MHz in CDCl_3)

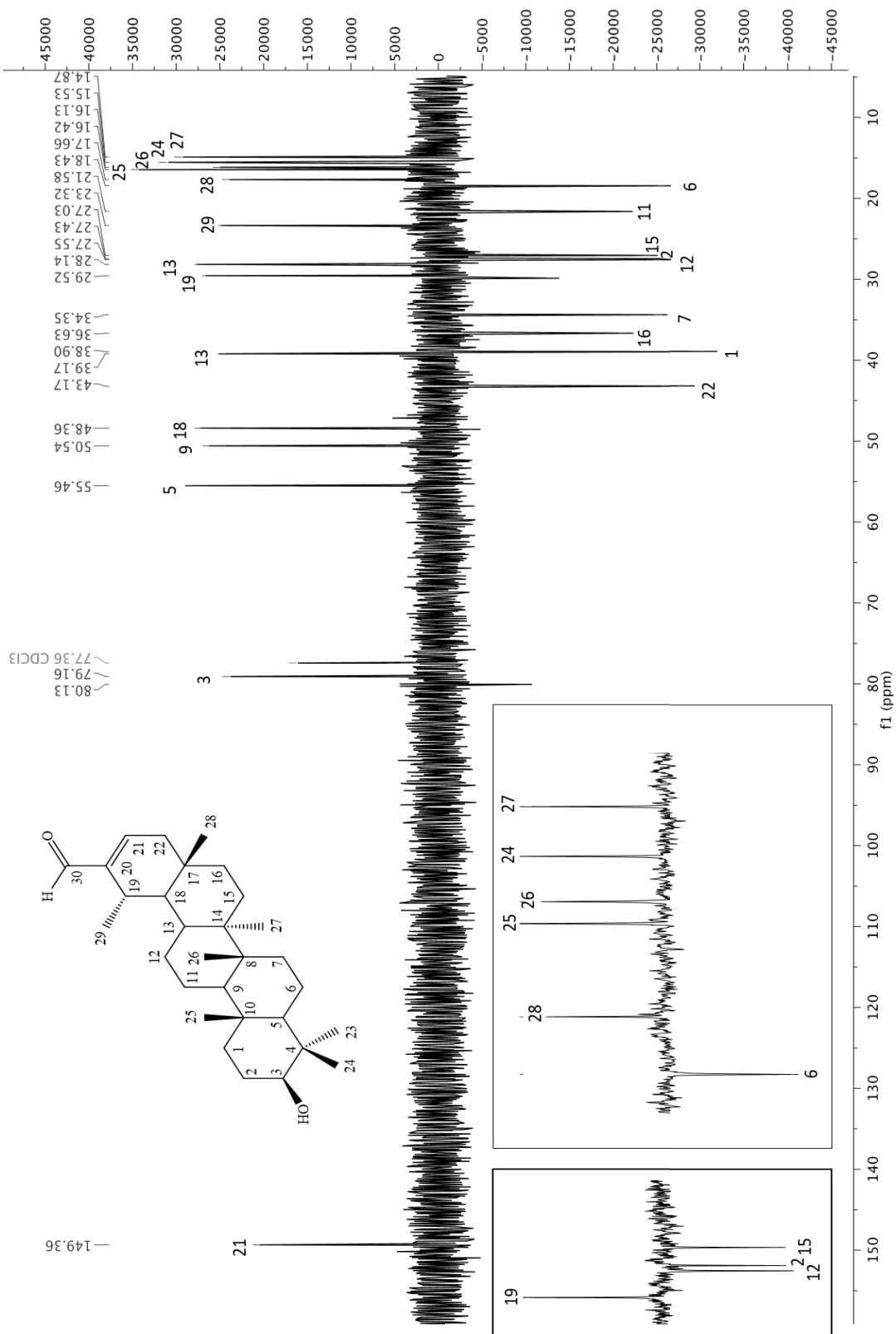


Abbildung 2.180: ^{13}C -NMR-DEPT-Spektrum von Verbindung 14 (150 MHz in CDCl_3)

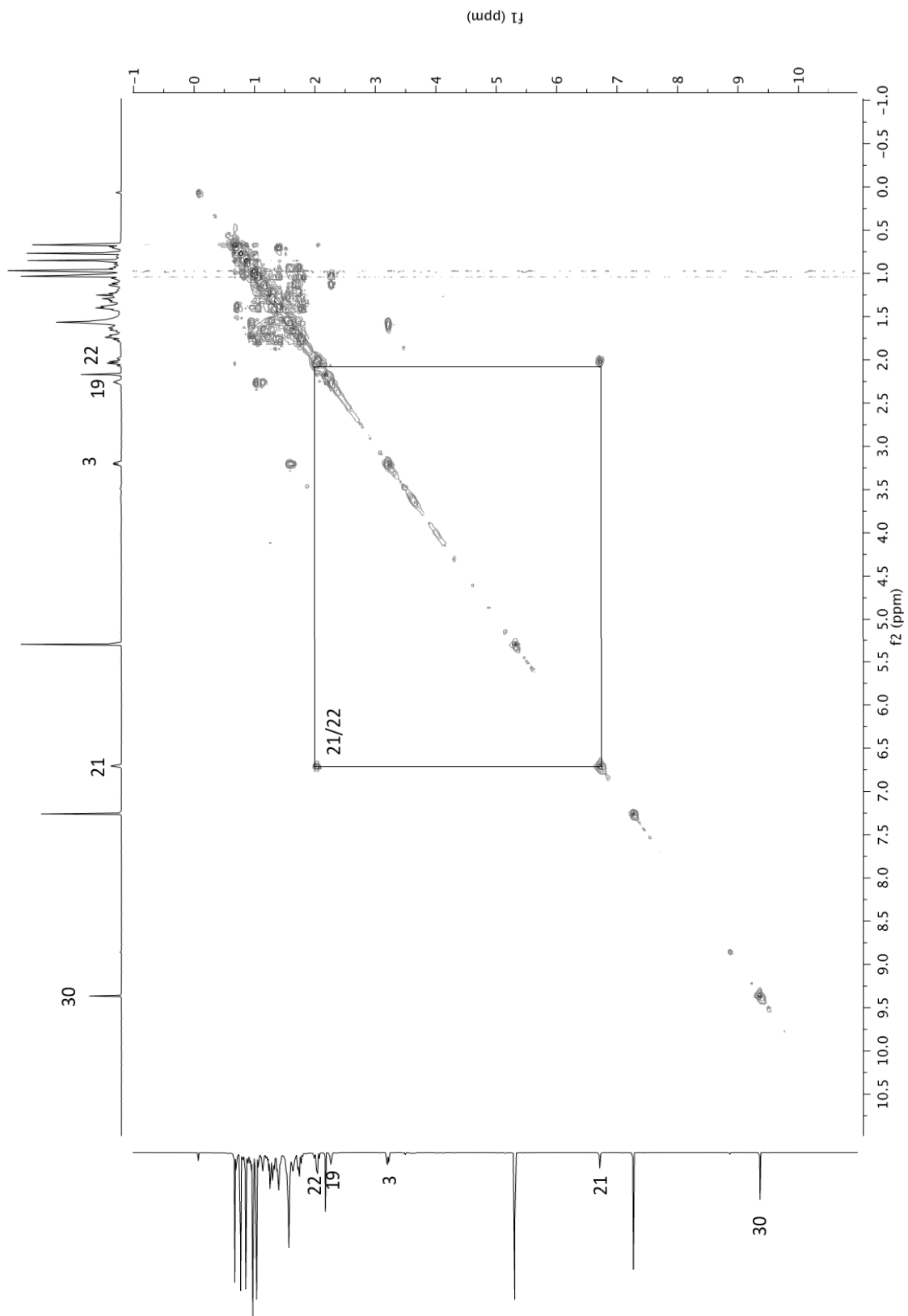


Abbildung 2.181: 2D-COSY-Spektrum von **14** (600 MHz in CDCl₃)

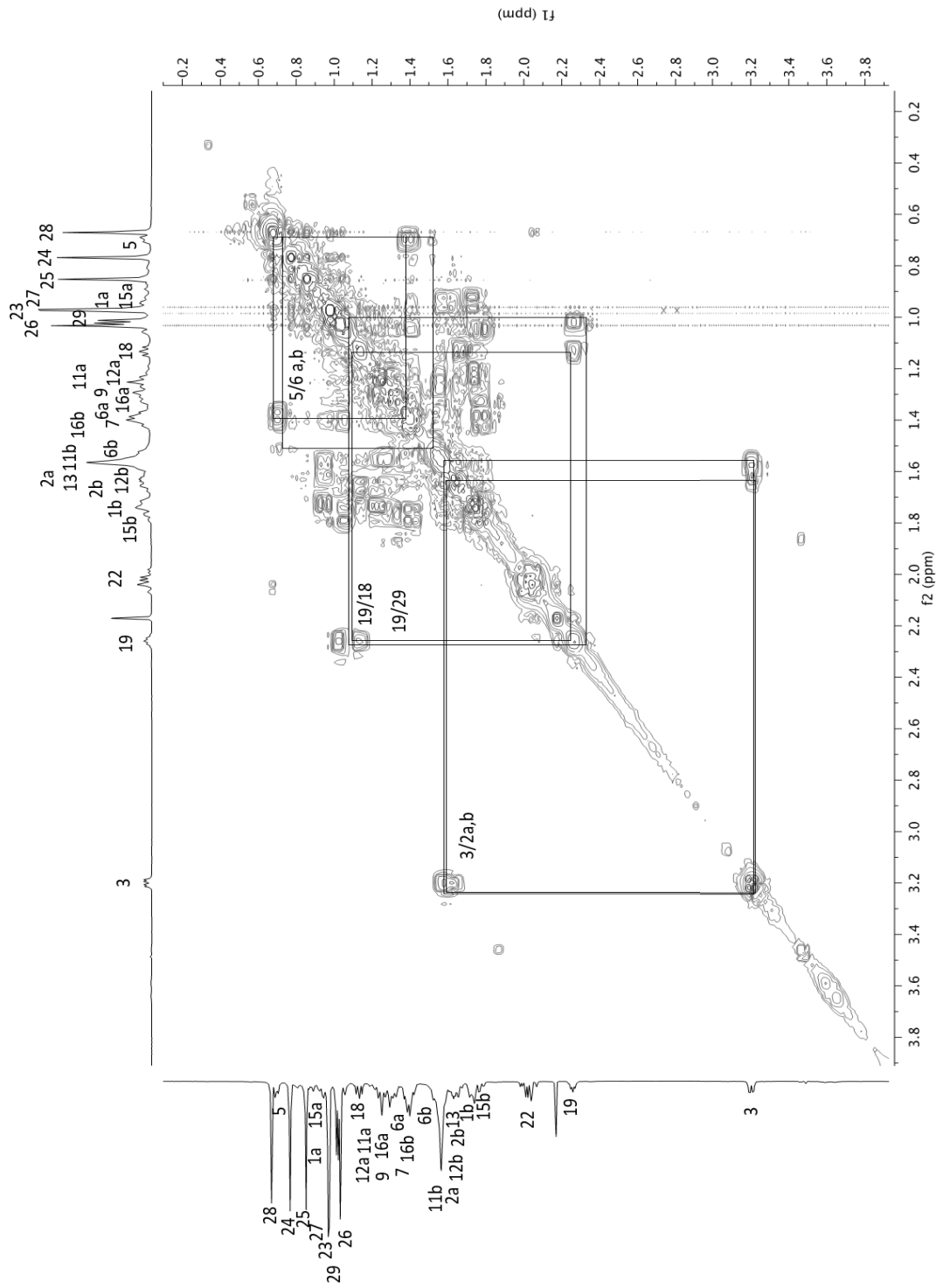


Abbildung 2.182: Ausschnitt aus dem 2D-COSY-Spektrum von **14** (600 MHz in CDCl_3)

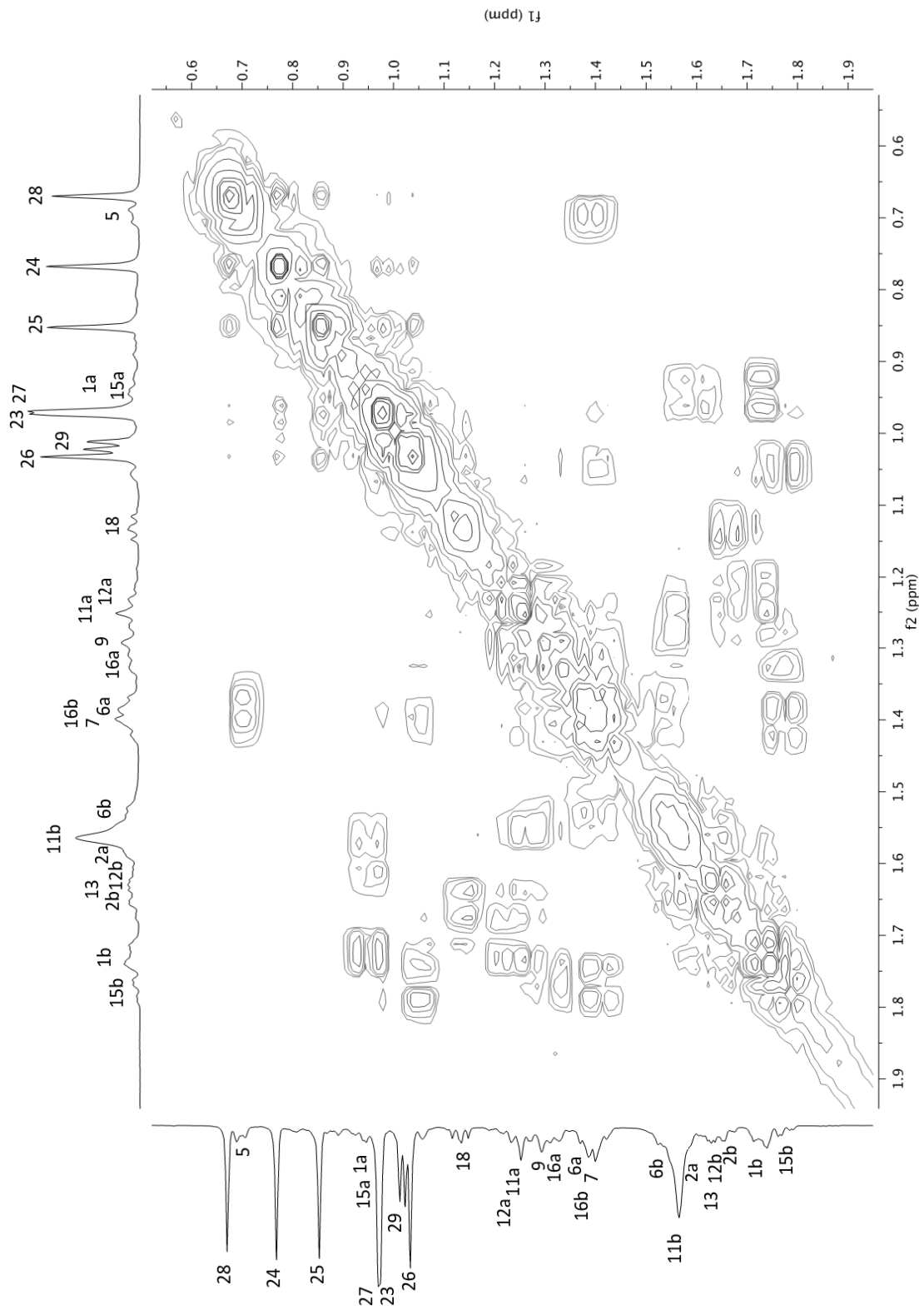


Abbildung 2.183: Ausschnitt aus dem 2D-COSY-Spektrum von **14** (600 MHz in CDCl₃)

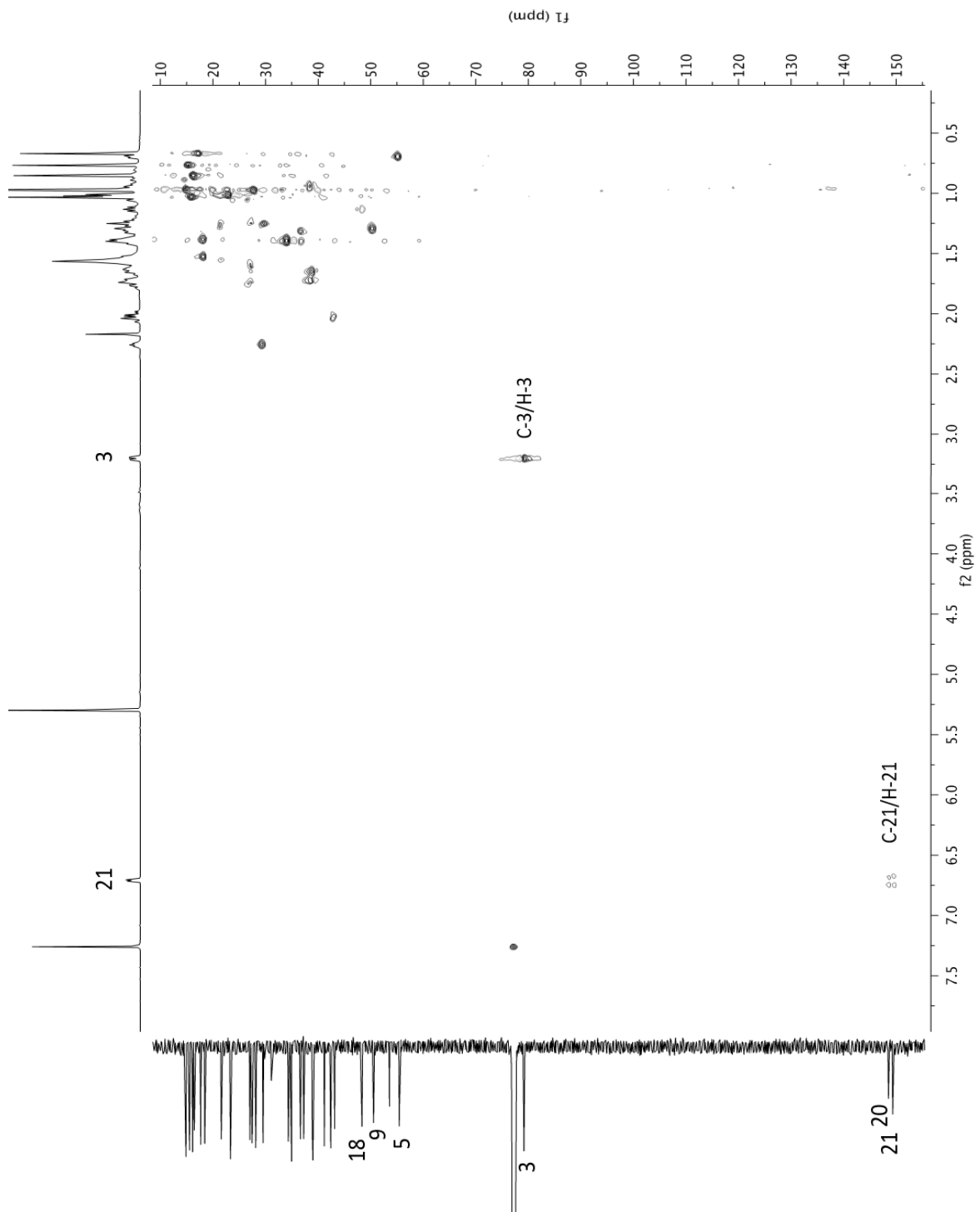


Abbildung 2.184: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in CDCl_3)

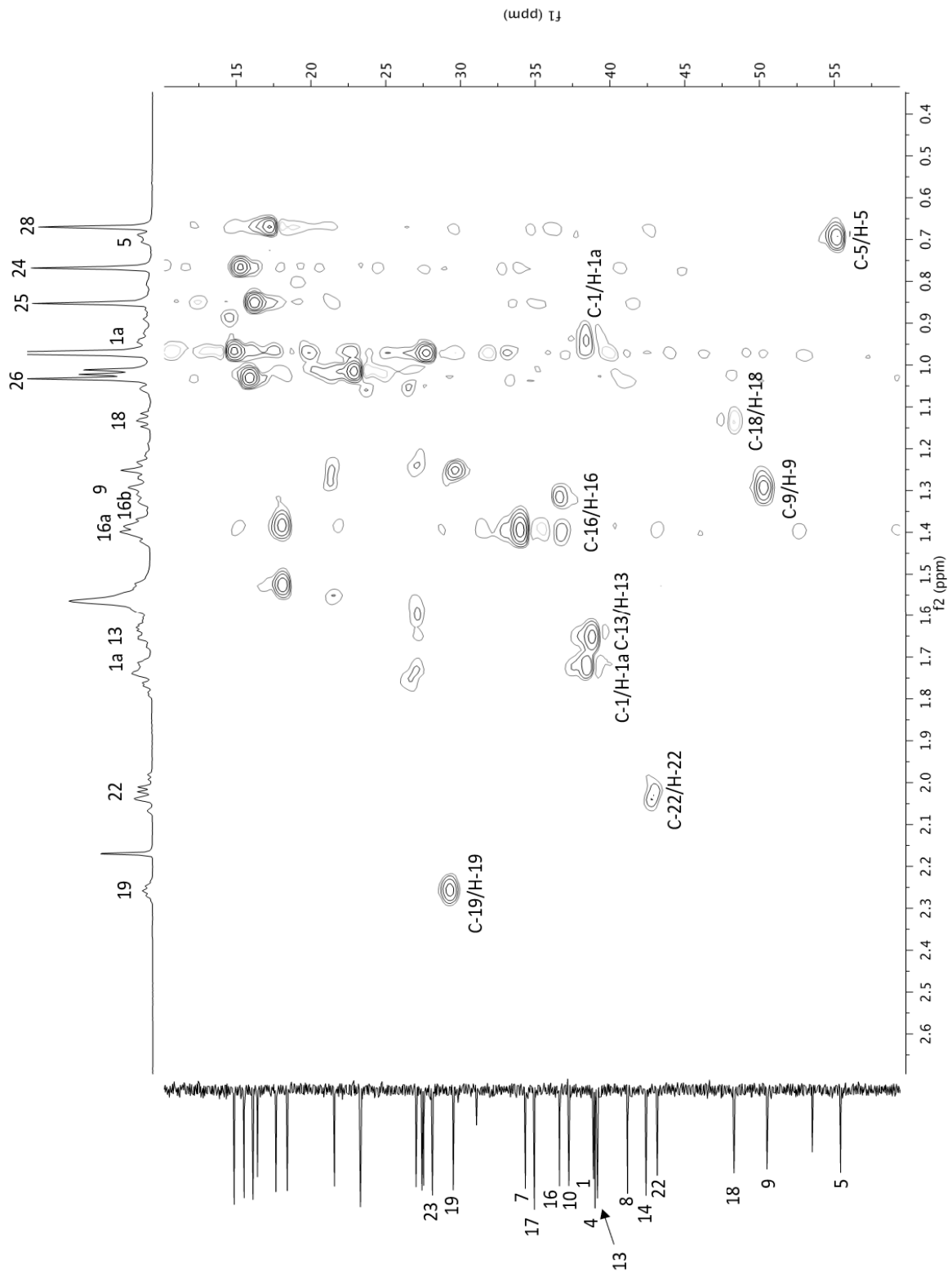


Abbildung 2.185: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **14** (600 MHz in CDCl_3)

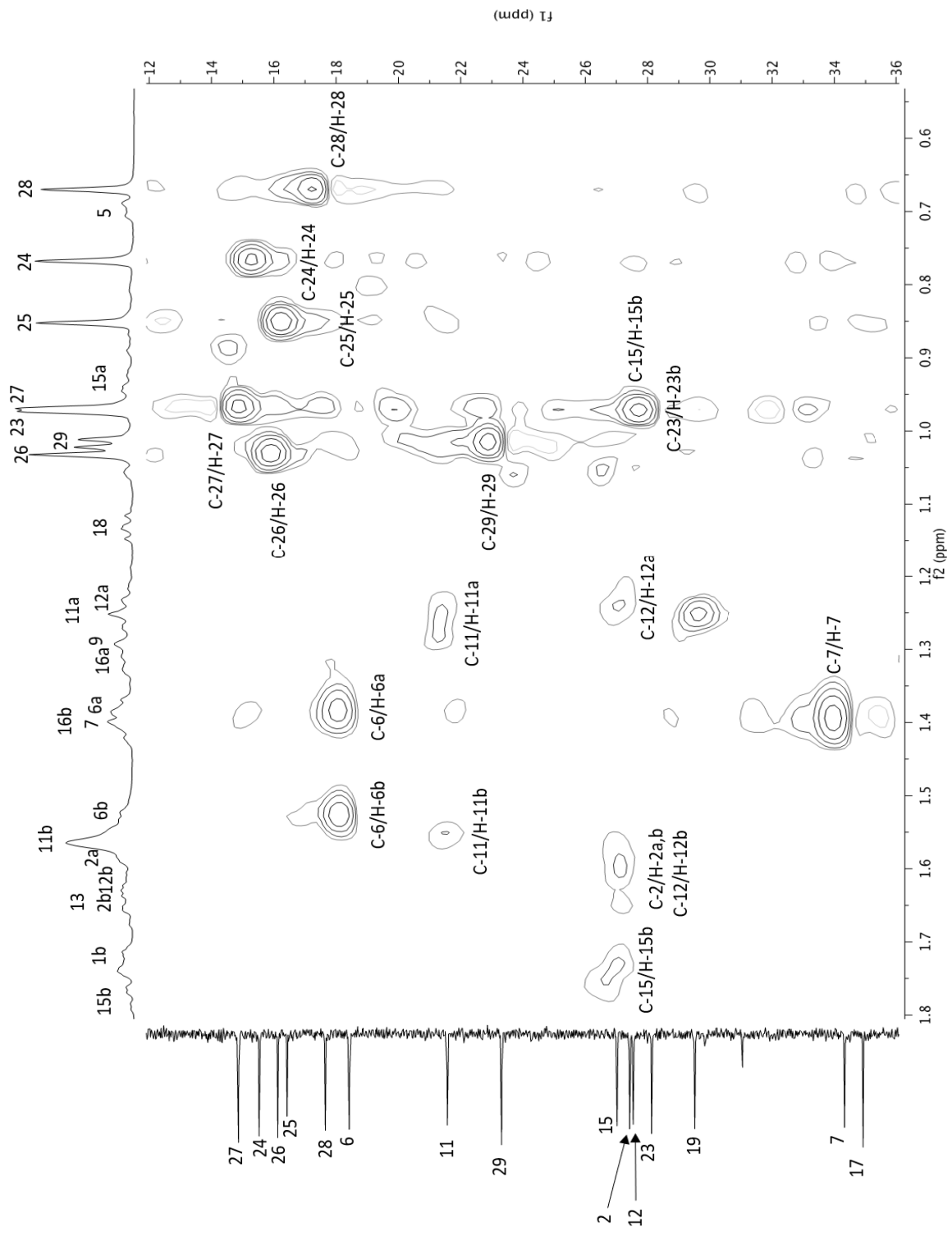


Abbildung 2.186: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in CDCl_3)

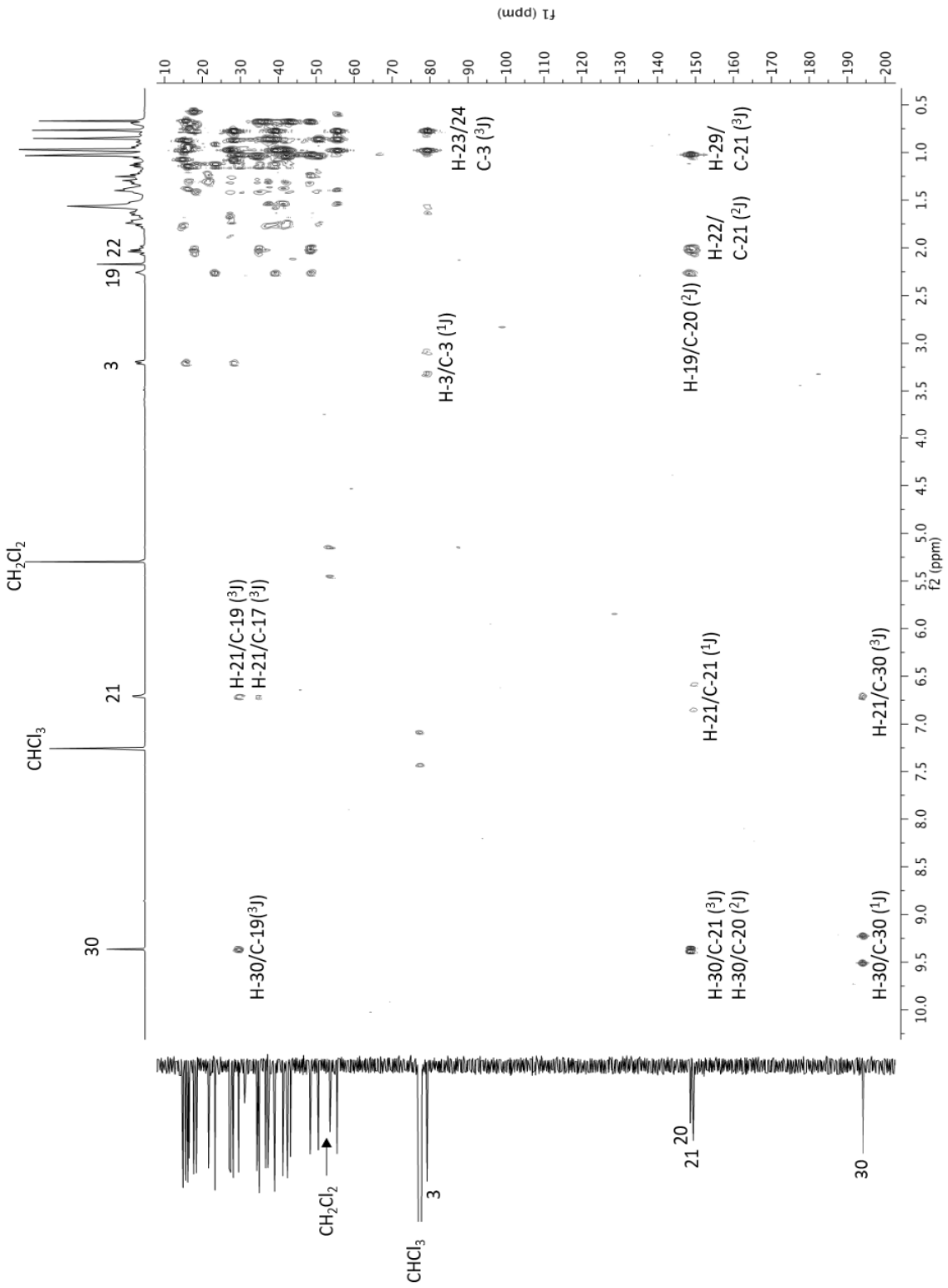


Abbildung 2.187: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in CDCl_3)

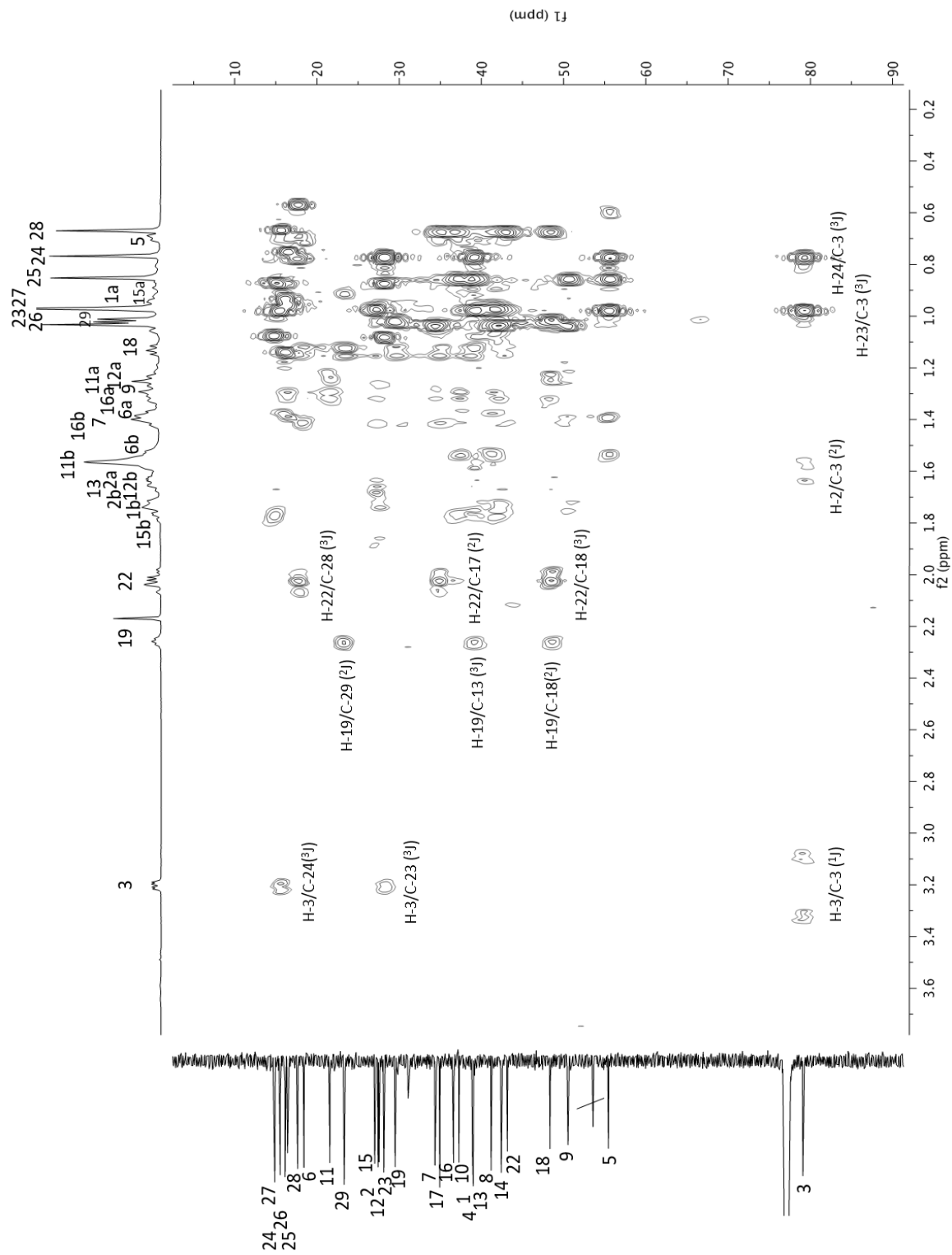


Abbildung 2.188: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in CDCl_3)

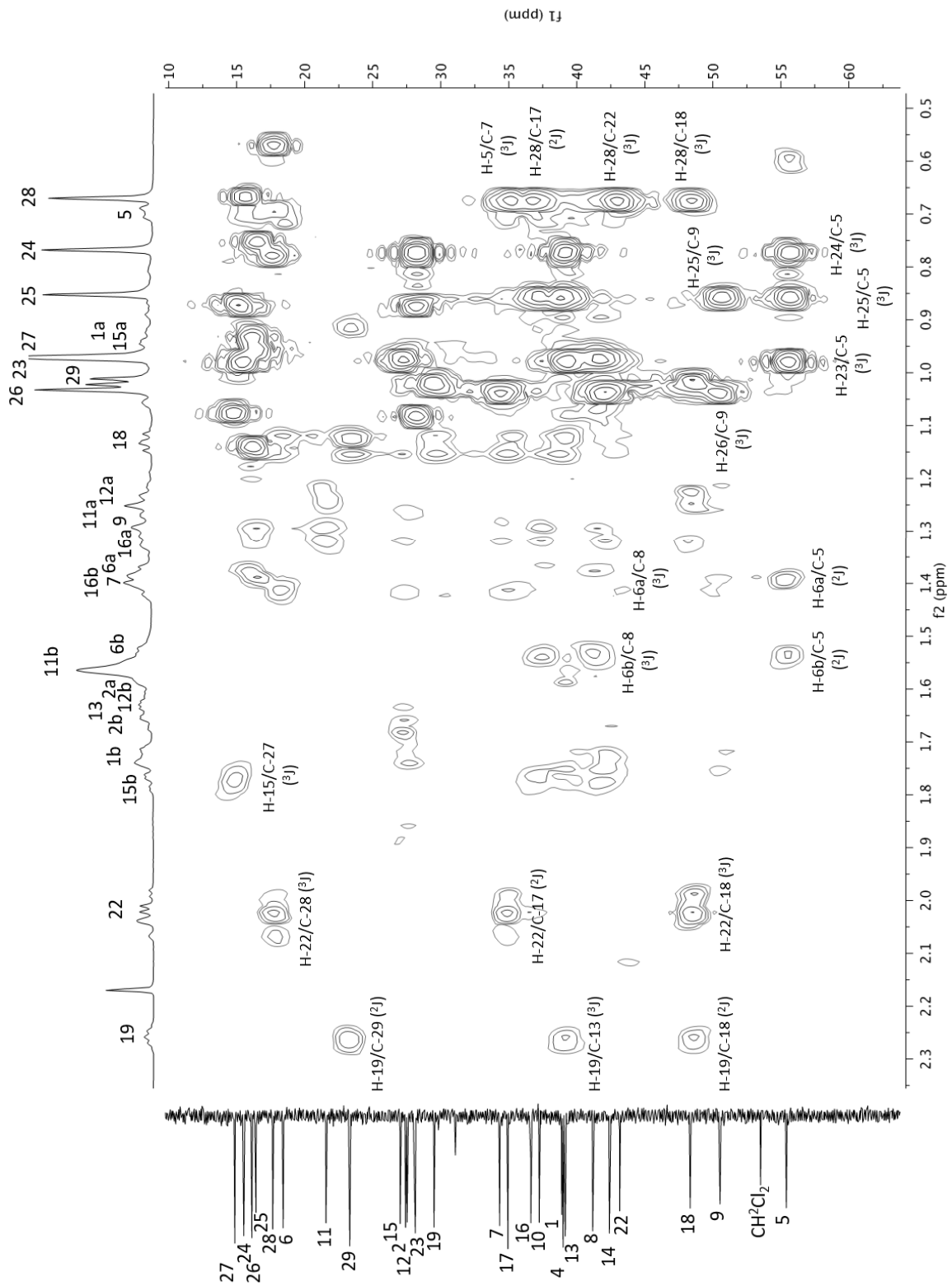
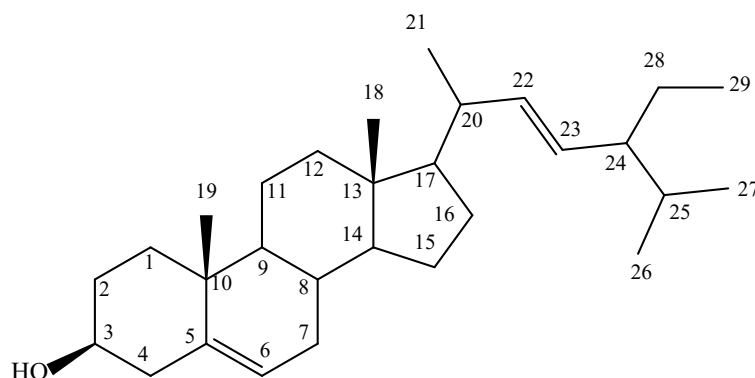


Abbildung 2.189: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **14** (600 MHz in CDCl₃)

2.2.13 Verbindung 15 (Stigmasterol)



Die Verbindung **15** wurde durch spontanes Auskristallisieren aus Fraktion V.b.6 in einer Ausbeute von 39,5 mg (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.3) gewonnen. Ihre analytischen Daten (s. Exp. Teil, Kap. 5.5), insbesondere das Massenspektrum deuteten bereits darauf hin, dass es sich um ein Phytosterol, ein pflanzliches Sterin, handeln könnte. Das EI-Massenspektrum zeigt das Molekülion bei $m/z = 412$ und die charakteristischen Folgefragmente für ein Sterin mit zusätzlicher Doppelbindung in der Seitenkette (s. Abb. 2.190) wie dies beispielsweise beim häufig gefundenen Stigmasterol der Fall ist.

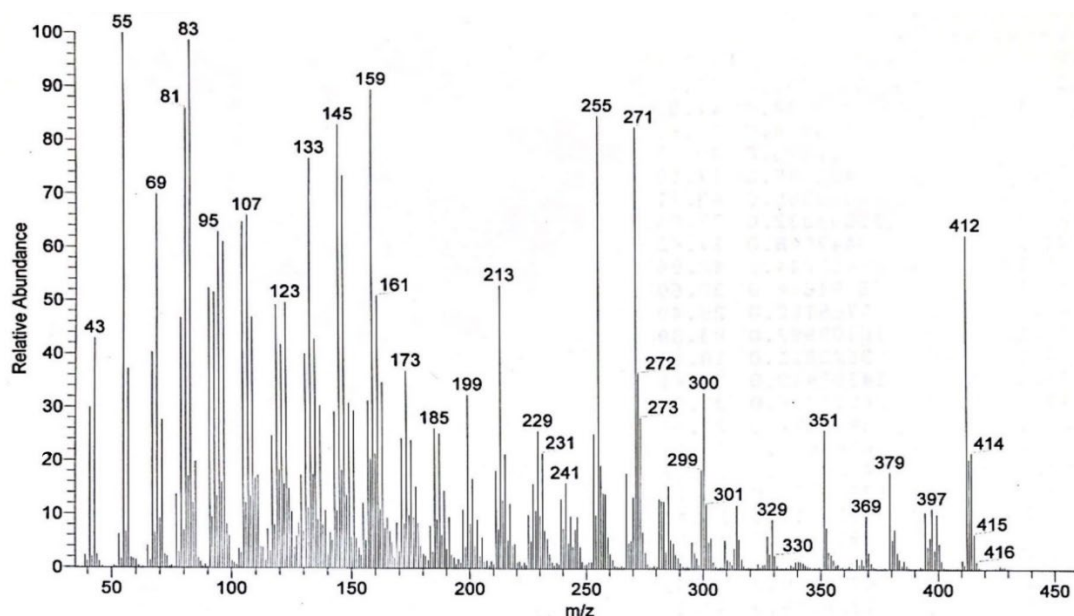


Abbildung 2.190: EI-Massenspektrum von **15**

Abbildung 2.191 (S. 292) zeigt das Fragmentierungsmuster von Verbindung **15** in Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Spaltprodukte von Stigmastrol und ähnlichen Verbindungen (Afzal, 2012, Jiang, 2019 und Lukitaingsih, 2012) . Auffällig sind die intensiven Fragmente bei m/z 271 und 255 die aus der Abspaltung der Seitenkette ($C_{10}H_{19} = 139$) aus den Fragmenten bei m/z 410 $[M-H_2]^+$ und m/z 394 $[M-H_2O]^+$ resultieren (s. Abb, 2.190).

Zur endgültigen Absicherung der Struktur von **15** wurden 1D- und 2D-NMR Spektren in Chloroform aufgenommen (s. Abb. 2.192 – 2.203, , S. 295 – 305 und Tab. 2.24, S.293). Das ^{13}C -NMR zeigt erwartungsgemäß die Signale für 29 Kohlenstoffe. Aufgrund der Korrelationen mit den zugehörigen Protonensignalen im HSQC-Spektrum (s. Abb. 2.198, S.301) konnten sechs der Signale als Methylkohlenstoffe erkannt werden, neun Signale stammten von Methylenkohlenstoffe und elf Signale wurden von Methinkohlenstoffen verursacht. Vier weitere Signale zeigten keine Korrelation zu einem Protonensignal, so dass es sich um quartäre Kohlenstoffe handeln musste. Die Zuordnung dieser Signale gelang über die 2J - und 3J -Korrelationen im HMBC-Spektrum (s. Abb. 2.200, S.302). Aufgrund der Spaltprodukte im EI-Massenspektrum (s. Abb. 2.190), besitzt Verbindung **15** eine Doppelbindung in der Seitenkette, deren Position je nach Verbindung unterschiedlich ist. Während Stigmastrol ein $\Delta^{22,23}$ -Sterin darstellt, gibt es auch Verbindungen mit einer Doppelbindung zwischen C_{24} und C_{25} (Stigmastadienol) und zwischen C_{24} und C_{28} (Fucosterol). Auch die Doppelbindung in zugrunde liegenden, tetracyclischen Androstan-Grundgerüst kann in unterschiedlichen Positionen vorkommen, meist findet man eine $\Delta^{5,6}$ - oder $\Delta^{7,8}$ -Doppelbindung. In den Spektren von **15** finden sich die Signale für vier sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffe bei $\delta = 140.90, 138.47, 129.43$ und 121.87 ppm. Während das am weitesten tieffeldverschobene Kohlenstoffsignal keine Korrelation zu einem Proton im HSQC-Spektrum (s. Abb. 2.198) zeigt, finden sich die Signale der an den anderen Kohlenstoffen gebundenen Protonen bei $\delta = 5.15$ und 5.02 ppm als Dublett vom Dublett und bei $\delta = 5.35$ ppm als verbreitertes Dublett im für Protonen an ungesättigten Kohlenstoffen typischen Shiftbereich. Die Auswertung der Crosspeaks der beiden Dublett vom Dublett Signale im COSY-Spektrum ergab, dass es sich dabei um die beiden miteinander koppelnden Protonen an der Doppelbindung der Seitenkette handelt, die aufgrund der Kopplungskonstante von ca. 15 Hz trans-konfiguriert sein muss. Jedes dieser Doppelbindungsprotonen besitzt einen weiteren Kopplungspartner, so dass nur es sich bei 15 um ein $\Delta^{22,23}$ -Sterin handeln musste. Die Zuordnung sämtlicher Signale der Seitenkette gelang über die Korrelationen im COSY-, HSQC und HMBC-Spektrum (s. Abb. 2.195 – 2.203).

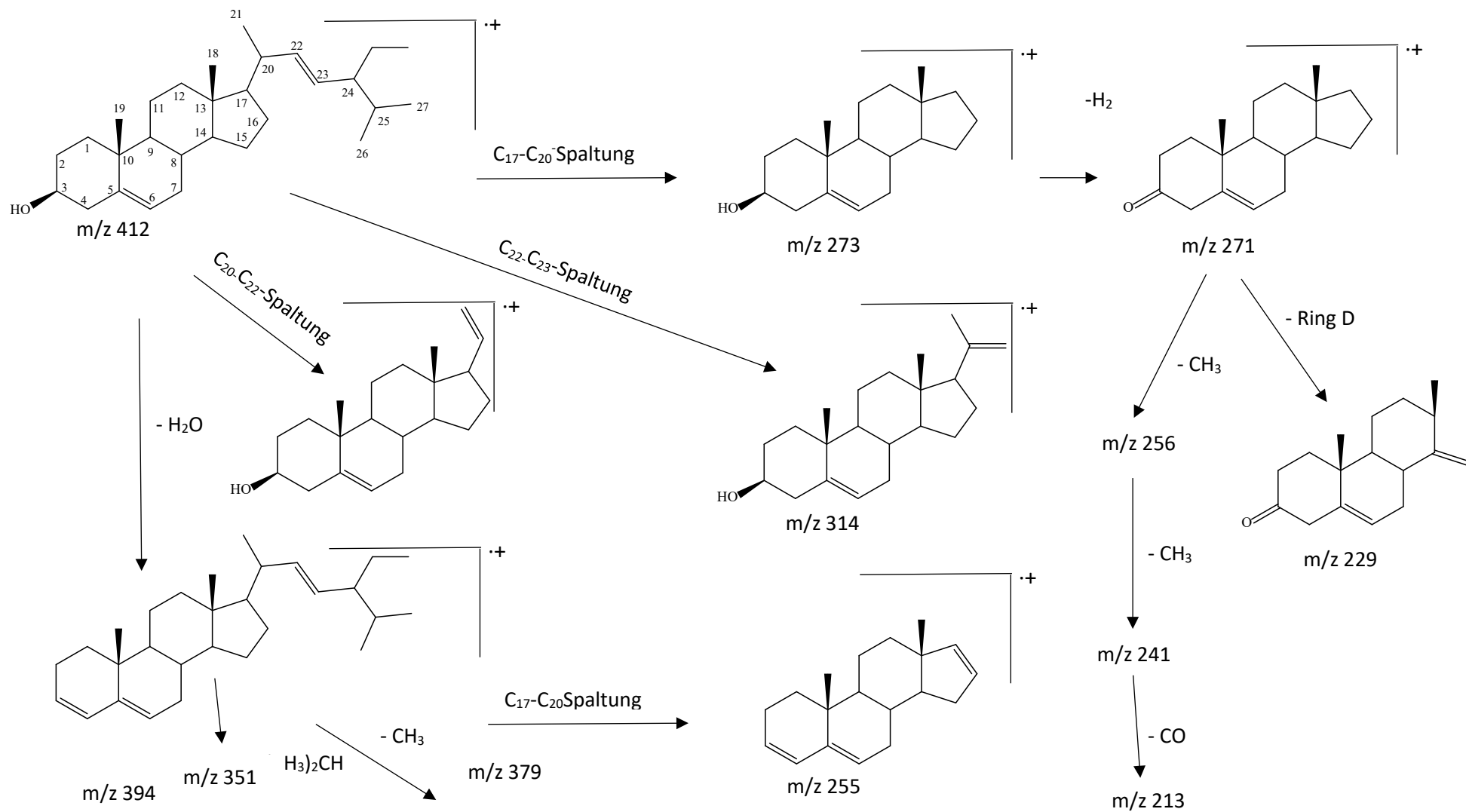


Abbildung 2.191: Mögliche Fragmentierungswege von 15 im EI-Massenspektrum

Tabelle 2.24: NMR Daten der Verbindung **15** (600 MHz in CDCl₃; δ in ppm, (J in Hz))

	¹ H	¹³ C	Literaturdaten			
			Huang & Yang 2004	Lukitaningsih (2012)		Kamal et al (2016)
1a	1.08 m	37.41		1.30 m	37.4	37.1
1b	1.85 m			1.84 m		
2	1.84 m	31.81		1.50 m	28.4	31.6
3	3.52 m	71.97	3.52 m	3.50 m	71.9	71.8
4a	2.24 m	42.45		2.27 m	42.5	41.5
4b	2.30 dd (5.1;2.2)					
5	-	140.90		-	140.9	140.3
6	5.35 d (5.3)	121.87	5.35 d (4.8)	5.34 dd	121.9	121.7
7	1.53 m	31.62		1.98 m	32.0	31.7
8	1.26 m 1.99 m	32.08		1.70 m	32.1	32.0
9	0.94 m	50.31		0.92 m	50.3	50.1
10	-	36.66		-	36.7	36.7
11	1.50 m	21.24		1.50 m	20.0	20.8
12	2.00 m	39.83		2.01 m	39.4	39.6
13	-	42.37		-	46.0	42.3
14	1.02 m	57.02		1.10 m	56.9	56.7
15	1.06 m 1.55 m	24.52		1.09 m 1.70 m	23.2	24.3
16	1.70 m	29.07		1.70 m	26.3	28.6
17	1.15 m	56.10		1.20 m	56.2	55.9
18	0.70 s	12.20	0.68 s	0.68 s	12.0	11.6
19	1.01 s	19.55	1.01 s	1.01 s	19.2	19.2
20	2.04 m	40.65		1.28 m	40.6	40.1
21	1.03 d (6.7)	21.37	0.92 d (6.2)	0.92 s	19.6	20.5
22	5.15 dd (15.2; 8.7)	138.47	5.16 dd (15.3; 8.0)	5.01 dd	138.5	138.0
23	5.02 dd (15.1; 8.7)	129.43	5.01 dd (15.3; 8.0)	5.16 dd	129.4	129.2
24	1.53 m	51.39		1.50 m	51.4	51.1
25	1.46 m	32.05		1.90 m	29.3	32.0
26	0.80 d (6.1)	19.13	0.79 d (6.2)	0.83 d	18.9	19.0
27	0.85 d (6.2)	21.24	0.81 d (6.2)	0.83 d	21.2	21.2
28a	1.17 m	25.56		1.20 m	24.5	25.4
28b	1.42 m					
29	0.80 t (7.5)	12.40	0.86 t (6.7)	0.83 d	12.3	12.0

Bei den anderen beiden Signalen ($\delta = 140.90$ und 121.87) sollte es sich vermutlich um eine Doppelbindung zwischen C_5 und C_6 bzw. C_7 und C_8 handeln. Durch die 3J -Korrelation zwischen dem Signal des quartären sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffs (δ_C 140.90) mit dem Protonensingulett für eine Methylgruppe bei $\delta = 1.01$ ppm, konnte die Position der Doppelbindung im B-Ring des Androstan-Grundgerüsts eindeutig bewiesen werden. Somit sollte es sich bei **15**, wie bereits vermutet, um das Stigmasterol handeln. Die Zuordnung aller weiteren Protonen und Kohlenstoffresonanzen gelang über die zweidimensionalen Korrelationsspektren und ein Vergleich mit der Literatur zeigte große Übereinstimmung (s. Tab. 2.24). Leider finden sich nicht in allen Arbeiten NMR-Daten der Protonen- und Kohlenstoffe, vielfach wurden aufgrund starker Überlagerung der Signale nur wenige Protonensignale zugeordnet (Huang & Yang 2004). Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass das Stigmasterol in vielen Fällen im 1:1-Gemisch mit Sitosterol vorlag, so dass es in einigen Fällen auch zu einer falschen Zuordnung gekommen sein kann.

Auch Verbindung **15** ist mit Sitosterol (s. Verbindung **16**) verunreinigt, aber, wie man an der Intensität der kleineren Signale in den Spektren erkennen kann, beträgt die Verunreinigung hier nur wenige Prozent, so dass die Zuordnung der Signale hier eindeutig ist.

Bei Stigmasterol (**15**) handelt es sich um eine ubiquitäre Verbindung, es finden sich ca. 15.000 Literaturstellen in den Chemical Abstracts. Dennoch ist diese Verbindung in der Gattung *Volutaria* bisher noch nicht gefunden worden. In der Gattung *Amberboa* wurde Stigmasterol zusammen mit β -Sitosterol und Campesterol bisher nur in einer Species, *A. divaricata*, beschrieben (Jagatap, 1976).



Abbildung 2.192: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung 15 (600 MHz in CDCl₃)

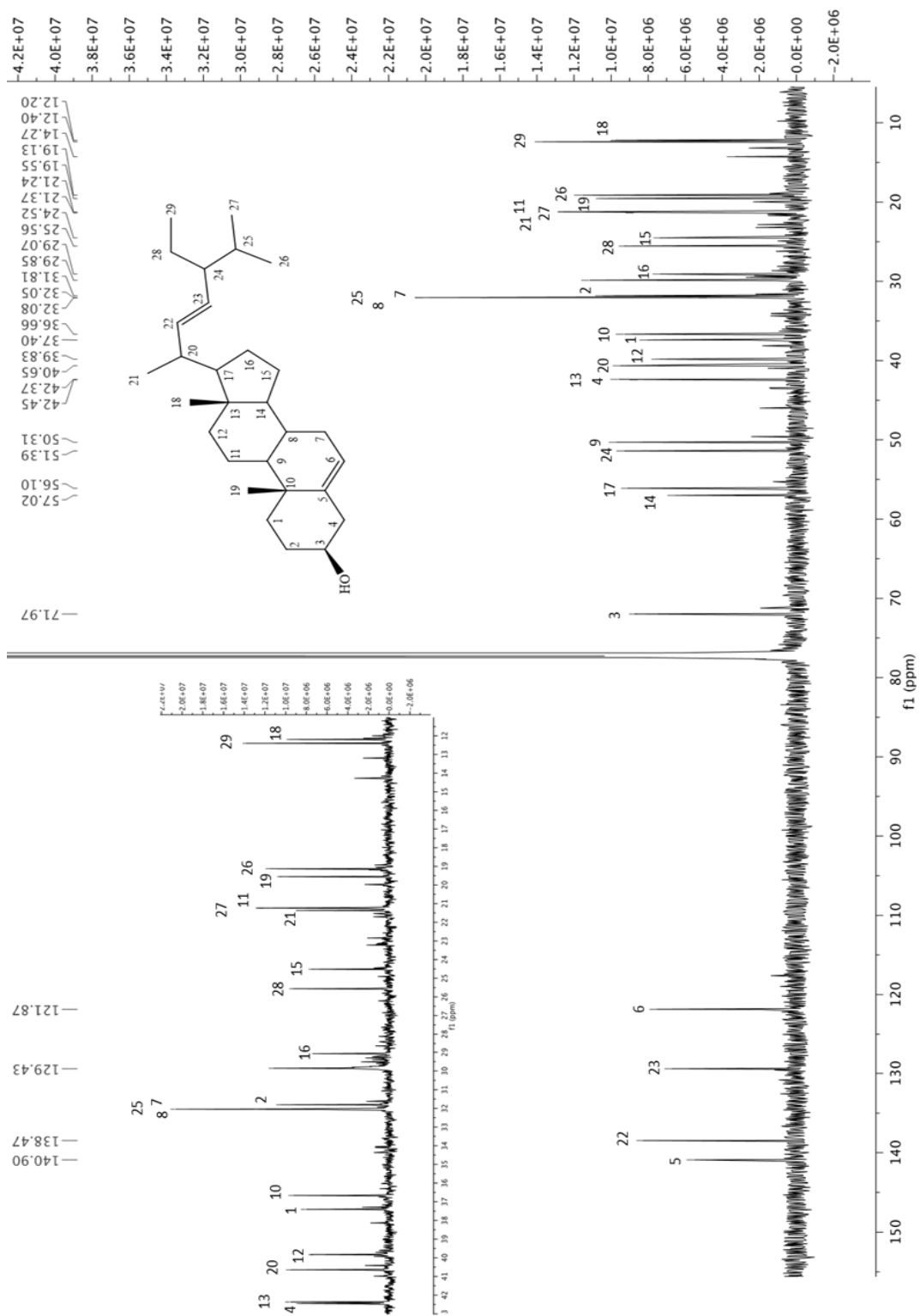


Abbildung 2.194: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 15 (150 MHz in CDCl_3)

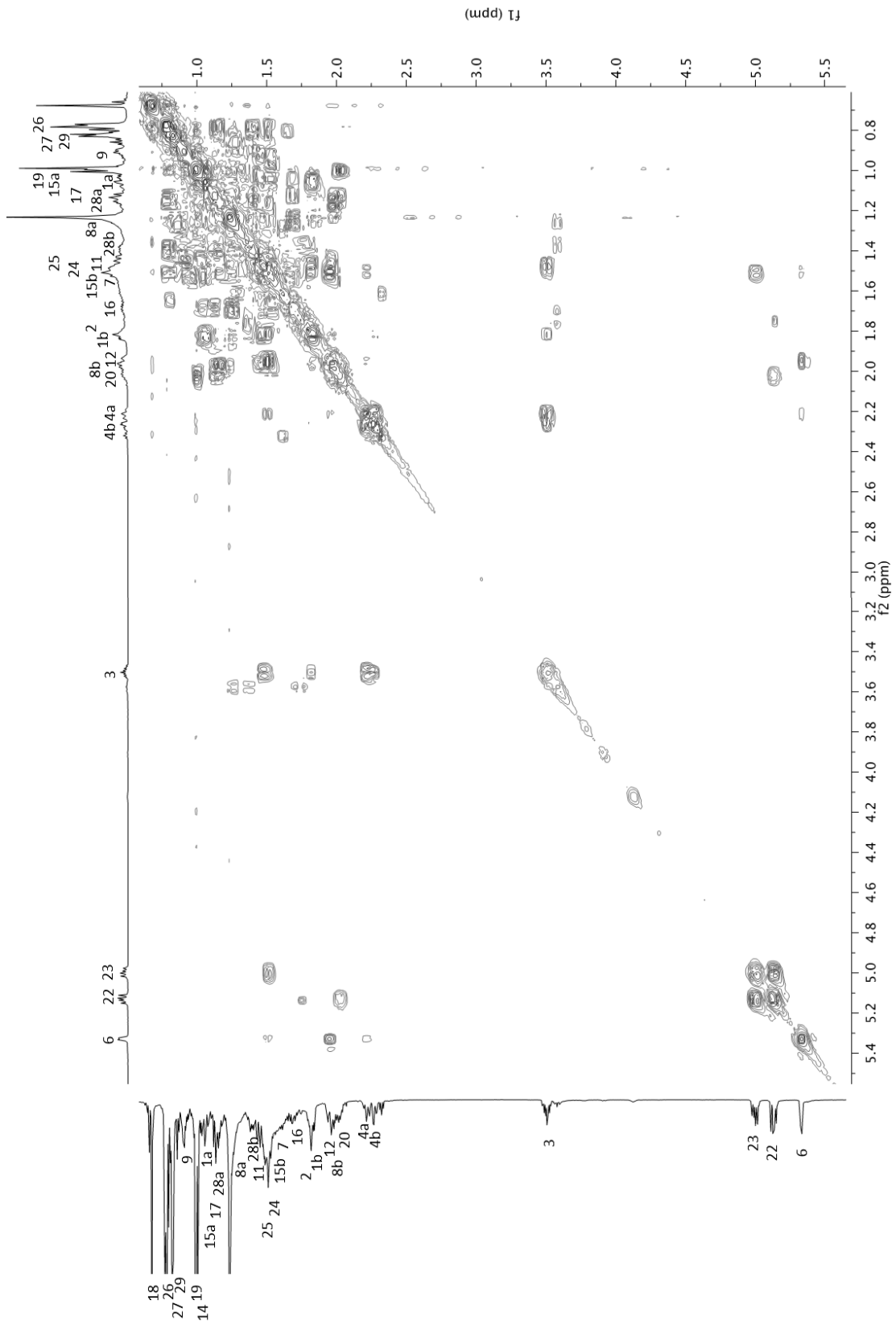


Abbildung 2.195: 2D-COSY-Spektrum von **15** (600 MHz in CDCl_3)

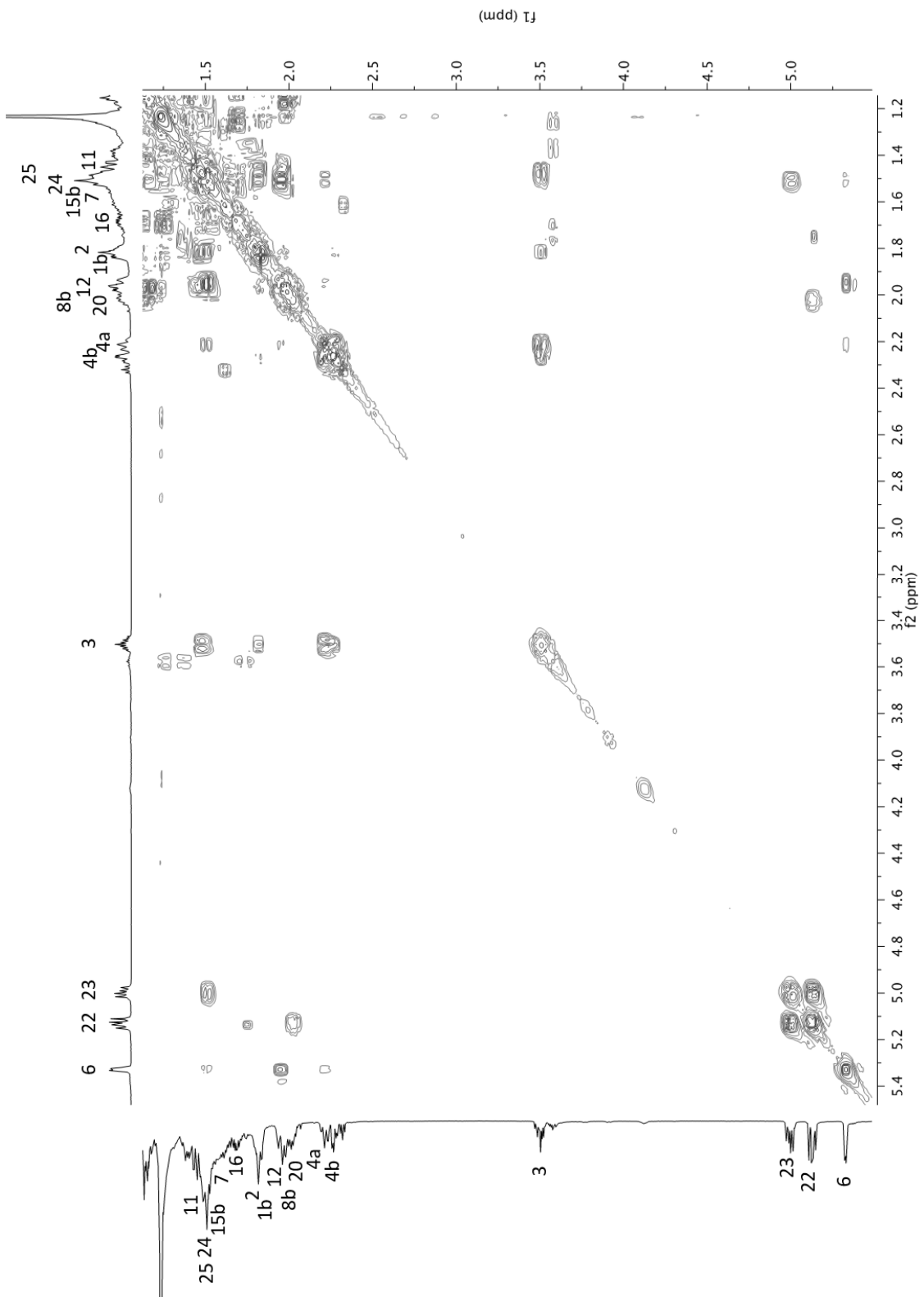


Abbildung 2.196: Ausschnitt aus dem 2D-COSY-Spektrum von **15** (600 MHz in CDCl_3)

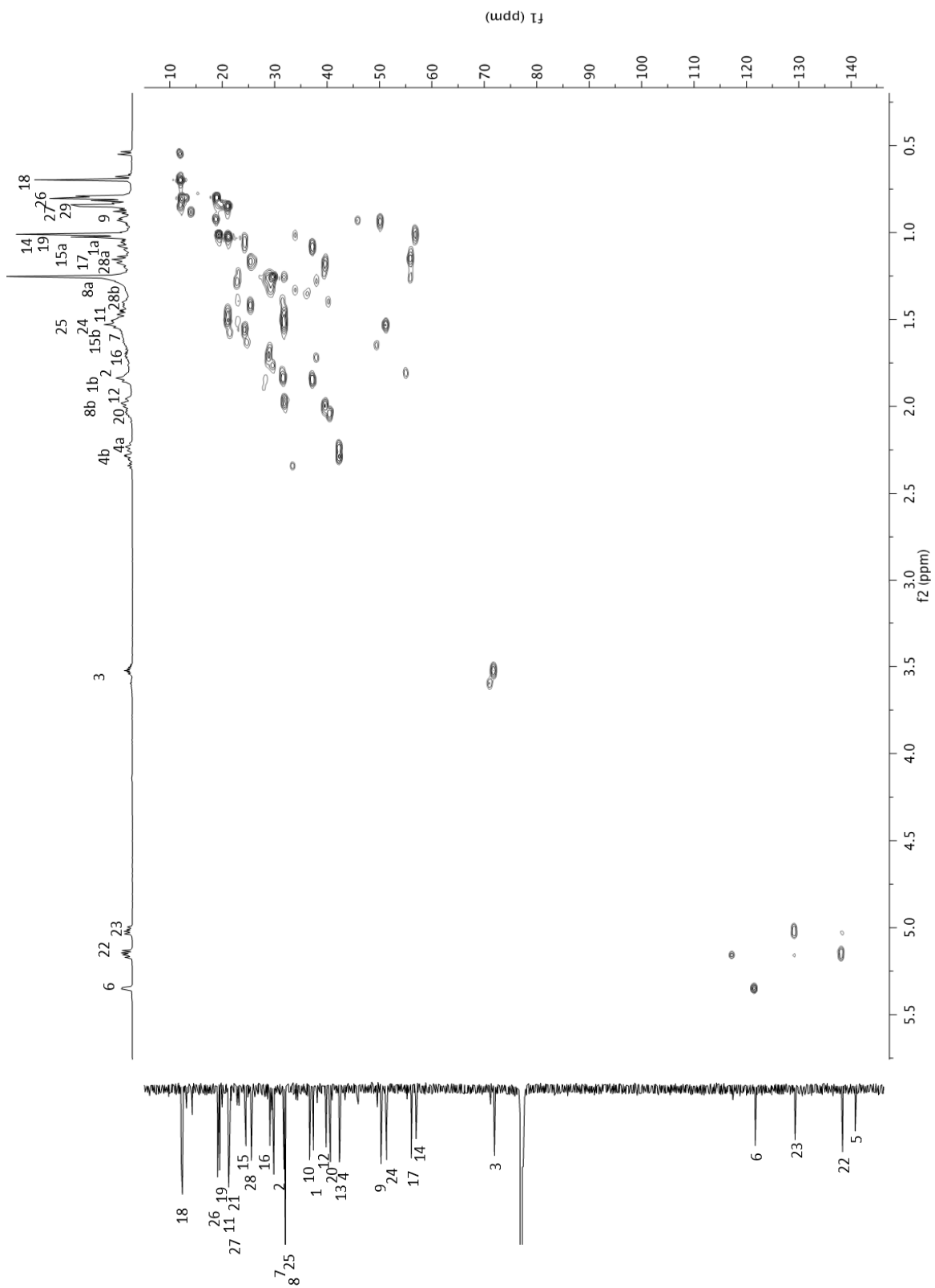


Abbildung 2.198: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **15** (600 MHz in CDCl_3)

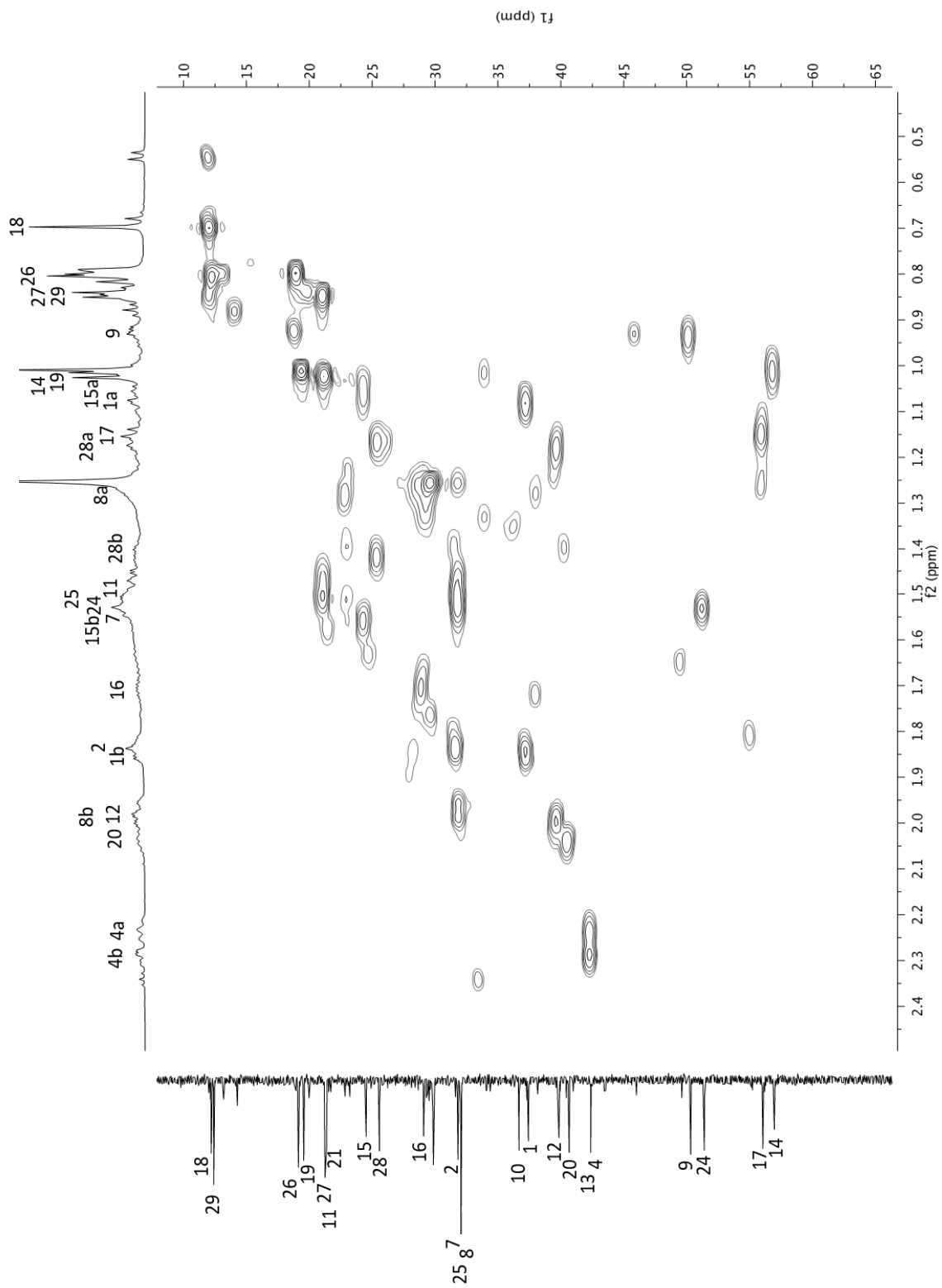


Abbildung 2.199: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **15** (600 MHz in CDCl_3)

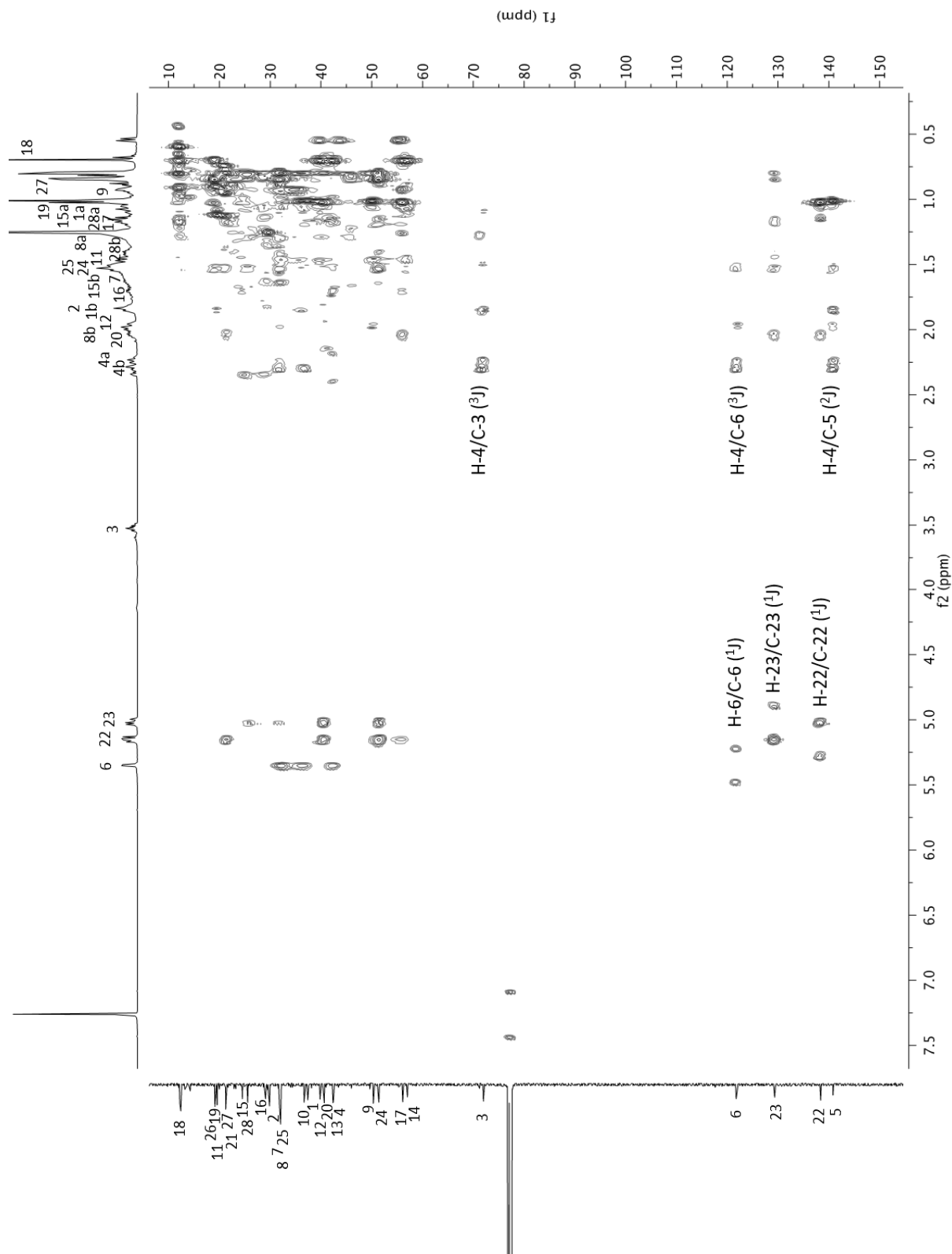


Abbildung 2.200: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 15 (600 MHz in CDCl_3)

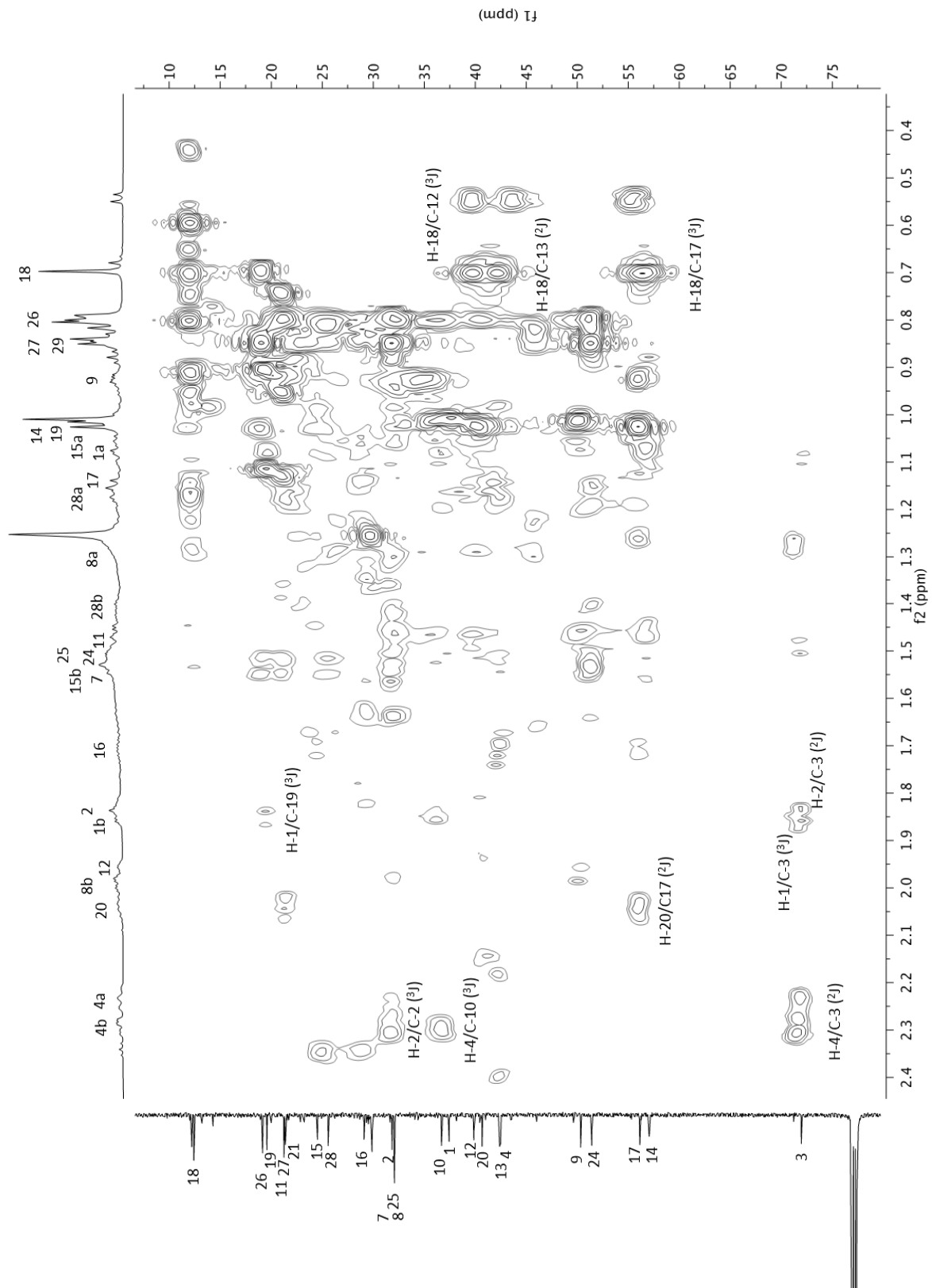


Abbildung 2.201: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 15 (600 MHz in CDCl_3)

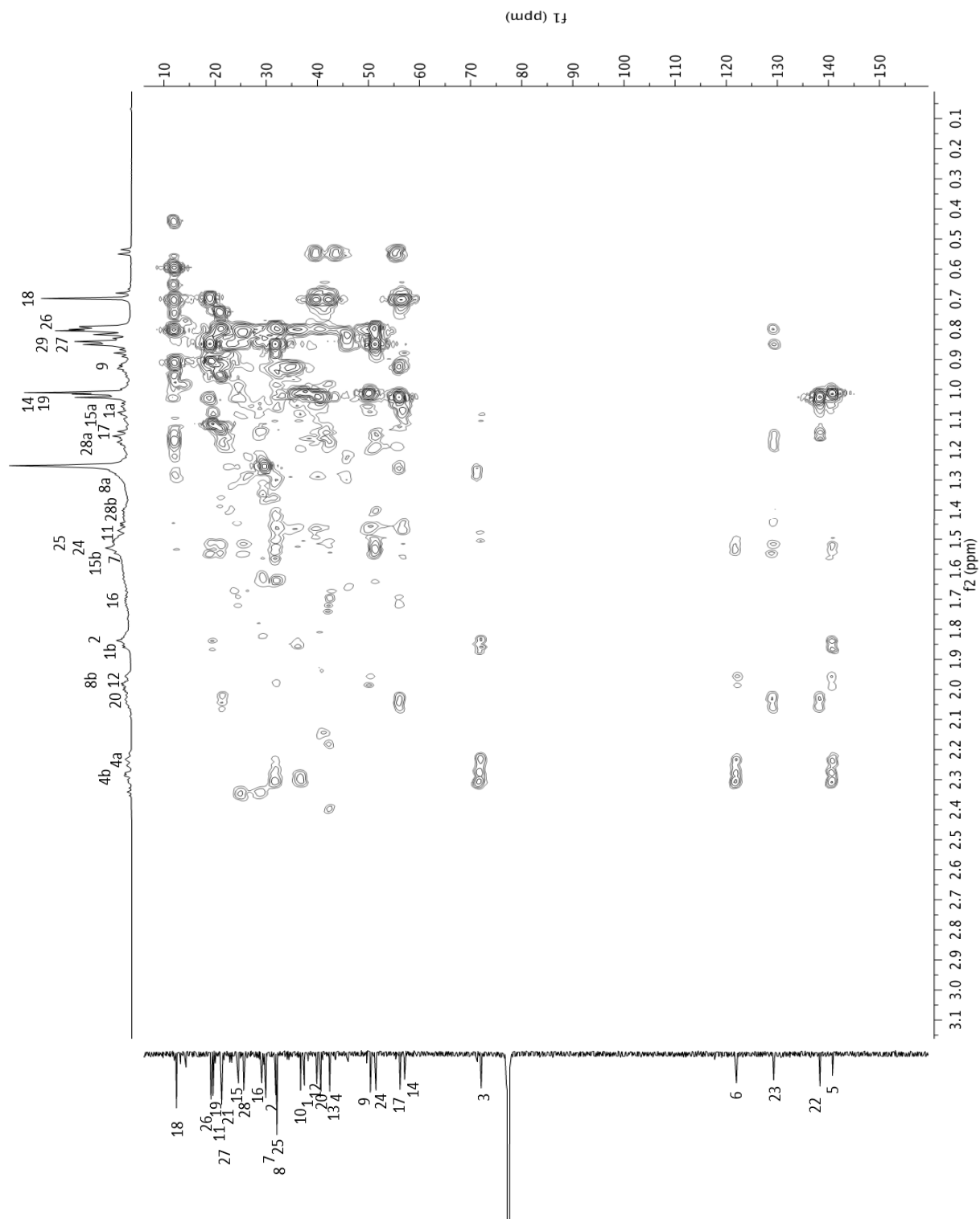


Abbildung 2.202: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **15** (600 MHz in CDCl_3)

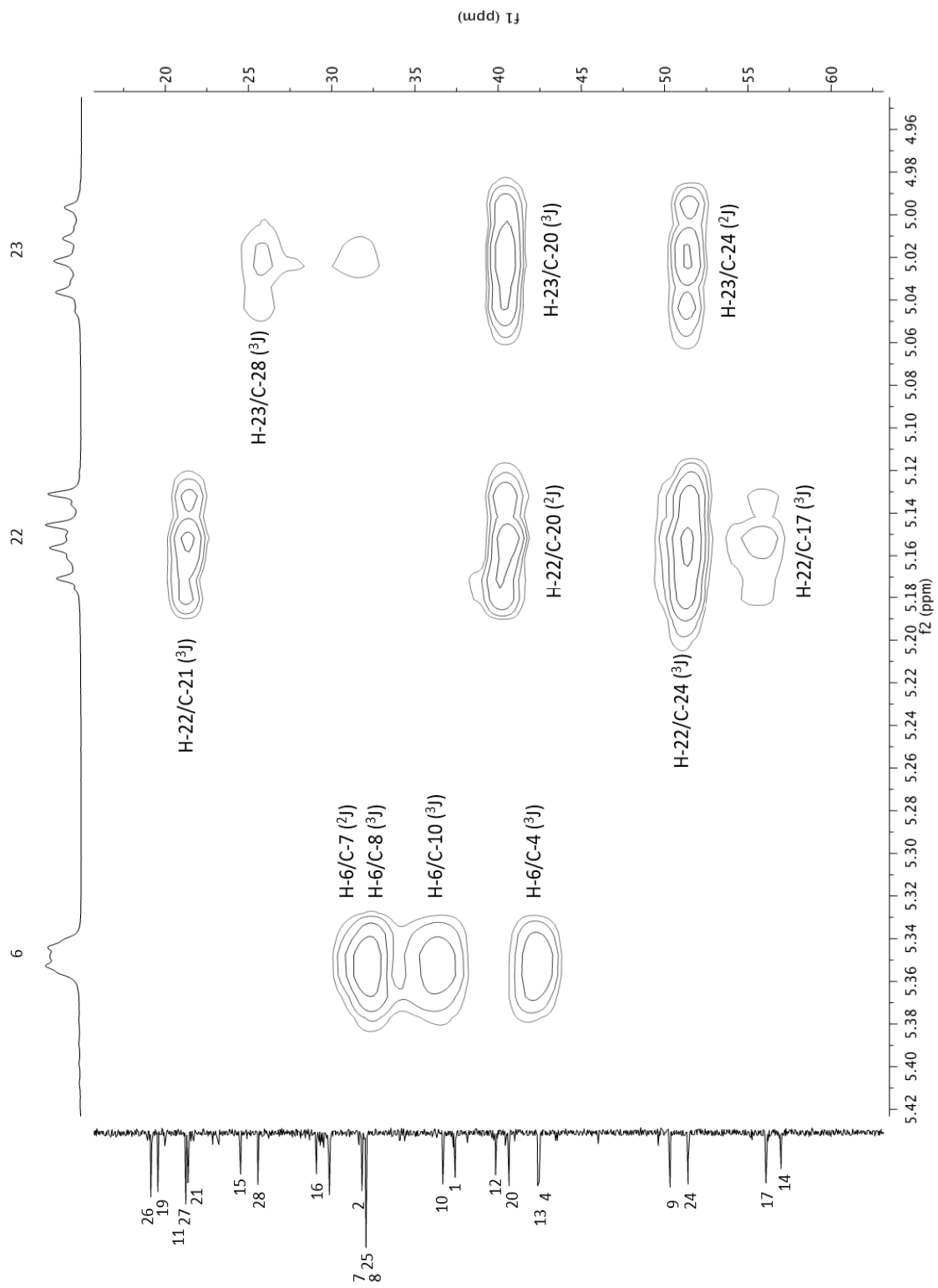
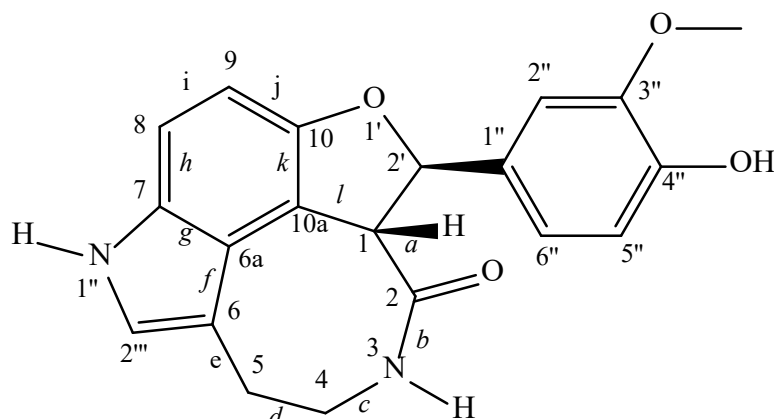


Abbildung 2.203: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **15** (600 MHz in CDCl_3)

2.2.15 Verbindung 17 (Serotobenine)



Verbindung **17** fiel in der Methanolfraction 6.1.7 an. Im DC besaß die Verbindung einen Rf-Wert von 0,56 (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1). Die Substanzzone färbt sich nach Besprühen Naturstoffsreagenz A bei Tageslicht gelb (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.1., Tab. 5.2). Nach semipräparativer Reinigung im HPLC (s. Exp. Teil, Kap. 5.2.5) wurden 6,4mg isoliert (s. Exp. Teil, Kap. 5.4.4). Im HPLC betrug Die Retentionszeit von **17** 21,53 Min: Das bei der HPLC aufgenommene UV-Spektrum zeigte ein Maximum bei $\lambda = 231$ und 285 nm. Abbildung 2.203 zeigt das HRESI-Massenspektrum von **17** mit dem Quasimolekülion bei $m/z = 351,3142$ $[M+H]^+$. Daraus lässt sich die Summenformel $C_{20}H_{18}N_2O_4$ ableiten. Damit muss es sich um das erste stickstoffhaltige Verbindung handeln, die aus einer *Volutaria* Art isoliert worden ist. Bei einer Literaturrecherche zur Summenformel $C_{20}H_{18}N_2O_4$ bei www.scifinder.cas.org fanden sich 7919 Strukturen in 3019 Literaturstellen.

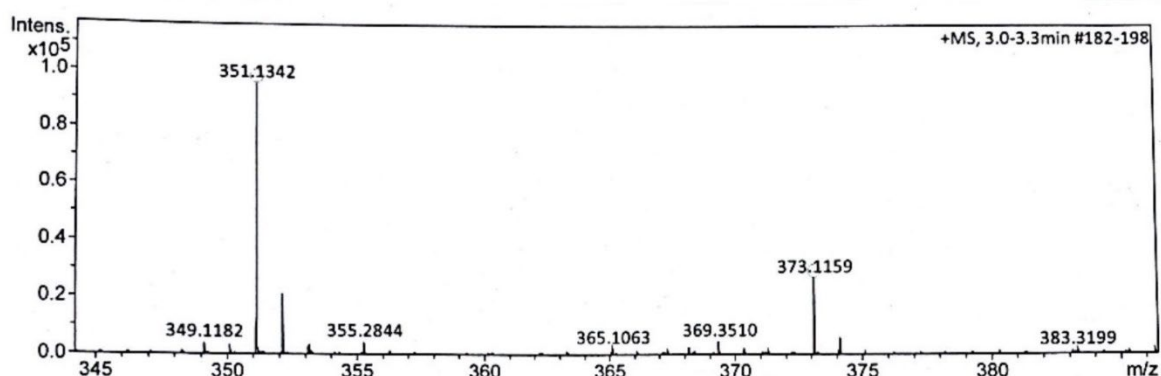


Abbildung 2.204: HR-ESI Massenspektrum von **17**

Bei Kombination dieser Suche mit den Stichwörtern *Volutaria*, *Amberboa* und *Centaurea* erhielt man nur nach Eingabe von *Centaurea* zwei Publikationen von Sarker et. al. (1997) und Kumarasamy et al. (2002) aus der Arbeitsgruppe von Sarker, inzwischen in Aberdeen (Schottland), zu den Indolalkaloiden von *Centaurea moschata*. Zur endgültigen Aufklärung der Struktur wurden das ¹H- und ¹³C-NMR Spektrum von **17** aufgenommen (s. Abb. 2.205 und 2.206, S. 313-314). Die Zuordnung der Signale wurde über die 2d-COSY, HSQC und HMBC Spektren abgesichert (s. Abb. 2.207 – 2.209, S. 315 - 317 und Tab. 2.25, S.310). Zum besseren Vergleich wurde die Nummerierung aus der Veröffentlichung von Sarker et al. (1997) übernommen. Das ¹³C-NMR Spektrum zeigt erwartungsgemäß die Signale für 20 Kohlenstoffe, von denen eins zu einer aromatisch gebundenen Methoxygruppe gehört (δ_C 56.39). Das korrespondierende Protonensignal findet sich über das HSQC Spektrum (s. Abb. 2.208) als Singulett für drei äquivalente Methoxyprotonen bei δ_H = 3.85 ppm. Diese Methoxygruppe ist aufgrund der ³J-Korrelation im HMBC-Spektrum (s. Abb. 2.209) am aromatischen Kohlenstoff bei δ_C = 149.15 (C-3'') gebunden. Dieser Kohlenstoff gehört zu den sechs Kohlenstoffen eines 1,3,4-disubstituierten Phenylrings der, wie bereits bei den Flavonoiden **6** und **7** und dem Lignan **12** gefunden, mit dem C-1'' am restlichen Molekül gebunden ist. Die drei Protonensignale der aromatischen C-H Kohlenstoffe treten als typisches ABX-System bei δ_H = 7.05 (d, H-2'') 6.92 (dd, H-6'') und 6.81 (d, H-5'') auf. Die korrespondierenden Kohlenstoffe liegen bei δ_C = 110.76 (C-2''), 120.01 (C-6'') und 116.23 (C-5''). Über die Kopplungen der Protonen des Phenylrings im HMBC-Spektrum, kann einerseits das quartäre, hydroxylierte C-4 (Kopplungen mit H-2'' und H-6'') bei δ_C = 147.52 identifiziert werden, andererseits findet sich eine Korrelation zwischen H-2'' und einem Kohlenstoffsignal bei δ_C = 85.71 ppm. Bei diesem handelt es sich um das C-2 eines 2,3-disubstituierten Dihydrobenzofurans. Das zugehörige H-2' bei δ_H = 6.25 ppm koppelt mit dem benachbarten Proton des Furanrings (hier H-1) bei δ_H = 4.74 ppm. Beide Signale spalten mit einer Kopplungskonstante J = 9.4 bzw. 9.5 Hz zum Dublett auf, wodurch gefolgert werden kann, dass sie keine weiteren Kopplungspartner besitzen und trans-angeordnet sind. Ausgehend von H-1 finden sich mit den Signalen des Carbonylkohlenstoffs bei δ_C = 174.39 (C-2) und des quartären, aromatischen Kohlenstoffs bei δ_C = 114.6 ppm zwei weitere Kopplungspartner (²J-Kopplungen) über deren weitere Korrelationen die übrigen Strukturelemente identifiziert werden konnten. Das Kohlenstoffsignal C-10a zeigt eine ³J-Kopplung mit dem H-9 des Benzofurans bei δ_H = 6.70 ppm, das eine ortho-Kopplung (J = 8.6 Hz) mit dem Proton bei δ_H = 7.22 ppm (H-8) besitzt.

Tabelle 2.25: NMR Daten der Verbindung **17** (600 MHz in CD₃OD; δ in ppm, (J in Hz))

	17		Moschamindole (Sarker et. al, 1997)	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1'''' NH			9.98 s (br.)	-
3-NH			8.00 s (br.)	-
1	4.74 d (9.5)	55.95	4.74 d (9.4)	54.9
2	-	174.39	-	170.0
4	4.11 ddd (14.4, 12.1, 1.8) 3.53 ddd (15.1, 4.3, 2.7)	42.13	4.10 t (br.) 3.48 m	40.7
5	3.17 m 3.07 dddd (16.65, 12.27, 2,74, 1.36)	30.72	3.13 m	28.0
6	-	112.15	-	111.0
6a	-	123.81	-	122.3
7	-	134.54*	-	133.0
8	7.22 dd (8.6, 1.1)	112.73	7.22 dd (8.6, 1.0)	111.3
9	6.70 d (8.6)	105.50	6.70 d (8.6)	104.1
10	-	153.87	-	152.0
10a	-	114.66	-	113.5
2'	6.25 d (9.4)	85.71	6.25 d (9.4)	84.3
1''	-	134.66*	-	133.0
2''	7.05 d (2.07)	110.76	7.05 d (1.9)	109.4
3''	-	149.15	-	147.8
4''	-	147.52	-	146.5
5''	6.81 d (8.1)	116.23	6.81 d (8.1)	114.8
6''	6.92 dd (8.2, 2.0)	120.01	6.92 dd (8.1, 1.9)	118.6
2'''	7.08 d (1.3)	126.01	7.08 d (1.0)	124.6
OCH ₃ an C-3''	3.85 s	56.39	3.88 s	55.0

* Zuordnung vertauschbar

Darüber hinaus finden sich zwei Methylenkohlenstoffe bei $\delta_C = 42.13$ und 30.72 ppm, die zusammen mit dem tetrasubstituierten Aromaten und dem C-2'''' eines Indols ein substituiertes Serotoninderivat bilden. In der Publikation von Sarker et al (1997) wurde dieser Kohlenstoff als C-5'''' bezeichnet.

In den hier gemessenen Spektren spalten die Signale für die beiden Methylenprotonen an C-4 bei $\delta_H = 4.11$ und 3.53 ppm jeweils zum Dublett vom Dublett von Dubletts (ddd) auf (s. Tab. 2.25). In der Publikation von Sarker (1997) fand sich nur ein breites Triplet bei 4.10 und ein Multiplett bei 3.13 ppm. Die beiden Protonen des direkt an das Indol gebundenen Methylenkohlenstoffs C-5 wurden von Sarker als ein Multiplett für 2 Protonen bei $\delta_H = 3.13$ beschrieben. In unseren Spektren finden sich zwei getrennte Signale für jeweils 1 Proton bei $\delta_H = 3.17$ und 3.07 ppm. Während das Signal bei 3.17 ppm keine eindeutige Aufspaltung zeigt und daher auch hier als Multiplett bezeichnet werden muss, spaltet das Proton bei $\delta_H = 3.07$ ppm zum Dublett vom Dublett vom Dublett von Dubletts (dddd) auf. Neben der geminalen Kopplung der beiden Methylenprotonen an C-5 und den beiden vicinalen Kopplungen mit den Protonen an C-4, findet sich in diesem Signal noch eine weitere Kopplung, allylische Kopplung mit dem Proton an C-2^{''}, was die Struktur weiter bestätigt.

Verbindung **17** ist auch unter dem Trivialnamen Moschamindole bekannt (Sarker et al., 1997). In der ursprünglichen Publikation beschrieb Sarker et al. (1997) die beiden benachbarten Protonen an C-1 und C-2' aufgrund von NOE-Effekten als *cis*-konfiguriert. Die dabei gefundenen Effekte ließen dies aber eigentlich nicht eindeutig erkennen. Vier Jahre später veröffentlichte die gleiche Arbeitsgruppe (Cox et al., 2001) eine Röntgenstruktur von Moschamindole. Auch wenn die absolute Stereochemie nicht geklärt werden konnte, wurde erkannt, dass die beiden Stereozentren C-1 und C-2' gleich angeordnet sind, und entweder R,R- oder S,S-konfiguriert vorliegen. Im abgebildeten ORTEP-Plot ist dabei gut zu erkennen, dass die beiden Protonen an C-1 und C-2' trans-konfiguriert vorliegen (Cox et al., 2001)

Insgesamt gesehen stimmen die hier ermittelten NMR Daten sehr gut mit den von Sarker et al. (1997) für das aus den Samen von *Centaurea moschata* isolierten {2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)}-dihydrofuro[*kl*]-1*H*-pyrrolo[*fg*]-2-oxo-1,2,3,4,5,6-hexahydro-benzazocine überein. Die von uns gemessenen ¹³C NMR Daten liegen geringfügig höher, was möglicherweise an der unterschiedlichen Kalibrierung liegen könnte. Leider finden sich bei Sarker et al. (1997) keine Informationen darüber, ob TMS zur Kalibrierung der Spektren verwendet wurde. Bei der Aufnahme unserer Spektren wurde kein TMS zugesetzt, die Kalibrierung erfolgte auf das Lösungsmittelsignal des Methanols bei $\delta_C = 49.000$ ppm.

Substanz **17** findet sich auch unter der Bezeichnung Serotobenine in der Literatur. Diese Bezeichnung wurde erstmals 1985 von Sato et al. für ein phenolisches Amid aus den Samen der Färberdistel, *Carthamus tinctorius* (Asteraceae), in die Literatur eingeführt. Die dort

veröffentlichten NMR-Daten lassen sich nur bedingt mit den hier ermittelten Daten vergleichen, da Sato et al, (1985) nur die NMR Daten nach Acetylierung der phenolischen OH-Gruppe an C-4“ veröffentlicht hat. Außerdem wurde das ¹H- in Aceton-d₆ und das ¹³C-NMR Spektrum in DMSO-d₆ aufgenommen. Sato et al. veröffentlichten aber bereits damals die Daten einer mit Serotobenine durchgeführten Röntgenstrukturanalyse, bei der sie zu dem Schluss kamen, dass es sich bei der aus *Carthamus tinctorius* isolierten Verbindung um ein Racemat des R,R- und S,S-Serotobenine handelt (Sato, et al, 1985). Die Protonen an den beiden chiralen Zentren waren dementsprechend *trans* angeordnet. Es bleibt unklar, warum Sarker et al. (1997) die bereits 12 Jahre zuvor veröffentlichte Arbeit nicht erwähnten haben.

Bei Verbindung **17** handelt es sich demnach um das Serotobenine. Diese Verbindung ist von großem pharmazeutischem Interesse. Zhang et al. (2002) konnten zeigen, dass die strukturell sehr ähnlich Substanz Decursivine aus der Araceae *Rhaphidophora decursiva*, die sich von Serotobenine nur durch eine Methylendioxygruppe anstelle der OH- und Methoxygruppe am Phenylring unterscheidet, eine, wenn auch geringe Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, zeigt. Dies konnte auch durch Nyemeck et al. (2018) gezeigt werden, die zeigen konnten, dass auch Serotobenine aus *Campylospermum* Arten eine gewisse Aktivität gegen *P. falciparum* zeigt. Zeitgleich wurde die Verbindung erneut unter dem Namen Moschamindole vom Kumarasamy et al. (2002) erfolgreich gegen verschiedene Bakterienstämme getestet. In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Huang et a. (2021) veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung, die als Konstituent von *Phragmites communis* (Poaceae) beschrieben wird, in der Lage ist zytotoxische Effekte gegenüber Glioblastomzellen auszuüben.

Serotobenine ist das erste Alkaloid, das in der Gattung *Volutaria* gefunden wurde.

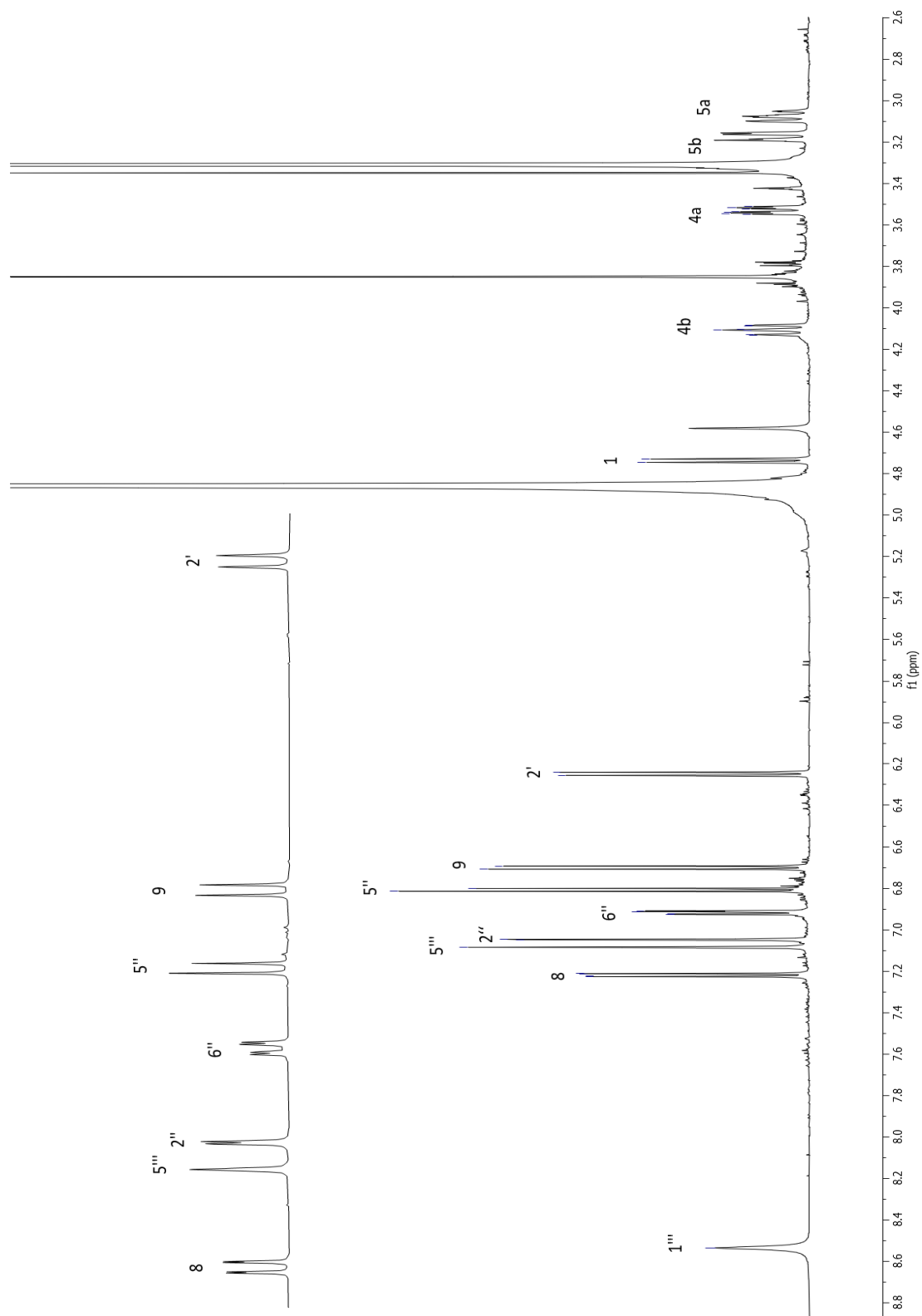


Abbildung 2.205: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung 17 (600 MHz in CD_3OD)

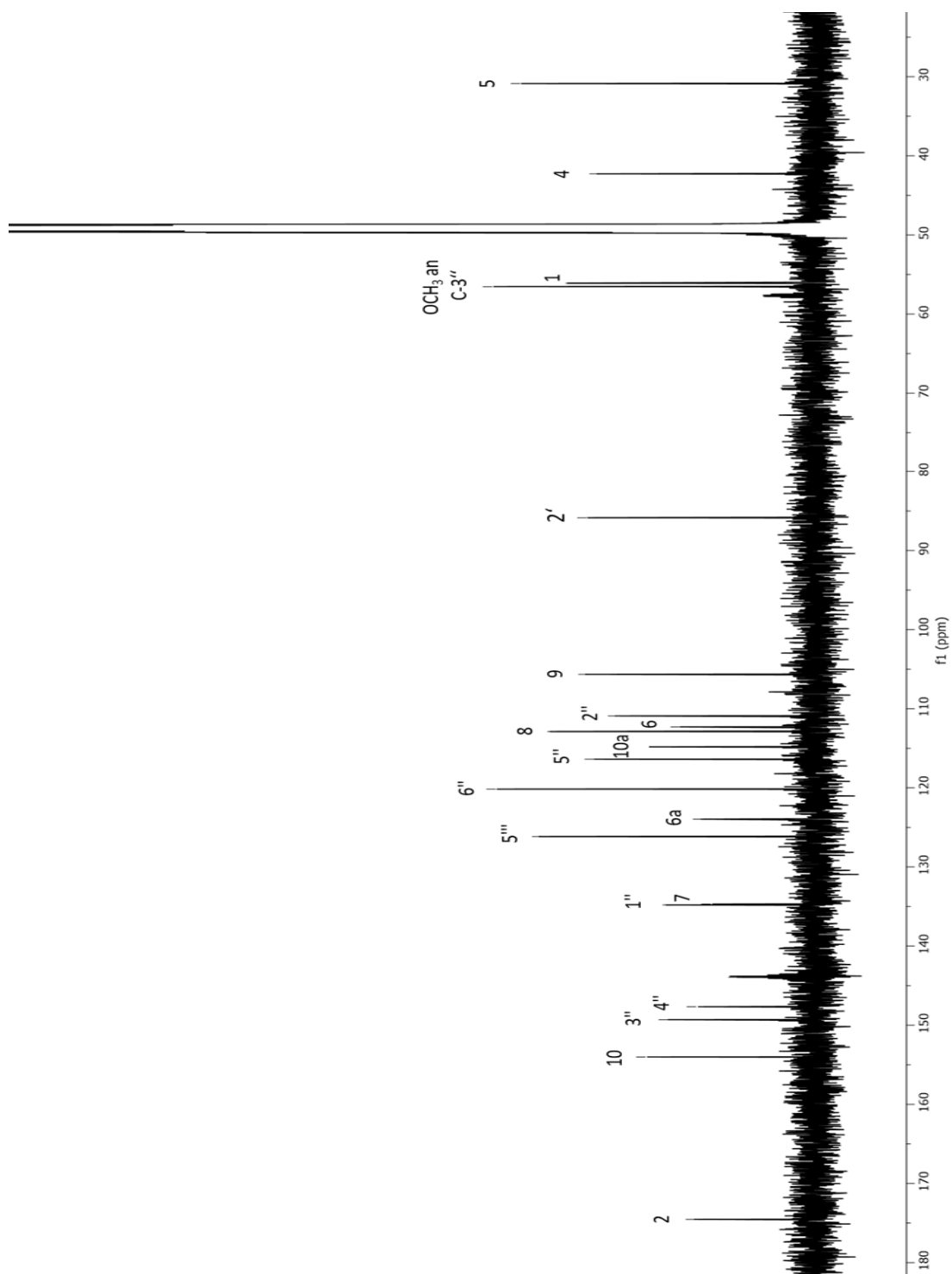


Abbildung 2.206: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung 17 (150 MHz in CD_3OD)

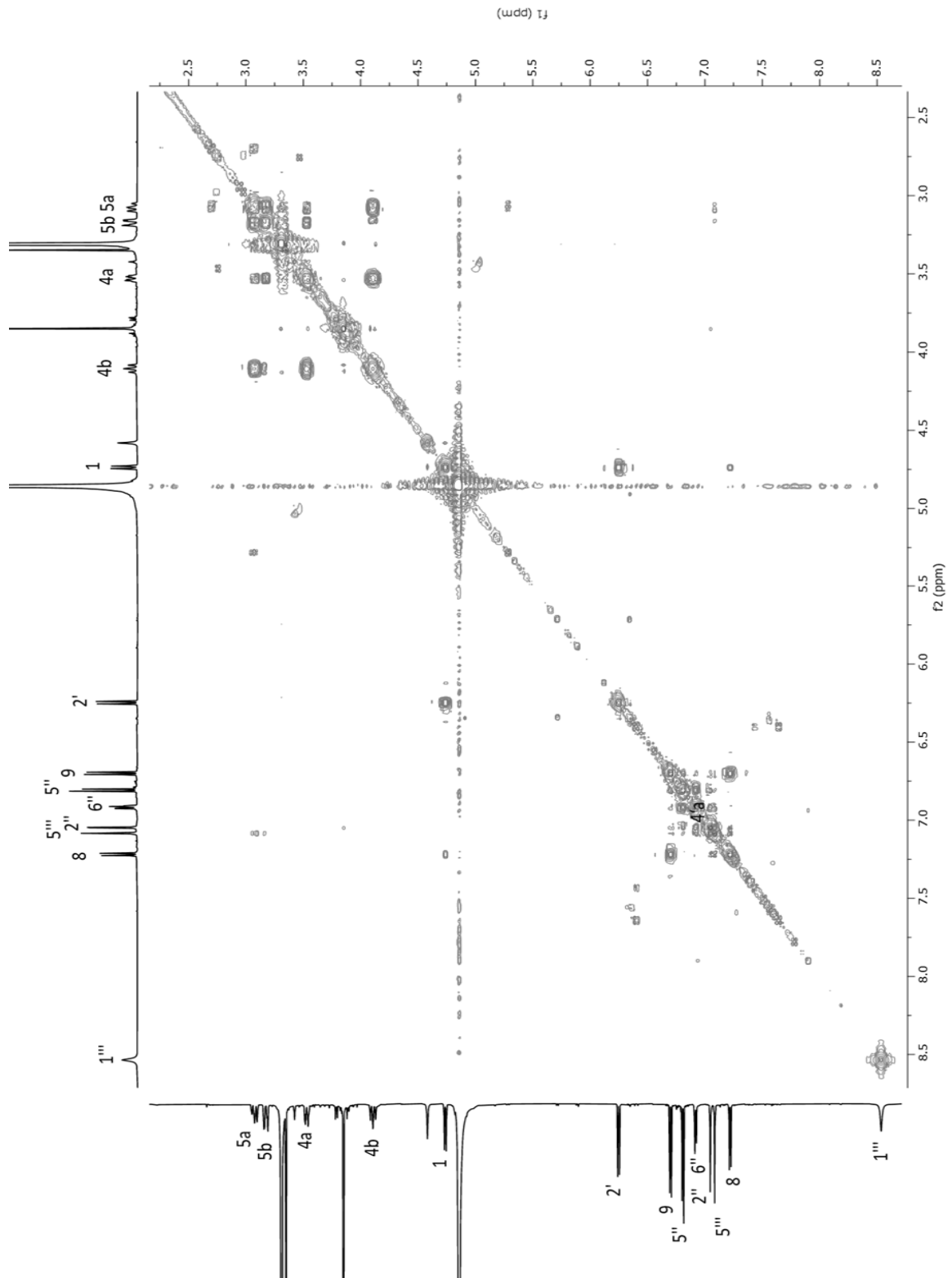


Abbildung 2.207: 2D-COSY-Spektrum von 17 (600 MHz in CD₃OD)

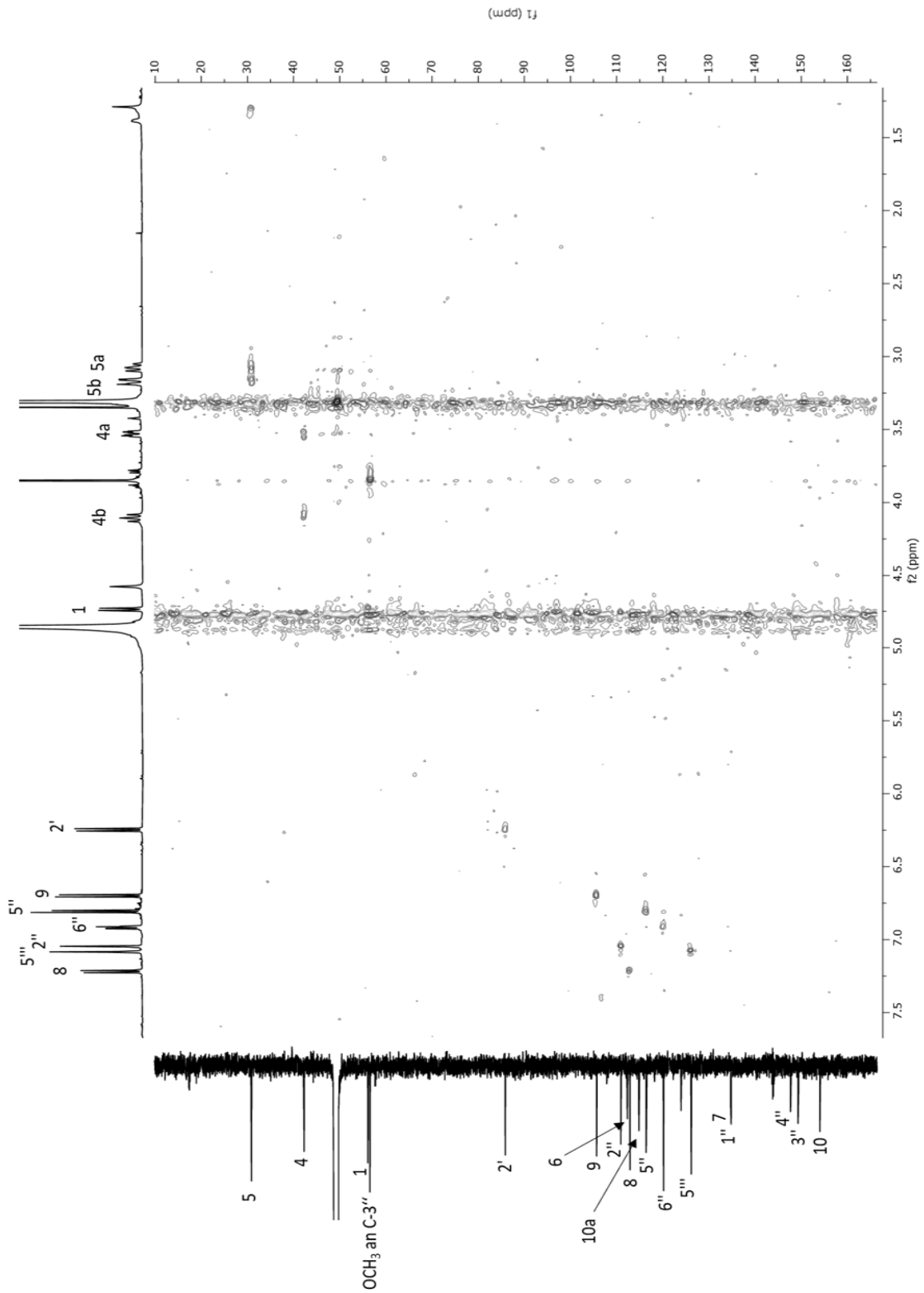


Abbildung 2.208: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung **17** (600 MHz in CDCl_3)

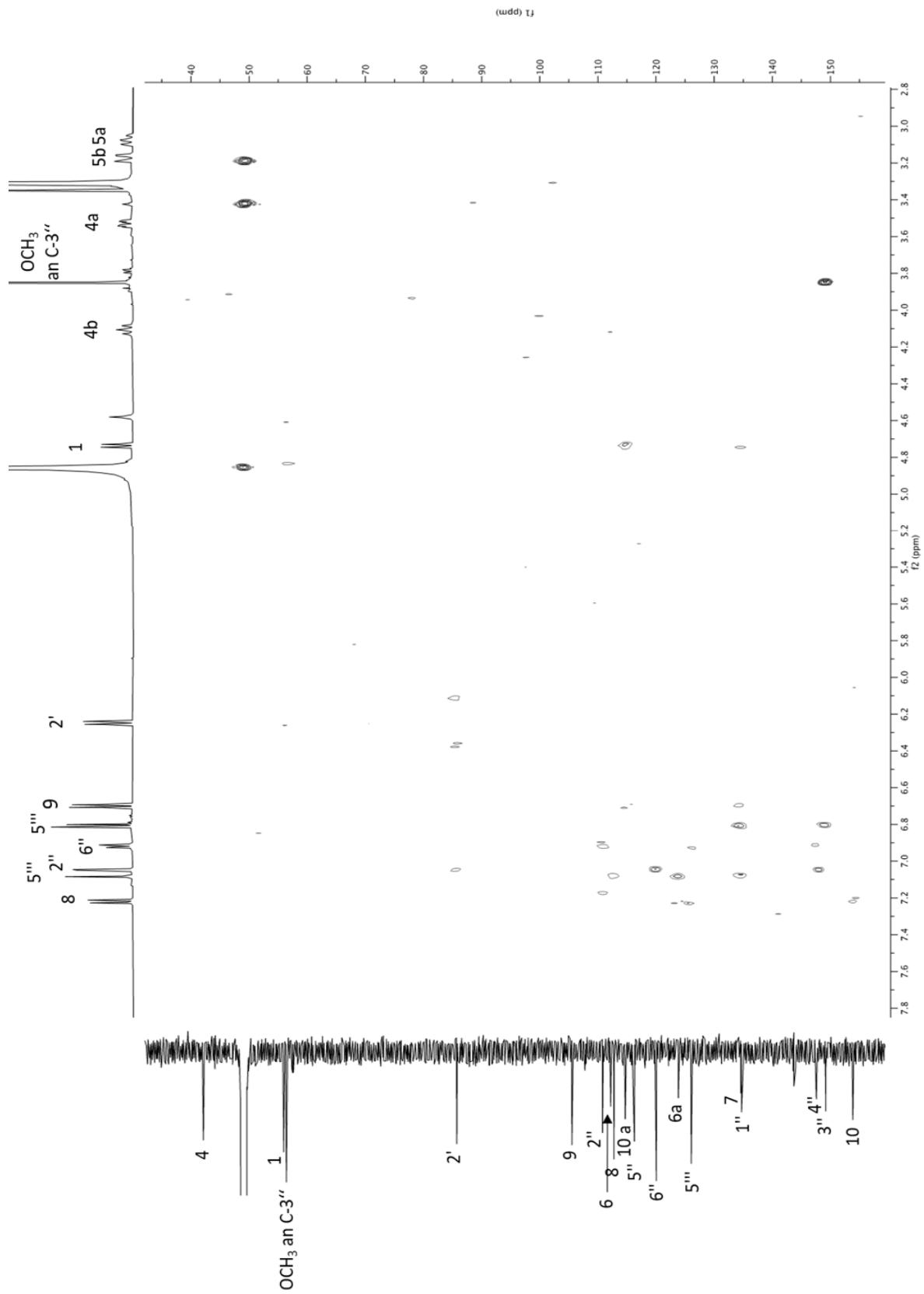


Abbildung 2.209: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 17 (600 MHz in CDCl_3)

3. Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen

Untersuchung zur Zytotoxizität

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Kassack, Institut für pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, wurden die zytotoxischen Eigenschaften der aus *Volutaria boranensis* isolierten Verbindungen **1 – 4**, **6 - 8** und **12 - 15**-gegenüber Ovarialkarzinomzellen der Zelllinie A2780 sens untersucht (s. Exp. Teil, Kapitel 5.6). Die Verbindung **5**, bei der es sich um das C-4 Epimer von **4** handelt, konnte ebenso wenig getestet werden wie das Gemisch der beiden Eriodictyolglucuronide **9** und **10** und der Chlorogensäure (**11**), da die Struktur dieser Verbindungen erst zu spät aufgeklärt wurde. Neben den Substanzen, die aus *Volutaria boranensis* isoliert werden konnten, wurden auch einige zuvor von Ingo Kolb in unserem Arbeitskreis isolierten, prenylierten Flavonoide aus *Erythrina burtii* untersucht. Es handelt sich dabei um drei Isoflavonoide, vier Pterocarpane und sechs Flavanone (s. Abb. 3.1 und 3.2) (Passreiter et al, 2015). Tab. 3.1 listet alle aus *Volutaria boranensis* und *Erythrina burtii* getesteten Verbindungen und deren Bezeichnungen in den pharmakologischen Tests.

Tabelle 3.1: Untersuchte Verbindungen aus *Volutaria boranensis* und *Erythrina burtii*

<i>V. boranensis</i>		<i>E. burtii</i>	
Isolipidiol/Lipidiol (2,3)	AKC-01	4'-O-Methylabyssinone V (III)	IKC-12
Cynaropikrin (1)	AKC-02	Abyssinone IV 4'-O-methylether (IV)	IKC-13
4 α -Methylboranoflavon (4)	AKC-03	Abyssinone IV (V)	IKC-14
Hispidulin (6)	AKC-04	Bidwillon A (VIII)	IKC-15
Eupafolin (7)	AKC-05	Abyssinoflavanone VII 4'-methylether (II)	IKC-16
Arctiin (12)	AKC-06	Addisoniaflavanon II (I)	IKC-17
Taraxasterol (13)	AKC-08	Neorautenol (X) / Phaseolin (XI)	IKC-18
Stigmasterol (15)	AKC-10	Wighteone 4'-methylether (VII)	IKC-19
Boranensisflavon (8)	AKC-11	Desmethyl-erysubin C (XIII)	IKC-20
		Glabridin (XII)	IKC-21
		Abyssinone II (VI)	IKC-22
		Glyasperin B (IX)	IKC-23

Flavanone

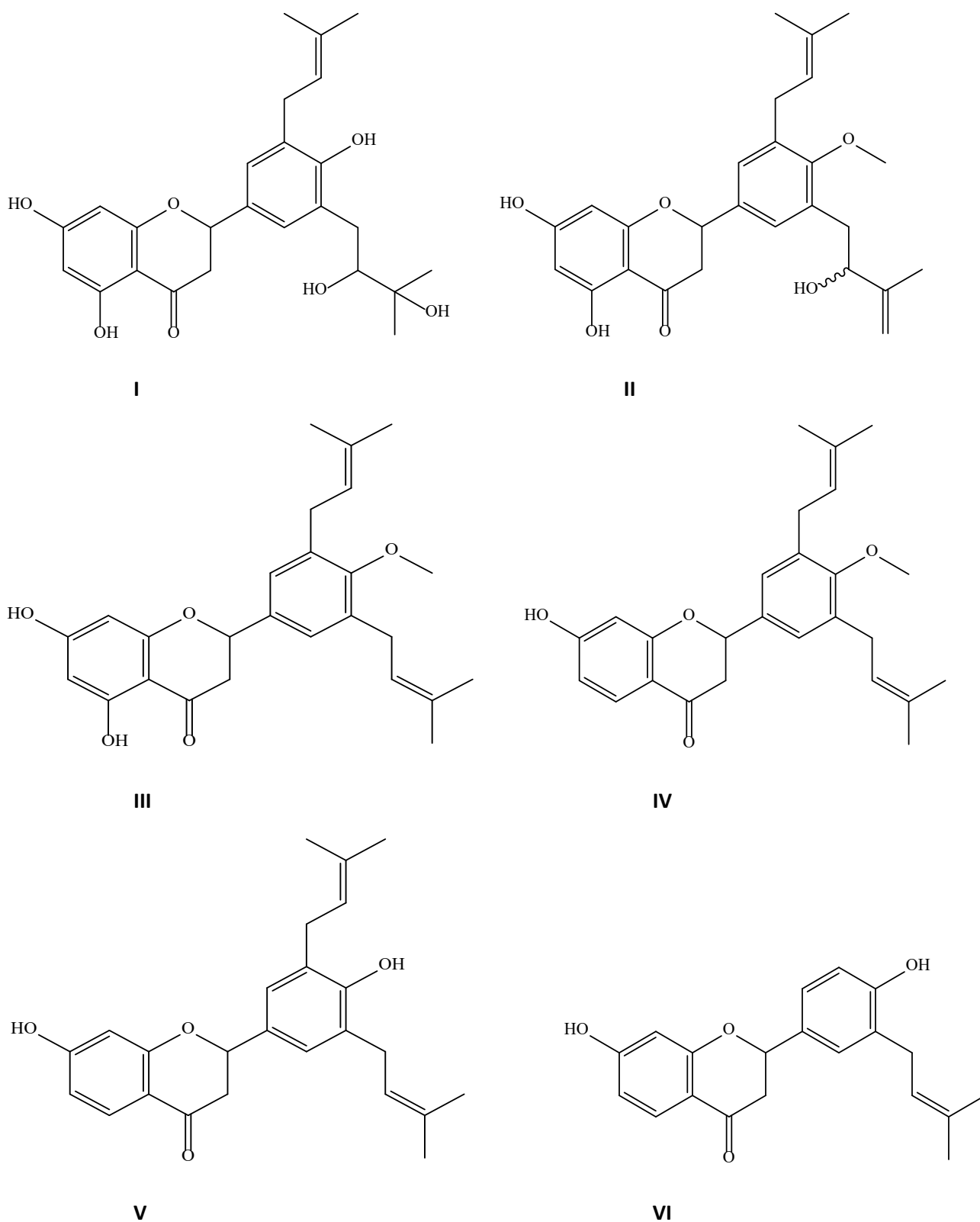
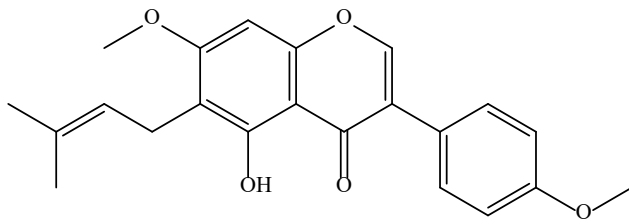
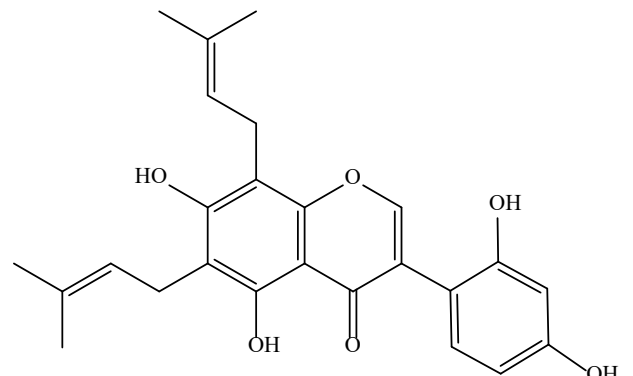


Abbildung 3.1: Aus *Erythrina burtii* isolierte und getestete Flavanone

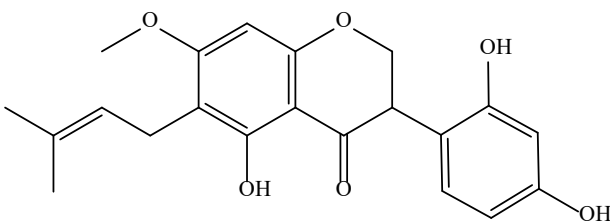
Isoflavonoide



VII

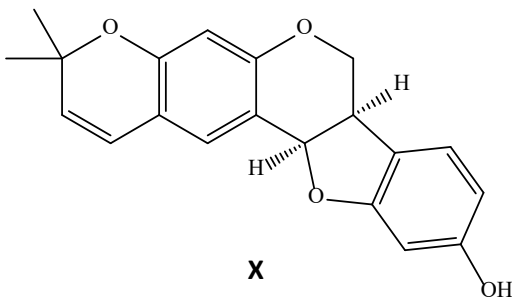


VIII

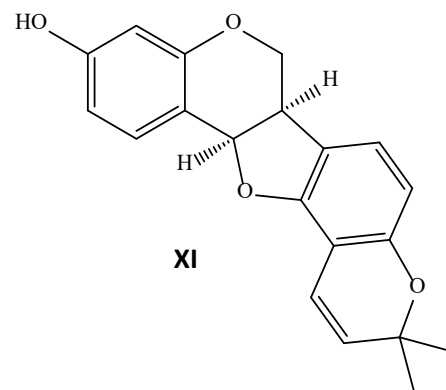


IX

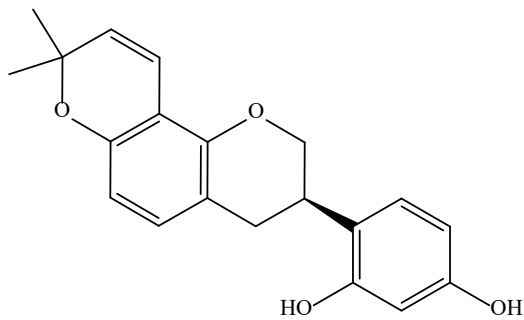
Pterocarpane



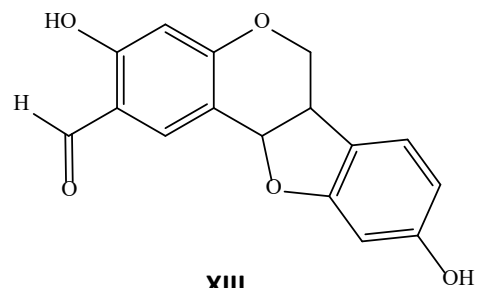
X



XI



XII



XIII

Abbildung 3.2: Aus *Erythrina burtii* isolierte und getestete Isoflavonoide und Pterocarpane

Zur Bestimmung der Zytotoxizität gegenüber den genannten Zellen wurden die isolierten Verbindungen zunächst in jeweils nur zwei Konzentrationen (10 und 100 μM) untersucht. In den Balkendiagrammen in Abbildung 3.3 und 3.4 (S. 323-324) und Tabelle 3.2 (Seite 322) sind die Ergebnisse der MTT-Assays dargestellt (s. Exp. Teil., Kap. 5.6.2), im Vergleich zu Cisplatin (cDDP, 100 μM), das als Positivkontrolle diente. Als Referenzwert wurden DMSO-Lösungen in zwei Konzentrationen (0,1% und 1%) mitgetestet, um Lösungsmittelleffekte auf die Toxizität der Verbindungen auszuschließen (s. Exp. Teil, Kapitel 5, 6.2).

Die meisten der getesteten Substanzen zeigten nur in einer Konzentration von 100 μM deutliche Effekte. Nur drei der aus *Volutaria boranensis* isolierten Verbindungen zeigten bei dieser Testkonzentration eine geringere Hemmung auf das Zellwachstum als Cisplatin (87,97%). Das Lignan Arctiin (**12**) war nur um etwa 10 % weniger stark wirksam, die Verbindungen **7** (Eupafolin) und **15** (Stigmasterol) blieben mit Werten von 54,8 und 43,1 %- Hemmung weit dahinter zurück (s. Tab. 3.2). Von den 12 Testsubstanzen aus *Erythrina burtii* erreichten nur die Verbindung **I** (Addisoniaflavanon II) und **VII** (Wighteone 4'-methylether) mit 72,5 bzw. 51,3 % keine Hemmwirkung in Bereich des Cisplatins von etwa 90 %, die anderen Substanzen zeigten vielversprechende Werte (s. Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Inhibition des Tumorzellwachstums in Prozent.

<i>V. boranensis</i>			<i>E. burtii</i>		
<i>Verbindung</i>	100 µM	10 µM	<i>Verbindung</i>	100 µM	10 µM
1 (AKC-02)	87,2	87,7	I (IKC17)	72,5	3,02
2/3 (AKC-01)	88,1	0	II (IKC-16)	90,4	14,9
4 (AKC-03)	87,9	88,6	III (IKC-12)	90,9	24,4
6 (AKC-04)	69,7	0	IV (IKC-13)	88,5	64,1
7 (AKC-05)	54,8	23,8	V (IKC14)	90,4	18,5
8 (AKC-11)	89,3	88,4	VI (IKC-22)	90,7	35,7
12 (AKC-06)	71,20	63,60	VII (IKC19)	51,3	6,13
13 (AKC-08)	83,9	0	VIII (IKC-15)	88,8	7,11
15 (AKC-09)	43,1	1,5	IX (IKC-23)	88,9	7,5
			X/XI (IKC-18)	91,6	23,1
			XII (IKC-21)	90,8	8,82
Cisplatin	87,97	n.t.	XIII (IKC-20)	92,2	2,65

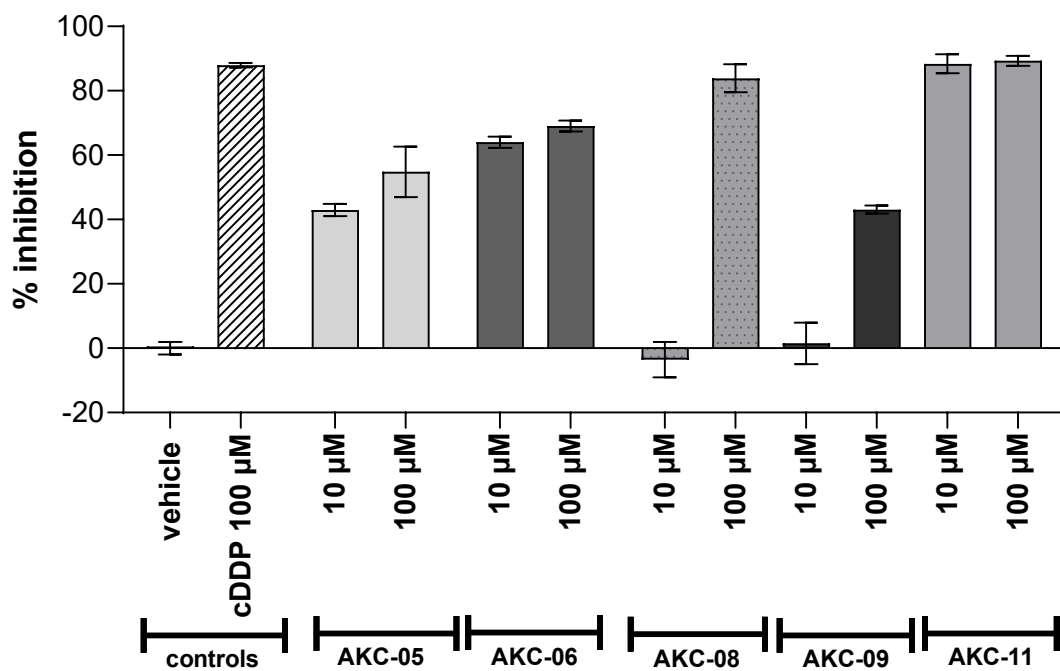
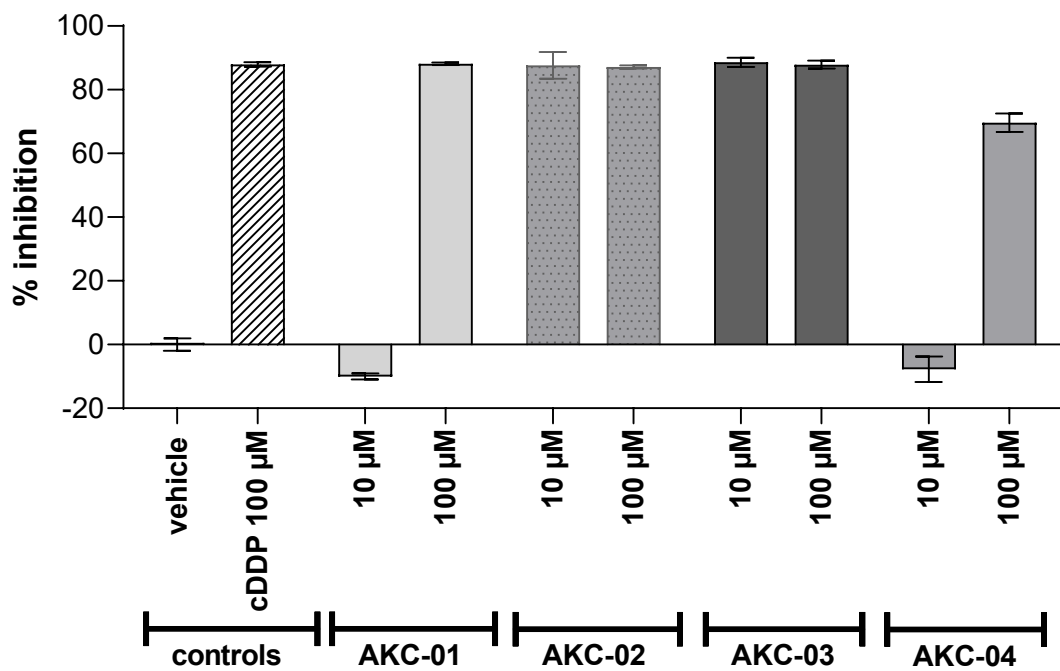


Abbildung. 3.3: Ergebnis der MTT-Assays der Verbindungen AKC-01 bis AKC-11 aus *Volutaria boranensis*

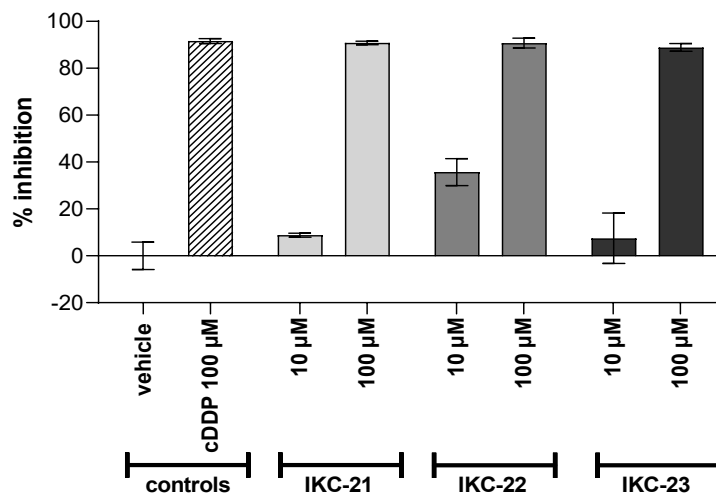
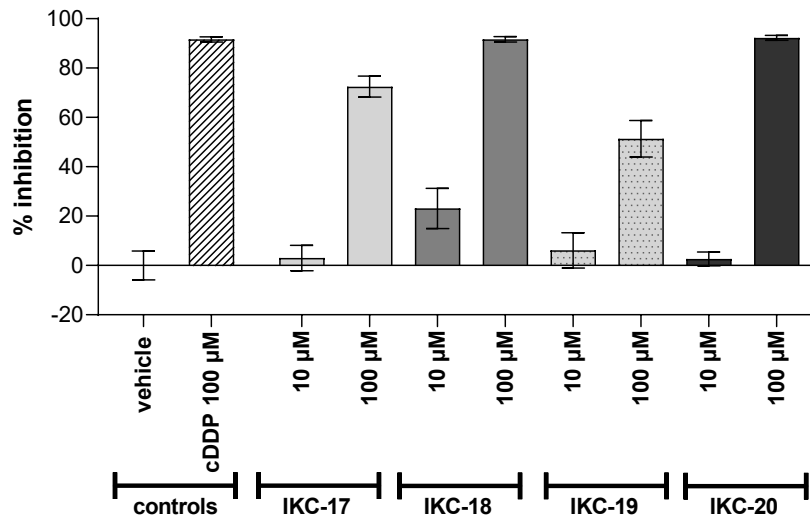
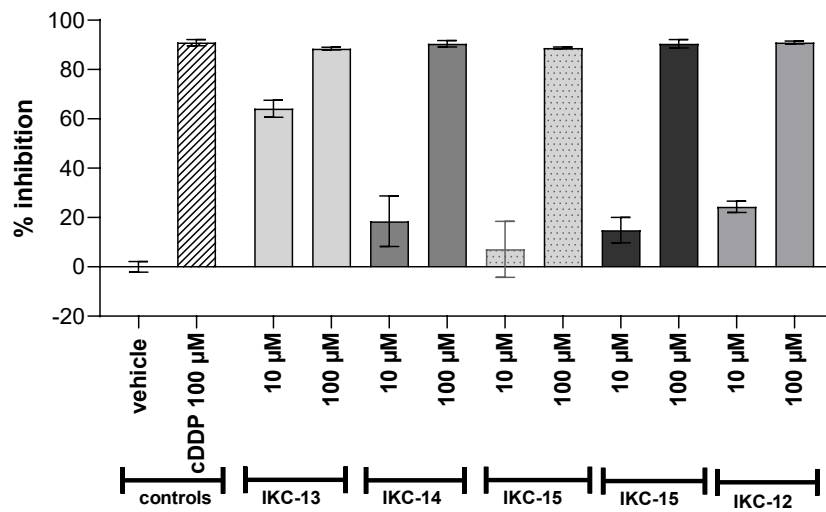


Abbildung. 3.4: Ergebnis der MTT-Assays der Verbindungen IKC-12 bis IKC-23 aus *Erythrina burtii*

Eine starke Cytotoxizität lässt sich aber nur bei Einsatz niedriger Konzentrationen erkennen, da Cisplatin auch bei einer Testkonzentration von 10 µM noch eine hemmende Wirkung in dieser Größenordnung besitzt. Wird die Konzentration der Testsubstanz auf 10 µM abgesenkt, zeigten viele Substanzen keine bzw. annähernd keine Wirkung mehr (s. Abb. 3.3 und 3.4, und Tab. 3.2), Bei den Volutaria-Substanzen zeigte vier Verbindungen gar keine Wirkung mehr. Das Gemisch aus Isolipidiol (**2**) und Lipidiol (**3**) zeigte genauso, wie das Flavon **6** (Hispidulin) und das Triterpen **13** (Taraxasterol) keine Wirkung mehr. Das zweite aus *V. boranensis* getestete Triterpen **15** war ja bereits bei einer Konzentration von 100 µM nur sehr schwach wirksam und zeigte mit 1,5 % Hemmung praktisch gar keine Aktivität mehr (s. Tab. 3.2). Das zweite Flavonoid Eupafolin (**7**) hingegen behielt eine schwache Restaktivität auch bei 10 µM. Auch das Lignan Arctiin (**12**) verlor bei Absenken der Testkonzentration auf 10 µM weiter an Aktivität, allerdings erreichte die Substanz auch in der niedrigen Konzentration immer noch eine Hemmung des Zellwachstums von 63,6 %. Die Sesquiterpenlactone Cynaropikrin (**1**), 4 α -Methylboranoflavon (**4**) und das Sesquiterpenlacton-Flavon-Dimer (Boranensisflavon, **8**) zeigten mit Werten von 87,7 – 88,6 %-Hemmung (s. Tab. 3.2) eine ausgesprochen starke Aktivität, so dass diese Verbindungen in weiteren Konzentrationen (s. Exp. Teil, Kap., S. 5.6) getestet wurden, wodurch die IC₅₀-Werte mit Zuhilfenahme des PrismPad Programms (s. Exp. Teil, Kap. S. 5.6.3) für diese drei stärksten Substanzen ermittelt werden konnten (s. Abb. 3.5 S.326 und Tab. 3.3, S.325). Alle drei Verbindung zeigen IC₅₀-Werte im Bereich von 3 µM, signifikante Unterschiede waren nicht zu erkennen.

Tabelle 3.3: IC₅₀-Werte der Verbindungen **1**, **4** und **8** aus *Volutaria boranensis* nach Messung von 5 Substanzkonzentrationen (10⁻³M bis 10⁻⁷M)

Verbindung	IC ₅₀ (µM)
1	3,07
4	2,94
8	2,99

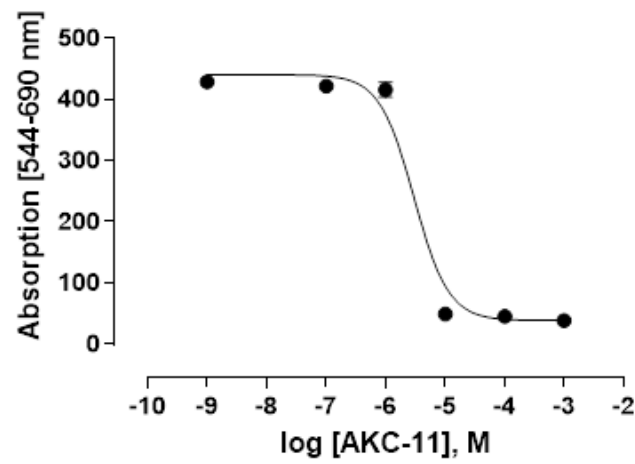
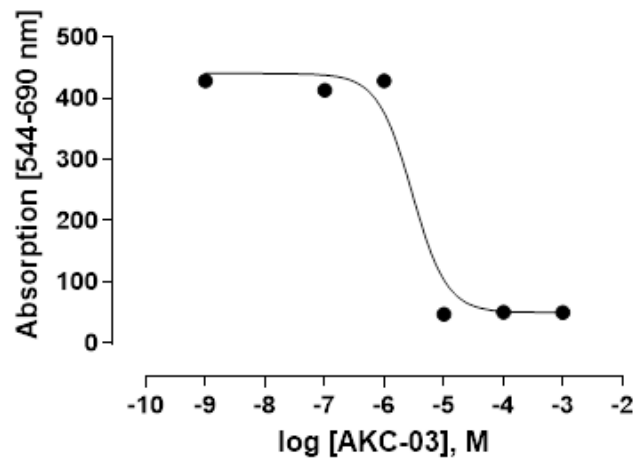
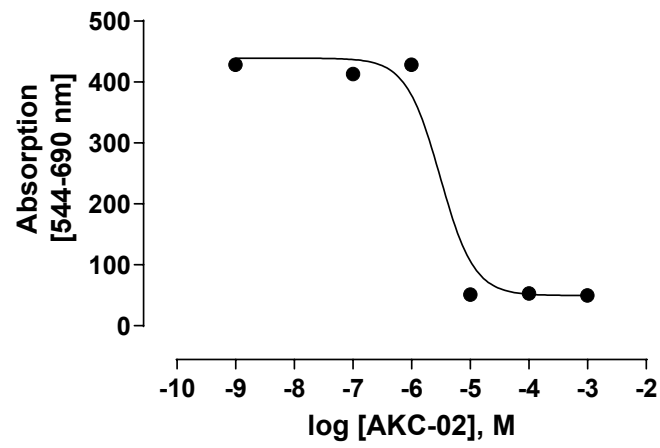


Abbildung 3.5: Konzentrations-Effektkurven von Verbindung 1 [AKC-02], 4 [AKC-03] und 8 [AKC-11] aus *Volutaria boranensis*

In Gegensatz zu den einfachen Flavonoiden aus *V. boranensis*, zeigten einige der Flavonoide aus *Erythrina burtii* auch bei einer Konzentration von 10 μ M noch eine gewisse Aktivität. Verbindung **IV** (Abyssinone IV 4'-O-methylether), ein am B-Ring zweifach prenyliertes Flavanon (s. Abb 3.1), zeigte hier mit einer Hemmung des Zellwachstums in Höhe von 64,1 % eine mit dem Lignan Arctiin aus *V. boranensis* vergleichbare Wirkstärke. Weitere schwach wirksame Verbindungen waren das Abyssinone II (**VI**), der 4'-Methylabyssinone V (**III**), das Gemisch aus Neorautenol (**X**) und Phaseolin (**XI**), der Abyssinone IV (**V**) und Abyssinoflavanone VII 4'-methylether (**II**) mit 35,7 %, 24,4 %, 23,1 %, 18,5 % und 14,9 %-Hemmung (s. Tab. 3.2). Alle anderen gemessenen %-hemmungen lagen unter 10 %.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte kenianische Asteraceae *Volutaria boranensis* (Cufod.) Wagenitz gehört zur Gattung *Volutaria*, die je nach Meinung der Autoren 18 -20 verschiedene Arten umfasst (Calleja et al, 2016). Die Pflanzen sind im iranisch-turanischen und mediterranen Raum weit verbreitet und kommen in semiariden bis trockenen Gebieten vor. Viele heute zur Gattung *Volutaria* gerechnete Arten, waren auch schon in die verwandten Genera *Amberboa* und *Centaurea* eingeordnet. Dies trifft auch für *Volutaria boranensis* zu, die von dem österreichisch-italienischen Botaniker Georg Cufodontis (1943) als Subspecies *boranensis* von *Centaurea hochstetteri* bezeichnet wurde. Später wurde die Pflanze dann von Wagenitz (1991) in *Volutaria boranensis* umbenannt.

Aus der Gattung *Volutaria* waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit insgesamt nur vier Arten, namentlich *V. crupinoides*, *V. lippi*, *V. muricata* und *V. abyssinica*, phytochemisch bzw. pharmakologisch untersucht ((Bohlmann et al, 1967; Marzouk, 2015 ;Rafrafi et al, 2021;Zaabat et al, 2011). Die meisten Arbeiten finden sich dabei zu den drei erstgenannten, in Nordafrika vorkommenden Arten, wobei die meisten Arbeiten zu *Volutaria lippi* erschienen sind, auch unter der alten Bezeichnung *Amberboa lippi* (Gonzalez, 1970). Diese Species mit Herkunft Tunesien wurde parallel zu unserer Arbeit erneut untersucht, die Ergebnisse wurden erst im letzten Jahr von Rafrafi et al (2021) veröffentlicht. Als typische Inhaltsstoffe wurden Sesquiterpenlactone identifiziert, die in Abb. 4.1 und dargestellt sind. Darüber hinaus wurden einige Flavonoide und weitere, eher ubiquitäre Inhaltsstoffe isoliert, teilweise aber auch nur mit Hilfe analytischer Methoden, wie der LC/MS identifiziert (Ben Salah et al, 2019). Bei den Sesquiterpenlactonen handelt es sich ausnahmslos um Guaianolide. Insgesamt waren, vor Beginn dieser Arbeit, sechs verschiedene Verbindungen isoliert worden, von denen vier (Grosshemin, Cynaropikrin und sein Desacylderivat sowie Muricatin), eine für die Reaktivität und damit auch die biologische Aktivität wichtige exocyclische Exomethylengruppe am γ -Lactonring besitzen (Ren, 2016; Drogosz und Janecka, 2019). Solche Verbindungen reagieren relativ leicht im Sinne einer Michael-Addition mit schwefelhaltigen Gruppen in Proteinen (Drogosz, 2019). Für viele Sesquiterpenlactone konnte gezeigt werden, dass gerade dieses Strukturelement für die Wirkung verantwortlich ist (Lindenmeyer,2004; Flemming, 2014). So weiß man heute beispielsweise, dass die Sesquiterpenlactone bei vielen Pflanzenextrakten, die für die entzündungshemmenden Eigenschaften und auch für die Toxizität verantwortlichen Verbindungen sind (Merfort, 2011). Beispielsweise hemmen viele Sesquiterpenlactone intra-

zellulär die Freisetzung des wichtigen Transkriptionsfaktors NF- κ B, in dem sie das im inaktiven Zustand mit dem Transskriptionsfaktor verbundene inhibitorische Protein (I κ B) alkylieren (Lyss, 1997). Sind weitere α,β - ungesättigte Strukturelemente im Molekül vorhanden, wird diese Wirkung zusätzlich verstärkt. Sesquiterpenlactone besitzen aber nicht nur antiinflammatorische Effekte, sondern viele Verbindungen besitzen auch zytotoxische Eigenschaften, die sie interessant für die Tumorforschung machen

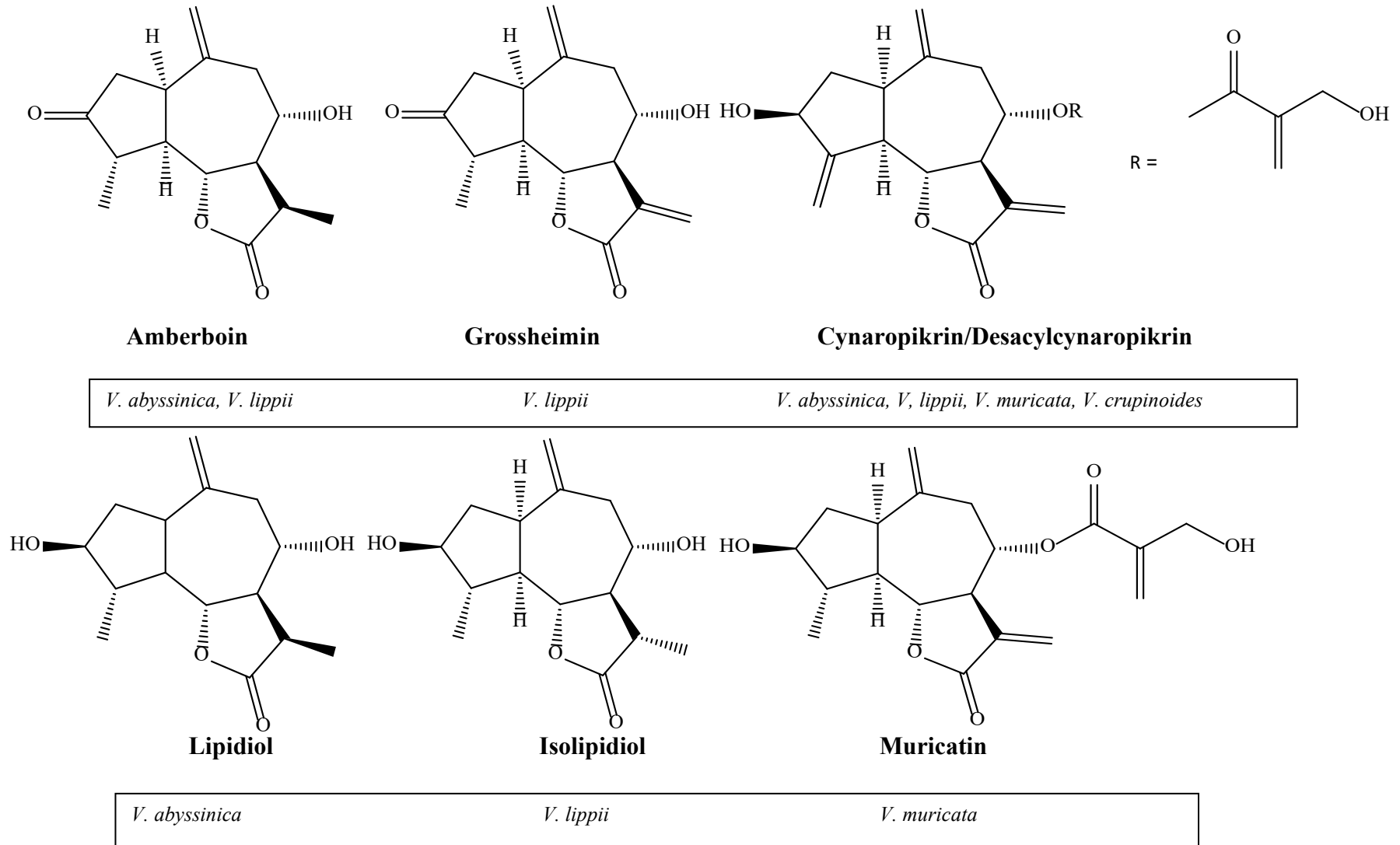


Abbildung 4.1: Sesquiterpenlactone aus *Volutaria*-Arten vor Beginn der vorliegenden Arbeit

Merfort (2011) zeigt in einer Übersichtsarbeit die Perspektiven von Sesquiterpenlactonen als potenzielle Wirkstoffe gegen Entzündungen und Krebs auf. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Sesquiterpenlactone zytotoxisch sind, was aber noch nicht bedeutet, dass von diesen Stoffen eine antitumorale Wirkung ausgeht und damit eine Möglichkeit zur Anwendung dieser Substanzen gegen Krebs tatsächlich gegeben ist (Merfort, 2011). Einige Sesquiterpenlactone sind aufgrund ihrer auffallend starken Bioaktivität besonders gut erforscht. Eine dieser Verbindungen ist das Helenalin (s. Abb. 4.3) aus der in Deutschland gebräuchlichen Arzneipflanze *Arnica montana*, von der die officinellen Arnikablüten (*Arnicae flos*) gewonnen werden (Ph.Eur, 2020.). Die Erforschung der Inhaltstoffe der Arnikablüten wurde von der Gründung des Institutes für Pharmazeutische Biologie bis zur Jahrtausendwende von Prof. Willhuhn, dem ersten Direktor des Institutes intensiv betrieben (Willhuhn et al. 1983; Willhuhn et al. 1984). In einer Übersichtsarbeit zur multidirektionalen Aktivität des Helenalins werden die Wirkungen und deren mechanistische Grundlagen übersichtlich dargestellt (Drogosz und Janecka, 2019). Sesquiterpenlactone leiten sich vom Terpenstoffwechsel ab und werden aus drei Einheiten aktivem Isopren gebildet (Steinegger & Hänsel, 1992). Das Ausgangsmolekül ist ein bicyclisches Germacrangrundgerüst, vermutlich ein Epoxid, von dem sich die anderen Sesquiterpengrunderüste ableiten (Steinegger & Hänsel, 1992). Sesquiterpenlactone lassen sich aufgrund der Grundgerüste in neun Untergruppen unterteilen (s. Abb. 4.2). Neben den bereits angesprochenen Guaianoliden gibt es die Pseudoguaianolide, die Germacranolide, Eudesmanolide, Elemanolide, Eremophilanolide, Xanthanolide, seco-Pseudoguaianolide und Cadinanolide (Fischer, 1990). Das Helenalin gehört zur Gruppe der Pseudoguaianolide und besitzt neben der Exomethylengruppe am γ -Lactonring im Cyclopentenonring eine zweite α,β -ungesättigte Stelle im Molekül. Dadurch kann das Helenalin gleichzeitig mit zwei nucleophilen Stellen von Biomolekülen, insbesondere mit Thiolgruppen, im Sinne einer Michael-Addition reagieren (Drogosz und Janecka, 2019). Die besonders starke Wirkung des Helenalins (s. Abb. 4.3) erklärt sich aber nicht allein durch diese Tatsache, sondern auch dadurch, dass der γ -Lactonring 7,8-cis verknüpft ist, wodurch die exocyclische Methylengruppe frei über das restliche Molekül herausragt und so für chemische Reaktionen noch leichter zugänglich ist. Das Strukturisomer Mexicanin I, das sich von Helenalin nur durch die *trans*-Verknüpfung des Lactonrings mit dem Cycloheptanring unterscheidet, ist wesentlich weniger cytotoxisch und auch weniger aktiv gegen Protozoen (Drogosz und Janecka, 2019). Der Wirkungsmechanismus des Helenalins ist mittlerweile auch durch viele *in vitro* und *in vivo* Experimente näher untersucht (Drogosz und Janecka, 2019).

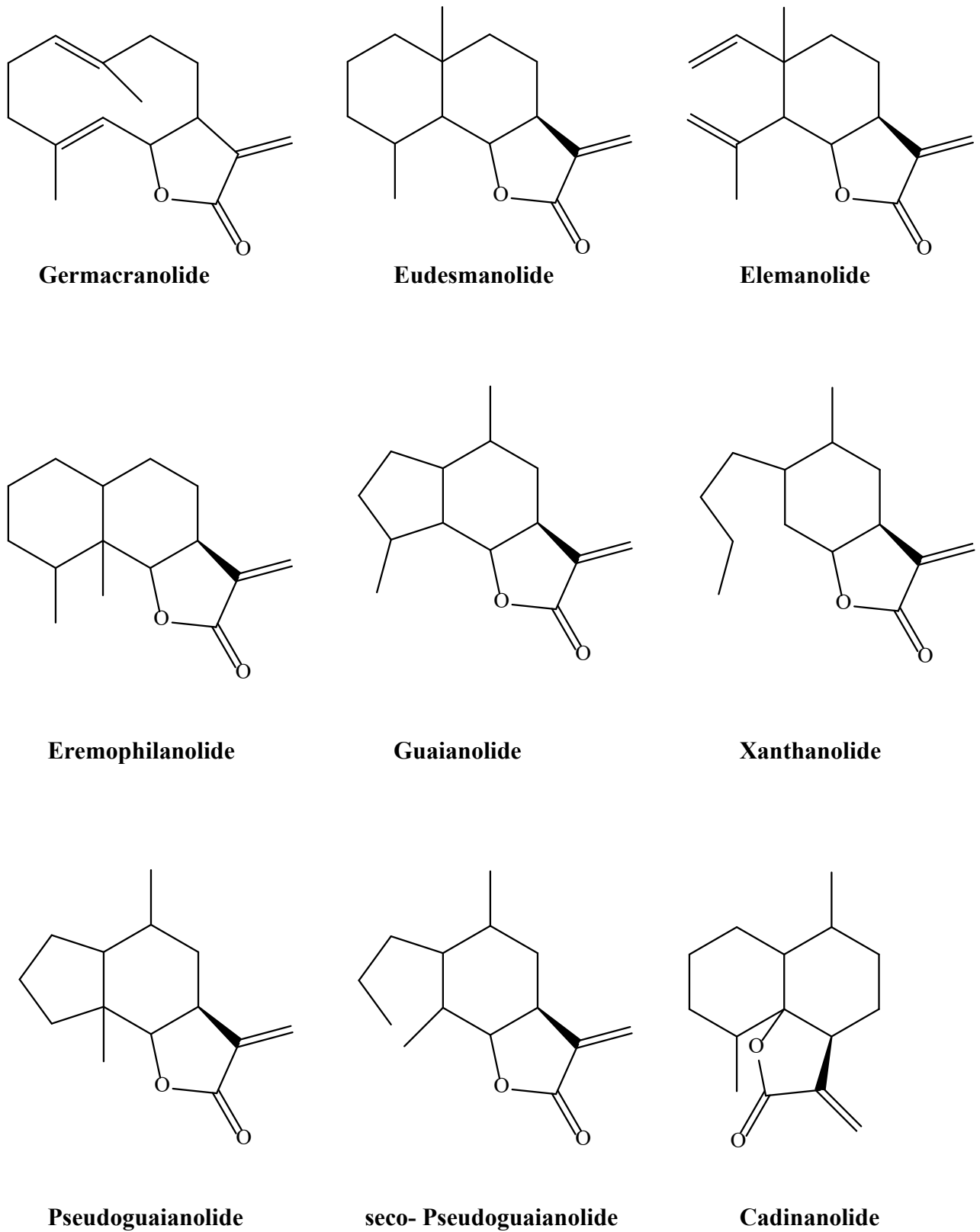
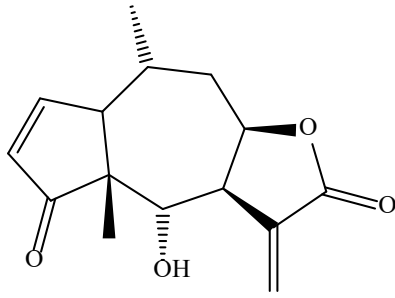
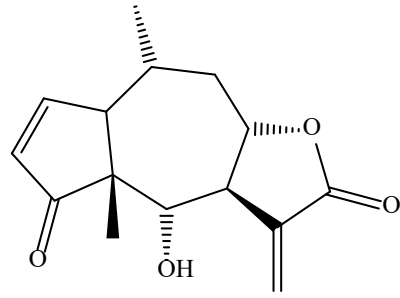


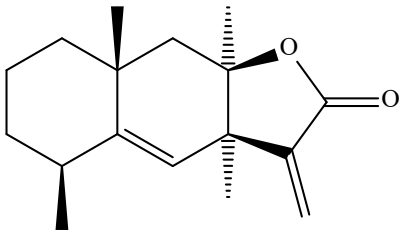
Abbildung. 4.2: Grundgerüste der Sesquiterpenlactone nach Fischer (1990)



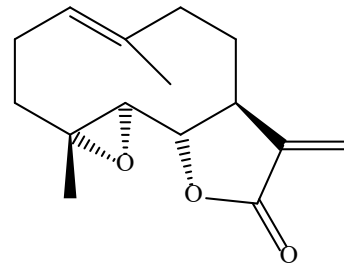
Helenalin



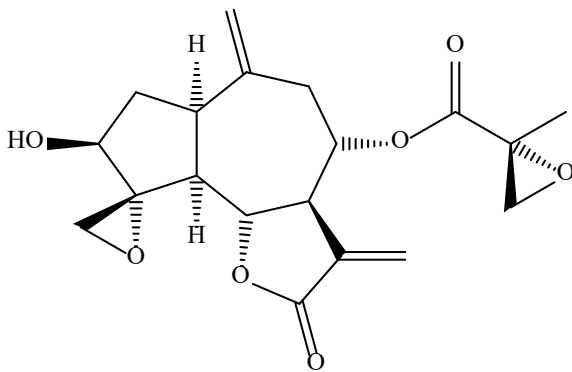
Mexicanin I



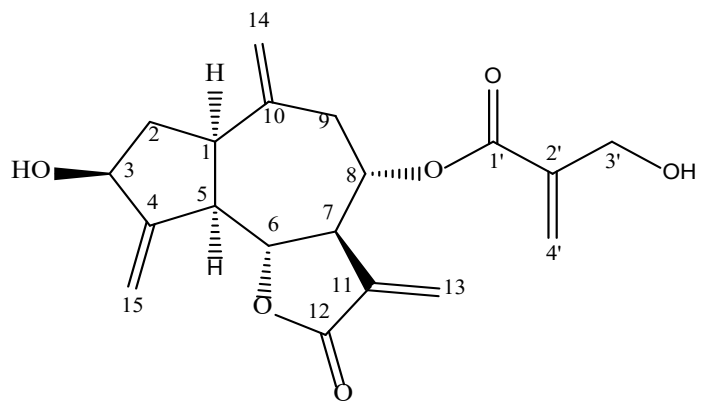
Alantolactone



Parthenolid



Repin



Cynaropikrin

Abbildung. 4.3: Beispiele für cytotoxische Sesquiterpenlactone

Neben der bereits angesprochenen Hemmung von NF- κ B, hemmt Helenalin die für die Zellteilung wichtige Telomerase, indem es an das Cystein-445 bindet und mit einem Lysin eine Wasserstoffbrücke bildet (Zhang et al. 2014). Außerdem führt es die Zelle in die Apoptose durch Beeinflussung der Caspase-Aktivität (Drogosz und Janecka, 2019). Helenalin ist nicht das einzige cytotoxische Sesquiterpenlacton. Für viele andere Verbindungen aus dieser Stoffklasse wurden solche Bioaktivitäten ebenfalls beschrieben (Zhang et al., 2005; Janecka et al., 2012; Quintana und Estevez, 2018). Quintana und Estevez beschreiben in ihrem 2018 erschienenen Übersichtsartikel zur Cytotoxizität von Sesquiterpenlactonen, dass die Guaianolide neben den Pseudoguaianoliden die größte Aktivität besitzen, wenn sie eine exocyclische α -Methylengruppe am γ -Lactonring besitzen (Quintana und Estevez, 2018). Außerdem verstärkt eine ebenfalls exocyclische Methylengruppe an C-10 des Cycloheptanrings oder eine Doppelbindung an C-3 des Cyclopentanrings die Wirkungsstärke von Guaianoliden und Pseudoguaianoliden (Quintana und Estevez, 2018). Einige Guaianolide, wie z.B. das Repin aus *Centaurea* Arten (Bruno et al., 2005) oder das Cynaropicrin, das ursprünglich aus der Artischocke (*Cynara scolymus*) isoliert wurde, inzwischen aber in vielen Asteraceen gefunden wurde, weisen ebenfalls gute Bioaktivitäten auf (Abb. 4.3). Cynaropikrin wurde auch schon als Inhaltsstoff von verschiedenen *Volutaria*-Arten identifiziert (Abb. 4.4).

Vor dem Hintergrund der Bioaktivität der Sesquiterpenlactone wurde die bisher phytochemisch noch nicht bearbeitete Asteraceae *Volutaria boranensis* phytochemisch untersucht. Da es sich bei Sesquiterpenlactonen um amphiphile Verbindungen handelt, die sowohl lipophil als auch wässrig-methanolisch löslich sind, wurde der mit Dichlormethan als Lösungsmittel gewonnene Extrakt aus den oberirdischen Teilen portionsweise in Methanol gelöst (s. Exp. Teil., Kap. 5). Mit dieser Methode konnten die eventuell in der Pflanze vorkommenden Sesquiterpenlactone von anderen lipophilen Begleitstoffen getrennt werden. Nach Auftrennung chromatographisch interessanter Fraktionen konnten insgesamt sechs Sesquiterpenlactone isoliert werden. Drei der isolierten Verbindungen konnten als die Guaianolide Cynaropikrin (**1**), Isolipidiol (**2**) und Lipidiol (**3**), die bereits aus anderen *Volutaria*-Arten bekannt waren, identifiziert werden (s. Abb. 4.4). Leider konnten die beiden Verbindungen aufgrund der geringen isolierten Menge nicht voneinander getrennt werden. Als Hauptkomponente konnte das Isolipidiol erkannt werden. Da die beiden Verbindungen bereits 1970 (Gonzales et al) erstmals beschrieben wurden, war die Datenlage in Bezug auf die NMR-Spektren, relativ gering. Zur Aufklärung der Stereochemie an den beiden hydroxylierten Kohlenstoffen C-3 und C-8 sowie den Methylgruppen tragenden Kohlenstoffen C-4 und C-11, wurden daher die NMR-Daten vieler

verschiedener Epimere an diesen Positionen miteinander verglichen. Dabei fiel auf, dass die in der Literatur publizierte Struktur des Dentalactons, bei dem es sich um das 4,8-Epi-Lipidiol handelt vermutlich falsch ist und revidiert werden sollte. Für Dentalacton wird ein Kohlenstoffshift von 18.4 ppm angegeben, was auf eine α -ständige Methylgruppe hindeutet. Bei dem von Chung et. al. (1993) veröffentlichten Dentalacton sollte es sich daher vielmehr um das 8-Epi-Lipidiol handeln, das bisher noch nicht in der Natur gefunden wurde.

Auch bei den beiden Sesquiterpenlactonen **4** und **5** handelt es sich um zwei stellungsisomere Guaianolide, die sich nur in der Position der Methylgruppe am C-4 des Cyclopentanrings unterscheiden (s. Abb. 4.4).

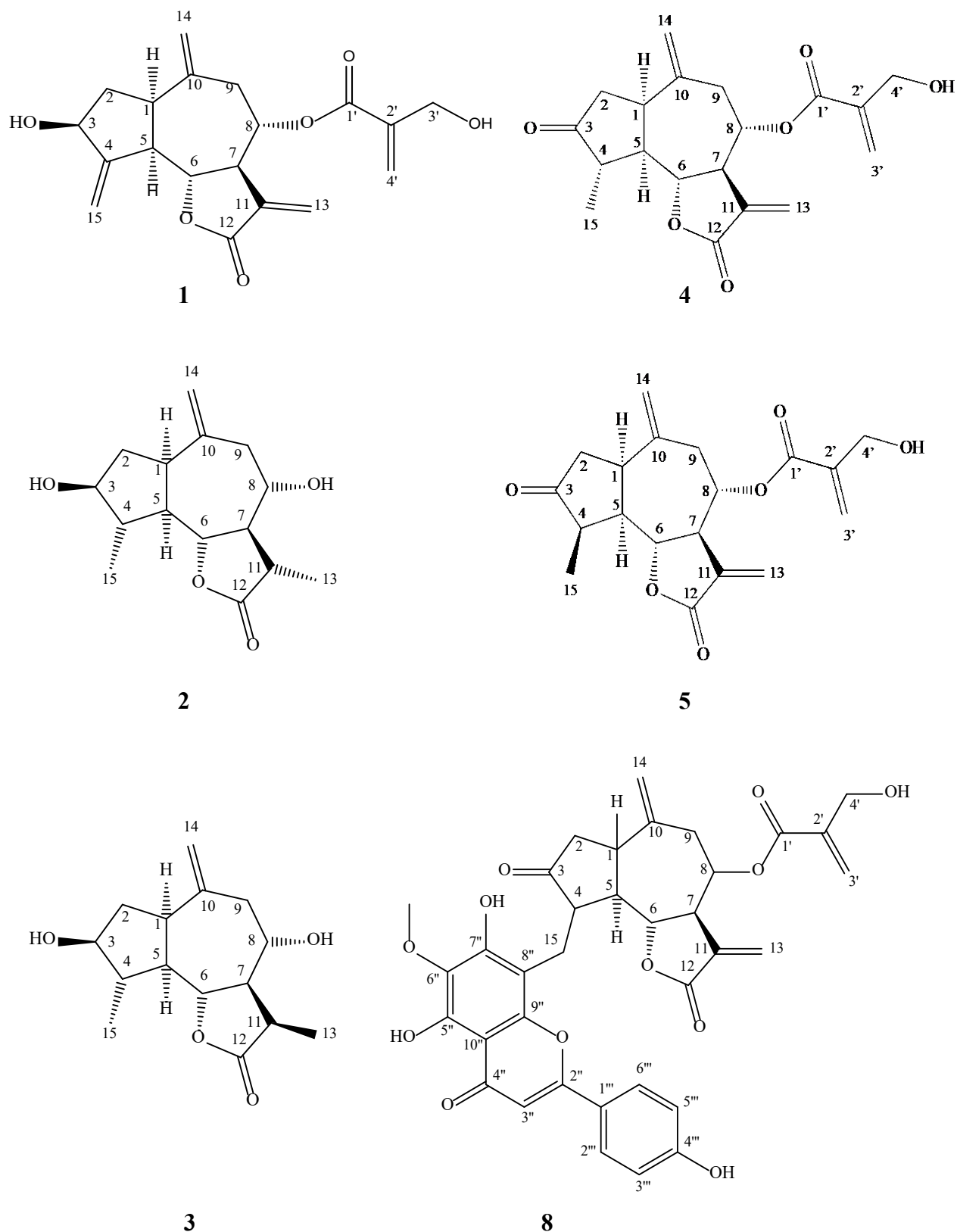


Abbildung 4.4: Sesquiterpenlactone aus *Volutaria boranensis*

Nach Auswertung der analytischen Daten, war festzustellen, dass es sich bei diesen Verbindungen um bisher noch nicht publizierte Sesquiterpenlactone handelte. Bei Verbindung **4** war allerdings nur das Esterderivat noch nicht publiziert, denn beim zugrundeliegenden Sesquiterpenlactonalkohol handelt es sich um das Guaianolid Grosheimin (s. Abb. 4.1), das bereits in *Volutaria lippii* gefunden wurde (Breton Funes, J.L., 1968). Bei Verbindung **5** sollte es sich um einen neuen Naturstoff handeln. Im letzten Jahr veröffentlichte eine Arbeitsgruppe aus tunesischen und griechischen Wissenschaftlern eine Arbeit zu Sesquiterpenlactonen aus in Tunesien gesammeltem Pflanzenmaterial von *Volutaria lippii* (Rafrafi, et al., 2021). Insgesamt wurden sieben Verbindungen publiziert. Neben den beiden Flavonoiden Luteolin und Hispidulin und dem Methylester des Apigenin 7-glucuronids, bei dem es sich vermutlich um ein, durch Verwendung von Methanol aus dem Apigenin 7-glucuronid gebildetes, Artefakt handelt, wurden insgesamt vier Sesquiterpenlactone beschrieben. Neben den beiden aus *V. lippii* bereits bekannten Verbindungen Isolipidiol und Cynaropikrin wurden zwei Esterderivate beschrieben, bei denen es sich um das bereits bekannte 4-O-Acetylderivat des Cynaropikrins handelt und um ein Esterderivat des Grosheimins oder 4-Epi-Grosheimins. Rafrafi et al. (2021) konnten die Position der Methylgruppe an C-4 aufgrund ihrer Daten nicht klären. Um zu prüfen, welches der beiden hier aus *V. boranensis* isolierten Derivate mit der von Rafrafi et al. (2021) beschriebenen Verbindung identisch ist, haben wir uns die im „Supplementary Material“ hinterlegten Spektren genauer angesehen. Dabei fiel auf, dass die Spektren nicht in allen Fällen mit den in der Tabelle aufgelisteten Werten der Kohlenstoffe übereinstimmten. In der Tabelle finden sich die Daten in Methanol-d₄, das abgebildete Spektrum wurde in DMSO-d₆ aufgenommen. Auch bei den 2D-Spektren sind Zweifel angebracht, da die Korrelationen nicht immer zu erkennen sind bzw. die Spektren nicht aufprojiziert wurden, so dass nicht beurteilt werden kann, ob die abgebildeten Kreuzsignale tatsächlich zu den zugehörigen Protonen- und Kohlenstoffsignalen gehören. Trotzdem scheint es so zu sein, dass die Verbindung, die Rafrafi isoliert und unter dem Namen Lippiin publiziert hat, möglicherweise mit der hier isolierten Verbindung **5** identisch ist. Bei Verbindung **4** handelt es sich daher um ein erstmals aus *Volutaria boranensis* isoliertes Sesquiterpenlacton, genauer gesagt um das Grosheimin, das mit der α,β -ungesättigten 2-(Hydroxymethyl)-2-propensäure verestert ist. Für diese Verbindung wird der Trivialname 4 α -Methylboranolacton vorgeschlagen. Da es sich bei Verbindung **5** um das 4-Epimer dieser Verbindung handelt, wäre die Bezeichnung 4 β -Methylboranolacton angemessen.

Verbindung **8** ist eine Verbindung, die bisher noch nicht in der Natur gefunden wurde. Es handelt sich um eine Substanz, die aus zwei Molekülteilen, einem Sesquiterpenlacton- und einem Flavonoidteil besteht. Mit einem Flavonoid substituierte Sesquiterpenlactone wurden bisher noch nicht beschrieben, es gibt aber viele Flavonoide, die mit terpenenoiden Verbindungen substituiert sind. Während einfache, mit einem C₅-Rest substituierte Prenylflavonoide relativ häufig sind (Barron & Ibrahim, 1996, Passreiter et al, 2015), wurden mit Sesqui- oder Diterpenen verbundene Flavonoide bisher nur sehr selten in der Natur gefunden. Beispiele für solche Verbindungen (s. Abb. 4.5) sind die Fissistigmatine A-D, die aus der vietnamesischen Arzneipflanze *Fissistigma bracteolatum* (Annonaceae) isoliert wurden (Porzel et. al, 2000) oder das Denticulaflavonol aus der Euphorbiaceae *Macaranga denticulata* (Sutthivaiyakit et al., 2002).

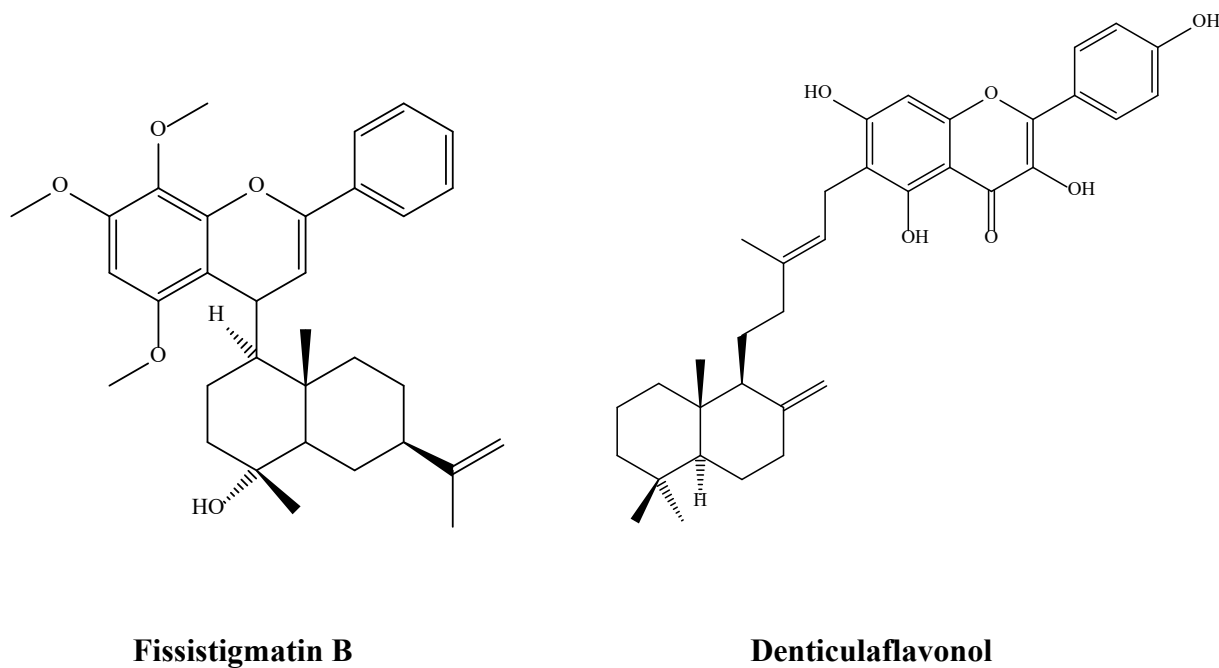


Abbildung 4.5: Sesqui- und Diterpenoide Flavonoide

Bei Verbindung **8** handelt es sich demnach um einen neuen Naturstoff, dessen Stereochemie hier aufgrund der geringen Menge leider nicht eindeutig geklärt werden konnte. Es wäre daher wünschenswert, dass eine größere Menge des Pflanzenmaterials von *Volutaria boranensis* zur Nachisolierung von Verbindung **8** eingesetzt wird, um die Stereochemie abschließend zu klären.

In Analogie zu Denticulaflavon aus *Macaranga denticulata*, bei dem es sich um ein substituiertes Flavonol handelt, wird der Trivialname Boranensisflavon für Verbindung **8** vorgeschlagen.

Neben den Sesquiterpenlactonen konnten noch weitere Sekundärstoffe aus anderen Stoffgruppen aus dem Dichlormethanextrakt von *V. boranensis* isoliert und identifiziert werden. Neben den weit verbreiteten Phytosterolen Stigmasterol (**15**) und Sitosterol (**16**), die als Bestandteile pflanzlicher Zellmembranen ubiquitär verbreitet sind, aber als Bestandteile von „funktionale food“ wegen ihres Einflusses auf die Zusammensetzung der Blutfette in den letzten Jahren durchaus große Beachtung finden (Papierska und Ignatowicz, 2019), wurden mit Taraxasterol (**13**) und dem Pseudotaraxasterol-30-aldehyd (**14**) auch zwei Triterpene gefunden.

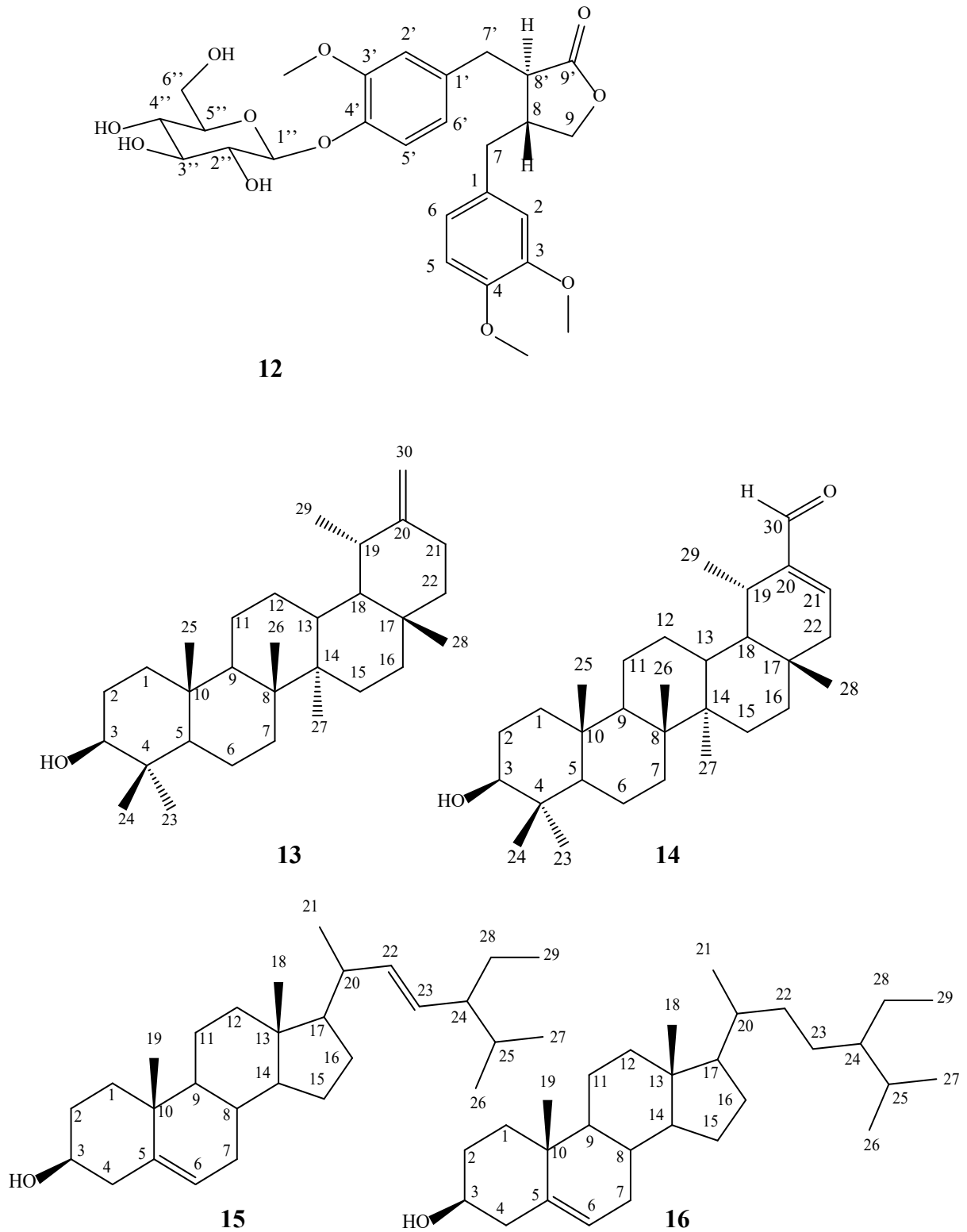
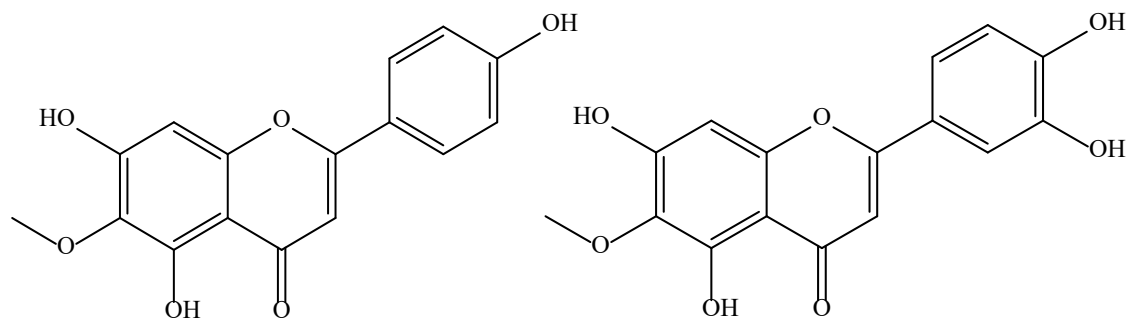


Abbildung 4.6 : Weitere Inhaltsstoffe aus dem Dichlormethanextrakt von *Volutaria boranensis*

Taraxasterol wurde bereits 1912 als Bestandteil der Wurzel des Löwenzahns (*Taraxacum officinale*) erkannt (Power und Browning, 1912). Seitdem wurden ca. 650 Veröffentlichungen publiziert, die sich mit dem Vorkommen oder den Eigenschaften dieser Substanz beschäftigen (www.scifinder.org). In der Gattung *Volutaria* wurde dieses Triterpen bisher noch nicht gefunden, es wird daher hier erstmals als Inhaltsstoff von *Volutaria boranensis* in dieser Pflanzengruppe beschrieben. Aus Pflanzen der verwandten Gattung *Centaurea* wurde es schon mehrfach isoliert und auch in Bezug auf seine Toxizität getestet (Gonzales et al., 1983; Sekeler et al., 2020). Im Gegensatz dazu ist der Pseudotaraxasterol 30-aldehyd eine eher selten gefundene Verbindung. Diese Substanz wurde bisher nur in den Asteraceen *Saussurea deltoidea* (Huang et al, 2011), *Launea spinosa* (Sokkar et al, 1993), *Ixeris chinensis* (Shiojima et al., 1996) und in zwei Species aus der Gattung *Pulicaria* (Triana et al., 2011) gefunden und in Euphorbiaceen gefunden (Duarte et al, 2009).

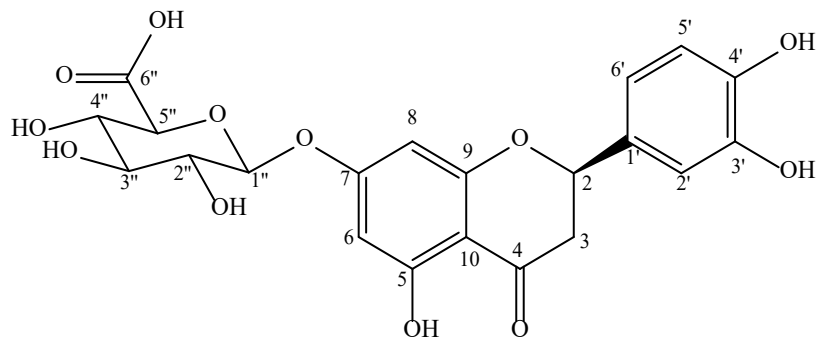
Bei Verbindung **12** handelt es sich um das Arctiin. Es ist das erste Lignan, das in der Gattung *Volutaria* gefunden wurde. Innerhalb der Stoffgruppe der Lignane gibt es viele biologisch aktive Verbindungen, die insbesondere auch cytotoxische und antitumorale Wirkungen haben, wie beispielsweise das Podophyllotoxin aus den Indischen Fußblatt, *Podophyllum peltatum* (Ardalani et al., 2017). In Pflanzen der Gattung *Centaurea* wurde Arctiin bereits mehrfach gefunden und auch auf seine Cytotoxizität getestet (Harraz et al., 1988). Aus *Centaurea valachorum*, einer in Albanien vorkommen Species dieser Gattung, wurde das Arctiin (**12**) ebenfalls isoliert (Hodaj et al., 2017). Neben diesem Lignan wurde mit Matairesinol noch eine zweite Substanz aus dieser Stoffgruppe gefunden.

Darüber hinaus wurden zwei Derivate des Serotonins, die Indolalkaloide N-(p-coumaroyl)-serotonin and Moschamine, isoliert und identifiziert (Hodaj et al., 2017). Auch in der hier untersuchten *Volutaria boranensis* konnte erstmals aus dieser Gattung ein Indolalkaloid gefunden werden. Diese aus einer Fraktion des Methanolextraktes isolierte Substanz (s. Abb. 4.6) konnte als Serotobenine (**17**) identifiziert werden. Serotobenine wurde erstmals von Sato et al. (1985) aus der Färberdistel, *Carthamus tinctorius*, isoliert und die Struktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Es handelte sich demnach um ein Racemat des R,R- und S,S-Serotobenins (Sato, et al, 1985). Die Substanz, die von einigen Autoren auch als Moschamindole bezeichnet wird (Sarker et al., 1997), ist von großem pharmazeutischem Interesse. Nyemeck et al. (2018) konnten zeigen, Serotobenine aus *Campylospermum* Arten eine gewisse Aktivität gegen *P. falciparum* zeigt.

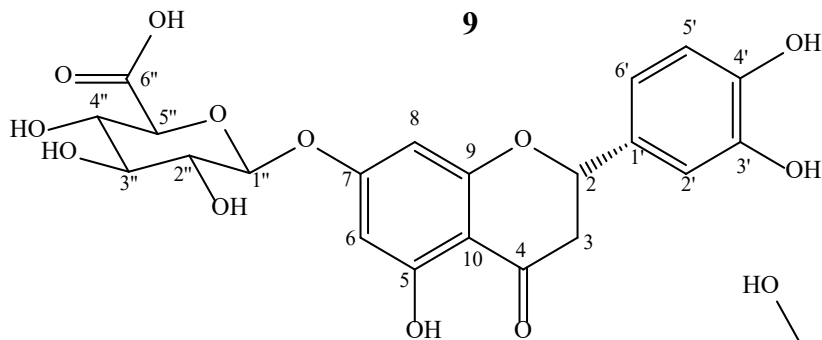


6

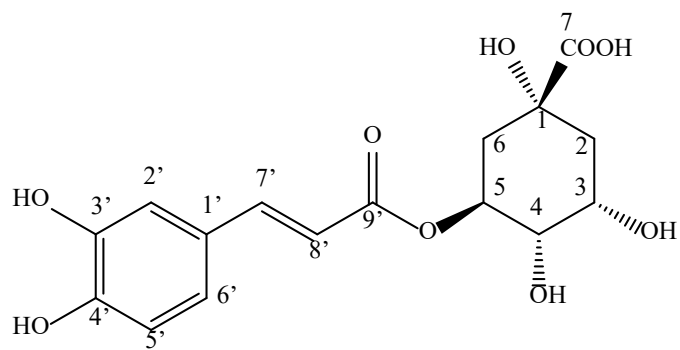
7



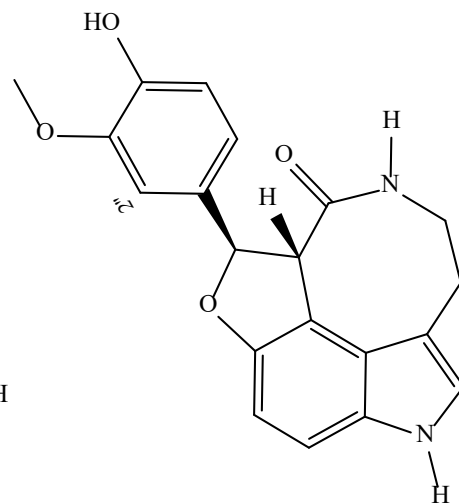
9



10



11



17

Abbildung 4.7: Weitere Inhaltsstoffe von *Volutaria boranensis*

Zeitgleich wurde die Verbindung unter dem Namen Moschamindole von Kumarasamy et al. (2002) erfolgreich gegen verschiedene Bakterienstämme getestet. In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Huang et al. (2021) veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung zytotoxische Effekte gegenüber Glioblastomzellen besitzt.

Außerdem konnten vier Flavonoide (**6**, **7**, **9** und **10**) und die in Asteraceen weit verbreitete Chlorogensäure (**11**) isoliert und identifiziert werden. Die Flavonaglyka Hispidulin (**6**) und Eupafolin (**7**) wurden aus dem Dichlormethanextrakt isoliert, während die isomeren Flavanoglykoside (**9** und **10**) in einer Fraktion des Methanolextraktes gefunden wurden. Beide Aglyka (**6** und **7**) sind relativ weit verbreitet (Mabry et al, 1975), ihr Vorkommen in *Volutaria boranensis* wird hier jedoch erstmals beschrieben. Der erste Bericht über das Vorkommen von Flavonoiden in *Volutaria* stammt von einer Arbeitsgruppe aus Algerien die ihre Ergebnisse leider unter der veralteten Bezeichnung „*Centaurea lippii*“ im Titel veröffentlicht haben. Dort wurden das sehr weit verbreitete Flavonoglykosid Isoquercitrin (Quercetin 3-O-glucosid), das Nicotiflorin (Kämpferol 3-O-rutinosid) und die Glykosylflavon Isovitexin (6-Glykosyl-Apigenin) gefunden (Mezache et.al, 2010). 2019 veröffentlichten Ben Salah et al (2019) eine LC-ESI-MS/MS Analyse mit deren Hilfe sie mehrere Pflanzensäuren, unter anderem auch die hier isolierte Chlorogensäure (**11**), sowie die Flavonoidaglyka Kämpferol, Apigenin, Acacetin und Cirilineol und die Flavonoidglykoside Rutin, Luteolin 7-O-glucosid, Quercetin und Apigenin 7-O-Glucosid nachgewiesen haben (Ben Salah et al., 2019). Bei allen Substanzen handelt es sich um Flavone und Flavonole. Während Hispidulin zusammen mit dem Apigenin 7-glucuronidmethylester, bereits in *Volutaria lippii* gefunden wurde (Rafrafi et al., 2021), ist über das Vorkommen von Eupafolin in *Volutaria* Arten bisher noch nicht berichtet worden. Ein weiteres in *Volutaria*-Arten gefundenes Flavon ist das Luteolin aus *Volutaria crupinoides* (Zaabat, 2011). Bei den Flavonoiden **9** und **10** handelt es sich nicht wie bei **6** und **7** um Flavone, sondern um Flavanone, denen die Doppelbindung zwischen den C.2 und C-3 fehlt. Dadurch entsteht ein Asymmetrisches C-Atom (C-2), das (R)- oder (S)-konfiguriert vorliegen kann. Die beiden Verbindungen fielen als untrennbares Diastereomerengemisch an, da sie beide eine chirale D-Glucuronsäure gebunden haben und daher nur am C-2 unterschiedlich konfiguriert sind. Ein solches Diastereomerengemisch wurde auch aus dem Farn *Davallia mariesii* und *Crataegus x macrocarpa* isoliert (Cui et al, 1990; Ringl et al., 2007). Auch dort war die Trennung der beiden Diastereomeren nicht möglich. Eryodictyol 7-glucuronid wurde erstmals von Bohm und Gottlieb (1989) aus der Gattung *Stephanomeria* (Asteraceae) beschrieben. In den Gattungen *Volutaria* und *Amberboa* wurden **9** und **10** bisher noch gefunden, es ist der erste

Fund eines Flavanons in *Volutaria boranensis*. Innerhalb der Gattung *Centaurea* wurde über das Vorkommen in *Centaurea urvillei* berichtet (Guelcemal et al., 2010). Da Flavonoide in Pflanzen weit verbreitet sind und daher wichtige taxonomische Marker darstellen (Mabry et al., 1975), wäre es interessant die Gattung *Volutaria* systematisch auf das Vorkommen von Flavonoiden zu untersuchen, insbesondere um mögliche Unterschiede zwischen den nordafrikanischen Arten und den durch die Sahara geographisch davon getrennten, am Horn von Afrika und in Ostafrika vorkommenden Arten zu erkennen. Möglicherweise ist das Vorkommen von Flavanonen, die bisher nur in *Volutaria boranensis* gefunden wurden, dabei von Bedeutung.

Die meisten der hier isolierten Verbindungen wurden anschließend auf ihre Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen der Zelllinie A2780 sens getestet (s. Kap. 3). Einige Verbindungen (**5**, **9**, **10**, **11**, **17**) wurden hier nicht getestet, weil die Isolierung bzw. Strukturaufklärung dieser Verbindungen bei Durchführung der Zytotoxizitätstest noch nicht abgeschlossen war.

Bis auf die Verbindungen **7** (Eupafolin) und **14** (Pseudotraxasterol-30-aldehyd) zeigten alle Testsubstanzen eine gute Hemmwirkung auf das Zellwachstum bei Einsatz einer Konzentration von 100 μM . Reduziert man die Konzentration auf ein Zehntel dieser Konzentration (10 μM), so erreichten nur noch die die Verbindungen **1**, **4** und **8** eine Hemmwirkung von etwa 90 % (s. Kap 3, Tab. 3.2). Das Arctiin (**12**) war mit einer Hemmung in Höhe von ca. 60 % mittelstark aktiv. Für die stark wirksamen Verbindungen **1**, **4** und **8** wurden durch Verwendung weiterer, niedrigerer Konzentrationen (10^{-3}M bis 10^{-7}M), die IC_{50} -Werte bestimmt. Alle drei Substanzen zeigte dabei eine 50%-Hemmung des Zellwachstums bei Verwendung einer Konzentration von ca. 3 μM .

Bei allen vier Verbindungen handelt es sich um Lactone. Während **1**, **4** und **8** Sesquiterpenlactone darstellen, handelt es sich bei **12** um ein Lignan (s. Abb. 4.5 und 4.6). Zur biologischen Aktivität des bereits häufig gefundenen Arctiins (**12**) gibt es viele Publikationen (www.scifinder.cas.org), in denen auch über die cytotoxischen Eigenschaften von Arctiin und sein Aglykon Arctigenin berichtet wurde (Iranshahy et al., 2016; Cai et al., 2018; Chen et al., 2013; Gui Rong et al., 2012). Iranshahy et al. (2016) testeten Arctiin und Arctigenin auf ihre Cytotoxizität gegenüber verschiedenen Krebszelllinien (MCF-7, human breast adenocarcinoma; MCF-7/MX, mitoxantrone-resistent human breast adenocarcinoma; PC3, human prostate cancer; HL-60, human promyelocytic leukemia cells; Jurkat, human T cell

lymphoblast-like cell line; HEK, human embryonic kidney). Während Arctigenin keine Zytotoxizität gegen diese Zellen zeigte, war Arctiin in einer Konzentration von 10 µg/mL nur gegen die HEK-Zelllinie aktiv (Iranshahy et al., 2016). Arctiin und ein weiteres, ebenfalls glykosidiertes Lignan vom Butyrolactontyp, das Matairesinosid, das sich von Arctiin nur durch das Fehlen einer Methylierung am nicht glykosidierten Aromaten unterscheidet, wurden von Shoeb et al. (2007) aus in der Türkei endemischen *Centaurea* Arten isoliert und gegen Darmkrebszellen (Zelllinie CaCo-2). Die ermittelten IC₅₀-Werte lagen für das phenolische Matairesinol und sein Derivat Arctiin bei 220 bzw. 280 µM. Das gleichzeitig mitgetestete stark zytotoxische Podophyllotoxin zeigte in der Untersuchung einen IC₅₀-Wert von 0,06 µM (Shoeb et al., 2007). Moritani et al. (1996) untersuchten die Inhaltsstoffe von *Bardanae radix*, der Klettenwurzel. Die dort isolierten Verbindungen Arctiin, Arctigenin und Chlorogensäure wurden auch auf die Zytotoxizität gegen Hep G2 und Chang liver cells getestet (Moritani et al., 1996). Während die Chlorogensäure in keinem Test cytotoxisch war, wurden für Arctiin und Arctigenin IC₅₀-Werte von 2,6 bzw. 1,3 µg/ml ermittelt (Moritani et al., 1996). Unsere Ergebnisse bestätigen insgesamt gesehen die grundsätzlichen cytotoxischen Eigenschaften des Arctiins. Die Aktivität gegenüber den in unseren Untersuchungen verwendeten Ovarialkarzinomzellen ist allerdings nur als moderat einzustufen. Das bestätigt die Arbeiten von Iranshahy (2016) in dessen Untersuchungen das Arctiin gegenüber vielen getesteten Krebszelllinien inaktiv war (Iranshahy, 2016).

Bei zwei der drei aktiven Sesquiterpenlactone handelt es sich um neue Naturstoffe, die deshalb hier zum ersten Mal hinsichtlich ihrer Cytotoxizität getestet werden konnten. Für das ebenfalls aktive Cynaropikrin (**1**) liegen bereits Cytotoxizitätsdaten vor, weil es sich bei Cynaropikrin um einen der Haupt-Bitterstoffe der Artischocke (*Cynara scolymus* bzw. *C. cardunculus*) handelt. Dort ist die Frage der Cytotoxizität besonders wichtig, um einerseits mögliche Risiken andererseits aber auch mögliche Vorteile in der Krebsprävention durch pflanzliche Kost abschätzen zu können (Ben Salem et al., 2015; Villarini et al., 2021). Turak und Aisa (2018) berichteten über die Isolierung von fünf Elemanoliden, einem Germacranolid und einem Guaianolid aus *Vernonia anthelmintica* (Turak und Aisa, 2018). Bei dem Guaianolid handelte es sich um das Cynaropikrin (**1**). Nur diese Verbindung zeigte einen extrem starken Effekt gegen die Zelllinien HCT-15 and PC-3 mit IC₅₀-Werten von 0.56 and 0.69 µM. Die IC₅₀-Werte der anderen Sesquiterpenlactone lagen zwischen 9 und 28 µM (Turak und Aisa, 2018). Choi et al. untersuchten die Zytotoxizität der Sesquiterpenlactone von *Saussurea calciccola* (Choi et al., 2005). Neben Cynaropikrin (**1**) fanden sie weitere Guaianolide, die sich von Cynaropikrin nur

durch die am C-8 des Cycloheptanrings gebundene Säure unterschieden. Zusätzlich enthielt die Pflanze auch das 8 α -Hydroxy-11 α ,13-dihydrozaluzanin C, bei dem es sich um das 11,13-Dihydroderivat des deacylierten Cynaropikrins handelt (Choi et al., 2005). Die Aktivität der Verbindungen wurden an insgesamt fünf kultivierten menschlichen Krebszelllinien getestet, Das Cynaropikrin und das Aguerin B, das mit der Methacrylsäure verestert ist und das von Rafrafi et al. (2021) kürzlich auch in *Volutaria lippi* gefunden wurde, besaßen die stärkste Zytotoxizität mit ED₅₀-Werten im Bereich von 0.23 bis 1.72 μ g/mL (Choi et al., 2005). Auch Cho et al. konnte die Zytotoxizität des Cynaropikrins nachweisen (Cho et al. 2004). Ihre Ergebnisse zeigten, dass Cynaropikrin dosisabhängig die Überlebensrate von U937, Eol-1 und Jurkat T Zellen mit einer IC₅₀ von 3.11, 10.9 bzw. 2.36 μ M nach 48 h Inkubationszeit reduziert (Cho et al. 2004). Darüber hinaus konnte die Autoren zeigen, dass Cynaropikrin die Zellen in die Apoptose führt, in dem es zur Spaltung der Proteinkinase (PKC δ) kommt (Cho et al. 2004).

Wie bereits eingangs erwähnt, gehören die Guaianolide zusammen mit den Pseudoguaianoliden zu den am stärksten cytotoxisch wirkenden Sesquiterpenlactonen. Insbesondere Verbindungen mit exocyclischer Methylengruppe am γ -Lactonring besitzen, durch ihre Fähigkeit leicht mit Proteinen zu reagieren cytotoxische Eigenschaften (Ren, 2016; Drogosz und Janecka, 2019; Quintana und Estevez, 2018). Unsere Ergebnisse bestätigen diesen Befund, da alle drei stark wirksamen Guaianolide aus *Volutaria boranensis* dieses Strukturelement besitzen und die 11,13-Dihydrolactone Lipidiol (**3**) und Isolipidiol (**2**) keine Cytotoxizität bei 10 μ M aufweisen (s. Kapitel 3). Aufgrund der Tatsache, dass alle drei Verbindungen etwa gleich stark wachstumshemmend auf die Ovarialkarzinomzellen sind, lassen sich keine weiteren Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen.

Die von Kolb und Passreiter aus *Erythrina burtii* isolierten, prenylierten Flavonoide (pers. Mitteilung), zeigen weniger starke toxische Eigenschaften in dem hier verwendeten Zellmodell als die Sesquiterpenlactone aus *V. boranensis* (s. Kap. 3, Abb. 3.3 u. 3.4, Tab. 3.2). Die am stärksten wirksame Substanz war Abyssinone IV 4'-O-methylether (**IV**), ein am B-Ring zweifach prenyliertes Flavanon (s. Kap. 3, Abb. 3.2), das in einer Konzentration von 10 μ M das Zellwachstums um 64,1 % reduzierte (s. Kapitel 3) Die Wirkung lag damit in etwa auf dem Niveau des Arctiins (**12**). Der in unseren Untersuchungen nicht bestimmte IC₅₀-Wert muss somit unterhalb von 10 μ M liegen (s. Kap. 3).

Verbindung **III** (4'-O-Methylabyssinone V) wurde bereits von Wätjen et. al (2008) aus *Erythrina addisoniae* isoliert und identifiziert. Bei den gleichzeitig durchgeführten Cytotoxizitätstests gegenüber H4IIE Hepatomzellen zeigte diese Verbindung einen IC₅₀-Wert von 15 µM (Wätjen et al., 2008). In dem hier durchgeführten Experiment ist Verbindung **III** etwas schwächer wirksam. Bei einer Konzentration in Höhe von 10µM war nur noch eine Hemmung von 24,4 % festzustellen.

Die übrigen Verbindungen waren viel schwächer wirksam. Unter diesen Verbindungen war das Abyssinone II (**VI**), das von Passreiter et. al. (2015) bereits aus *Erythrina addisoniae* isoliert wurde, die Substanz mit der höchsten %-Hemmung (35,7 %). Diese Verbindung, die eine 2''-3''-Dihydroxyprenylgruppe besitzt (s. Kap. 3, Abb. 3.1) zeigte bei den Toxizitätstests in der Arbeitsgruppe von Wätjen einen EC₅₀ Wert von ca. 8,5 µM gegenüber H4IIE Hepatomzellen (Passreiter, 2015). Für diese Verbindung wurde kein IC₅₀- Wert bestimmt, man kann aber erkennen, dass die Aktivität gegenüber den hier verwendeten Ovarialkarzinomzellen bei 10 µM etwas geringer ist. Die anderen Flavonoide aus *E. addisoniae* hatten EC₅₀-Werte im Bereich von 15 – 100 µM (Passreiter, 2015).

In den vorangegangenen Untersuchungen zur Cytotoxizität von Flavonoiden der Gattung *Erythrina* (Wätjen et al., 2007; Wätjen et. al, 2008; Passreiter et al., 2015; Koch et al, 2019) wurden 3',5'-prenylierte Flavonoide als besonders wirksam gefunden. So wurde das Abyssinoflavanon VII als stark wirksame Substanz mit einem IC₅₀-Wert von 3,5 µM gefunden (Wätjen, 2008). Die Substanz, deren Wirkstärke damit im Bereich der Aktivitäten der hier aus *V. boranensis* isolierten Sesquiterpenlactone liegt, wurde als sehr aktive Verbindung weiter untersucht. Sie induzierte die Apoptose und wurde als Stoff für weitere Untersuchungen in der Tumorthherapie vorgeschlagen (Wätjen, 2008). In *E. burtii* war die Verbindung leider nicht enthalten, so dass sie hier nicht getestet werden konnte. Aus *E. burtii* wurde aber ihr 4'-Methylether (Abyssinoflavanone VII 4'-methylether) isoliert (s. Kap. 3). Diese Substanz (**II**) zeigte jedoch keine gute Aktivität (s. Kap.3) Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die frei phenolische Hydroxylgruppe zwischen den beiden Prenylresten essenziell für die Wirkung ist.

Etwas überraschend ist das schlechte Abschneiden des Gemisches der Pterocarpane Neorautenol (**X**) und Phaseollin (**XI**) in unserem Testsystem. In der Publikation von Wätjen et. al (2007) zeigten die beiden Verbindungen IC₅₀-Werte von 1.0 bzw. 1.5 µM (Wätjen et al., 2007). Gegenüber den hier eingesetzten Ovarialkarzinomzellen war die Aktivität sehr viel

geringer. Die eingesetzten 10 μ M führten lediglich zu einer Hemmung des Wachstums in Höhe von 23 %. Möglicherweise ist das auf das Gemisch der beiden Substanzen zurückzuführen, obwohl die Mischung der Substanzen bei annähernd gleicher Wirkstärke nicht zu einem so starken Rückgang der Aktivität führen sollte.

Es wäre wünschenswert, wenn die hier isolierten, aktiven Substanzen an weiteren Krebszelllinien getestet würden, idealerweise sollten im Falle der prenylierten Flavonoide von *Erythrina*, auch die zuvor aus *E. addisoniae* und *E. melanacantha* isolierten Verbindungen auch gegen Ovarialkarzinomzellen getestet werden, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können. Mit den stark wirksamen Sesquiterpenlactonen sollten weitere Untersuchungen zum genauen Wirkungsmechanismus durchgeführt werden.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeines

Alle verwendeten Extrakte und isolierte Reinsubstanzen wurden entweder im Vakuum-Exsiccator oder nach Stickstoffbegasung bei 2 bis 8 °C im Kühlschrank gelagert.

Die verwendeten Lösungsmittel zur Extraktion waren technischer Art, welche nach Bezug aus dem Chemikalienlager, zweimal destilliert wurden.

Für UV-Detektion, Hochleistungs- Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie wurden hochreine Lösungsmittel verwendet (Methanol Hypersolv , Chloroform).

Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel verwendet: Dimethylsulfoxid, Methanol, Aceton, Chloroform.

5.2. Chromatographische Verfahren

5.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Zusammensetzung säulenchromatographisch gewonnener Fraktionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Durch Fließmitteloptimierung wurden Substanzen aufgetrennt. Außerdem wurden Reinsubstanzen auf ihre Reinheit hin überprüft. Als stationäre Phase wurden DC-Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ von der Firma Merck verwendet.

Zur Auftrennung von Substanzgemischen wurden als mobile Phase verschiedene Lösungsmittelgemische, je nach Lipophilie der in den Fraktionen enthaltenen Substanzen, eingesetzt.

Tabelle 5.1: Lösungsmittelzusammensetzung für Dünnschichtchromatographie

DC-System-Nr.	Lösungsmittelzusammensetzung	Mischungsverhältnis
1	Dichlormethan / n-Hexan / Methanol	70:40:10
2	Dichlormethan / n-Hexan / Methanol	60:40:20
3	Ethylacetat / Eisessig / Ameisensäure / Wasser	100:11:11:26
4	n-Hexan / Ethylacetat	60:40
5	Toluol / Ethylacetat	30:70

Nach der Befüllung der DC-Kammer mit dem entsprechenden Lösungsmittelgemisch wurde die Kammer gesättigt. Die zu untersuchenden Fraktionen/ Reinsubstanzen wurden Bandenförmig (1cm) aufgetragen. Die Laufstrecke betrug in der Regel 8 cm. Nach Entwicklung der DC in der Kammer, wurde die Platte luftgetrocknet und die aufgetrennten Substanzen anschließend ausgewertet. Die Auswertung der DC's erfolgte zunächst unter UV-Licht. Dabei wurde zunächst die Fluoreszenzlöschung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm und anschließend die Eigenfluoreszenz bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm ermittelt. Anschließend wurden die Platten zur besseren optischen Auswertung der Trennergebnisse mit einem der nachfolgend aufgeführten Sprühreagenzien besprüht.

Anisaldehyd-Sprühreagenz:

0,5 ml Anisaldehyd mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml Schwefelsäure 96% wurden in der hier angegebenen Reihenfolge unter Eiskühlung vorsichtig gemischt.

Die DC-Platten wurden anschließend so lange mit dem Reagenz besprüht, bis der in der Platte enthaltene Fluoreszenzindikator unter UV-Licht bei $\lambda = 254$ nicht mehr zu erkennen war und die zuvor grün fluoreszierende Platte nur noch dunkelviolett erschien. Danach wurde die besprühte Platte vorsichtig bis zur vollständigen Farbentwicklung der Substanzzonen erhitzt.

Naturstoffreagenz A – Sprühreagenz:

Lösung 1

1% Lösung von Diphenylboryloxyethylamin in Methanol

Lösung 2:

5%ige Lösung von Polyethylenglykol 400 in Ethanol

Das Naturstoffreagenz A dient in erster Linie zur Identifizierung von Flavonoiden, andere Stoffe reagieren aber teilweise auch. Zunächst besprüht man die bereits entwickelte und getrocknete DC-Platte mit Lösung 1 so lange bis die Entwicklung der im sichtbaren bzw. UV-Licht (365 nm) entstehenden Farben bei Raumtemperatur abgeschlossen ist. Anschließend wird die detektierte Platte mit Lösung 2 fixiert.

Rf-Werte

Nach erfolgter Trennung und Detektion wurden die Laufstrecken der einzelnen Verbindungen bzw. Substanzzonen im DC mit der maximalen Laufstrecke der Fließmittelfront ins Verhältnis gesetzt. Die so in den Fließmittelgemischen DC-1 und DC-7 ermittelten Rf -Werte für die in dieser Arbeit isolierten Verbindungen sind in Tabelle 5.2.2 festgehalten. Je nach Substanz wurde entweder mit Anisaldehyd-Sprühreagenz bzw. mit Naturstoffreagenz A besprüht.

Tabelle 5.2: R_f-Werte der isolierten Verbindungen **1 – 17**

Verb.	R _f -Wert DC- 1	R _f - Wert DC- 2	R _f -Wert DC-3	Farbe nach Detektion mit Anisaldehyd-Reagenz	Farbe nach Detektion mit Naturstoffreagenz A	
					Tageslicht	UV 365 nm
1	0,36		-	Braunviolett	-	
2	0,73	0,42	-	Braunviolett	-	
3	0,73	0,42	-	Braunviolett	-	
4	0,41	-	-	Gelb	-	
5	0,41	-	-	Gelb		
6	0,39		-	Gelb	Gelb	Orange
7	0,36		-	Gelb	Gelb	Orange
8	0,34		-	Dunkelgelb	Gelb	Gelb
9	-	-	0,61	-	Gelb	-
10	-	-	0,61	-	Gelb	-
11	0,5	-	-		-	Hellblau
12	-	0,44	-	Braun	-	-
13	0,70	-	-	Dunkelbraun	-	-
14	0,71	-	-	Dunkelbraun	-	-
15	0,61	-	-	Dunkelbraun	-	-
16	0,61	-	-	Dunkelbraun	-	-
17	0,56				Gelb	Gelb

5.2.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

Diese Form der DC wurde zur Gewinnung einzelner Substanzonen nach erfolgter Trennung verwendet. Dazu wurde die zu trennende Fraktion in Form einer konzentrierten Lösung bandenförmig auf die gesamte Breite der DC-Platte aufgetragen, wobei jeweils ein Sicherheitsabstand von 1 cm zum Rand eingehalten wurde. Anschließend wurde das Chromatogramm in der geeigneten mobilen Phase entwickelt.

Die aufgetrennten Banden wurden unter UV-Licht detektiert und markiert und anschließend vorsichtig mit einem geeigneten Spatel ausgekratzt. Das so gewonnene, die Substanzen enthaltene Kieselgelpulver wurde mithilfe eines geeigneten Lösungsmittels unter ständigem Rühren (Magnetrührer) erschöpfend eluiert. Zur Entfernung von eventuell mitgelöstem Kieselgel wurde durch Blauband-Papierfilter (Whatman, Fa. Schleicher&Schuell) filtriert.

Das so gewonnene Eluat wurde danach entsprechend weiterbehandelt.

5.2.3. Säulenchromatographie (SC)

Zur Auftrennung des, nach der Soxhletextraktion erhaltenen, Rohextraktes und zur weiteren Auftrennung der dabei erhaltenen Fraktionen, wurde die Säulenchromatographie verwendet. Dazu wurden Glassäulen mit Fritte und feinregulierbarem Auslaufhahn, in einer der Menge an stationärer Phase entsprechenden Größe, verwendet. Als stationäre Phasen wurden Kieselgel und Sephadex LH-20 genutzt.

Das zu trennende Substanzgemisch des Rohextraktes bzw. der Folgefraktionen wurde bei Verwendung von Sephadex LH-20 hauptsächlich nach der Molekülgröße aufgetrennt, bei Verwendung von Kieselgel war die Hydrophilie bzw. Lipophilie der Substanzen im Wesentlichen für die Trennung verantwortlich.

Sephadex LH-20 der Fa. Sigma Aldrich:

Das pulverförmige Sephadex LH-20 wurde zur Verwendung als stationäre Phase zunächst außerhalb des Glasrohrs in Methanol aufgeschlemmt, anschließend in die Glassäule überführt und 48 h zur Äquilibration stehengelassen. Das Verhältnis aus Sephadex LH-20 zur Menge der aufzutrennenden Substanz betrug 100:1.

Nach der Äquilibration wurde die im geeigneten Lösungsmittel gelöste, aufzutrennende Substanz, in möglichst dünner Schicht auf die stationäre Phase pipettiert.

Anschließend wurde mit Methanol als mobile Phase eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 20 Tropfen pro Minute.

Kieselgel 60 (Firma Merck; Korngröße: 0,2-0,5mm):

Die Menge des verwendeten Kieselgels richtete sich wie beim Sephadex LH-20 nach der Menge der zu trennenden Substanz. Es wurde ebenfalls die Hundertfache Menge verwendet. Auch das Kieselgel wurde im, zu Anfang der Chromatographie, verwendeten Fließmittel vorgequollen und nach ausreichender Ruhephase in ein geeignetes Glasrohr mit Fritte überführt. Die Substanz wurde im geeigneten Lösungsmittel gelöst und mit einer kleinen Menge Kieselgel vermischt. Diese Mischung wurde zum Trocknen 24 h stehen gelassen und die trockene Mischung auf die vorbereitete Kieselgelsäule aufgestreut.

Mit geeigneter mobiler Phase (Tabelle 5.3) wurde hier ebenfalls bei gleicher Tropfgeschwindigkeit eluiert.

Tabelle 5.3: Mobile Phasen: Lösungsmittelzusammensetzungen für Kieselgelsäulen

SC System-Nr.	Fließmittelzusammensetzung	Mischungsverhältnis
SC1	Dichlormethan / Hexan / Methanol	70:40:10
SC2	Dichlormethan / Hexan / Methanol	60:40:20
SC3	Dichlormethan / Hexan / Methanol	50:30:40
SC4	Dichlormethan / Hexan / Methanol	50:50:10
SC5	Dichlormethan / Methanol	80:20
SC6	Dichlormethan / Methanol	50:50
SC7	Hexan / Dichlormethan / Methanol	70:40:10
SC8	Hexan / Dichlormethan / Methanol	60:30:20
SC9	Hexan / Methanol	80:20
SC10	Hexan / Methanol	70:30

Die in Tabelle 5.3 aufgeführten Fließmittelsysteme wurden sowohl einzeln als auch als Fließmittelgradienten verwendet, wobei die Mischung zum Ende immer polarer wird.

Fließmittelgradient 1 (FM-G1): SC1(12 Stunden), danach SC2 (12 Stunden) und abschließend SC3 (8 Stunden).

Fließmittelgradient 2 (FM-G2): SC5 (12 Stunden), danach SC6 für weitere 12 Stunden

Fließmittelgradient 3 (FM-G3): SC9, nach 24 Stunden Wechsel zu SC10 für weitere 12 Stunden

Bei allen säulenchromatographischen Trennungen wurden die Eluate mit automatischen Fraktionssammlern aufgefangen. Dabei erfolgte der Vorschub der Reagenzgläser alle 30 Minuten bzw. bei kleineren Säulen alle 15 Minuten. In diesen Fällen wurde auch die Tropfgeschwindigkeit halbiert.

Per Dünnschichtchromatographie wurde jedes dritte Reagenzglas überprüft und die Gläser, die gleiche Substanzzonen erkennen ließen, wurden zu einer Fraktion zusammengefasst und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers im Vakuum zur Trockene einrotiert.

5.2.4. Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Das Prinzip der Hochleistungs-Flüssigchromatographie ist eine technisch optimierte Säulenchromatographie, mit einer mobilen Phase in Form eines Eluenten bzw. Eluentengemisches und einer Säule, meist „reversed phase“RP-Säule als stationäre Phase. Das Säulenmaterial bestand bei den hier verwendeten Säulen aus unpolaren, monomeren C18 Molekülen (Eurospheer 100-C18, Fa Knauer und befindet sich in einem Metallrohr von 4mm Durchmesser (analytische HPLC) Das Elutionsmittel wird mit Hilfe einer Pumpe durch die Säule gepresst, wodurch die Substanzen wie bei jeder Säulenchromatographie entsprechend ihrer Polarität mehr oder weniger stark an die stationäre Phase absorbiert und wieder eluiert werden. Am Ende der Säule befindet sich zur Detektion der Substanzen, die nach der entsprechenden Retentionszeit die Säule verlassen ein Detektor. Meist ist das ein Dioden Array Detektor, der in der Lage ist, ein ganzes Spektrum verschiedener Frequenzen im sichtbaren und ultravioletten Licht zur Detektion der Substanzen zu verwenden. Auf diese Weise kann man gleichzeitig das UV-Spektrum der Substanz gewinnen, da die Absorption der eingestrahnten Frequenzen kontinuierlich gemessen wird. Man erhält auf diese Weise neben der Retentionszeit

(Rt), die unter gleichen Bedingungen besser vergleichbar ist als der Rf-Wert im Dünnschichtchromatogramm. Die HPLC diene aufgrund der besseren Trenneigenschaften auch zur Überprüfung der Reinheit von bereits rein isolierten Substanzen.

Für die analytische HPLC wurde das Dionex P580-System verwendet mit einer P580 Pumpe welches an ein Dioden-Array-Detektor UVD 340 S (Fa. Dionex Softron) gekoppelt ist. Als Probengeber diene dabei das ASI-100 (Fa. Dionex) und als Säule eine Reversed Phase HPLC-Säule der Marke Eurosphere 10 C₁₈ (125 × 4mm) (Fa.Knauer).

Durchführung einer Reinheitsprüfung und Ermittlung der Retentionszeiten:

10 µl der in Methanol p.a. gelösten Probe wurden in die Säule eingespritzt. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Methanol (HPLC grade, Fa. Hypersolv) und Wasser (NANOpur Diamond™ Fa. Barnstead) verwendet. Zur Elution wurden die beiden Lösungsmittel in Form eines Gradienten (s. Tab. 5.4), bei einer Flussrate von 1ml/min eluiert (Standardprogramm) Die so ermittelten Retentionszeiten der isolierten Substanzen sind in Tabelle 5.5 aufgeführt.

Tabelle 5.4: HPLC-Gradient zur Ermittlung der Retentionszeiten und Überprüfung der Reinheit (Standardprogramm)

Zeit (min)	Methanol (%)	Wasser (%)
0	10	90
5	10	90
35	100	0
45	100	0
46	10	90
60	10	90

Tabelle 5.5: Retentionszeiten der aus *V. boranensis* isolierten Verbindungen;

Isolierte Verbindung	Retentionszeit (min)
1	25,99
2	37,94
3	37,94
4	21,05
5	21,08
6	25,18
7	23,27
8	27,79
9	16,74
10	16,74
11	13,76
12	14,94
13	36,80
14	37,96
15	38,25
16	38,25
17	21,53

5.2.5. Semipräparative HPLC

Die HPLC wurde auch zur Trennung von Fraktionen verwendet.

Für die semipräparative HPLC wurde mit einem Lachrom-Merck Hitachi-System (Pumpe L7100, UV-Detektor L7400, Eurosphere 100 C18-Säule, 300 × 8 mm, Fa. Knauer) durchgeführt.

Hierzu wurde die aufzutrennende Fraktion als konzentrierte Lösung mit geeignetem Lösungsmittel Methanol, Methanol-Wassermischung oder Acetonitril gelöst und die Säule pro HPLC-Lauf mit jeweils 80 µl beladen.

Programm 1:

0-2 min.	Methanol: Wasser + 0,1% Ameisensäure 10:90
2-20 min.	Methanol : Wasser + 0,1% Ameisensäure 35:65
21-40 min.	Methanol : Wasser + 0,1% Ameisensäure 50:50
40-45 min.	Methanol : Wasser + 0,1% Ameisensäure 100:0

Programm 2:

0-10 min.	Acetonitril : Wasser 90:10
10-15min.	Acetonitril : Wasser 100:0
15-20 min.	Acetonitril : Wasser 100:0

Die Eluate wurden jeweils anhand der auftretenden Peaks, in verschiedenen Kolben aufgefangen. Die so erhaltenen Fraktionen wurden anschließend zur weiteren Verarbeitung eingengt und getrocknet.

5.3. Spektroskopische Verfahren

5.3.1. UV-Vis-Spektroskopie

Zur weiteren Charakterisierung und Identifizierung einer Substanz kann man die UV-Spektren und die darin enthaltenen Absorptionsmaxima als charakteristische Merkmale hinzuziehen. Alle UV-Spektren wurden während der HPLC mit einem Photodiodenarray-Detektor (HP 1050, Hewlett Packard) bei einem Wellenlängenbereich von 210 bis 595nm aufgenommen.

5.3.2. Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Zur endgültigen Identifizierung wurden NMR-Spektren der isolierten Substanzen aufgenommen. Als Gerät zur Messung diente ein Kernresonanz-Spektrometer AscendTM 600 der Firma Bruker. Es verfügte über einen TBI-Probenkopf (triple broadband inverse gradient head) für ¹H-NMR sowie für die auf dem Protonenkanal aufgenommenen Korrelationsspektren und einen QNP-Probenkopf (quadro nuclear probe) für ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, ¹³C-DEPT- und ROESY-NOESY-Messungen. Die Messungen wurden je nach Gerät bei 500 bzw. 600 MHz auf dem Protonenkanal bzw, 125 und 150 MHz auf dem Kohlenstoffkanal durchgeführt. Die Messungen wurden in Abhängigkeit von der Löslichkeit der Verbindungen in deuteriertem Methanol (CD₃OD), Chloroform (CDCl₃) oder Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆) als Lösungsmittel vorgenommen.

5.3.3. Massenspektrometrie (MS)

Bei der Massenspektrometrie werden die nach chemischer Ionisation der Substanz mittels Elektrospray (ESI) entstehenden Ionen im Hochvakuum gemessen (Ho et al, 2003) oder in Direkteinlassverfahren nach Elektronenbeschuss (EI) detektiert. Während es sich bei der ESI-Ionisation um ein weiches, schonendes Verfahren handelt, bei dem meist nur das Molekülion (M+H oder M-H) entsteht, treten im drastischeren „Electron Impact“-Verfahren auch sehr viele Folgefragmente auf. Je nach Stabilität des Molekülions, ist dieses bei EI-Spektren manchmal nicht mehr zu erkennen. Das so erhaltene Massenspektrum gibt dann aber nicht nur Auskunft über das Molekulargewicht der Untersuchungssubstanz, sondern die Folgefragmente geben auch wichtige Hinweise über die funktionellen Gruppen und Strukturelemente der Verbindung.

EI-Spektren wurden mit dem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer TSQ 7000 der Firma Finnigan MAT aufgenommen. HR-ESI-Spektren wurden mit dem UHR-QTOF maXis 4G von der Firma Bruker Daltonics aufgenommen.

5.3.4. Optische Drehung

Die Messung der spezifischen Drehung erfolgte unter Verwendung einer Quarzküvette der in einer Schichtdicke von 1 dm in Methanol Uvasol, Fa Merck oder Chloroform (Uvasol, Fa Merck) an einem Polarimeter 341 LC der Firma Perkin-Elmer. Als monochromatisches Licht wurde die Natrium-D-Linie verwendet und die Messung bei 589 nm und einer Temperatur von 20°C vorgenommen. Als Vergleichsstandard wurde eine 1%ige Prolin-Lösung (MeOH) oder 1%ige Griseofulvin-Lösung (CHCl₃) verwendet.

5.4. Isolierung der Inhaltsstoffe aus dem Drogenmaterial von *Volutaria boranensis*

5.4.1. Herkunft des Drogenmaterials

Volutaria boranensis (Cufod.) Wagenitz wurde am 05.08.2008 in Athi River (Machakos County), Kenya gesammelt und an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde von Patrick Mutiso, dem Kurator des Botanischen Gartens der Nairobi Universität, identifiziert, wo ein Belegexemplar mit der Signatur PBC2008/26 befindet .

5.4.2. Extraktion des Drogenmaterials

917 g der getrockneten und pulverisierten oberirdischen Pflanzenteile von *Volutaria boranensis* wurden in 4 Portionen aufgeteilt und mit Dichlormethan in einer Soxhletapparatur über 36 Stunden erschöpfend extrahiert. Die 4 entstandenen Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum am Rotationsverdampfer schonend vom Dichlormethan befreit. Daraus ergaben sich 133,67 g eines zähen, grün-schwarzen Dichlormethan-Extraktes.

Die in den Extraktionshülsen verbliebene und bereits trockene, pulverisierte Droge wurde mit dem gleichen Verfahren mit Methanol ebenfalls erschöpfend extrahiert. Nach Trocknung wurden 82g Methanolextrakt erhalten. Nach Abtrennung des sich bildenden Niederschlags nach Auflösung in Methanol, ergaben sich 30 g Extrakt. Alle Folgefraktionen des Dichlormethanextraktes wurden mit dem Anfangsbuchstaben D und alle entsprechenden Fraktionen des Methanolextraktes erhielten zur Abgrenzung ein M.

5.4.3. Fraktionierung des Dichlormethanextraktes

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone lag, wurde nicht der gesamte Extrakt, sondern nur der methanollösliche Anteil verwendet. Sesquiterpenlactone sind amphiphile Verbindungen, die sowohl in Dichlormethan als auch in wässrigem Methanol löslich sind. (Sticher, 2007). Auf diese Art und Weise, wurden lipophile Verunreinigungen entfernt. Der gesamte Dichlormethanextrakt (133,67g) wurde daher mit Methanol mithilfe der Soxhlet-Apparatur ausgezogen (Paßreiter, 1990; Skibinski 1990), wobei 33g Methanol-löslicher Anteil des Dichlormethan-Extraktes erhalten wurden. Dieser Anteil des Dichlormethanextraktes wurde als Ausgangsmaterial der nachfolgende Trennmethode zur Isolierung der Einzelverbindungen verwendet.

Insgesamt 33 g des so erhaltenen Extraktteils wurden in 5 Portionen säulenchromatographisch an Sephadex LH.20 mit Methanol als mobile Phase aufgetrennt. Die Eluate der jeweiligen Portionen wurden mehrmals dünnschichtchromatographisch im Fließmittelsystem DC1 aufgetrennt und die Chromatogramme anschließend entweder mit Anisaldehyd- oder mit Naturstoffreagenz A besprüht. Nach Auswertung der im DC's und bei Betrachten im UV-Licht vor und nach Besprühen und nach der durch Umsetzung mit den Sprühreagentien detektierten Substanzonen, wurden die in Reagenzgläsern aufgefangenen Fraktionen aufgrund ihrer chromatographischen Ähnlichkeiten weiter zusammengefasst. Durch Vergleich der so gebildeten Fraktionen aus allen 5 Durchgängen wurden anschließend 13 Fraktionen gebildet (s. Tab. 5.6).

Tabelle 5.6: Ergebnis der Auftrennung des methanollöslichen Anteils des Dichlormethanextraktes mit Sephadex LH-20 und daraus isolierte Substanzen

Fraktion	Ausbeute (g)	Isolierte Verbindungen
V.b.D.1 – V.b.D.5	10,50	-
V.b.D.6	2,90	15, 16
V.b.D.7	6,80	-
V.b.D.8	3,93	1 - 5, 12, 13, 14
V.b.D.9	3,67	-
V.b.D.10	1,15	8
V.b.D.11	5,34	-
V.b.D.12	1,05	6
V.b.D.13	0,88	7

Für die in Tab. 5.6 aufgeführten Fraktionen wurde eine Übersichts-DC angefertigt.

Anschließend wurden ausgewählte Fraktionen weiterbearbeitet.

Fraktion V.b.D.6

Fraktion V.b.D.6 wurde mit Methanol versetzt, wobei sich eine weiße Ausfällung zeigte. Nach Abtrennung des Niederschlags und Trocknung resultieren 39,5 mg einer weißen, kristallinen Substanz. Diese zeigte im DC-Fließmittelsystem-1 (Tab.5.1) drei Flecke, wobei zwei davon sehr schwach ausfielen und ein dunkelbrauner Fleck bei $R_f=0,61$ sehr intensiv ausfiel.

Um diesen Fleck zu isolieren, wurde eine Kieselgelsäule verwendet mit dem Fließmittelsystem SC-1 (Tab.5.3) Daraus ergaben sich 3 Fraktionen, wobei Fraktion 1 und 2 umkristallisiert, und zur Strukturaufklärung verwendet wurde (Verbindung **15** und **16**). (s. Kapitel 2.2.13 u. 2.2.14)

Tabelle 5.7: Fraktion 6 nach Auftrennung über Kieselgel

Fraktion	Ausbeute (mg)	Isolierte Verbindungen
V.b.D.6.1.	39,5	15, 16
V.b.D.6.2	2,7	15, 16
V.b.D.6.3	21,0	-

Fraktion V.b.D.8

Nach Zugabe von Methanol fiel auch aus Fraktion V.b.D.8 eine weiße, kristalline Substanz, welche im DC (Fließmittelsystem DC 1, s. Tab. 5.1) einen intensiven dunkelblauen Fleck bei 0,70 aufwies. und direkt der Strukturaufklärung zugeführt. Es wurden auf diese Weise 22,5mg von Verbindung **13** erhalten (s. Kapitel 2.2.11).

Die überstehende Lösung wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (400g) weiter aufgereinigt. Als mobile Phase wurde das Fließmittelgradient FM-G3 (Kap. 5.2.3) verwendet. Nach DC-Kontrolle konnten die aufgefangenen Eluate zu 27 Fraktionen V.b.D.8.1 bis V.b.D.8.27 vereinigt werden. Tabelle 5.8 listet die aufgetrennten Fraktionen und die daraus isolierten Substanzen.

Tabelle 5.8: Fraktionierung von V.b.D.8

Fraktion	Ausbeute (mg)	Isolierte Verbindungen
V.b.D.8.1	3,5	
V.b.D.8.2	40,3	
V.b.D.8.3	3,5	
V.b.D.8.4	12,2	
V.b.D.8.5	195,2	
V.b.D.8.6	12,8	
V.b.D.8.7	21,0	
V.b.D.8.8	30,0	
V.b.D.8.9	29,0	14
V.b.D.8.10	13,0	
V.b.D.8.11	14,6	
V.b.D.8.12	33,3	
V.b.D.8.13	20,7	

V.b.D.8.14	528,4	4, 5
V.b.D.8.15	40,5	
V.b.D.8.16	296,1	1
V.b.D.8.17	500,1	
V.b.D.8.18	251,1	
V.b.D.8.19	95,7	2, 3
V.b.D.8.20	46,9	
V.b.D.8.21	67,4	
V.b.D.8.22	36,2	
V.b.D.8.23	28,5	
V.b.D.8.24	135,4	12
V.b.D.8.25	213,7	
V.b.D.8.26	156,8	
V.b.D.8.27	73,1	

Fraktion V.b.D.8.9:

Auch in den Folgefraktionen von V.b.D.8 fiel eine Verbindung bereits kristallin in Fraktion V.b.D.8.9DK1 mit einer Menge von 7,4 mg an. Die Kristalle wurden ebenfalls gewaschen und getrocknet und zeigten im DC (Fließmittelsystem DC 1, s. Tab. 5.1, S.350) einen intensiven dunkelbraunen Fleck bei Rf 0,71 sowie weitere sehr schwache Flecken und wurde durch präparative DC (Fließmittelsystem DC 1) isoliert. Dabei wurden 2,26 mg Substanz erhalten, welche nach der Strukturaufklärung Verbindung **14** ergab (s. Kapitel 2.2.12)

Fraktion V.b.D.8.14:

498 mg dieser Fraktion wurden anschließend erneut über Kieselgel (100g) aufgetrennt. Als Elutionsmittel wurde das Fließmittelsystem S1 (s. Tab. 5.3) verwendet. Nach DC-Kontrolle im Fließmittelsystem DC 1 (s. Tab. 5.1) wurden die Eluate zu 7 Fraktionen zusammengefasst, von denen Fraktion 2 am vielversprechendsten zu sein schien. V.b.D.8.14.2 wurde daher im HPLC näher untersucht und anschließend mit dieser Methode präparativ behandelt. Das Ziel der semipräparativen HPLC war es einen gelben Fleck mit dem Rf-Wert 0,41 im Fließmittelsystem DC 1 zu isolieren. Die Fraktion wurde mit Programm 2 zur semipräparativen HPLC (s. Kap.

5.2.4, S.358) getrennt. Es ergaben sich vier Fraktionen (0,1,2,3), die nach Trocknung erneut mit dem HPLC untersucht wurden. Die Fraktionen V.b.D.8.14.2.2 und V.b.D.8.14.2.3 zeigten jeweils nur einen Peak im analytischen HPLC (Tab. 5.4) und wurden daher getrennt der Strukturaufklärung zugeführt (Verbindung **4** und **5**, (s. Kapitel 2.2.3 und 2.2.4)

Tabelle 5.9: Fraktion 8.14 nach Auftrennung über Kieselgel

Fraktion	Ausbeute (mg)	Isolierte Verbindungen
V.b.D.8.14.1	57,22	-
V.b.D.8.14.2	28,7	4, 5
V.b.D.8.14.3	36,5	-
V.b.D.8.14.4	22,9	
V.b.D.8.14.5	54,2	
V.b.D.8.14.6	111,3	
V.b.D.8.14.7	120,4	

Tabelle 5.10: Fraktion 8.14.2 nach semipräparativer Auftrennung

Fraktion	Ausbeute (mg)	Isolierte Verbindungen
V.b.D.8.14.2.0	12,35	-
V.b.D.8.14.2.1	8,19	
V.b.D.8.14.2.2	2,32	4
V.b.D.8.14.2.3	1,91	5

Fraktion V.b.D.8.16:

In Fraktion V.b.D.8.16 zeigte sich im Übersichts-DC (Fließsystem DC 1, Tab.5.1) ein deutlicher, braun-violetter Fleck mit einem Rf-Wert von 0,36. Nach Zugabe von Dichlormethan und n-Hexan fiel eine weiß-kristalline Substanz aus. Nach vollständiger Abtrennung des Niederschlags durch Stehenlassen im Kühlschrank (24 h, 4 °C), wurde die überstehende Lösung vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und der Niederschlag gewaschen. Die ausgefallene Substanz (135mg) wurde anschließend der Strukturauflösung zugeführt (Verbindung **1**, s. Kapitel 2.2.1)

Fraktion V.b.D.8.19:

Fraktion V.b.D.8.19 enthielt eine Substanz, deren dunkelbraune Zone im Dünnschichtchromatogramm bei Rf 0,42 im Fließmittelsystem DC 2 (Tab. 5.1) auffiel. Zur Reinigung wurde die Fraktion (69,25 mg) erneut an einer Kieselgelsäule (30 g) mit dem Fließmittelsystem SC1 (Tab. 5.3) aufgetrennt. Die Eluate wurden wie üblich im DC kontrolliert und nach Ähnlichkeit weiter zusammengefasst (Fließmittelsystem DC2; Tab. 5.1) Es wurden 5 Fraktionen V.b.D.8.19.A bis V.b.D.8.19.F gebildet. In der Fraktion V.b.D.8.19.E fand sich die gesuchte Substanz, die im HPLC eine Retentionszeit von 37,94 min. aufwies. Auch diese Substanz wurde der Strukturaufklärung zugeführt (Verbindung **2** und **3**, s. Kapitel 2.2.2). Nach Auswertung der NMR Spektren fiel auf, dass es sich um ein Gemisch zweier isomerer Substanzen handelte. Alle Versuche die beiden Verbindungen zu trennen, schlugen jedoch fehl.

Tabelle 5.11: Fraktion V.b.8.19 nach Auftrennung

Fraktion	Ausbeute (mg)	Isolierte Verbindungen
V.b.D.8.19.A	3,93	-
V.b.D.8.19.B	22,69	
V.b.D.8.19.C	4,80	
V.b.D.8.19.D	2,92	
V.b.D.8.19 E	2,38	2, 3
V.b.D.8.19.F	8,15	

Fraktion V.b.D.8.24

Auch Fraktion V.b.8.24 (135,40 mg) wurde erneut säulenchromatographisch an Kieselgel (20g) aufgetrennt. Als Elutionsmittel wurde das Fließmittelgradient FM-G2 verwendet (s. Kapitel 5.2.3). Die aufgefängenen Fraktionen wurden im DC kontrolliert Fließmittelsystem DC2 (s. Tab. 5.1) entwickelt und anschließend mit Anisaldehyd besprüht und bis zur vollständigen Farbentwicklung erhitzt. Es resultierten 7 Fraktionen, wobei nur Fraktion V.b.8.24.2 (14,50mg) eine saubere Substanz enthielt, die direkt zur Strukturaufklärung verwendet werden konnte (Verbindung **12**, s. Kapitel 2.2.10)

Fraktion V.b.D.10

500 mg der Faktion V.b.D.10 wurden mit über eine Kieselgelsäule (100 g) als stationäre Phase weiter aufgetrennt. Als Fließmittelmischung wurde Fließmittelsystem SC4 (s. Tab. 5.3.) verwendet. Es resultierten 12 Fraktionen V.b.D.10.1 - V.b.D.10.12 (s. Tab 5.11). Während die meisten Fraktionen im DC (DC 1, Tab. 5.1) erkennen ließen, dass eine weitere Aufarbeitung nicht sinnvoll ist, zeigte Fraktion V.b.D.10.10 eine einheitlich dunkelgelbe gefärbte Substanzzone im DC nach Besprühen mit Anisaldehyd bei Rf 0,34. Diese Verbindung wurde anschließend der Strukturaufklärung zugeführt (Verbindung **8**, s. Kapitel 2.2.7).

Tabelle 5.12: Fraktionierung von V.b.D.10

Fraktion	Ausbeute (mg)	Isolierte Verbindungen
V.b.D.10.1	249,00	
V.b.D.10.2	302,86	
V.b.D.10.3	78,50	
V.b.D.10.4	140,88	
V.b.D.10.5	21,90	
V.b.D.10.6	30,78	
V.b.D.10.7	1,22	
V.b.D.10.8	42,90	
V.b.D.10.9	2,80	
V.b.D.10.10	2,55	8
V.b.D.10.11	1,90	
V.b.D.10.12	7,96	

Fraktion V.b.D.12

Fraktion 8.12 (95,4mg) wurde mit Dichlormethan und n-Hexan versetzt. Dabei fiel eine gelbe-kristalline Substanz aus. Nach vollständiger Abtrennung des Niederschlags durch Stehenlassen im Kühlschrank (24 h, 4 °C), wurde die überstehende Lösung vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und der Niederschlag gewaschen. Die ausgefallene Substanz zeigte im DC (DC 1) eine sehr intensiv gelbe Substanzzone bei Rf 0,39 und enthielt die Reinsubstanz Hispidulin mit einer Ausbeute von 10,21mg (Verbindung 6, Kapitel 2.2.5).

Fraktion V.b.D.13

Bei der Aufarbeitung von Fraktion V.b.D.13 fiel nach Zusatz von Dichlormethan und n-Hexan ebenfalls eine gelbe kristalline Substanz aus, welche im Fließmittelsystem DC1 zwei Substanzzonen bei den Rf-Werten 0,39 und 0,36 aufwies, die durch präparative DC gewonnen werden konnten. Nach Auskratzen der Zonen und Filtration konnten zwei reine Verbindungen gewonnen werden, die der Strukturaufklärung zugeführt wurden. Verbindung 6 (10,5mg) und Verbindung 7 (2,07mg) (Verbindung 6 und 7, s. Kapitel 2.2.5 und 2.2.6)

5.4.4 Fraktionierung des Methanolextrakts

Wie im Kap. 5.4.3 für den Dichlormethanextrakt bereits beschrieben, wurde auch der Methanolextrakt viermal an Sephadex LH 20 aufgetrennt. Dabei wurden 7 Fraktionen erhalten (M.1 – M.7). Nur die Fraktionen M.6 und M.7 erlaubten eine schnelle Isolierung von Substanzen, so dass diese beiden Fraktionen weiter aufgetrennt wurden.

Tabelle 5.13 : Fraktionen 1-7 nach Auftrennung an Sephadex LH-20

Fraktion	Ausbeute (g)	Isolierte Verbindungen
V.b.M.1 -5	4,51	-
V.b.M.6	1,26	11 , 17
V.b.M.7	0,32	9, 10

Fraktion V.b.M.6

Diese Fraktion wurde per Kieselgel aufgetrennt und ergab 4 weitere Fraktionen, wobei Fraktion 6.1 einen vielversprechenden Fleck bei Rf 0,56 in einer Übersichts DC mit dem Fließmittel-System DC 1 (Tab. 5.1) ergab, welcher im HPCL allerdings mehrere Peaks zeigte. Somit wurde diese Fraktion per semipräparative HPLC aufgetrennt.

Dabei wurden 50 mg in 8 ml Methanol gelöst und mit Programm 1 für semipräparative HPLC aufgereinigt (s. Kap. 5.2.5).

Diese Auftrennung ergab 8 weitere Fraktionen und Fraktion 6.1.4. ergab anschließend einen sauberen Peak im HPLC bei 13,76min. (s. Kapitel 5.2.4) und wurde nach Aufnahme von NMR- und Massenspektren als Chlorogensäure (Verbindung **11**, s. Kap. 2.2.9) identifiziert.

Außerdem ergab die Fraktion V.b. M. 6.1.7 ebenfalls einen Peak im HPLC bei einer Retentionszeit von 21,53 min. Diese Substanz mit einer Ausbeute von (6,4mg) wurde ebenfalls der Strukturaufklärung zugeführt und ergab die Verbindung **17** (s. Kap. 2.2.15.)

Tabelle 5.14: Fraktion 6 nach Auftrennung per Kieselgel

Substanz	Ausbeute (mg)	Isolierte Verbindungen
V.b.M.6.1.	72,25	11, 17
V.b.M.6.2	181,61	-
V.b.M.6.3	45,41	-
V.b.M.6.4	120	

Tabelle 5.15: Fraktion 6.1 nach Auftrennung per semipräparative HPLC

Substanz	Ausbeute (mg)	Isolierte Verbindungen
V.b.M.6.1.1	1,26	
V.b.M.6.1.2	1,40	
V.b.M.6.1.3	1,50	
V.b.M.6.1.4	5,27	11
V.b.M.6.1.5	3,04	
V.b.M.6.1.6	5,0	
V.b.M.6.1.7	6,4	17
V.b.M.6.1.8	11,5	

Fraktion V.b.M.7

Fraktion 7 mit einer Ausbeute von 320mg zeigte im HPLC (Standardprogramm) mehrere Peaks und wurde per semipräparativer HPLC aufgetrennt. Dabei wurden mehrere Portionen mit je 40 mg in 8 ml Methanol gelöst und mit Programm 1 für semipräparative HPLC aufgereinigt (Kapitel 5.2.5)

Diese Auftrennung ergab 5 weitere Fraktionen und Fraktion 7.1sp3 ergab anschließend einen isolierten Peak im HPLC bei einer Retentionszeit von 16,74 min. und wurde nach Aufnahme von NMR- und Massenspektren als **2(R)- und 2(S)-Eriodictyol 7-glucuronid** (Verbindung **9+10**, Kapitel 2.2.8) identifiziert.

Tabelle 5.16: Fraktion 7 nach Auftrennung per semipräparative HPLC

Substanz	Ausbeute (mg)	Verbindung
V.b.M.7.1sp1	95,8mg	-
V.b.M.7.1sp2	21,61mg	-
V.b.M.7.1sp3	5,41mg	Verbindung 9+10

5.5 Analytische Daten der isolierten Verbindungen

5.5.1. Cynaropikrin

Ursprungsfraction: V.b.D.8.16

Summenformel: C₁₉H₂₂O₆

Molare Masse: 346.38 g/mol

CAS-Nr. 35730-78

Optische Drehung: $[\alpha]_{20}^D + 59,48^\circ$ (c 0,4 %; MeOH)

HPLC: 25,99min.

UV: $\lambda_{\max} = 216$ nm

EI-MS: m/z (rel.Int): 346 [M]⁺; 262 [M⁺ - 84] (19) ; 244 [262 - H₂O]⁺ (33),
226 [244 - H₂O]⁺ (22), 148 (32), 85 (Basis-Ion, 100%);
57 [85-CO]⁺ (20)

MS: HR-ESI: m/z= 347,1485 [+H⁺], m/z= 364,1752 [NH₄⁺], m/z=369,1304 [Na⁺]

NMR: siehe Tabelle 2.1, S.20/21

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.2. Isolipidiol und Lipidiol

Ursprungsfraction: V.b.D.8.19

Summenformel: C₁₅H₂₂O₄

Molare Masse: 266.33 g/mol

CAS-Nr. 30825-68-4

HPLC: 37,94 min.

UV: $\lambda_{\max} = 216$ und 283 nm

EI-MS: m/z (rel.Int): 266 [M]⁺; 248 [M-18]⁺ (7) , 230 [M-2x18]⁺ (3),
193 [M - HOOC-CH-CH₃; (M - 73)]⁺ (Basispeak, 100%), 168 (95)

HR-ESI-MS: m/z: 267,1595 [+H⁺]

NMR: siehe Tabelle 2.2, S. 42

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.3. 4- α -Methylboranoflavon

Ursprungsfraction: V.b.D.8.14

Summenformel: C₁₉H₂₂O₆

Molare Masse: 346.38 g/mol

Optische Drehung: $[\alpha]_{20}^D + 59^\circ$ (c 0,4 %; MeOH)

HPLC: 21,05 min.

UV: $\lambda_{\max} = 213$ nm

HR-ESI-MS: m/z = 347,1489 [$+H^+$]; m/z=364,1756 [$+NH_4^+$]; m/z=369,1309 [$+Na^+$]

NMR: siehe Tabelle 2.5, S.70

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.4. 4 - β -Methylboranoflavon

Ursprungsfraction: V.b.D.8.14

Summenformel: C₁₉H₂₂O₆

Molare Masse: 346.38 g/mol

Optische Drehung: $[\alpha]_{20}^D + 56,71^\circ$ (c 0,4 %; MeOH)

HPLC: 21,08 min.

UV: $\lambda_{\max} = 214$ nm

HR-ESI-MS: m/z = 347,1489 [$+H^+$]; m/z=364,1756 [$+NH_4^+$]; m/z=369,1309 [$+Na^+$]

NMR: siehe Tabelle 2.8, S. 105

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.5. Hispidulin

Ursprungsfraction: V.b.D.8.12

Summenformel: C₁₆H₁₂O₆

Molare Masse: 300.26 g/mol

CAS-Nr. 1447-88-7

HPLC: 25,18 min.

UV: λ_{max}= 270nm und 346 nm

HR-ESI-MS: m/z = 301,0709 [+H⁺]

NMR: siehe Tabelle 2.9, S. 137

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.6. Eupafolin

Ursprungsfraction: V.b.D.8.13

Summenformel: C₁₆H₁₂O₇

Molare Masse: 316.17 g/mol

CAS-Nr. 518-11-6

HPLC: 23,27 min.

UV: λ_{max}= 241 und 348 nm

EI-MS: m/z (rel. Int.): 316 [M]⁺ (60); 298 [M-H₂O]⁺ (32), 273 [M-CO-CH₃]⁺(34),
155 (Basispeak 100%), 69 (55), 43 (52)

NMR: siehe Tabelle 2.11, S. 153

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.7. Boranensisflavon

Ursprungsfraction: V.b.D.10.10

Summenformel: C₃₅H₃₂O₁₂

Molare Masse: 644 g/mol

Optische Drehung: $[\alpha]_{20}^D +21,47^\circ$ (c 0,4 %; MeOH)

HPLC: 27,79 min.

UV: λ_{\max} = 278 und 336 nm

HR-ESI-MS: m/z = 645,1964 [$+H^+$]

NMR: siehe Tabelle 2.12, S.169 und Tab. 2.13, S. 181

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.8. 2(R)- und 2(S)-Eriodictyol 7-glucuronid

Ursprungsfraction: V.b.M.7.1.

Summenformel: C₂₁H₂₀O₁₂

Molare Masse: 464.40g/mol

CAS-Nr. 35730-78

HPLC: 16,74 min.

UV: λ_{\max} = 284 und 328nm

ESI-MS: m/z= 463,3 Quasimolekülion [$M-H$]⁺ m/z= 927,1 [$2x M-H$]⁺

HRESI-MS: m/z = 465,3465 [$+H^+$]; m/z=488,3938 [$+Na^+$]

NMR: siehe Tabelle 2.14, S. 196

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.9. Chlorogensäure

Ursprungsfraction: V.b.M.6.1.4

Summenformel: C₁₆H₁₈O₉

Molare Masse: 354.31g/mol

CAS-Nr. 327-97-9

HPLC: 13,76 min.

UV: λ_{\max} = 239 und 325nm

HR-ES-MS: m/z = 355,1020 [$+H^+$]

NMR: siehe Tabelle 2.16, S. 215

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.10. Arctiin

Ursprungsfraction: V.b.D.8.24

Summenformel: C₂₇H₃₄O₁₁

Molare Masse: 534.55 g/mol

CAS-Nr. 20362-31-6

Optische Drehung: $[\alpha]_{20}^D - 3,45^\circ$ (c 0,1 %; MeOH)

HPLC: 14,94min.

UV: λ_{\max} = 235 und 275 nm

HR-ESI-MS: m/z = 552.2437 [$+NH_4^+$]

NMR: siehe Tabelle 2.18, S. 227

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.11. Taraxasterol

Ursprungsfraction: V.b.8DK

Summenformel: C₃₀H₅₀O

Molare Masse: 426.72 g/mol

CAS-Nr. 1059-14-9

HPLC: 36,80 min.

UV: λ_{max}= 202 nm

EI-MS: (rel. int. %): m/z 426 [M⁺] (20), 357 [M-69]⁺ (10), 207 [M-219]⁺ (60),
189 (Basispeak 100%), 135 (50), 121 (48), 109 (51)

NMR: siehe Tabelle 2.20, S.249

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.12. Pseudotaraxasterol-30-aldehyd

Ursprungsfraction: V.b.8.9DK1

Summenformel: C₃₀H₅₁O₂

Molare Masse: 440,3 g/mol

CAS-Nr. 464-98-2

HPLC: 37,96 min.

UV: λ_{max}= 209 nm

EI-MS: (rel. int. %): m/z 440 [M⁺] (5), 422 [M-H₂O]⁺ (25), 379 [M-61]⁺ (18),
207 (40); 189 (Basispeak 100%), 135 (65), 121 (51)

NMR: siehe Tabelle 2.22, S.271

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.13. Stigmasterol

Ursprungsfraction: V.b.D.6

Summenformel: C₂₉H₄₈O

Molare Masse: 412.69g/mol

CAS-Nr. 83-48-7

HPLC: 38,25 min.

UV: λ_{max}= 237 nm

EI-MS: rel. int. [%]: m/z 412 [M]⁺, 379 [M-H₂O-CH₃]⁺ (18), 351[M-H₂O-(CH₃)₂CH]⁺ (27),
271 [M-H₂-C₁₀H₁₉]⁺ (83), 255 [M-H₂O-C₁₀H₁₉]⁺ (85), 213 (53), 159 (90),
145 (82), 107 (66), 81(86), 55 (100)

NMR: siehe Tabelle 2.24, S. 293

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.14. β-Sitosterol

Ursprungsfraction: V.b.D6K1

Summenformel: C₂₉H₅₀O

Molare Masse: 414 g/mol

CAS-Nr. 559-7-06

HPLC: 38,25 min.

UV: λ_{max}= 237nm

EI-MS: (rel. int. [%]): m/z 414 [M]⁺, 381 [M-H₂O-CH₃]⁺ (8), 273 [M-H₂-C₁₀H₁₉]⁺ (28),
257 [M-H₂O-C₁₀H₁₉]⁺ (20), 215 (20), 161 (50), 147 (72), 109 (65),
83 (99), 57 (35)

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.5.15. Serotobenine

Ursprungsfraction: 6.1.7

Summenformel: C₂₀H₁₈N₂O₄

Molare Masse: 350,37g/mol

CAS-Nr. 99615-94-8

HPLC: 21,53 min.

UV: λ_{max}= 231 und 285nm

HR-ESI-MS: m/z = 351,1342 [H⁺]

NMR: siehe Tabelle 2.25, S. 310

DC: siehe Tabelle 5.2, S.352

5.6 Pharmakologische Arbeitsmethoden

Die folgenden zytotoxischen Untersuchungen wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmazeutische Chemie bei Herrn Prof. Dr. Kassack von Frau Dr. Parichat Sureechatchaiyan durchgeführt.

5.6.1. Zelllinie: Ovarialkarzinomzelllinie

Die verwendete Zelllinie A2780 sens ist eine Cisplatin-sensitive Ovarialkarzinomzelllinie, die beim *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, Salisbury, Großbritannien) bezogen wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im entsprechenden Nährmedium (RPMI 1640 + 120 µg/ml Streptomycin, 120 U/ml Penicillin und 10% hitzeinaktiviertes FKS der Firma PAN Biotech, Aidenbach) im Inkubator bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 96% und 5% CO₂-Gehalt.

5.6.2. Bestimmung der Viabilität (MTT-Assay)

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der MTT-Assay analog zu Marek et al. (2013) und Engelke et al. (2016) verwendet. Dazu wurden die Zellen in 96-well Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium ausgetauscht und die Zellen mit den zu testenden Substanzen versetzt. Nach 72 Stunden wurde zur Bestimmung der Zellviabilität 25 µl MTT-Lösung in jedes Well gegeben. Intakte Zellen mit funktionierendem Stoffwechsel sind in der Lage, das wasserlösliche MTT durch die mitochondriale Dehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu violetterem, wasserunlöslichem Formazan umzusetzen. Dafür wurden die Zellen 10-20 Minuten, je nach Zelllinie, im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit dem enthaltenen Formazan in 75 µl DMSO lysiert. Die Absorption wurde bei $\lambda = 544$ nm im FLUOstar Mikroplatten-Reader vermessen. Um die Hintergrundabsorption durch Zelltrümmer zu berücksichtigen, wurde die 96-well Platte zusätzlich bei 690 nm ausgewertet. Die erhaltenen Absorptionswerte bei 690 nm wurden von denen von 544 nm subtrahiert.

Die untersuchten Verbindungen wurden in DMSO gelöst. Durch die im Grobscreening verwendeten Konzentrationen ergibt sich in den Lösungen ein DMSO-Gehalt von 1% und 0,1%. Diese DMSO Konzentrationen wurden als Kontrollen inkludiert, um sicherzustellen, dass von dem enthaltenen DMSO kein zytotoxischer Effekt ausgeht.

Als Positivkontrolle dient Cisplatin, also die Verbindung, die in jedem Fall die Zellen abtötet und somit einen Vergleich mit den untersuchten Verbindungen erlaubt. NaCl ist das

Lösungsmittel für Cisplatin und dient somit als Kontrolle, dass das Lösungsmittel selbst keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Das DMSO ist das Lösungsmittel für die Substanzen und wird ebenfalls als Negativkontrolle verwendet, da es selbst ebenfalls keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat.

5.6.3 Berechnung der IC₅₀ – Werte

Nach Bereinigung der Absorptionswerte, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, wurde die Inhibition des Zellwachstums aller getesteter Substanzen in Prozent berechnet.

Aufgrund der Ergebnisse der %-Inhibitionen (s. Tabelle 3.3, Kapitel 3) wurde für die Testsubstanzen AKC02, AKC03 und AKC11 jeweils eine Verdünnungsreihe aus fünf Konzentrationen (10^{-3} M bis 10^{-7} M) angefertigt und die Absorption vermessen.

Mit dem Programm GraphPad Prism wurde, mit Hilfe der nicht-linearen Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Hill-analogen Gleichung, eine Konzentrations-Effekt-Kurve erstellt.

Dabei wurde die gemessene Absorption gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Substanzkonzentration aufgetragen. Der Wendepunkt der sich ergebenden sigmoidalen Kurven ergab dann den IC₅₀-Wert. (s. Tab.3.4, Kapitel 3)

6. Literaturverzeichnis

- ALTINORDU, F. und Ferrer-Gallego, P.P. (2017) Typifications of Linnaean names in the genus *Centaurea* and *Serratula* (Asteraceae). *Nordic Journal of Botany* 35, 121-123.
- AMBERGER-LAHRMANN, M., Fleig, H., Forth, W., Gelbke, H. P., Habs, H., Habs, M., ... & Weichardt, H. (2013). *Gifte: Geschichte der Toxikologie*. Springer-Verlag.
- ARDALANI, H., Avan, A., & Ghayour-Mobarhan, M. (2017). Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. *Avicenna journal of phytomedicine*, 7(4), 285.
- ASAKAWA, Y., Toyota, M., Uemoto, M. and Aratani, T. (1976) *Phytochemistry* 15, 1929.
- ASAKAWA, Y., Toyota, M., Takemoto, T. and Suire, C. (1979) *Phytochemistry* 18, 1007.
- ASAKAWA, Y., Toyota, M. and Takemoto, T. (1981) *Phytochemistry* 20, 257.
- AYATOLLAHI, A.A., Ghanadian, M., Afsharypour, S. Abdella, O.M., Mirzai, M., Askari, G. (2011) pentacyclic Triterpenes in *Euphorbia microsciada* with their T-cell Proliferation Activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10 (2), 287-294.
- AYAD, R. and Akkal, S. (2019) *Phytochemistry and biological activities of Algerian Centaurea and related genera*. *Studies in Natural Products Chemistry* 63, Chapter 12, 357-414.
- BARRON, D., & Ibrahim, R. K. (1996). Isoprenylated flavonoids—a survey. *Phytochemistry*, 43(5), 921-982.
- BEENTJE, H. J., Jeffrey, C., & Hind, D. J. N. (2005). Compositae (part 3), *Flora of tropical East Africa*. *Kew, Royal Botanic Gardens*, 676-680.
- BENESOVA, V., Samek, Z. and Vasickova, S. (1975) *Coll. Czech. Chem. Commun.* 4e, 1966.
- BEN SALAH, H., Smaoui, S., Abdennabi, R. and Allouche, N. (2019) LC-ESI-MS/MS phenolic profile of *Volutaria lippii* (L.) Cass. extracts and evaluation of their in vitro antioxidant, antiacetylcholinesterase, antidiabetic and antibacterial activities. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2019, 1-13.
- BEN SALEM, M.; Affes, H.; Ksouda, K.; Dhouibi, R.; Sahnoun, Z.; Hammami, S.; Zeghal, K.M. (2015) Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 70, 441–453.
- BEZUIDENHOUDT, B. C., Brandt, E. V., & Ferreira, D. (1987). Flavonoid analogues from *Pterocarpus* species. *Phytochemistry*, 26(2), 531-535.
- BLASCHEK, W. (2016). *Wichtl-Teedrogen und Phytopharmaka*. (pp. 365-366). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- BHATTACHARYYA, P. R., Barua, N. C., & Ghosh, A. C. (1995). Cynaropicrin from *Tricholepis glaberrima*: a potential insect feeding deterrent compound. *Industrial Crops and Products*, 4(4), 291-294.

BOHLMANN, F., Zdero, C., & Bethke, H. (1967). Polyacetylenverbindungen, CXXXV. Die Polyine aus *Centaurea*

BOHM, B.A.; Gottlieb, L. D. (1989) Flavonoids of the annual *Stephanomeria* (Asteraceae) *Biochemical Systematics and Ecology* 17(6), 451-453.

BONNER, T. G., Bourne, E. J., Lewis, D., & Yüceer, L. (1975). Monobutylidene acetals of 1-deoxy-D-galactitol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (14), 1323-1325.

BRETON FUNES, J.L.; Garcia Marrero, B.; Gonzalez Gonzalez, A. (1968) Sesquiterpene lactones of *Amberboa lippii*. Structure of grosshemine, *Anales de Quimica* 64(11), 1015-1016

BRUCE A. Bohm, Tod F. Stuessy (2001) *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)*, Springer Verlag Wien, S. 122.

BRUNEAU, A. (1996): Phylogenetic and Biogeographical Patterns in *Erythrina* (Leguminosae: Phaseoleae) as Inferred from Morphological and Chloroplast DNA Characters. *Systematic Botany*, Volume 21, Issue 4, 587-605.

BRUNO, M., Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, R.A., Bastow, K.F., Lee, K.-H. (2005) Cytotoxic Activity of Some Natural and Synthetic Guaianolides. *J Nat Prod.* 68 (7):1042-1046.

BUDESINSKY, M., and D. Šaman. (1995)"Carbon-13 NMR spectra of sesquiterpene lactones." *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. Vol. 30. Academic Press, 231-475.

CAI, E.; Guo, S.; Yang, L.; Han, M.; Xia, J.; Zhao, Y.; Gao, X.; Wang, (2018) Synthesis and antitumour activity of arctigenin amino acid ester derivatives against H22 hepatocellular carcinoma. *Nat. Prod. Res.* 32(4), 406-411.

CALLEJA, J. A., Garcia-Jacas, N., Roquet, C., & Susanna, A. (2016). Beyond the Rand Flora pattern: phylogeny and biogeographical history of *Volutaria* (Compositae). *Taxon*, 65(2), 315-332.

ČEKAN, Z., Herout, V., & Šorm, F. (1957). Über terpene LXXX. Die struktur von matricin, ein guajanolid aus der kamille (*Matricaria chamomilla* L.). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 22(6), 1921-1929

CHA, M.-R. et al. (2011) New Guaiane Sesquiterpene Lactones from *Ixeris dentata*, *Planta Med.* 77, 380-382.

CHEN, G.R.; Li, H.F.; Dou, D.Q.; Xu, Y.B.; Jiang, H.S.; Li, F.R.; Kang, T.G. (2013) (-)-Arctigenin as a lead compound for anticancer agent. *Nat. Prod. Res.* 27(23), 2251-2255.

CHEN, X., Mukwaya, E., Wong, M. S., & Zhang, Y. (2014). A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharmaceutical biology*, 52(5), 655-660.

CHO, Jae Youl; Kim, Ae Ra; Jung, Jee H.; Chun, Taehoon; Rhee, Man Hee; Yoo, Eun Sook (2004) Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines *European Journal of Pharmacology* 492(2-3), 85-94

- CHOI, S.Z. et al (2004) Kor. J. Pharmacogn. 35 (1), 35-40.
- CHOI, Sang Zin; Choi, Sang Un; Lee, Kang Ro (2005) Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Saussurea calcicola*. Archives of Pharmacal Research 28(10), 1142-1146
- CHOI, Y.H., Kim, H.K., Linthorst, H.J.M., Hollander, J.G., Lefeber, J.G., Erkelens, C., Nuzillard, J.-M., Verpoorte R. (2006) NMR Metabolomics or Revisit the Tobacco Mosaic Virus Infection in *Nicotiana tabacum* Leaves. J. Na. Prod. 69, 742-748.
- CHUNG, H.S. et al. (1993) Dentalactone, a Sesquiterpene from *Ixeris dentata*, Phytochemistry 35 (6), 1583-1584.
- CORBELLA, A.; Gariboldi, P.; Jommi, G.; Samek, Z.; Holub, M.; Drozd, B.; Bloszyk, E. (1972) Absolute stereochemistry of cynaropicrin and related guaianolides. J. Chem. Soc., Chem. Commun. (7), 386-387.
- COX, P.J., Fergusson, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2001) Moschamindole. Acta Cryst. E57, 81-82.
- CUI, C.-B., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Nakano, H., Tamaoki, T., Park, J.-H. (1990) Constituents of a Fren, *Davallia mariesii* Moore. I. Isolation and Structures of Davallialactone and a New Flavanone Glucuronide. Chem. Pharm. Bull. 38 (12), 3218-3225.
- CUFODONTIOS, G. (1943) *Centaurea hochstetteri* ssp. *boranensis*. N. Giorn. Bot. Ital. 50, 115.
- DEROSNE J.-F. (1804) Ueber das Opium. Journal der Pharmacie 12 (1), 223 – 253.
- DITTRICH, M. (1968). Morphologische Untersuchungen An den Früchten der Subtribus Cardueae-Centaureinae (Compositae)(Morphological Researches on Fruits of the Subtribe Cardveae-Centaureinae (Compositae). *Willdenowia*, 67-107.
- DOMINGUEZ, X. A., Gutierrez, M., & Aragon, R. (1976). Isolation of baileyolin a tumor inhibitory and antibiotic sesquiterpenlactone from *Baileya multiradiata*. *Planta medica*, 30(08), 356-359.
- DOMINIK, A., Steinhilber, D., & Wurglics, M. (2013). *Instrumentelle analytik kompakt*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart.
- DUARTE, Noelia; Ramalhete, Catia; Varga, Andras; Molnar, Joseph; Ferreira, Maria-Jose U. (2009) Multidrug resistance modulation and apoptosis induction of cancer cells by terpenic compounds isolated from *Euphorbia* species. Anticancer Research, 29(11), 4467-4472
- ELSEBAI, M. F., Ghabbour, H.A., Marzouk, A.M., Salmas, R.E., Orhan, I.E., Senol, F.S. (2018) Amberboin and lipidiol: X-ray crystallographic data, absolute configuration and inhibition of cholinesterase Phytochemistry Letters, 27, 44-48
- ENGELKE, L.; Hamacher, A.; Proksch, P.; Kassack, M. (2016) Ellagic Acid and Resveratrol Prevent the Development of Cisplatin Resistance in the Epithelial Ovarian Cancer Cell Linie A2780. *Journal of Cancer* (2016) 7(4) 353-363.

EMERENCIANO, V. P.; Militao, J. S. L. T.; Campos, C. C.; Romoff, P.; Kaplan, M. A. C.; Zambon, M.; Brant, A. J. C. (2001) Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(9), 947-957.

ESATBEYOGLU, T., Rodriguez-Werner, M., Winterhalter, P. (2017) Fractionation and Isolation of Polyphenols from *Aronia melanocarpa* by countercurrent and membrane chromatography, *Eur. Food. Res. Technol.* 243, 1261-1275.

FAZYLOVA, A.S., Turdybekov, K.M. CCDC 1441214: Experimental Crystal Structure Determination, 2015, DOI: 10.5517/cc1kcpd

FERRARO, G.E., Martino, V.S. und Coussio J.D. (1988) 4',4''-Dimethylcupressuflavanone from *Eupatorium subhastatum*, *J. Nat. Prod.* 51 (3), 586–587

FISCHER, N.H. (1990). Sesquiterpene Lactones: Biogenesis and Biomimetic Transformations. In: Towers, G.H.N., Stafford, H.A. (eds) *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids. Recent Advances in Phytochemistry*, vol 24. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8789-3_4

FLEMMING, M. (2014). *Phytochemische, pharmakologische und chemoökologische Untersuchungen zu Sesquiterpenlactonen aus Kamille, Schafgarbe und Arnika* (Doctoral dissertation).

GADESCHI, E., Jorge, Z. D., Massanet, G. M., & Luis, F. R. (1989). Two derivatives of costic acid from *Centaurea arguta*. *Phytochemistry*, 28(8), 2204-2206.

GANZER, U.; Jakupovic, J. (1990) Schkuhripinnatolides, unusual sesquiterpene lactones from *Schkuhria pinnata*. *Phytochemistry* 29(2), 535-539.

GEISSLINGER, G., Menzel, S., Gudermann, T., Hinz, B., Ruth, P., & Mutschler, E. (2020). *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie-Klinische Pharmakologie-Toxikologie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

GONZALEZ, A. G., Garcia Marrero, B., & Breton, J. (1970). Terpenoides de las Compuestas. X. Estructura de la grosshemina, lipidiol, e isolipidiol. Lactonas de la Amberboa (*Centaurea lippii* DC e su posible estereoquímica. *Ann. Quim*, 66, 799.

GONZALEZ, A., Bermejo Barrera, J., Massanet, G.M., Perez, J. (1973) Chemistry of compounds. XXV. Muracatin, a new sesquiterpene lactone isolated from *Amberboa muricata*. *Anales de Quimica* 69 (12), 1333-1334.

GONZALEZ, A. G., Darias, V., Alonso, G., Boada, J. N., & Feria, M. (1978). Cytostatic activity of sesquiterpene lactones from Compositae of the Canary Islands. *Planta medica*, 33(04), 356-359.

GONZALEZ, A. G., Velazquez, J. M., & Bretón, J. L. (1983). Lactonas sesquiterpénicas de la *Centaurea solstitialis* L. química de las compuestas XLVII.

GORTER, K. (1907) Contribution to our Knowledge of Coffee. First Paper. *Bull. Dept. Agr. Indes Nierland*, (14), 162.

GROSS, J. H. (2013). Fragmentierung organischer Ionen und Interpretation von EI-Massenspektren. In *Massenspektrometrie* (pp. 273-379). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.

GUELCEMAL, D., Alankus-Caliskan, O., Karaalp, C., Oers, A.U., Ballar, P., Bedir, E. (2010) Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *Urvillei*. *Carbohydrate Research*, 345 (17), 2529-2533.

GUI-RONG, C.; Li-Ping, C.; De-Qiang, D.; Ting-Guo, K.; Hong-Fu, L.; Fu-Rui, L.; Ning, (2012) Synthesis of (-)-arctigenin derivatives and their anticancer activity. *Nat. Prod. Res.* 26(2), 177-181.

HALLER, D., Rimbach, G., & Grune, T. (2013). Phytosterole. In *Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe* (pp. 217-226). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.

HÄNSEL, R., & Pertz, H. (2010). Alkaloide. In *Pharmakognosie—Phytopharmazie* (pp. 1217-1386). Springer, Berlin, Heidelberg.

HAO, X. et al. (2013) Chemical Constituents from *Teucrium viscidum*, *Biochem Syst. Ecol.* 51, 78-82.

HARRAZ, Fathalla M.; Amer, Masouda E. (1988) Proton- and carbon-13-NMR assignments and cytotoxic activity of the lignan glucoside arctiin from *Centaurea alexandrina* Del. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 168-71

HARMATHA, J., Budesinsky, M. Trka, A. (1982) *Collect, Czech. Chem. Commun.* 47, 644-663.

HARTWELL, K. A.; Miller, P.G.; Mukherjee, S.; Kahn, A.R.; Stewart, A.L.; Logan, D.J.; Negri, J.M.; Duvet, M.; Jaeras, M.; Puram, R. et al (2013) Niche-based screening identifies small-molecule inhibitors of leukemia stem cells, *Nature Chemical Biology*, 9(12), 840-848.

HÄUSLER, M.: *Phytochemische, analytische und pharmakologische Untersuchungen zu Cynara scolymus L.*, Dissertation, Universität Innsbruck 2001.

HEGNAUER; R. (1959). Chemotaxonomische Betrachtungen. *Planta Medica*, 7(04), 344-366.

HELLWIG, F. H. (2004). *Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean—history of ecogeographical radiation.* *Plant Systematics and Evolution*, 246(3), 137-162.

HERZ, W., Aota, K., Holub, M. und Samek, Z. (1970) Sesquiterpene Lactones and Lactone Glycosides from *Hymenoxys* Species, *J. Org. Chem.* 85 (8) 2611-2624.

HERZ; W. (1977) in *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds) Vol. I, pp. 337-357. Academic Press, New York.

HEYWOOD, V. H., Harborne, J. B., & Turner, B. L. (1977). *Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press.

HILLEBRAND, S. (2004) Analytik von Polyphenolen in Buntsäften im Hinblick auf Saftqualität, Farbe und Antioxidative Aktivität, Dissertation TU Braunschweig, Cuvillier Verlag, Göttingen, ISBN 3-86 537-289-9.

HO, C. S., Lam, C. W. K., Chan, M. H. M., Cheung, R. C. K., Law, L. K., Lit, L. C. W., & Tai, H. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 24(1), 3.

HODAJ, Entela; Tsiftoglou, Olga; Abazi, Sokol; Hadjipavlou-Litina, Dimitra; Lazari, Diamanto (2017) Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity. *Natural Product Research*, 31(10), 1195-1200

HOFFMANN, K. F. (1954). Die Heilkräuter bei St. Hildegard von Bingen (1098–1179). *Planta medica*, 2(03), 92-98.

HOFMANN, R.E. (2006) Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents. *Magn. Res. Chem.* 44, 606-616.

HOU, C. C., Lin, S. J., Cheng, J. T., & Hsu, F. L. (2003). Antidiabetic Dimeric Guianolides and a Lignan Glycoside from *Lactuca indica*. *Journal of natural products*, 66(5), 625-629.

HUANG, X. und Yang, R.-Z. (2004) *Chemistry of Natural Compounds* 40 (5), 457-459. HUANG, Huo-qiang; Yan, Mei-na; Piao, Xiang-lan; Cui, Jian (2011) Triterpenoids from *Saussurea deltoidea*. *Zhongguo Shiyang Fangjixue Zazhi*, 17(16), 50-53

HUJANG, G.-D., Chen, F.-F., Yang, J.-H., Ma, G.-X., Liao, Z.-J., Li, W.-P., Li, Z.-Y., Chen, L. (2021) Moschamindole induces glioma cell apoptosis by blocking Mia40-dependent mitochondrial intermembrane space assembly and oxidative respiration. *Phytotherapy Research*, 35(6), 3390-340.

HUANG, Huo-qiang; Yan, Mei-na; Piao, Xiang-lan; Cui, Jian (2011) Triterpenoids from *Saussurea deltoidea*. *Zhongguo Shiyang Fangjixue Zazhi*, 17(16), 50-53

IRANSHAHY, Milad; Tayarani-Najaran, Zahra; Kasaian, Jamal; Ghandadi, Morteza; Emami, Seyed Ahmad; Asili, Javad; Chandran, Jima N.; Schneider, Bernd; Iranshahi, Mehrdad (2016) Highly Oxygenated Sesquiterpene Lactones from *Cousinia aitchisonii* and their Cytotoxic Properties: Rhaserolide Induces Apoptosis in Human T Lymphocyte (Jurkat) Cells via the Activation of c-Jun n-terminal Kinase Phosphorylation. *Phytotherapy Research* 30(2), 222-226

JANG, D.S. et al. (2000) Isolation of Isoamberboin and Isolipidiol from Whole Plants of *Youngia japonica*, *Kor. J. Pharmacogn.* 31 (3), 306-309.

JAGATAP, G.B. und Banerjee, S.K. (1976) Phytochemical investigations of *Amberboa divaricata*. *Planta Med.* 29 (2), 113-115.

JANECKA A, Wyrębska A, Gach K, Fichna J, Janecki T. (2012) Natural and synthetic α -methylene lactones and α -methylene lactams with anticancer potential. *Drug Discov Today*; 17: 561-72.

JIANG, K., Gachumi, G., Poudel, A., Shurmer, B. Bashi, Z., El-Aneed, A. (2019) The Establishment of Tandem Mass Spectrometric Fingerprints of Phytosterols and Tocopherols and the development of Targeted Profiling Strategies in Vegetable Oils. *J.A. Soc. Mass Spectrom.* 30, 1700-1712.

JUNIOR, G.M.V., Soussa, C.M. de M., Cavaleiro, A.J., Lago, J.H.G., Chaves, M.H. (2008) Phenolic derivatives from Fruits of *Dipteryx lacunifera* DUCKE and evaluation of their Antiradical Activities. *Helv. Chim. Acta* 91, 2159- 2167.

KHALILOV, L. M., Khalilova, A. Z., Shakurova, E. R., Nuriev, I. F., Kachala, V. V., Shashkov, A. S., & Dzhemilev, U. M. (2003). PMR and ¹³C NMR spectra of biologically active compounds. XII. Taraxasterol and its acetate from the aerial part of *Onopordum acanthium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 39(3), 285-288.

KAMAL, N., Clements, C., Gray, A. I., & Edrada-Ebel, R. (2016). Anti-infective activities of secondary metabolites from *Vitex pinnata*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(1), 102-106.

KAMIYA, K., Saiki, Y., Hama, T., Fujimoto, Y., Endang, H., Umar, M., & Satake, T. (2001). Flavonoid glucuronides from *Helicteres isora*. *Phytochemistry*, 57(2), 297-301.

KANNAN, K. S., Kandavel, D., & Rajalakshmi, P. (2022). In vitro Assessment of Antioxidant and Anticancer Potential of Flavonoid Glycosides of *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC. *Asian Journal of Chemistry*, (4), 1003-1008.

KATO, M.; Ogami, N.; Ita, M.; Taguchi, N. (2011) Age-related or noise-induced hearing loss and tinnitus prophylactic/therapeutic agents containing endothelin B receptor expression promoters, compositions containing the agents, production of transient hearing loss mouse model, use thereof, drug screening using the mouse, and detection or prediction of the hearing disorders Japan, JP2011037738 A 2011-02-24

KLOCKGETHER-RADKE, A.P. (2002) F. W. Sertürner und die Entdeckung des Morphins. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37 (5), 244-249

KISIEL, W. und Michalska, K. (2001) Sesquiterpenoids from *Crepis conyzifolia*, *Z. Naturforsch* 56c, 961-964.

KISIEL, W. (2011) NMR studies of isomeric dehydrocostuslactone derivatives and structure revision of dentatins A-C, *Phytochem. Lett.* 4, 311-314.

KNOCHE, H. G., Ourisson, G. and Perold, G. W. (1969) *Science* 166, 239.

KOCH, K., Schulz, G., Döring, W., Büchter, C., Havermann, S., Mutiso, P. C., ... & Wätjen, W. (2019). Abyssinone V, a prenylated flavonoid isolated from the stem bark of *Erythrina melanacantha* increases oxidative stress and decreases stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(6), 1007-1016.

KOLB; I., Passreiter, C.M., persönliche Mitteilung.

- KUMARASAMY, Y., Fergusson, M., Nahar, L. Sarker, S.D. (2002) Bioactivity of Moschamindole from *Centaurea moschata*, *Pharm. Biol.* 40 (4), 307-310.
- LANG, G. (2001). *Phytochemische Untersuchung der Blätter von Eupatorium semialatum Benth., einer in Zentralamerika traditionell verwendeten Arzneipflanze (" Bacché")* (Doctoral dissertation, Düsseldorf, Univ., Diss., 2001).
- LEE, Tzong-Huei; Lee, Ming-Shian; Ko, Horng-Huey; Chen, Jih-Jung; Chang, Hsun-Shuo; Tseng, Mei-Hwei; Wang, Sheng-Yang; Chen, Chien-Chih; Kuo, Yueh-Hsiung (2015) New furanone and sesquiterpene from the pericarp of *Calocedrus formosana*. *Natural Product Communications* 10(6), 845-846.
- LI, N., Wu, J.-L., Sakai, J., Ando, M. (2003) Dibenzylbutyrolactone and Dibenzylbutanediol Lignans from *Peperonia duclouxii*. *J.Nat. Prod.* 66, 1421-1426.
- LINDENMEYER, M. T. (2004). *Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus der antiinflammatorischen Aktivität von Sesquiterpenlactonen* (Doctoral dissertation, Freiburg (Breisgau), Univ., Diss., 2004).
- LIU, Tianyu; Zhang, Junmin; Han, Xiao; Xu, Jianqiang; Wu, Yueting; Fang, Jianguo (2019) Promotion of HeLa cells apoptosis by cynaropicrin involving inhibition of thioredoxin reductase and induction of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 135, 216-226
- LUKITANIGSIH, E- (2012) *Pharmacon (Indonesia)* 13 (2), 47-54
- LYSS, G., Schmidt, T.J., Merfort, I., Pahl, H.L. (1997) Helenalin, an anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF- κ B. *Biol. Chem.* 378. 951-961.
- LÜDEMANN, H. D., & Nimz, H. (1974). ^{13}C -kernresonanzspektren von ligninen, 1. Chemische verschiebungen bei monomeren und dimeren modellsubstanzen. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 175(8), 2393-2407.
- MA, X.-M. et al. (2008) *Chemistry of Natural Compounds* 44 (3), 399-401.
- MABRY T. J., Abdel-Baset, Z., Padolina, W. G., & Jones Jr, S. B. (1975). Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2(3-4), 185-192.
- MACIAS, F.A., Vinolo, V.M.I., Fronczek, Massanet, G.M, Molinillo, J.M.G. CCDC 605933: Experimental Crystal Structure Determination, 2006, DOI: [10.5517/ccnbi7q](https://doi.org/10.5517/ccnbi7q)
- MAGNUSSON, G. and Thoren, S. (1973) *Acta Chem. Scand.* 27, 1573.
- MALIK, M. N., Haq, I. U., Fatima, H., Ahmad, M., Naz, I., Mirza, B., & Kanwal, N. (2022). Bioprospecting *Dodonaea viscosa* Jacq.; a traditional medicinal plant for antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and antimicrobial potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3), 103688.

- MAREK, L.; Hamacher, A.; Hansen, F.; Kuna, K.; Gohlke, H.; Kassack, M.; Kurz, T. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors with a Novel connecting Unit Linker Region Reveal a Selectivity Profile for HDAC5 with Improved Activity against Chemoresistant Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* (2013) 56 (2) 427-436
- MARZOUK, A. (2015). Investigating *Volutaria abyssinica* as a potential source for cytotoxic sesquiterpenoids. *J. Am. Sci*, 11, 73-81.
- MENEZES, J.J.M.D.S.; Diederich, M.F. (2021) Bioactivity of natural biflavonoids in metabolism-related disease and cancer therapies, *Pharmacol. Res.* 167, 105525
- MERFORT, I. (2011) Perspectives on Sesquiterpene Lactones in Inflammation and Cancer. *Current Drug Targets* 12, 1560-1573
- MEZACHE, N. Bendjeddou, D., Satta, D., Mekkiou, R., Benayache, S. and Benayache, F. (2010) Secondary metabolites from *Centaurea lippii*. *Chem. Nat. Comp* 46 (5), 801-802.
- MIN, Byung-Sun; Na, Min-Kyun; Oh, Sei-Ryang; Ahn, Kyung-Seop; Jeong, Gil-Saeng; Li, Gao; Lee, Sang-Ku; Joung, Hyouk; Lee, Hyeong-Kyu (2004) New Furofuran and Butyrolactone Lignans with Antioxidant Activity from the Stem Bark of *Styrax japonica*. *J. Nat. Prod.* 67(12), 1980-1984.
- MIYASE, T. et al. (1985) Studies on Sesquiterpenes from *Macrocladidium trilobum*, *Chem Pharm. Bull.* 33 (10), 4445-4450.
- MO, Z., & Melzig, M. F. (2021). Herbstzeitlose, *Colchicum autumnale* L. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 42(02), 111-116.
- MORALES, G., Sierra, P., Mancilla, A., PAREDES, A., LOYOLA, L. A., GALLARDO, O., & BORQUEZ, J. (2003). Secondary metabolites from four medicinal plants from northern Chile: antimicrobial activity and biotoxicity against *Artemia salina*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 48(2), 13-18.
- MORRISON, R. T., Boyd, R. N., & Mayer-Ruthardt, I. (1978). *Lehrbuch der organischen Chemie* (Vol. 3). VCH.
- MORITA, N. (1960) The flavonoid of sesame leaves. I. The structure of the glycoside, pedaliin, *Chem. Pharm. Bull.* 8, 59-65.
- MORITANI, Shuzo; Nomura, Masaaki; Takeda, Yasunori; Miyamoto, Ken-ichi (1996) Cytotoxic components of *Bardanae Fructus* (Goboshi). *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19(11), 1515-1517
- MOTL, O., Repčák, M., Buděšínský, M., & Ubik, K. (1983). Weitere Bestandteile des Kamillenöls, 3. Mitt. 1. *Archiv der Pharmazie*, 316(11), 908-912.
- MÜLLER, J. (1998). Hexensalben und Liebestränke: Ein Beitrag zur Kulturgeschichte, der Nachtschattengewächse. *Gesnerus*, 55(3-4), 205-220.

- MUTSCHLER, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., & Schäfer-Korting, M. (2001). Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9.
- NAIDENOVA, E.; Dryanovska-Noninska, L.; Drozhd, B. (1977) Nitrogen-containing derivatives of the sesquiterpene lactone grossheimin. *Problemi na Farmatsiyata*, 5, 85-92
- NAVARRO, J.J.; Caballero, M.C.; Moran, J.R.; Medarde, M.; Grande, M.; Anaya, J. (1990) Guaianolides and eudesmanolides from *Centaurea ornata*. *J. Nat. Prod.* 53(3), 573-578.
- NEILL, D.A: (1988) Experimental Studies on Species Relationships in *Erythrina* (Leguminosae:Papilionoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75 (3), 886-969.
- NIEMANN, A.(1860) Über eine neue organische Base in den Cocablättern. *Arch. Pharm.* 153 (2 u. 3), 129–155 und 291–308.
- NYEMECK, N.M. II, Bikobo, D.S.N., Zintchem, A.A.A., Diboue, P.H.B., Ndjakou, B.L., Pegnyemb, D.E., Koert, U. (2018) Phytochemical investigation and in vitro antimalarial activities of stem barks of *Campylospermum zenkeri* and roots of *Campylospermum vogelii*. *Journal of Pharmacy Research* 12 (5), 689-696.
- PAPIERSKA, K., Ignatowicz, E. (2019) Functional food in prevention of cardiovascular diseases and obesity. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 76 (6), 945-958.
- PASSREITER, C. M., & Isman, M. B. (1997). Antifeedant bioactivity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* and their antagonism by γ -aminobutyric acid. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(5), 371-377.
- PASSREITER, C. M., Suckow-Schnitker, A. K., Kulawik, A., Addae-Kyereme, J., Wright, C. W., & Wätjen, W. (2015). Prenylated flavanone derivatives isolated from *Erythrina addisoniae* are potent inducers of apoptotic cell death. *Phytochemistry*, 117, 237-244.
- PH. EUR. (Pharmacopeia Europaea)Europäisches Arzneibuch 10. Ausgabe, Grundwerk 2020. 10.0/1391: Deutscher Apotheker Verlag
- PICMAN, A.K. (1986) Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Biochemical Syst. Ecol.*, 14 (3) 255-281.
- POEPPIG, E. (1836). *Reise in Chile, Peru und auf dem Amazonenstrome während der Jahre 1827-1832* (Vol. 2). F. Fleischer
- PORZEL A., Lien T.P., Schmidt, J., Drosihn, S., Wagner, C., Merzweiler, K., Sung, T.V., Adam, G. (2000) Fissistigmatin A-D: Novel Type Natural Products with Flavonoid-Sesquiterpene Hybrid Structure from *Fissistigma bracteolatum*. *Tetrahedron* 865-872.
- POWER, F.B.; Browning, H. Jr. (1912) Constituents of *Taraxacum* Root. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 101, 2411-2429
- PFEIL, R.M.; Gage, D.A.; Lee, E.F.; Miski, M.; Mabry, T.J.; Powell, A.M. (1986) Sesquiterpene lactones from *Perityle vaseyi*. *Phytochemistry* 26(1), 195-198.

- QÉDAN, S. (1974). Heimische Arzneipflanzen der arabischen Volksmedizin. *Planta medica*, 26(05), 65-74.
- QUINTANA, J., Estevez, F. (2018) Recent Advances on Cytotoxic Sesquiterpene Lactones. *Current Pharmaceutical Design* 24, 4355-4361.
- RAFRAFI, M., Salah, H. B., Vougianniopoulou, K., Angelis, A., Skaltsounis, L. A., & Allouche, N. (2021). Sesquiterpene lactones and flavonoids with chemotaxonomic significance from *Volutaria lippii* (L.) Cass. *Biochemical Systematics and Ecology*, 96, 104249.
- RAHMAN, M. M., Dewick, P. M., Jackson, D. E., & Lucas, J. A. (1990). Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, 29(6), 1971-1980.
- RANGASWAMI, S, Rao, E.V. (1961) Proceedings – Indian Academy of Sciences, Section A, 54A, 51-59.
- RANIERI, R. L. and Calton, G. J. (1978) *Tetrahedron Letters* 499.
- REN, Y., Yu, J., Kinghorn, A.D. (2016) Development of Anticancer Agents from Plant-Derived Sesquiterpene Lactones. *Curr. Med. Chem.* 23, 2397-2420.
- REYNOLDS, W.F. et al (1986) *Tetrahedron* 42 (13), 3419-3428.
- RINGL, A., Prinz, S., Huefner, Antje, Kurzmann, M., Kopp, B. (2007) Chemosystematic Value of Flavonoids from *Crataegus x macrocarpa* (Rosaceae) with special Emphasis on (R)- and (S)-Eriodictyol-7-O-glucuronide and Luteolin-7-O-glucuronide. *Chemistry & Biodiversity* 4, 154-162
- RÖDER, E., & Krauß, H. (1992). Zur Synthese von β -Alkyl- α -methylen- γ -butyrolactonen. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1992(3), 177-181.
- RYBALKO, K.S.; Ban'kovskii, A.I.; Kibal'chich, P.N. (1964) Grosshemine, a new sesquiterpene lactone from *Grossheimia macrocephala*, *Zhurnal Obshchei Khimii*, 34(4), 1358-1359.
- SADOZAI, K. K., Levery, S. B., Anand, J. K., & Hakomori, S. I. (1996). Model compounds for plasmaloglycolipids: Preparation of long chain cyclic acetals of methyl β -D-galactopyranoside and determination of their regio- and stereochemistry by proton NMR. *Journal of carbohydrate chemistry*, 15(6), 715-725.
- SARG, T. M.; Ateya, A. M.; Dora, G. A. (1987) Constituents of Egyptian medicinal plants. Part VI. 3,4-Dihydroscopoletin, a new compound from *Launaea spinosa* growing in Egypt. *Fitoterapia* 58(2), 133-4 |
- SARKER, S.D., Savchenko, T., Whiting, P., Sik, V., Dinan, L.R- (1997) Moschamine, cis-Moschamine, Moschamindole and Moschamindolol: Four novel indole alkaloids from *Centaurea moschata*. *Nat. Prod. Lett.* 9, 189-199.

SATO, H., Kawagishi, H., Nishimura, T., Yoneyama, S., Yoshimoto, Y., Sakamura, S., Furusaki, A., Katsuragi, S., Matsumoto, T. (1985) Serotobenine, a novel phenolic amide from safflower seeds (*Carthamus tinctorius* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* 49(10), 2969-2974.

SCHMOLL, H. J., Niederle, N., & Achterrath, W. (1981). Etoposid (VP 16-213). *Klinische Wochenschrift*, 59(21), 1177-1188.

SCHWARZMANN_SCHAFFHAUSER, D (2005) Kokain. In: Werner E. Gerabek, Bernhard D. Haage, Gundolf Keil, Wolfgang Wegner (Hrsg.): *Enzyklopädie Medizingeschichte*. De Gruyter, Berlin/ New York, ISBN 3-11-015714-4, S. 772.

SEAMAN, F. C. (1982) *Bot. Re-* 48, 121.

SEFKOW, M., Kellin, A., Schilde, U. (2001) First Efficient Syntheses of 1-, 4-, and 5-Caffeoylquinic Acid. *Eur. J. Org, Chem*, 2735-2742

SEKERLER, T., Sen, A., Bitis, L., Sener, A. (2020) In vitro antihepatocellular carcinoma activity of secondary metabolites of *Centaurea kilaea* Boiss. *Journal of Research in Pharmacy* 24 (4), 479-486

SHEICHENKO, V. I., & Rybalko, K. S. (1972). NMR spectra, structure, and stereochemistry of grossheimin. *Chemistry of Natural Compounds*, 8(6), 708-712.

SHIMODA, H. et al. (2003) Anti-Hyperlipidemic Sesquiterpenes and New Sesquiterpene Glycosides from the leave of Artichoke (*Cynara scolymus* L.): Structure Requirement and Mode of Action, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 223-228.

SHIOJIMA, Kenji; Suzuki, Hideki; Kodera, Nobuyuki; Ageta, Hiroyuki; Chang, Hsien-Chang; Chen, Yuh-Pan (1996) Composite constituents: thirty-nine triterpenoids including two novel compounds from *Ixeris chinensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 44(3), 509-14

SHOEB, Mohammad; MacManus, Stephen M.; Jaspars, Marcel; Kong-Thoo-Lin, Paul; Nahar, Lutfun; Celik, Sezgin; Sarker, Satyajit D. (2007) Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17 (2), 155-159

SOKKAR, N. M.; Aboutabl, E. A.; Kubelka, W.; Mohamad, Z. H.; Hilal, S. H. (1993) Terpenoids from *Launaea spinosa* (Forssk)- *Plantae Medicinales et Phytotherapie*, 26(4), 368-74

SOOD R. P., Suri, K. A., Suri, O. P., Dhar, K. L. and Atal, C. K. (1982) *Phytochemistry* 21, 2125.

SPÄTH, E. (1937). Die natürlichen Cumarine. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 70(6), A83-A117.

SPENCER, C. M., & Faulds, D. (1994). Paclitaxel. *Drugs*, 48(5), 794-847.

STICHER, O. (2007). Isoprenoide als Inhaltsstoffe. In *Pharmakognosie—Phytopharmazie* (pp. 809-914). Springer, Berlin, Heidelberg.

STICHER, O., Heilmann, J., & Zündorf, I. (2015). *Pharmakognosie Phytopharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

SU, Shan; Cheng, Xinlai; Wink, Michael (2015) Natural lignans from *Arctium lappa* modulate P-glycoprotein efflux function in multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 22(2), 301-307.

SUSANNA, A., Jacas, N. G., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1995). Phylogenetic Relationships in Tribe Cardueae (Asteraceae) Based on ITS Sequences. *American Journal of Botany*, 82(8), 1056–1068.

SUTTHIVAIVAKIT, S. Unganont, S. Sutthivaiyakit, P., Suksamrarn, A. (2020) Diterpenylated and prenylated flavonoids from *Macaranga denticulata*, *Tetrahedron* 58, 3619-3622.

TEIXEIRA, Renan S.; Carvalho, Paulo H. D.; Aguiar, Jair A. K.; Medeiros, Valquiria P.; Da Silva Filho, Ademar A.; Nascimento, Jorge W. L. (2020) Improved method for obtaining of arctigenin from *Arctium lappa* L. and its antiproliferative effect on human hepatocarcinoma HepG2 cells. *Current Bioactive Compounds* 16 (3), 358-362

THOMAS, U. (1985). *Die Pharmazie im Spannungsfeld der Neuorientierung: Philipp Lorenz Geiger (1785-1836): Leben, Werk und Wirken: eine Biographie* (Vol. 36). In Kommission, Deutscher Apotheker Verlag.

TITTEL, G. (1982). Zur Standardisierung von Phytopharmaka: Nachweis von herzaktiven Verbindungen in Phytopharmaka. *Planta medica*, 45(07), 132-133.

TOKAR, M., & Klimek, B. (2004). Isolation and identification of biologically active compounds from *Forsythia viridissima* flowers. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 61(3), 191-197.

TRIANA, J. (2011) *Chemistry & Biodiversity* 8 (11), 2080-2089.

TRIANA Jorge; Lopez, Mariana; Perez, Francisco Javier; Leon, Francisco; Quintana, Jose; Estevez, Francisco; Hernandez, Juan C.; Gonzalez-Platas, Javier; Brouard, Ignacio; Bermejo, Jaime (2011) Secondary Metabolites from Two Species of *Pulicaria* and Their Cytotoxic Activity. *Chemistry & Biodiversity*, 8(11), 2080-2089

TURAK, Ablajan ; Aisa, Haji Akber (2018) Three new elemanolides from the seeds of *Vernonia anthelmintica*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 20(4), 313-320

VILLARINI, Milena ; Acito, Mattia ; Vito, Raffaella di; Vannini, Samuele; Dominici, Luca; Fatigoni, Cristina ; Pagiotti, Rita; Moretti, Massimo (2021), Pro-apoptotic activity of artichoke leaf extracts in human HT-29 and RKO colon cancer cells *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(8), 4166

VIDARI, G., De Bernardi, M., Vita-Finzi, P. and Fronza, G. (1976) *Phytochemistry* 15, 1953.

WACHS, L. O. (1868). *Das Codein: Eine Monographie. Inaug. Diss.* JA Koch.

WAGENITZ, G. (1991) *Volutaria boranensis*. *Candollea* 46 (2), 408.

WAETJEN, W., Kulawik, A., Suckow-Schnitker, A. K., Chovolou, Y., Rohrig, R., Ruhl, S., & Passreiter, C. M. (2007). Pterocarpan phaseollin and neorautenol isolated from *Erythrina addisoniae* induce apoptotic cell death accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Toxicology*, 242(1-3), 71-79.

WAETJEN, W.; Suckow-Schnitker, A. K.; Rohrig, R.; Kulawik, A.; Addae-Kyereme, J.; Wright, C. W.; Passreiter, C. M. (2008) Prenylated Flavonoid Derivatives from the Bark of *Erythrina addisoniae*. *Journal of Natural Products*, 71(4), 735-738

WEI, X. et al. (2004) *Biochem. Syst. Ecol.* 32, 1091-1096.

WENZEL, T. J. (1987). NMR shift reagents.

WILLHUHN, G., Röttger, P. M., & Wendisch, D. (1984). 6-O-Isobutyryl-tetrahydrohelenalin aus Blüten von *Arnica montana* l. *Planta medica*, 50(01), 35-37.

XIA, H. et al. (2007) *Biol. Pharm. Bull.* 30 (7), 1308 – 1316.

YENESEW, Abiy; Irungu, Beatrice; Derese, Solomon; Midiwo, Jacob O.; Heydenreich, Matthias; Peter, Martin G. (2003). "Two prenylated flavonoids from the stem bark of *Erythrina burttii*". *Phytochemistry*. 63 (4): 445–8. [doi:10.1016/S0031-9422\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00209-7). [PMID 12770595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12770595/).

YENESEW, Abiy; Derese, Solomon; Midiwo, Jacob O.; Bii, Christine C.; Heydenreich, Matthias; Peter, Martin G. (2005). "Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burttii*". *Fitoterapia*. 76 (5): 469–72. [doi:10.1016/j.fitote.2005.04.006](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.04.006). [PMID 15967591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15967591/).

YENESEW, Abiy; Akala, Hoseah M.; Twinomuhwezi, Hannington; Chepkirui, Carolyne; Irungu, Beatrice N.; Eyase, Fredrick L.; Kamatenesi-Mugisha, Maud; Kiremire, Bernard T.; et al. (2012). "The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina burttii*". *Acta Tropica*. 123 (2): 123–7. [doi:10.1016/j.actatropica.2012.04.011](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.011). [PMID 22575309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22575309/).

YENTIS, S.M., Vlassakov, K.V. (1999) Vassily von Anrep, forgotten pioneer of regional anesthesia. *Anesthesiology* 90 (3), 890–895.

YOSHIOKA, H., Mabry, T. J. and Timmermann, B. N. (1973) *Sesquiterpene Lactones: Chemistry, NMR, and Plant Distribution*. University of Tokyo Press.

ZAABAT, N. Seghiri, R., Bentamene, A., Mekkiou, R., Benayache, S. and Benayache, F. (2011) Secondary metabolites from *Volutaria crupinoides*. *Chem Nat. Prod.* 47 (1) 116-117.

ZDERO, C.; Bohlmann, F.; King, R.M. (1991) Guaianolides and labdanes from *Brickellia* species. *Phytochemistry*, 30(5), 1591-5

ZHANG, H., Qiu, S., Tamez, P., Tan, G.T., Aydogmus, Z., Van Hung, N., Cuong, N.M., Angerhofer, C., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.S. (2002) Antimalarial agents from plants II. Decursivine, a new antimalarial indole alkaloid from *Rhaphidophora decursiva*. *Pharmaceutical Biology* 40 (3), 221-224.

ZHANG S, Won YK, Ong CN, Shen HM. (2005) Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: Bioactivity and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5: 239-249.

ZHANG, X., Hung, T.M., Phuong, P.T., Ngoc, T-M., Min, B.-S., Song, K.-S., Seong, Y.H., Bae, K. (2006) Anti-inflammatory Activity of Flavonoids from *Populus davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* 29 (12), 1102-1108.

ZHANG, Z., Xu, L., Cheung, H.Y. (2014) The inhibitory effect of helenalin on telomerase activity is attributed to the CYS445 residue: Evidence from QM/MM simulations. *J. Mol. Graph. Model* 51, 97-103.

ZÜNDORF, I., & Fürst, R. (2020). Evidenzbasierte Phytotherapie von Erkältungskrankheiten. *Atemwegs-und Lungenkrankheiten*, 46(3), 162.

7. Anhang

7.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus *Volutaria boranensis* (Cufod.) Wagenitz sowie Untersuchungen zur Zytotoxizität ausgewählter pflanzlicher Sekundärstoffe“ selbst angefertigt habe.

Außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln wurden keine weiteren verwendet. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in abgewandelter Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Düsseldorf, den 14.6.2022

Arta Kuci

7.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Claus M. Paßreiter sehr herzlich danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu können.

Ich bedanke mich ganz herzlich für die vorzügliche Betreuung, die Motivation und wohlwollende Unterstützung, die für das Gelingen dieser Arbeit unerlässlich waren. Vielen Dank für den Respekt und die gute Zusammenarbeit auf professioneller und persönlicher Ebene.

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Kalscheuer für seine wohlwollende Unterstützung und die wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Teusch für die herzliche Aufnahme in Ihrem Arbeitskreis und die Möglichkeit die wissenschaftliche Arbeit fortführen zu dürfen.

Ich bedanke mich herzlich bei unserem ehemaligen Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Proksch für die wohlwollende Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Kassack aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit der Testung meiner isolierten Substanzen.

Ein besonderer Dank gebührt Frau Dr. Alexandra Hamacher für Ihre sehr herzliche, motivierende, und unermüdliche Unterstützung.

Frau Eva Müller danke ich herzlich für ihre fleißige Unterstützung im Labor.

Ingo Kolb danke ich herzlich für die Bereitstellung seiner isolierten Substanzen zur Zytotoxizitätstestung.

Frau Claudia Eckelskemper, Frau Katja Friedrich und Frau Simone Miljanovic danke ich ganz herzlich für Ihre stete und große Hilfsbereitschaft und Herzlichkeit.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen aus unserem Institut, für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich beim Team der Abteilung für Massenspektrometrie, Herrn Dr. Thomes und Herrn Bürgel.

Ich bedanke mich beim Team der NMR-Abteilung für die zahlreichen Messungen und Aufnahmen aller in dieser Arbeit vorgestellten NMR-Spektren.

Ich danke allen WPP-Studenten, die mich während ihres WPP-Praktikums, tatkräftig im Labor unterstützt haben.

Anuseema Singh und Ido Ben Shalom danke ich sehr für Ihre Freundschaft und die schönen gemeinsamen Erinnerungen.

Meinem lieben Mann danke ich sehr für seine verständnisvolle Unterstützung in den letzten Jahren.

Mein besonderer und ewiger Dank gilt meinen lieben Eltern Adem und Hatmane und meinem Bruder Arlind, die mich immer bedingungslos und liebevoll unterstützt haben. Diese Arbeit ist euch in Dankbarkeit und Liebe gewidmet.