

**Isolierung und Identifizierung sekundärer  
Inhaltsstoffe aus den Blättern von  
*Melicope barbiger* (A. Gray)  
sowie Untersuchungen zu deren Zytotoxizität**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Kim Thao Tran-Cong**  
aus Köln

Düsseldorf, Januar 2025

---

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Claus M. Paßreiter

2. Prof. Dr. Dres. h.c. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2025

---

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Claus M. Paßreiter**

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

---

Meiner Mutter gewidmet

### Zusammenfassung

Die Gattung *Melicope* aus der Familie der Rutaceae umfasst weltweit über 230 Arten, die im Raum Madagaskar, in Indien und im Himalaya, in Südostasien und auf zahlreichen pazifischen Archipelen verbreitet sind. [1] Einige dieser Arten werden volksmedizinisch verwendet, beispielsweise gegen Fieber, Entzündungen oder Krämpfe. [2]

Auf den Hawaiianischen Inseln sind etwa 50 *Melicope*-Arten durch ihr endemisches Vorkommen charakterisiert. [3,4] So kommt *Melicope barbiger*a - früher synonym als *Pelea barbiger*a bezeichnet - ausschließlich auf der Insel Kaua'i des Hawaii-Archipels vor.

Diese Art ist bisher phytochemisch nur wenig untersucht worden. Bis zum Beginn dieser Arbeit waren lediglich zwei Publikationen aus den 1970er-Jahren bekannt, in denen Cumarine, Alkaloide sowie polymethoxylierte Flavonoide als Sekundärstoffe beschrieben wurden. [5,6] Von diesen Substanzklassen gehen multifunktionelle Bioaktivitäten u.a. antioxidative oder zytostatische Effekte aus.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorgelegten Arbeit die getrockneten Blätter von *Melicope barbiger*a mit modernen analytischen Verfahren auf deren Inhaltsstoffe untersucht. Aus den Extrakten dieser Droge wurden mit Hilfe chromatographischer Verfahren 27 Verbindungen isoliert, deren molekulare Strukturen aufgeklärt werden konnten. Dabei kamen neben der UV/Vis-Spektroskopie insbesondere die NMR-Spektroskopie ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) und die Massenspektroskopie (ESI-MS und HRESIMS) zum Einsatz.

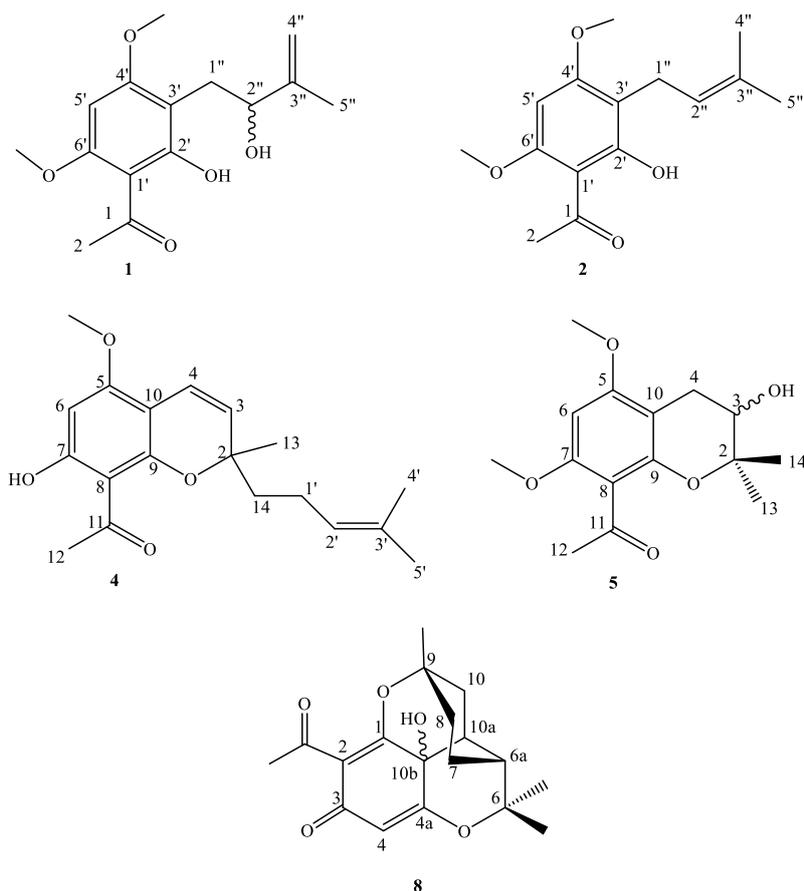
So konnten insgesamt acht Acetophenone und Chromene, vierzehn Flavonoide, vier Furanocumarine und ein Alkaloid als Reinsubstanzen isoliert und identifiziert werden. Unter diesen Verbindungen befinden sich **fünf neue Naturstoffe**: Melibarbinon A (**1**), Melibarbinon B (**2**), Melibarbichromen A (**4**), Melibarbichromen B (**5**) und Melifoliox B (**8**). Verbindung **8** leitet sich von Melifolione B (**7**) ab, das nicht von Melifolione A (**6**) getrennt werden konnte. Durch 2D-NMR konnte die komplexe Struktur auch im Gemisch vollständig charakterisiert werden. Außerdem konnten drei weitere, bereits bekannte Flavonoide erstmals als Inhaltsstoffe der Familie der Rutaceae nachgewiesen werden.

Insgesamt wurden 22 Substanzen erstmalig in *Melicope barbiger*a gefunden. Die zytotoxische Aktivität der meisten Verbindungen wurde in einem Nuklear Shrinkage Assay an humanen Ovarialkarzinomzellen (A2780) im Vergleich zu Cisplatin bestimmt. Dabei zeigten die Acetophenone **2** und **5** einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 30.0 bzw. 75.7  $\mu\text{M}$ .

Die Flavonoide **15** und **17** wiesen bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M Hemmwerte von 53,2 bzw. 60,9% auf. Die im Nuklear Shrinkage Assay aktiven Verbindungen wurden auch auf ihre Aktivität gegenüber Caspase 3/7 getestet. Bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M lag die höchste Wirksamkeit der 3/7 Caspase Aktivierung bei ca. 30%, bezogen auf Cisplatin (100 %).

Ein Teil der Ergebnisse zu den Verbindungen **1-7** wurde bereits im Journal „*Molecules*“ veröffentlicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind auch chemotaxonomisch relevant. Die meisten der hier nachgewiesenen Sekundärstoffe gehören zu den typischen Inhaltsstoffgruppen, die in der Gattung *Melicope* gefunden wurden. Innerhalb der Sektion Pelea ist *M. barbiger* erst die vierte Species, die phytochemisch untersucht wurde. Für die Identifizierung und infragenerische Taxonomie der *Melicope* Species sind nicht nur die morphologischen und genetischen Merkmale, sondern auch die Kenntnis der Inhaltsstoffe und deren schnelle Identifizierung wichtig. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein Nachweis der Sekundärstoffe mit Hilfe der HPLC aus geringen Mengen an Blattmaterial möglich ist.



**Abbildung 1:** Neue Naturstoffe aus *Melicope barbiger*

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
<b>1 Einleitung und Problemstellung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Acetophenone.....	9
1.2 Alkaloide .....	12
1.3 Cumarine .....	15
1.4 Flavonoide.....	17
<b>2 Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen.....</b>	<b>23</b>
2.1 Verbindung <b>1</b> (Melibarbinon A) .....	23
2.2 Verbindung <b>2</b> (Melibarbinon B).....	34
2.3 Verbindung <b>3</b> (Alloevodionol).....	42
2.4 Verbindung <b>4</b> (Melibarbichromen A).....	51
2.5 Verbindung <b>5</b> (Melibarbichromen B).....	61
2.6 Verbindung <b>6 + 7</b> (Melifolione A und B) .....	74
2.7 Verbindung <b>8</b> (Melifoliox B) .....	96
2.8 Verbindung <b>9</b> (5-Hydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-3',4'-methylendioxyflavon) .....	113
2.9 Verbindung <b>10</b> und <b>11</b> .....	132
2.9.1 Daten von <b>10</b> (5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon)...	136
2.9.2 Daten von <b>11</b> (Melibentin) .....	144
2.10 Verbindung <b>12, 13</b> und <b>14</b> .....	154
2.10.1 Daten von <b>12</b> (5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxyflavon) .....	157
2.10.2 Daten von <b>13</b> (5-Hydroxy-3,3',4',7,8-pentamethoxyflavon).....	167
2.10.3 Daten von <b>14</b> (3,3',4',5,6,7,8-Heptamethoxyflavon).....	178
2.11 Verbindungen <b>15, 16</b> und <b>17</b> .....	188
2.11.1 Daten von <b>15</b> (5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon).....	192
2.11.2 Daten von <b>16</b> (5,4'-Dihydroxy-3,3',6,7,8-pentamethoxyflavon) .....	199
2.11.3 Daten von <b>17</b> (Gossypetin-3,7,8,4'-tetramethylether) .....	206
2.12 Verbindung <b>18</b> und <b>19</b> .....	217
2.12.1 Daten von <b>18</b> (Quercetin 3,3'-dimethylether) .....	222
2.12.2 Daten von <b>19</b> (7-Isopentenyl-3,3'-dimethylquercetin).....	228
2.13 Verbindung <b>20</b> (Melisimplexin).....	239
2.14 Verbindung <b>21</b> und <b>22</b> .....	245
2.14.1 Daten von <b>21</b> (trans-Tilirosid).....	248
2.14.2 Daten von <b>22</b> (cis-Tilirosid) .....	258
2.15 Verbindung <b>23</b> (2',3'-Dehydromarmesin).....	261
2.16 Verbindung <b>24</b> (Marmesin).....	270
2.17 Verbindung <b>25</b> (5-Methoxy-2',3'-Dehydromarmesin) .....	279
2.18 Verbindung <b>26</b> (Isopimpinellin).....	288
2.19 Verbindung <b>27</b> (Evolitrin).....	302
<b>3 Nachweis von Flavonoiden im Blattmaterial von <i>Melicope barbiger</i> mit Hilfe der HPLC im qualitativen Maßstab.....</b>	<b>317</b>
<b>4 Ergebnisse der Untersuchungen zur Zytotoxizität der isolierten Verbindungen ...</b>	<b>328</b>
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>346</b>

5.1	Acetophenone.....	352
5.2	Alkaloide.....	374
5.3	Cumarine.....	387
5.4	Flavonoide.....	396
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>412</b>
6.1	Chromatographische Methoden.....	412
6.1.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	412
6.1.2	Flüssigchromatographie Sephadex.....	415
6.1.3	Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC).....	415
6.1.4	Vakuum-Flüssig-Chromatographie (VLC).....	420
6.1.5	Säulenchromatographie.....	421
6.2	Spektroskopische Methoden.....	422
6.2.1	Flüssigchromatographie / Massenspektroskopie.....	422
6.2.2	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	422
6.2.3	Mosher-Methode.....	423
6.2.4	Optische Drehung.....	423
6.2.5	UV-VIS-Spektroskopie.....	424
6.3	Eingesetzte Chemikalien.....	425
6.4	Pflanzenmaterial.....	427
6.5	Extraktion und Fraktionierung des Dichlormethan- und Methanolextraktes.....	427
6.6	Ausbeute und Ursprungsfraction der isolierten Verbindungen aus <i>M. barbiger</i> a.....	442
6.7	Untersuchungen zur Zytotoxizität.....	443
6.7.1	Zelllinien und Zellkulturen.....	443
6.7.2	Zytotoxizitäts-Assay.....	443
6.7.3	MTT-Assay.....	443
6.7.4	Caspase 3/7-Aktivierungs-Assay.....	444
6.7.5	Datenanalyse und Berechnung der IC <sub>50</sub> -Werte.....	444
<b>7</b>	<b>Analytische Daten.....</b>	<b>445</b>
7.1.1	Melibarbinon A (1).....	445
7.1.2	Melibarbinon B (2).....	445
7.1.3	Alloevodionol (3).....	446
7.1.4	Melibarbichromen A (4).....	446
7.1.5	Melibarbichromen B (5).....	447
7.1.6	Melifolione A und B (6 + 7).....	447
7.1.7	Melifoliox B (8).....	448
7.1.8	5-Hydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon (9).....	448
7.1.9	5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon (10).....	449
7.1.10	Melibentin (11).....	449
7.1.11	5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxyflavon (12).....	450
7.1.12	5-Hydroxy-3,3',4',7,8-pentamethoxyflavon (13).....	450
7.1.13	3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavon (14).....	451
7.1.14	5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon (15).....	451
7.1.15	5,4'-Dihydroxy-3,3',6,7,8-pentamethoxyflavon (16).....	452
7.1.16	Gossypetin-3,7,8,4'-tetramethylether (17).....	452
7.1.17	Quercetin 3,3'-dimethylether (18).....	453
7.1.18	7-Isopentenyl-3,3'-dimethylquercetin (19).....	453
7.1.19	Melisimplexin (20).....	454

## Inhaltsverzeichnis

---

7.1.20	trans-Tilirosid und cis-Tilirosid (21 + 22).....	454
7.1.21	2',3'-Dehydromarmesin (23) .....	455
7.1.22	Marmesin (24).....	455
7.1.23	5-Methoxy-2',3'-Dehydromarmesin (25) .....	456
7.1.24	Isopimpinellin (26).....	456
7.1.25	Evolitrin (27).....	457
<b>8</b>	<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>458</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>484</b>
9.1	Eidesstattliche Erklärung.....	484
9.2	Beiträge zur Forschung .....	485
	<b>Danksagung.....</b>	<b>486</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

CDCl <sub>3</sub>	Deuteriertes Chloroform
COSY	Correlation Spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO-d <sub>6</sub>	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
EI	Elektronenionisation
ESI	Elektro-Spray Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
HMBC	Hetero Multinuclear Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRESIMS	Hochauflösende ESI-Massenspektrum
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
J	Kopplungskonstante
LC	Liquid Chromatography
LM	Lösungsmittel
m	Multipllett
MB.D	<i>Melicope barbigera</i> Dichlormethanextrakt
MB.M	<i>Melicope barbigera</i> Methanolextrakt
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Kernresonanzspektroskopie
ppm	parts per million
rel. Int.	relative Intensität
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
t	Triplett
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
UV	Ultraviolett

## 1 Einleitung und Problemstellung

Pflanzen und die darin enthaltenen Naturstoffe spielen seit Menschengedenken eine bedeutende Rolle zum Beispiel als Lebensmittel, zum Färben von Textilien und Gerben von Leder, aber auch als Heilmittel. Teilweise werden auch Mikroorganismen und tierische Quellen genutzt. Das vielleicht bekannteste Beispiel für einen pflanzlichen Wirkstoff ist das Morphin, das im Jahr 1806 vom Apotheker Friedrich Wilhelm Adam Sertürner aus dem Opium, dem eingetrockneten Milchsaft unreifer Samenkapseln des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), isoliert wurde. [7] Die chemische Struktur von Morphin konnte erst 1925 aufgeklärt werden und erst 1952 gelang die Totalsynthese. [8] Letztere spielt aber keine große Rolle, da das Morphin bis heute aus Kostengründen aus dem Opium isoliert wird.

Weitere prominente Beispiele für bereits vor langer Zeit identifizierte, pflanzliche Wirkstoffe sind die Alkaloide Coffein (1819), Nicotin (1828), Atropin (1833), Cocain (1859) und Reserpin (1952), das Cardenolid Digitoxin (1875) und das Diterpen Taxol (1971). [9–15]

Die meisten dieser Stoffe besitzen auch heute noch große Bedeutung für die Pharmazie.

Wirkstoffe aus Pflanzen spielten in der Vergangenheit eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Medikamenten – entweder direkt oder in partialsynthetisch abgewandelter Form. Außerdem gibt es zahlreiche Beispiele dafür, dass ein Naturstoff als Leitstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gedient hat. So wurde zum Beispiel das Morphin-Grundgerüst systematisch „abgespeckt“ und die synthetischen Opioid-Rezeptor-Agonisten (Benzomorphan, Pethidin, Methadon, Fentanyl, Tramadol Tilidin u.a.m.) als starke Analgetika entwickelt. [16]

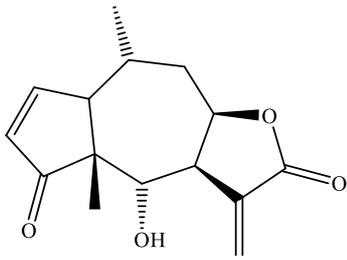
Wegen des großen Interesses an neuen Naturstoffen sind die meisten arzneilich genutzten Pflanzen in den letzten 150 Jahren intensiv auf Inhaltsstoffe untersucht worden, so dass es immer schwieriger wird, neue Arten mit noch unbekanntem Inhaltsstoffen zu finden.

Im Focus unserer Arbeitsgruppe stehen Pflanzengattungen, aus denen eine oder mehrere Species volksmedizinisch als Antiinfektiva, insbesondere gegen Protozoen, und/oder gegen Tumorerkrankungen eingesetzt werden. [17–20] Ziel der Arbeiten ist die für die jeweilige Wirkung verantwortlichen Substanzen zu isolieren und zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden bereits verschiedene Pflanzen aus den Familien Asteraceae und Fabaceae hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe und deren Zytotoxizität untersucht. [21–28]

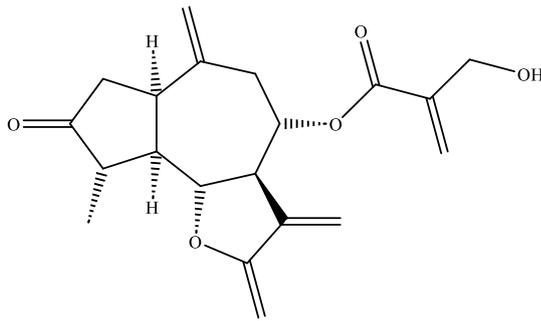
In der Vergangenheit spielten dabei in unserem Labor Sesquiterpenlactone aus verschiedenen Gattungen der Asteraceae, *Arnica*, *Neurolaena*, *Eupatorium*, *Volutaria* und die prenylierten Flavonoide aus der zur Familie der Fabaceae gehörenden Gattung *Erythrina* eine besondere

Rolle. [18,26,27] Die Abbildung 2 zeigt einige wichtige Sesquiterpenlactone und prenylierte Flavonoide mit zytotoxischer Wirkung, die in unserer Arbeitsgruppe untersucht wurden. [26]

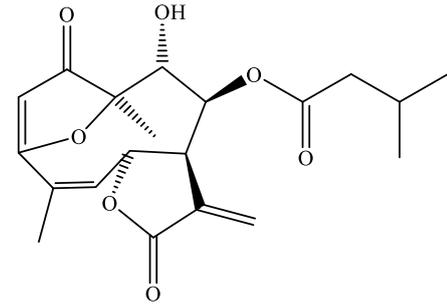
Einleitung und Problemstellung



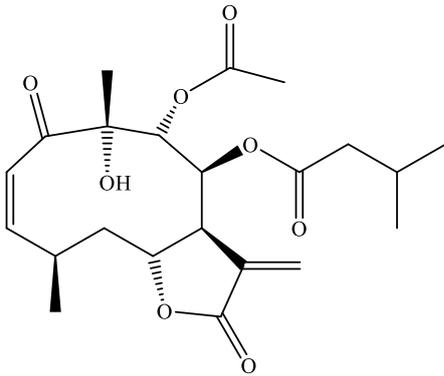
**Helenalin**



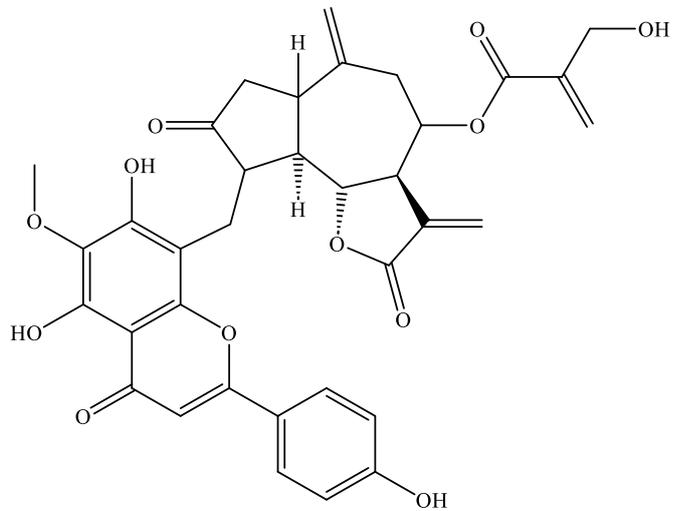
**4α-Methylboranolacton**



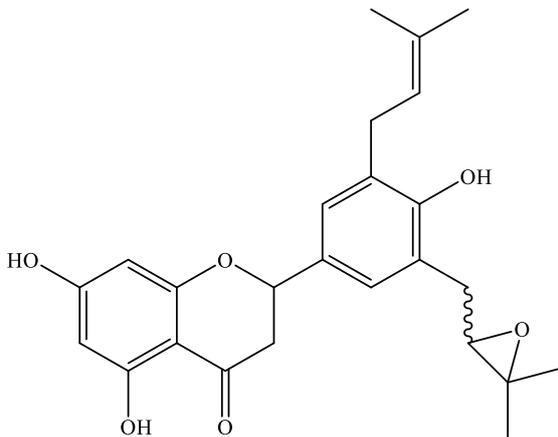
**Lobatin B**



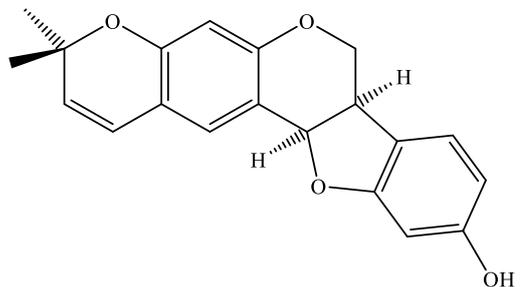
**Neurolenin B**



**Boranensisflavon**



**Addisoniaflavon I**



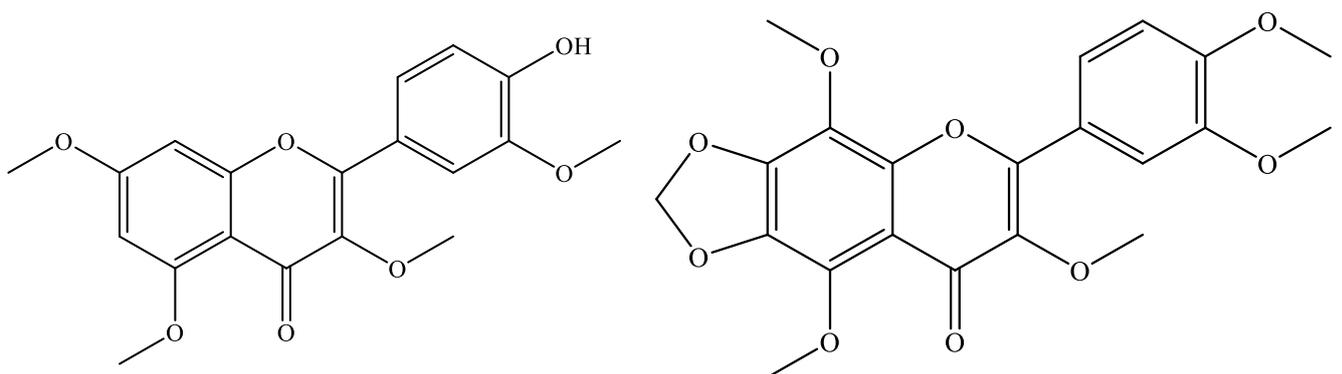
**Neorautenol**

**Abbildung 2:** Wichtige Sesquiterpenlactone und prenylierte Flavonoide mit zytotoxischer Wirkung

Wie bereits eingangs erwähnt, wird es immer schwieriger neue Pflanzen zu selektionieren, von denen man annehmen kann, dass sie neue, interessante pflanzliche Sekundärstoffe enthalten. Um die Vielfalt der möglichen Wirkstoffkandidaten zu erhöhen, ist es sinnvoll eine weitere Pflanzenfamilie auszuwählen, die in das gesuchte Wirkprinzip passt. Über den Kontakt zu Dr. Marc Appelhans, den Kustos des Herbariums der Abteilung Systematik, Biodiversität und Evolution der Pflanzen an der Georg-August-Universität Göttingen, wurden wir auf die Gattung *Melicope* aus der Familie der Rutaceae aufmerksam.

Die Familie der Rutaceae (Rautengewächse) wird in 6 Unterfamilien mit über 180 Gattungen eingeteilt. Sie umfasst weltweit insgesamt knapp 2000 Arten. [29] In der Unterfamilie der *Toddalioideae* zählt die Gattung *Melicope* über 230 Arten, die in zahlreichen pazifischen Archipelen vorkommen [1,30,31]. Auf Hawaii gibt es knapp 50 verschiedene *Melicope*-Arten, die heute zum Teil in ihrem Bestand gefährdet sind. [32]

Eine gezielte Literaturrecherche in den Chemical Abstracts, bei Pubmed, Medline und über Google Scholar zeigte, dass einige Pflanzen aus der Gattung *Melicope* volkmedizinisch verwendet wurden bzw. noch verwendet werden. Zum Beispiel werden verschiedene Pflanzenteile von *M. lunu-ankenda* zur Behandlung von Bluthochdruck, Menstruationsbeschwerden, Diabetes und Fieber eingesetzt [33], während *M. borbonica* zur Wundheilung und als schweißtreibendes Mittel eingesetzt wurde. [34] Weitere interessante Arten sind *M. pteleifolia* und *M. triphylla*. Bereits 1993 berichteten Hou et al. über das Vorkommen zweier, zytotoxischer Flavonoide (Abbildung 3), die sie aus dem Chloroformextrakt von *M. triphylla* isolieren und identifizieren konnten. [35]



**Abbildung 3:** Zytotoxische Flavonoide aus *M. triphylla*

Beide Verbindungen zeigten Aktivität gegen kultivierte leukämische Lymphozyten (P 388) mit  $ED_{50}$  – Werten zwischen 4 und 5  $\mu\text{g/ml}$ . [35] Kabir et al. berichteten 2017 über die antiproliferativen und Apoptose auslösenden Effekte lipophiler Extrakte (Hexan, Ethylacetat) von *M. pteleifolia*, einer in vielen Ländern Asiens als Heil- und Nahrungspflanze

gebräuchlichen *Melicope* Art. Getestet wurden die Effekte an vier verschiedenen Krebszelllinien (humanes, colorectales Karzinom (HCT116), Brustkrebs (HCC1937, MDA-MB-231) und hepatocelluläres Karzinom (HepG2)). [36] Da nur Extrakte untersucht wurden lagen die Werte lediglich unter 100 µg/ml.

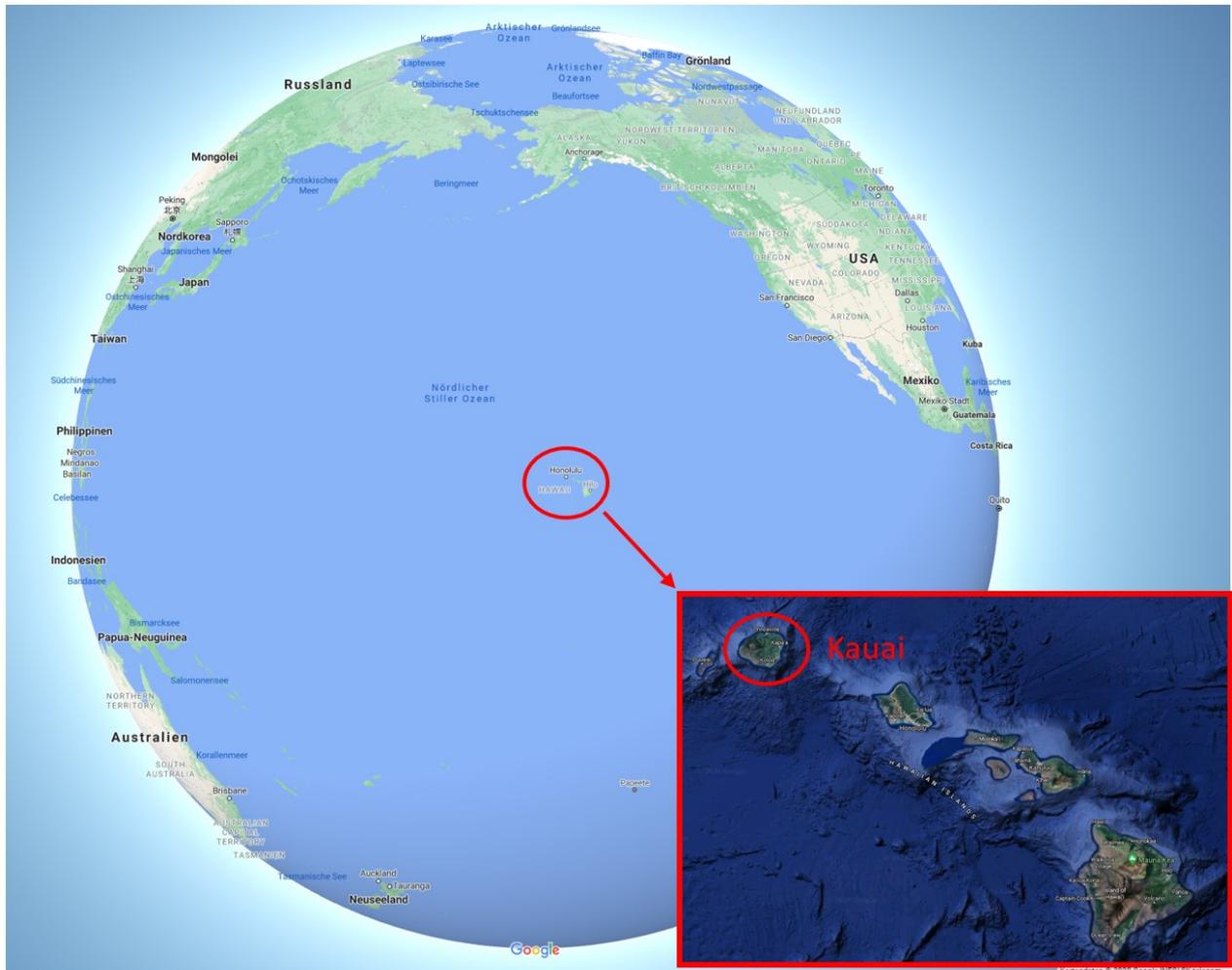
Über die Kontakte von Dr. Marc Appelhans nach Hawaii, konnten wir mit *M. barbiger*a eine der über 50 auf Hawaii vorkommenden, endemischen *Melicope*-Arten [3] für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung auswählen. Sie gehört zur Sektion *Pelea*, weshalb sie auch unter dem Synonym *Pelea barbiger*a in der Literatur zu finden ist. [6,37]

Wegen der isolierten geographischen Lage kommen auf Inseln oder Inselgruppen besonders häufig seltene oder endemische Pflanzen vor. Als endemische Species bezeichnet man in der Botanik, im Gegensatz zu ubiquitär, also überall vorkommenden Pflanzen, solche Arten einer Gattung, die nur in bestimmten Gebieten zu finden sind. Solche oder auch seltene Arten, die nur in begrenzter Zahl vorkommen [38], sind häufig nicht oder nur wenig untersucht und können demnach als aussichtsreiche Quellen zur Entdeckung neuer Naturstoffe mit potenzieller Bioaktivität dienen. Die Begriffe „selten“ oder „endemisch“ können auch simultan verwendet werden. [39] Mit dem Auffinden neuer Inhaltsstoffe könnte zusätzlich das Interesse an solchen Species geweckt und damit ein Beitrag zur Erhaltung dieser Arten geleistet werden. Die Inselgruppe um Hawaii gilt - ähnlich wie andere pazifische Inseln - als ein evolutionsbiologisch abgegrenzter Raum, in dem eine ökologische Nische die Entstehung neuer Arten begünstigt, zumal die hohe vulkanische Aktivität [40] die Artenvielfalt auf Hawaii maßgeblich geprägt hat. [41] Als bekanntes Beispiel aus der Tierwelt seien die Darwin-Finken erwähnt, die nur auf den Galapagos-Inseln vorkommen. [42]

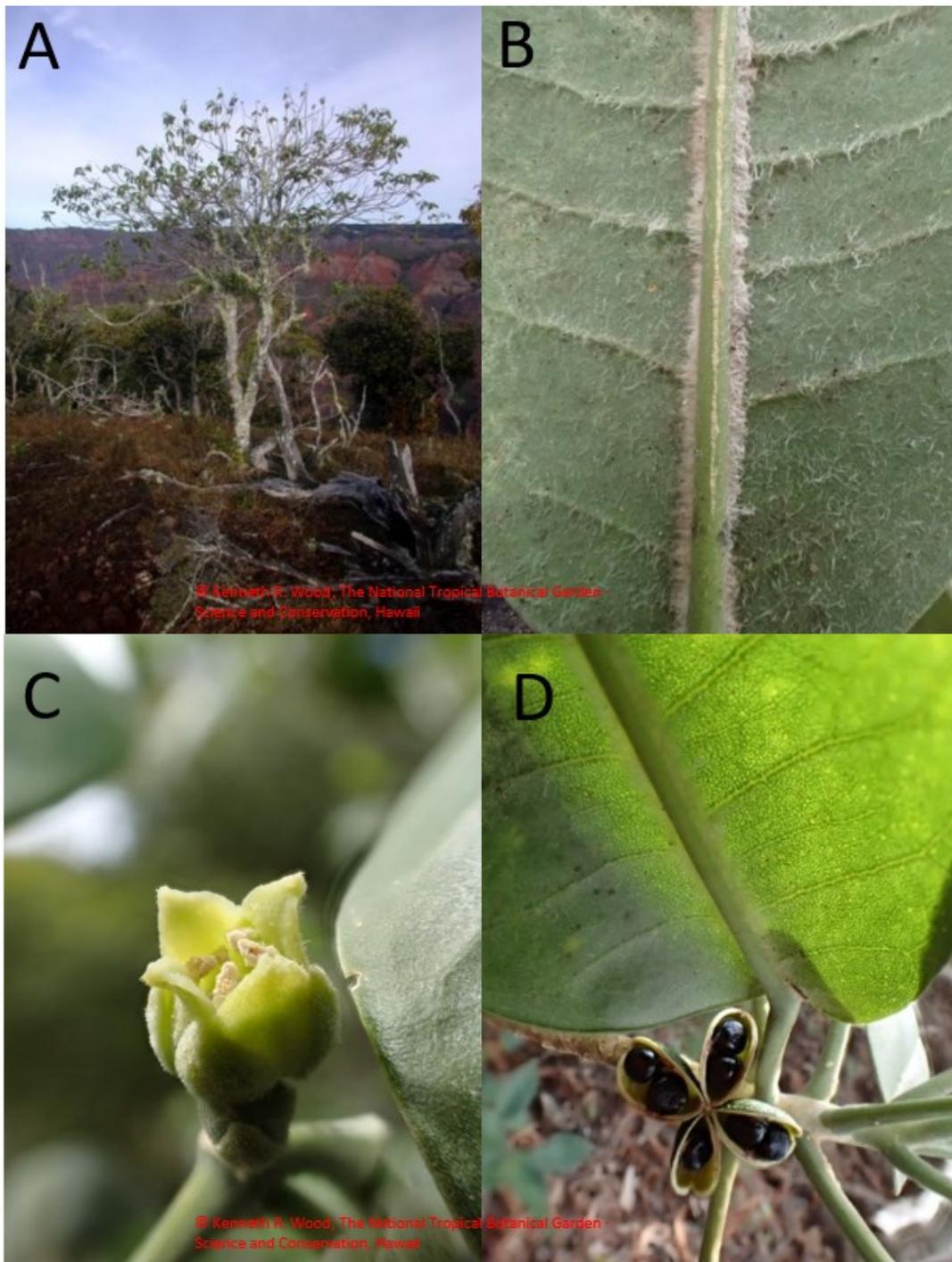
*M. barbiger*a wurde erstmals im Jahr 1854 von Asa Gray [43] beschrieben und kommt nur auf der Hawaii-Insel Kaua'i vor (Abbildung 4). Es handelt sich um 3-12 m hohe Bäume, die wegen der fein behaarten Blätter gräulich erscheinen. Die Blätter erscheinen matt grün mit wachsartigen Schuppen, die kreisförmig am Blattstiel angelegt sind. Die Blattform ist eng elliptisch, 8 bis 20 (-30) cm lang und 5-6.5 (-9) cm breit mit primär lateraler Nervatur. Die Blüten sind in cymösen Partialinfloreszenzen angeordnet. Die Früchte sind 20 - 40 mm breit und beinhalten vier Follikel (10-20 mm lang). Diese sind bogenartig und manchmal ist eines oder mehrere von ihnen nicht vorhanden. Während das Exokarp haarig ist, ist das Endokarp unbehaart. Pro Fruchtblatt werden ein oder zwei Samen gebildet, die 4-7mm lang sind

## Einleitung und Problemstellung

(Abbildung 5). Wenn die Blätter gemahlen werden, kann ein schwacher zitronenartiger Geruch wahrgenommen werden. [44]



**Abbildung 4:** Ausschnitt aus Google Maps™ mit Darstellung der hawaiianischen Inselgruppe (roter Kreis) zur Verdeutlichung der Entfernung zu den Kontinenten im pazifischen Ozean. Der Bildausschnitt unten rechts, zeigt die hawaiianische Inselgruppe mit der Insel Kaua'i (rot markiert) von der *Melicope barbiger* stammt.



**Abbildung 5:** Aufnahmen von *Melicope barbigeria* im natürlichen Habitat (mit freundlicher Genehmigung von Kenneth R. Wood)  
A: Aufnahme eines *Melicope barbigeria* Baumes auf Kauai'i;  
B: Nahaufnahme eines Blattes mit sichtbarer feiner Behaarung;  
C: Aufnahme einer Knospe;  
D: Aufnahme einer Frucht

Bei Durchsicht der zu Beginn der Arbeit vorhandenen Literatur findet man zahlreiche Publikationen, in denen *Melicope*-Arten auf ihre Inhaltsstoffe untersucht wurden. Dabei zeigte

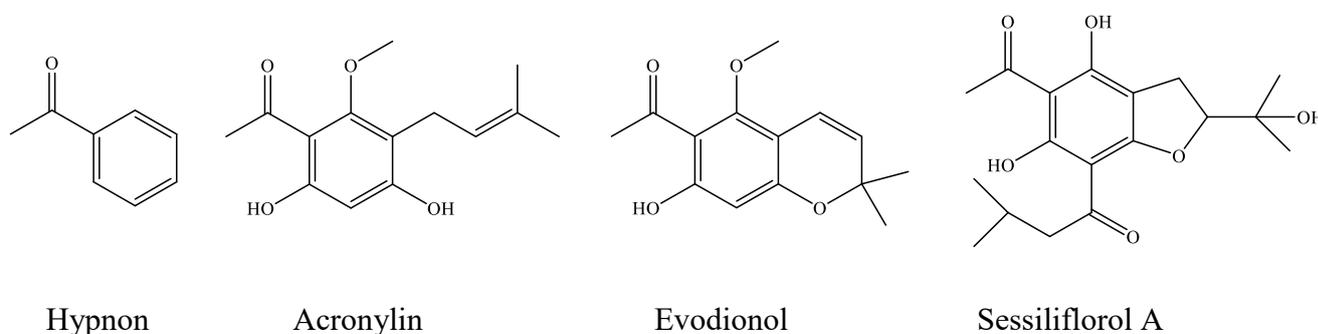
### **Einleitung und Problemstellung**

---

sich, dass neben dem, besonders für die Blüten und die Früchte so typischen ätherischen Öl, bisher im Wesentlichen Stoffe aus der Gruppe der Alkaloide, Acetophenone, Cumarine, Flavonoide und Furanocumarine gefunden wurden.

## 1.1 Acetophenone

Unter Acetophenonen (Abbildung 6) versteht man chemisch Derivate des Phenylmethylketons, ein C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-Körper, der unter dem Namen Hypnon als Hypnotikum eingesetzt wurde. [45] In der Gattung *Melicope* sind solche Verbindungen gefunden worden, die am Aromaten zusätzlich hydroxyliert und prenyliert waren. Ein Beispiel für ein solches Acetophenon mit Phloroglucinstruktur ist das in der Abbildung 6 dargestellte Acronylin aus *Melicope stipitata*. [46] Durch Zyklisierung dieser Verbindung entstehen die Benzopyrane (Chromene) mit einem 6-gliedrigen Heterozyklus, wie z.B. das bereits 1950 in *Melicope simplex* gefundene Evodionol [47] oder die Benzofurane mit einem 5-gliedrigen Furanring, wie z.B. das Sessiliflorol A aus *M. sessiliflora* [48].



**Abbildung 6:** Acetophenone, Chromene bzw. Phloroglucinderivate

Solche Verbindungen, wie das Acronylin und das Evodionol, können daher in der Literatur, je nach Autor, unter dem Stichwort Acetophenon, Chromen, Benzopyran, Benzofuran oder Phloroglucinderivat zu finden sein. Die Chemical Abstracts listen 37 Paper bei Kombination der Suchworte „*Melicope*“ und „Acetophenone“, 15 bei „*Melicope*“ und „Chromene“ und 9 nach Eingabe von „*Melicope*“ und „Phloroglucin“. [49] Allen Substanzen gemeinsam ist die Phenylmethylketonstruktur, so dass wir diese Verbindung hier unter dem Begriff Acetophenone zusammenfassen.

Auch einige Acetophenone wurden bereits hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber Tumorzelllinien untersucht. Der aus den Blättern *M. pteleifolia* (VR China) Dichlormethan/Methanol Extrakt (1:1), lieferte 17 neue Inhaltsstoffe, die als Umlagerungsprodukte von Phloroacetophenonen bezeichnet wurden. Die ersten vier Verbindungen, Evodialon A-D sind untereinander stereoisomer und besitzen jeweils einen Prenylsubstituenten. Die Melicolone C bis G, weisen unterschiedliche Grundgerüste auf.

Die isolierten Verbindungen wurden mit Doxorubicin kombiniert und gegen MDR MCF-7/ADR getestet. Dabei verstärkten sie die Zytotoxizität von Doxorubicin um das 6,2 bis 13,3-fache. [50–52] Neben der zytotoxischen Aktivität wurden die Acetophenone auch hinsichtlich weiterer Aktivitäten untersucht. Das oben dargestellte Sessiliflorol A und seine Derivate aus *M. sessiliflora* zeigen antivirale Eigenschaften gegen HSV-1 und HSV-2 mit  $IC_{50}$  Werten zwischen 0,3  $\mu$ M bis 10,4  $\mu$ M je nach Substanz und Virus. [48] Die vier Coodeanone A–C, B gibt es in der E- und Z-Form, wurden aus den Blättern von *M. coodeana* aus La Reunion isoliert und auf ihre antimikrobielle und Antimalaria-Aktivität untersucht. Es konnte keine antimikrobielle Aktivität festgestellt werden, man konnte aber eine moderate Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* ( $IC_{50} = 42,8 \mu$ M) feststellen. [53]

Einleitung und Problemstellung

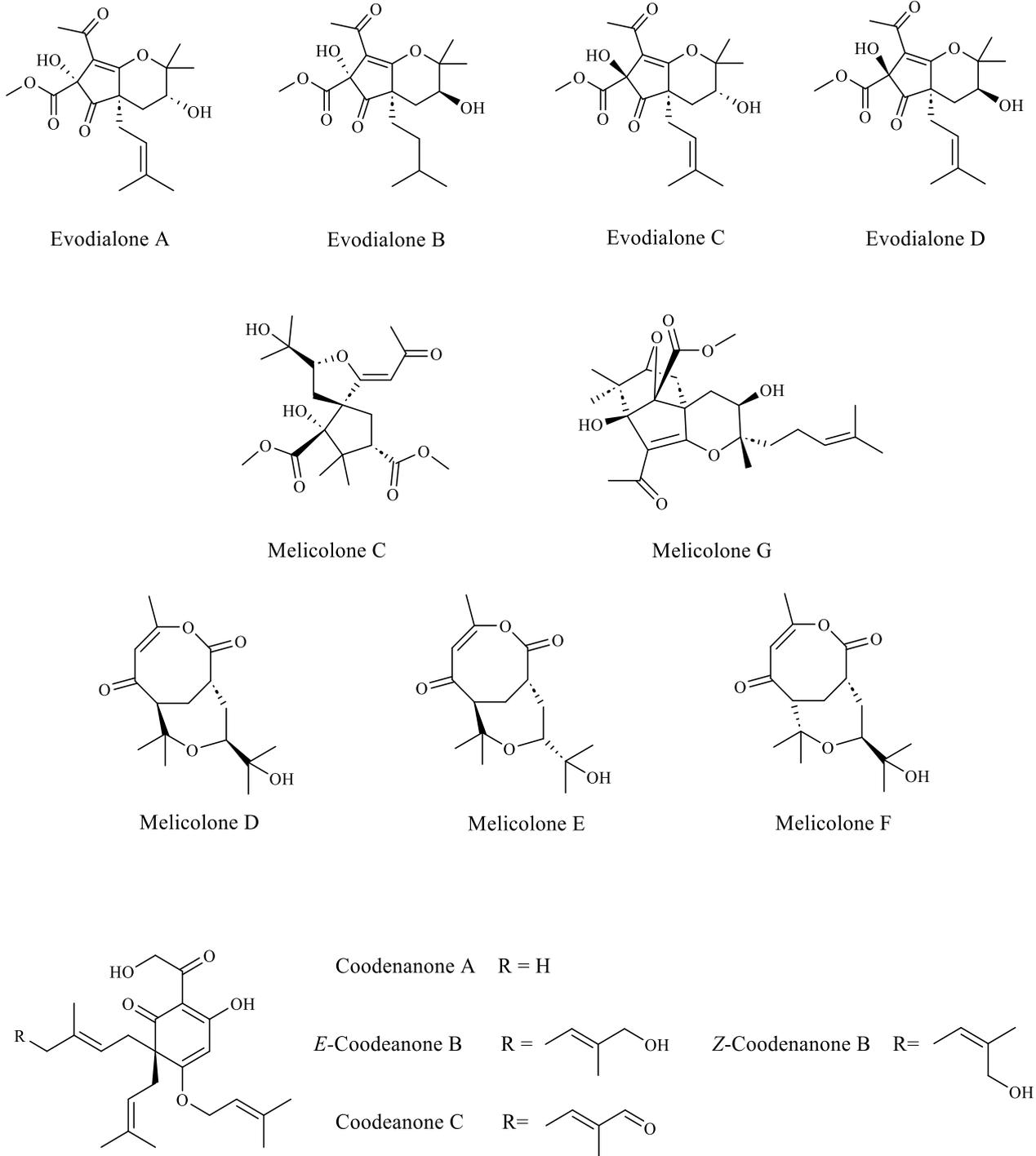


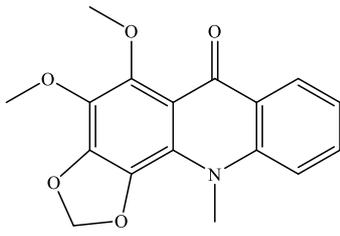
Abbildung 7: Acetophenone aus der Gattung *Melicope*

### 1.2 Alkaloide

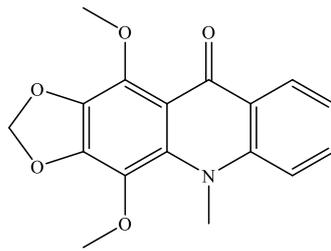
Eine Recherche in den Chemical Abstracts ergab etwa 40 Artikel, die sich mit Alkaloiden aus *Melicope*-Arten beschäftigen. [49] Bis heute sind es etwas mehr als 50 Paper. Bereits 1948 berichtete die Arbeitsgruppe der University of Sydney in der renommierten Zeitschrift Nature über die Isolierung und Identifizierung von mindestens 6, bis dahin unbekannt, Alkaloiden aus den im australischen Regenwald vorkommenden Rutaceen *Melicope fareana*, *Evodia xanthoxyloides* and *Acronychia baueri*. [54] Aus der Rinde von *M. fareana* konnten sie die 4 Alkaloide Melicopine, Melicopidine, Melicopicine und Acronycidine isolieren, deren Struktur in Abbildung 8 dargestellt ist. Während die drei zuerst genannten Verbindungen zu den Acridonalkaloiden (N-Methylacridone) gehören, handelt es sich beim Acronycidine um ein Chinolinalkaloid, genauer betrachtet um ein Furo[2,3-b]chinolin. Neben diesen beiden Strukturtypen wurden in der Gattung *Melicope* auch Chinolone, wie zum Beispiel das Melimoluccanin aus *Melicope moluccana* [55] und komplizierter aufgebaute Substanzen wie das Melicodenine G aus *Melicope denhamii* [56] und weitere Substanzen, die zum Beispiel über eine Diels-Alder Reaktion, aus zwei verschiedenen Molekülen entstandene, komplex aufgebaute Alkaloide darstellen. [57]

Einige der aus *Melicope* Species isolierten Alkaloide wurden bereits auf ihre Zytotoxizität gegen verschiedene Tumorzelllinien getestet. Das gilt insbesondere für die Derivate, die in neueren Arbeiten publiziert wurden. Von den in der Abbildung 8 dargestellten Verbindungen, wurden das Chinolinalkaloid Leptanoine und das Chinolon Melimoluccanine bereits erfolgreich auf ihre zytotoxischen und antiplasmodialen Aktivitäten getestet. [58] Während das Melimoluccanine die größte Zytotoxizität besaß ( $IC_{50} = 0.63 \mu\text{g/ml}$  gegenüber P-338 Leukämiezellen der Maus), war Leptanoine 10-fach weniger zytotoxisch aber doppelt so stark wirksam gegenüber *Plasmodium falciparum* ( $IC_{50} = 2.28 \mu\text{g/ml}$ ). Durch eine zusätzliche Methoxygruppe am C-8 (7-O-Isoprenyl- $\gamma$ -fagarin) wurde diese Aktivität um den Faktor 10 gesteigert. [58] Auch für das nicht prenylierte Furochinolinalkaloid Skimmianine aus *M. madagascariensis* konnte eine zytotoxische Aktivität ( $IC_{50} = 1.5 \mu\text{M}$ ) gegen HT-29 Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden. [59] Die aus den Blättern von *M. semecarpifolia* isolierten Furochinolinalkaloide zeigten Aktivitäten gegen drei Krebszelllinien (P-388, HT-29 und A549) [60] und auch das komplex aufgebaute Melicodenine war mit einem  $IC_{50}$  von  $9.5 \mu\text{g/ml}$  trotz des höheren Molekulargewichtes vergleichsweise wenig aktiv. [61]

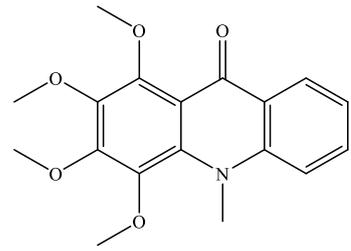
**I. Acridone**



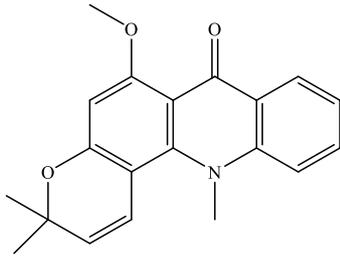
Melicopine



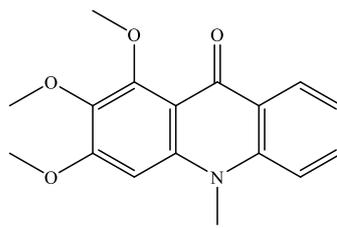
Melicopidine



Melicopicine

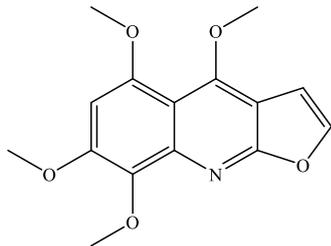


Acronycine

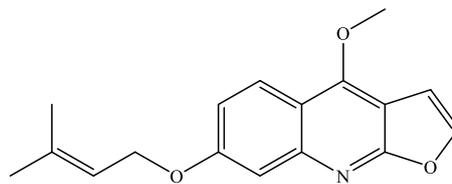


Melixyloidine

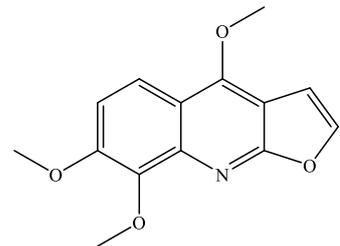
**II. Chinoline**



Acronycidine

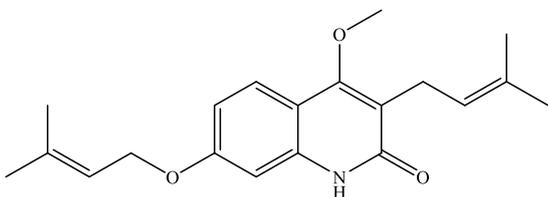


Leptanoine

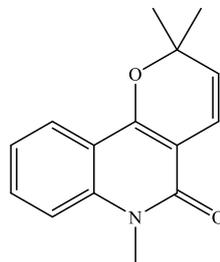


Skimmianine

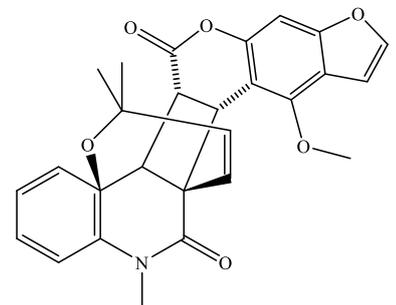
**III. Chinolone**



Melimoluccanine



Melicopidine



Melicodenine

**Abbildung 8:** Alkaloide aus der Gattung *Melicope*

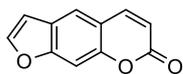
Weitere Beispiele für die Zytotoxizität der Alkaloide finden sich in der Literatur zu den Furanochinolinalkaloiden aus den Blättern von *Melicope bonwickii*, die eine moderate Aktivität gegen Zervixkarzinoma-Zelllinien (Hela) mit einem  $IC_{50}$  Wert von  $38 \mu\text{M}$  zeigten. [62] Ebenfalls interessant waren die Melicodenine A-I, neuartige Diels-Alder Addukte von Chinolin-Alkaloiden, die aus den Blättern der im Bogor Botanical Garden kultivierten *Melicope denhamii* isoliert wurden. Die Bioaktivität dieser Substanzen wurden mit DLD-1 humane Kolonkrebszellen bestimmt, wobei das Melicodenin G mit einem  $IC_{50}$  Wert von  $9,4 \mu\text{M}$  die größte Wirksamkeit zeigte. [56,61,63] Auch die Acridone zeigten nach Testung entsprechende Aktivitäten. So waren die entsprechenden Daten beispielsweise auch für das in der Abbildung 8 dargestellte Melixyloidine und dessen aus *M. xanthoxyloides* isolierten Derivate erhoben worden. [64]

### 1.3 Cumarine

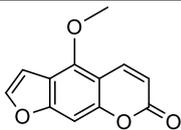
Cumarine, insbesondere Furanocumarine, sind typische, pflanzliche Sekundärstoffe der Doldenblütler (Apiaceae) und der Rautengewächse (Rutaceae). [65] Es ist daher nicht überraschend, dass solche Stoffe auch in der Gattung *Melicope* gefunden wurden. In den Chemical Abstracts finden sich mit der Stichwortkombination „*Melicope*“ und „Coumarins“ 21 Arbeiten, wovon die älteste im Jahr 1968 publiziert wurde. [49] Johns et al. beschreiben darin die Ergebnisse zur Isolierung und Identifizierung von Naturstoffen aus mehreren Pflanzen, u.a. aus *Melicope melanophloia*. Sie isolierten damals das Isopimpinellin, das 5,8-Dimethoxypsoralen (Abbildung 9), ein bereits aus anderen Rutaceen und Apiaceen bekanntes Furanocumarin. [66] Auch die beiden in der PUVA-Therapie der Psoriasis – man trägt die Substanzen auf die Haut auf und bestrahlt anschließend mit UV-A-Licht – gebräuchlichen 5- bzw. 8-Monomethoxyderivate des Psoralens (Abbildung 9), kurz 5-MOP (Bergapten) und 8-MOP (Xanthotoxin) genannt, wurden zum Beispiel in *M. denhamii* zusammen mit dem Psoralen selbst gefunden. [63]

Die Furanocumarine sind reaktive Verbindungen, die unter UV-Einfluss kovalente Verbindungen mit der DNA eingehen. Sie führen so zu einer Quervernetzung der beiden Nukleotidstränge, was bei der Psoriasis besser wirksam ist, als eine Bestrahlung mit UV-B-Licht. [67] Bekannt ist auch, dass solche Furanocumarine phototoxische Reaktionen nach Hautkontakt, z.B. mit dem als Herkulesstaude bekannten Riesenbärenklau (*Heracleum mantegazzianum*, Apiaceae), auslösen. [68] Weitere, in diesem Fall prenylierte Derivate wurden aus den Früchten von *Melicope triphylla* isoliert. [69] Neben den Furanocumarinen wurden auch einfache Cumarine gefunden, wie Melilunumarin A und B (Abbildung 9) aus *Melicope lunu-ankenda*. Beide Verbindungen unterdrücken das Wachstum der Tumorzelllinien A549, Colo205, KB and NALM-6. [70] Das ubiquitär vorkommende Umbelliferon wurde aus den Blättern und Stängeln von *Melicope hayesii* isoliert. [71] Zwei weitere, interessante Cumarin-Derivate wurden aus den Blättern von *Melicope quercifolia* isoliert. Meliquercifolin A und B (s. Abbildung 9) wurden gegen HeLa, MCF-2 sowie P-388 Krebszelllinien getestet, wobei Meliquercifolin A eine starke Aktivität gegen HeLa Krebszellen mit einem IC<sub>50</sub> Wert von 2,6 µM zeigte. [72]

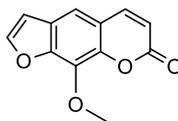
Einleitung und Problemstellung



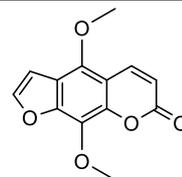
Psoralen



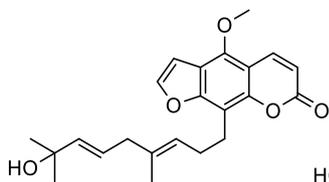
Bergapten (5-MOP)



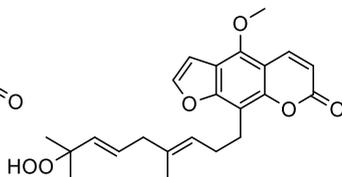
Xantotoxin (8-MOP)



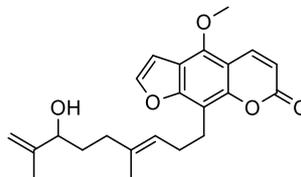
Isopimpinellin



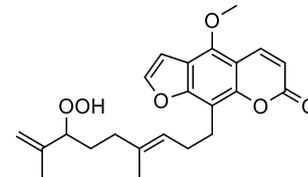
Melicotriphyllin A



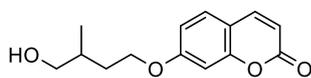
Melicotriphyllin B



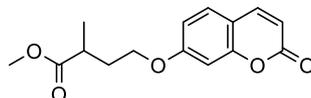
Melicotriphyllin C



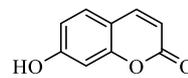
Melicotriphyllin D



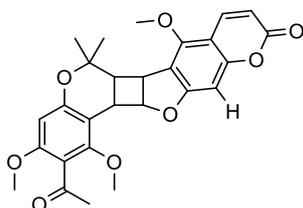
Melilunumarin A



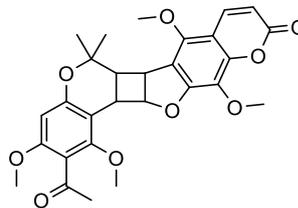
Melilunumarin B



Umbelliferon



Meliquercifolin A

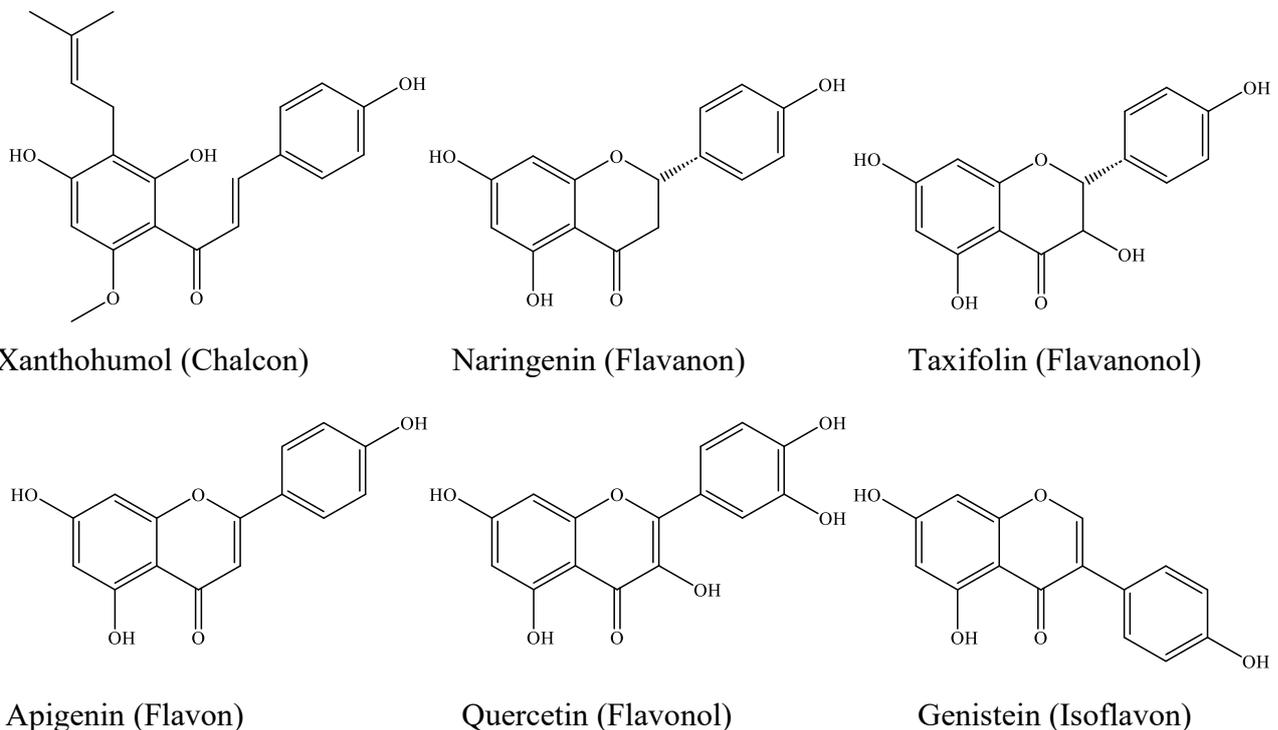


Meliquercifolin B

**Abbildung 9:** Coumarine aus *Melicope* Arten

## 1.4 Flavonoide

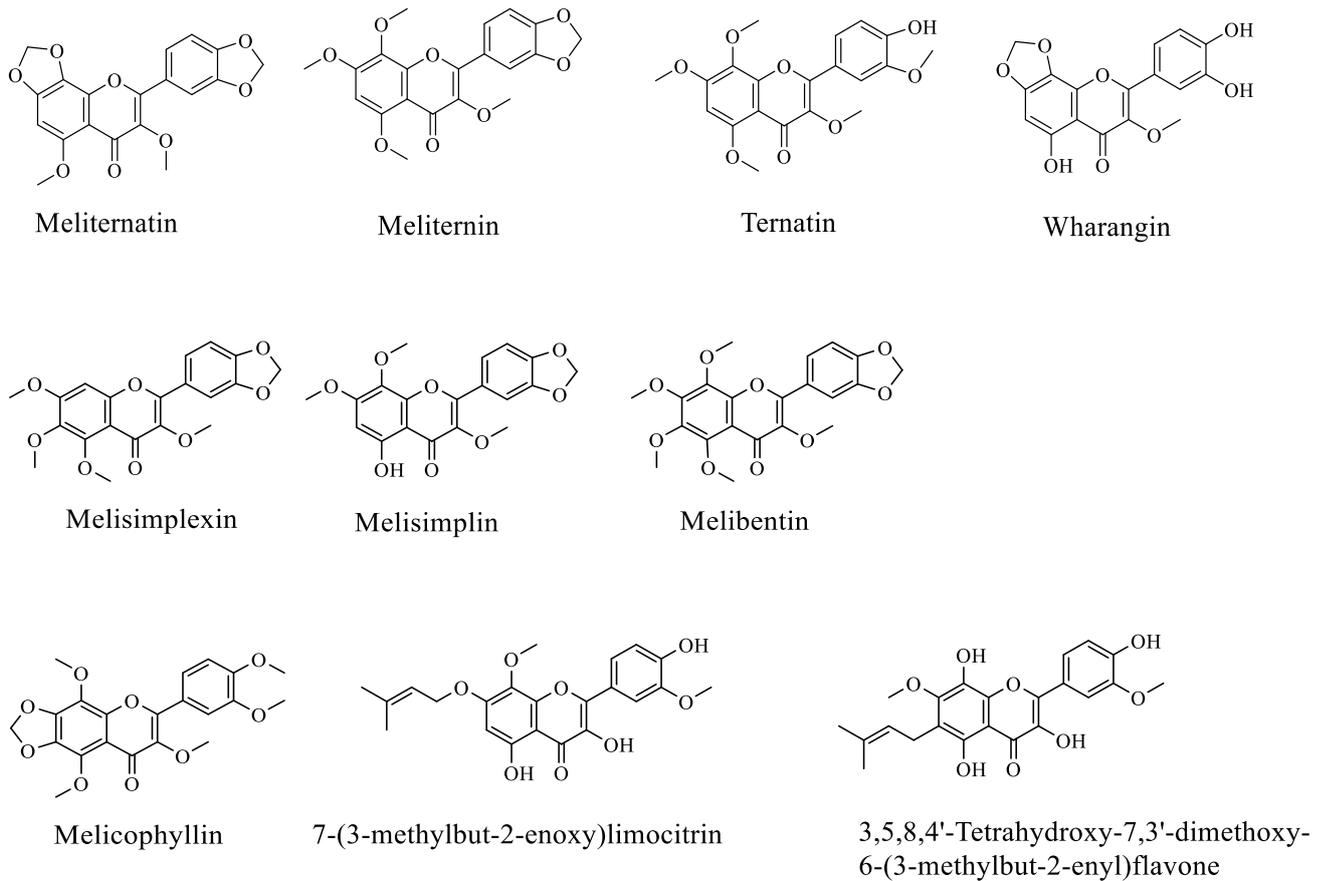
Die Stoffgruppe der Flavonoide ist eine der am besten untersuchten Stoffgruppen. Unter dem Stichwort „flavonoids“ subsumieren die Chemical Abstracts mehr als 220.000 Artikel. [49] Das wird nur durch die Alkaloide übertroffen, die der Publikationsanzahl knapp darüber liegen. Die Flavonoide unterteilt man, je nach Zyklisierung und Oxidationsstufe, in die Chalcone, Flavanone und Flavanonole, Flavone und Flavonole sowie Isoflavonoide. Beispiele finden sich in Abbildung 10. Die bei der Biosynthese über den gemischten Polyketidweg gebildeten Flavonoide, tragen normalerweise immer OH-Gruppen an den Kohlenstoffen 5, 7 und 4'. [68] Diese phenolischen Gruppen können anschließend unterschiedlich substituiert, aber auch entfernt werden. Außerdem ist eine weitere Oxygenierung und auch weitere Derivatisierung an den übrigen Kohlenstoffen möglich, so dass eine große Strukturvielfalt resultieren kann, wenn die Pflanze über die jeweiligen Enzyme verfügt. Da Flavonoide in allen oberirdischen Teilen von landlebenden Pflanzen vorkommen, sind chemotaxonomische Überlegungen zur Ermittlung von Verwandtschaftsbeziehungen möglich. [73]



**Abbildung 10:** Strukturtypen von Flavonoiden

In der Familie der Rutaceae sind Flavonoide ebenfalls weit verbreitet und auch in der Gattung *Melicope* sind bereits viele Flavonoide gefunden worden. Schon 1949 berichteten Briggs und

Locker über die Isolierung der vier Flavonole Meliternatin, Meliternin, Ternatin und Wharangin (Abbildung 11). [74] Die Struktur der Flavonoide Meliternatin (1), Meliternin (2), Ternatin (3) und Wharangin (4) wurde durch Synthese bestätigt. [74] Ein Jahr später wurden von derselben Arbeitsgruppe aus dem Harz von *Melicope simplex* (Neuseeland) die Verbindungen Melisimplexin und Melisimplin isoliert [47]. Aus Rinde und Holz von *Melicope broadbentiana* (Australien) wurde neben Melisimplexin und Melisimplin auch das polymethoxylierte Flavonoid Melibentin gefunden [75]. Die Autoren bezeichneten diese Stoffgruppe bereits in dieser Publikation als typisch für *Melicope* Arten



**Abbildung 11:** Flavonoide aus der Gattung *Melicope*

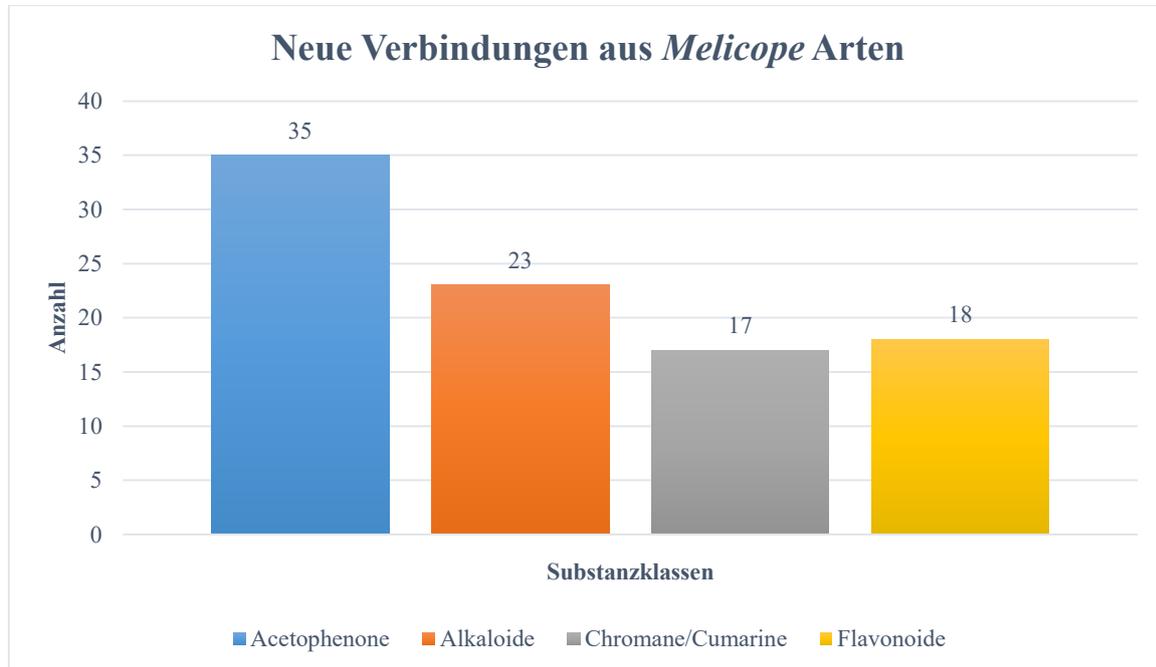
Mit den zwei Flavonoiden 7-(3-methylbut-2-enyl)limocitrin und 3,5,8,4'-Tetrahydroxy-7,3'-dimethoxy-6-(3-methylbut-2-enyl)flavone wurden erstmals zwei prenylierte Flavonoide aus der australischen *M. micrococca* isoliert. [76] Während die Prenylierung bei der erstgenannten Verbindung zur Veretherung der phenolischen Hydroxylgruppe an C-7 führte, ist der Prenylrest bei der zweiten Substanz direkt am C-6 des A-Rings gebunden.

Auch die aus *Melicope*-Arten isolierten Flavonoide wurden hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Das aus den Blättern *M. triphylla* isolierte Melicophyllin wurde an P-388 Lymphoma Zellen getestet. Es zeigte dabei einen  $IC_{50}$  Wert von 10,5  $\mu$ M. [35]

Trotz der großen Anzahl in Pflanzen gefundener Flavonoide, wurden aus den untersuchten *Melicope* Arten 25 neue Flavonoide isoliert. Die zur Isolierung benötigten Extrakte wurden sowohl aus den Blättern als auch aus dem Harz und der Rinde gewonnen. Dabei fällt auf, dass vorwiegend lipophile Lösungsmittel zur Herstellung der jeweiligen Extrakte verwendet wurden,

da die isolierten Flavonoide überwiegend polymethoxyliert, also lipophiler Natur waren. Über die Bioaktivität dieser polymethoxylierten Flavonoide ist bisher nur wenig berichtet worden. Neben der chemotaxonomischen Bedeutung der Untersuchung des Flavonoidvorkommens in weiteren *Melicope* Arten, können auch bereits beschriebene Substanzen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit untersucht werden.

Die Suche nach Naturstoffen in einer bisher nicht oder kaum untersuchten *Melicope*-Species lässt also erwarten, dass bekannte und auch neue Verbindungen aus der Pflanze, insbesondere aus den Blättern isoliert werden können. Wenn man die über 330 Arbeiten zu *Melicope* durchschaut und auf erstmals publizierte, neue Naturstoffe durchsucht, dann findet man 93 neue Verbindungen, wovon die meisten (35) aus der Gruppe der Acetophenone stammen. Die beiden, auf das gesamte Pflanzenreich bezogen, am stärksten untersuchten Substanzklassen der Alkaloide und Flavonoide bringen zusammen auf nur 41 Verbindungen. Das ist sicherlich nicht überraschend, denn mit der Anzahl gefundener Verbindungen, verringert sich die Wahrscheinlichkeit, neue, noch nicht beschriebene Naturstoffe zu finden. Dennoch ist die Untersuchung der Gattung *Melicope* sowohl in phytochemischer als auch pharmakologischer Hinsicht interessant.



**Abbildung 12:** Anzahl der in *Melicope*-Arten gefundenen, neuen Naturstoffe nach Substanzklassen eingeteilt (Stand 2024)

Aus der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *M. barbiger*a waren vor Aufnahme der Arbeiten zwei Alkaloide (Isoplatydesmine und Edulinine), zwei Flavonoide, vier Cumarine und der 4-Hydroxybenzaldehyd bekannt. [5,6,37]

Die Strukturaufklärung erfolgte allerdings teilweise nur aufgrund von ähnlichem Verhalten im UV-Licht und der Auswertung massenspektrometrischer Daten im Vergleich zu damals bekannten Verbindungen. Aufgrund der Vielzahl der in der Zwischenzeit aus anderen *Melicope* Arten beschriebenen Naturstoffe, war anzunehmen, dass in den Blättern von *Melicope barbiger*a wesentlich mehr Sekundärstoffe enthalten sind. Insbesondere die Stoffgruppe der Acetophenone, aus der auch einige Substanzen bereits erfolgreich gegen verschiedene Tumorzelllinien getestet wurden, ist dabei von großem Interesse. Bisher war noch kein Vertreter dieser Stoffgruppe in *M. barbiger*a gefunden wurde.

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits eine Reihe von lipophilen, prenylierten Flavonoiden, Isoflavonoiden und Pterocarpanen aus *Erythrina*-Arten (Fabaceae) erfolgreich gegen verschiedene Tumorzelllinien getestet [28,77,78]. Die hydrophileren, häufig vorkommenden Quercetin- oder Kämpferolderivate, haben sich in den hier durchgeführten Tests zur Zytotoxizität als unwirksam erwiesen. Es ist daher von großem Interesse lipophile, mehrfach methoxylierte und unprenylierte Flavonoide, wie sie in *Melicope* Arten vorkommen, zu testen. Die Tatsache, dass in *Melicope* Arten zusätzlich auch am Sauerstoff prenylierte Flavonoide vorkommen, ermöglicht den Vergleich zwischen diesen Sekundärstoffen und den am Kohlenstoff prenylierten Verbindungen aus der Gattung *Erythrina* in Bezug auf die Toxizität überhaupt und den Einfluss der Prenylierung auf die Wirkungsstärke.

Die Isolierung und Identifizierung der in *Melicope barbiger*a enthaltenen Flavonoide, ermöglicht außerdem die Entwicklung eines schnellen Analyseverfahrens, mit dem *Melicope* Arten aufgrund ihres Flavonoidmusters schnell unterschieden werden können. Dies ist insbesondere wichtig, um die Verbreitung bestimmter Endemiten auf Hawaii schnell zu bestimmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher möglichst viele und möglichst neue Naturstoffe aus *M. barbiger*a zu isolieren und deren Struktur aufzuklären. Die im Allgemeinen lipophilen Substanzen aus der Stoffgruppe der Acetophenone, Alkaloide, Flavonoide und Cumarine können dabei alle durch die gleiche Art der Extraktion gewonnen werden (s. Kap.6.5, Experimenteller Teil). Anschließend sollen die Substanzen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kassack (Pharm. Chem, HHU Düsseldorf)

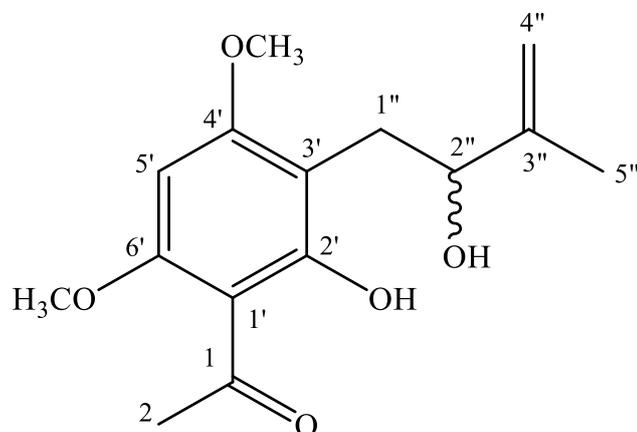
## **Einleitung und Problemstellung**

---

getestet werden. Für die Flavonoide soll dann noch der erste Aufschlag für die Entwicklung einer analytischen Methode zur qualitativen Flavonoidanalytik in Blattproben von ca. 2 g ausgeführt werden.

## 2 Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen

### 2.1 Verbindung 1 (Melibarbinon A)



Verbindung **1** wurde als gelber, öliges Rückstand aus der Fraktion MB.D-IV-8-3 in einer Ausbeute von 2,3 mg isoliert. Im DC zeigte die Verbindung **1** im Fließmittel DC-3 einen löschenden Substanzfleck bei einem  $R_f$ -Wert von 0,56 (s. Kap. 6.1.1). Dieser Fleck färbte sich bei Detektion mit Anisaldehyd-Reagenz orange (s. Kap. 6.1.1). Nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A färbte er sich gelb und fluoreszierte ebenfalls bei 366 nm gelb (s. Kap. 6.1.1).

Das hochauflösende ESI-Massenspektrum dieser Verbindung zeigte das Molekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z = 281.1384$ . Aus dieser Masse ließen sich die beiden Summenformeln  $C_{15}H_{20}O_5$  oder  $C_{16}H_{17}N_4O$  als theoretisch möglich ableiten.

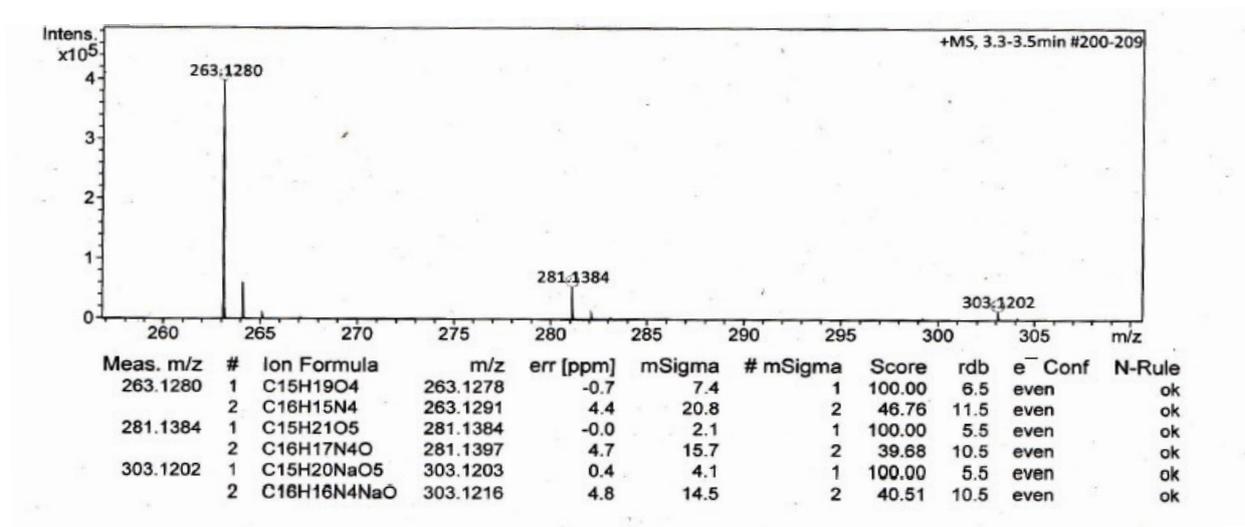


Abbildung 13: HRESIMS von Verbindung **1**

Zur weiteren Aufklärung der Struktur von Verbindung **1** wurden ein- und zweidimensionale NMR Spektren aufgenommen, deren Interpretation nachfolgend beschrieben ist.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR (Abbildung 15), fanden sich die Signale für 15 Kohlenstoffe, von denen 8, aufgrund der im zweidimensionalen, heteronuklearen H,C- Korrelationsspektrum (= HSQC) detektierten Korrelationen (Abbildung 17), als protonierte Kohlenstoffe erkannt wurden. Nach Integration der korrespondierenden Protonensignale konnte festgestellt werden, dass es sich um die Signale von 4 Methyl-, 2 Methylen- und 2 Methin-Kohlenstoffen handelt. Bei den übrigen Signalen ohne Protonenkorrelation, handelte es sich um die Signale von sieben quartären Kohlenstoffen. Damit war als Summenformel nur noch  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5$  möglich. Aufgrund der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffsignale (Tabelle 1), ließ sich bereits zu diesem Zeitpunkt vermuten, dass es sich bei **1** um eine aromatische Verbindung (7 Kohlenstoffe mit  $\delta > 100$  ppm) mit einer aliphatischen Seitenkette, einem Keton ( $\delta = 203.04$  ppm) und zwei Methoxygruppen handeln sollte.

Die Kohlenstoff- und Protonensignale bei 16.88 ppm (C-5'') und 1.69 ppm (H-5'') sowie bei 109.71 ppm (C-4'') und bei 4.51 (H-4''a) bzw. 4.54 (H-4''b) ppm, ließen auf das Vorhandensein eines ungesättigten aliphatischen Isoprenrestes schließen, wie er in vielen Naturstoffen vorkommt [18,27]. Im ebenfalls aufgenommenen H,H-COSY-Spektrum (Abbildung 16), das die Korrelation benachbarter Protonen sichtbar macht, findet man die allylische Korrelation zwischen den Methylprotonen an C-5'' ( $\delta = 1,69$  ppm, s) und den beiden Protonen der Methylengruppe C-4'' ( $\delta = 4.51$  und  $4.54$  ppm). Aufgrund der im HMBC Spektrum (Abbildung 18) ebenfalls vorhandenen Korrelation mit dem Signal eines quartären Kohlenstoffes bei  $\delta = 148.13$  ppm (C-3'') wurden diese als Methylenprotonen an einer Doppelbindung erkannt. Die Signale von H-4'' treten wegen einer weiteren Kopplung mit H-2'' als Multiplett oder verbreiterte Singulets auf (Abbildung 16 und Tabelle 1).

Das Signal von H-2'' findet sich ebenfalls als Multiplett bei  $\delta = 4.14$  ppm und befindet sich damit im Shiftbereich hydroxylierter Methinprotonen. [79] Das Proton H-2'' zeigt folgerichtig eine Korrelation mit dem Dublett bei  $\delta = 4.63$  ppm, welches keine Korrelation zu einem Kohlenstoff besitzt und somit dem OH-Proton an C-2'' zugeordnet werden konnte. Letztlich zeigt das Proton an C-2'' auch eine Korrelation mit den Signalen einer weiteren Methylengruppe bei  $\delta = 2.62$  ppm und  $2.71$  ppm, die an C-1'' des Prenylrestes gebunden sind (Abbildung 14 und Tabelle 1).

Die Position der Signale und deren Korrelationen in den 2D-COSY, HSQC und im ebenfalls aufgenommenen HMBC-Spektrum (Abbildung 18), mit dessen Hilfe auch das  $^{13}\text{C}$ -NMR Signals des quartären Kohlenstoffes C-3'' bei  $\delta = 148.13$  ppm zweifelsfrei zugeordnet werden konnte, bestätigen das Vorliegen eines hydroxylierten, ungesättigten Prenylrestes, wie er zum Beispiel bei Shamixanthon gefunden wurde. [80]

Die beiden Signale der Protonen an C-1'' bei  $\delta = 2.62$  ppm (H-1''a) und 2.71 ppm (H-1''b) zeigen, neben der Korrelation mit den Kohlenstoffen des Prenylrestes C-2'' ( $\delta = 73.49$  ppm) und C-3'' ( $\delta = 148.13$  ppm), zusätzliche Kreuzsignale mit drei quartären Kohlenstoffen eines aromatischen Systems bei  $\delta = 106.01$  ppm (C-3'),  $\delta = 164.14$  ppm (C-4') und  $\delta = 163.10$  ppm (C-2') im HMBC-Spektrum (Abbildung 18). Bei diesen drei Kohlenstoffen handelt es sich um das C-Atom, an dem der Prenylrest gebunden ist und um die direkt benachbarten Kohlenstoffe. Eines dieser beiden C-Atome (C-2') zeigt eine weitere Korrelation im HMBC mit dem weit tieffeldverschobenen Hydroxylproton bei  $\delta = 13.97$  ppm, bei dem es sich aufgrund der Lage im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abbildung 14) um ein wasserstoffbrückengebundenes Proton mit einer benachbarten Carbonylgruppe handeln muss. Hydroxyl-Protonen mit Shiftwerten in diesem Bereich sind in vielen Flavonoiden, bereits gefunden worden. [81,82] Der zweite benachbarte Kohlenstoff (C-4') besitzt wiederum einen Crosspeak mit den Methoxyprotonen bei  $\delta = 3.92$  ppm im HMBC-Spektrum.

Das Hydroxylproton bei  $\delta = 13.97$  ppm zeigt zwei weitere Korrelationen mit dem aromatischen Kohlenstoff, an dem der Prenylrest gebunden ist (C-3';  $\delta = 106.01$  ppm) und einem Kohlenstoff bei  $\delta = 164.14$  ppm, der seinerseits mit dem Methylsignal bei  $\delta = 55.90$  ppm korreliert.

Die Lage dieses Methylsignals ist typisch für aromatisch gebundene Acetylgruppen, wie sie in vielen Naturstoffen vorkommen. [83] Die Signale der beiden anderen, noch fehlenden aromatischen Kohlenstoffe befinden sich bei  $\delta = 87.14$  ppm (C-5') und  $\delta = 161.81$  ppm (C-6') im  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum. Das im hohen Feld auftretende Signal ( $\delta = 87.14$  ppm) koppelt im HSQC mit dem Proton bei  $\delta = 6.21$  ppm (H-5'), während das im tiefen Feld auftretende Signal ( $\delta = 161.81$ ) ppm zu einem quartären Kohlenstoff gehört.

Dieser Kohlenstoff (C-6') zeigt ebenfalls eine Korrelation im HMBC mit dem Signal eines Methylethers bei 55.90 ppm. Daraus ging klar hervor, dass es sich bei dem Signal bei 87.14 ppm um das C-5' und bei  $\delta = 161.81$  ppm um das C-6' handeln musste, wodurch die Struktur ermittelt werden konnte. Das aromatische Proton bei  $\delta = 6.21$  ppm (H-5') zeigt vier Kopplungen im HMBC-Spektrum (Abbildung 18). Neben den über zwei Bindungen auftretenden  $^2\text{J}$ -

Kopplungen mit den beiden benachbarten Kohlenstoffen bei  $\delta = 164.14$  ppm (C-4') und 161.81 ppm (C-6'), zeigen sich die typischen über drei Bindungen auftretenden  $^3J$ -Kopplungen zu den Kohlenstoffen C-1' bei  $\delta = 104.95$  ppm und C-3' bei  $\delta = 106.14$  ppm. Zum Vergleich der NMR Daten mit sehr ähnlichen Verbindungen, die aus der Rutaceae *Acronychia pedunculata* isoliert wurden, wurden zusätzliche NMR Spektren von **1** in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommen (Tabelle 1). Dabei zeigten sich große Übereinstimmungen im NMR mit Acronyculatin D, das den gleichen hydroxylierten Prenylrest besitzt, aber im Gegensatz zu **1** nur eine der drei phenolischen Hydroxylgruppen der Phloroglucingrundstruktur besitzt. [84]

Die Stereochemie des sekundären Alkohols an C-2'' konnte durch die Auswertung der NMR-Spektren nicht geklärt werden. Eine häufig benutzte Methode zur Aufklärung der absoluten Konfiguration ist die Methode nach Mosher und Dale. [85] Hierbei wurden zwei Mosher-Ester hergestellt und deren im Anschluss aufgenommene  $^1\text{H}$ -Spektren ausgewertet und miteinander verglichen (s. Kap.6.2.3, Experimenteller Teil). Beim Mosher-Reagenz handelt es sich um das  $\alpha$ -Methoxytrifluoromethylphenylacetylchlorid, das aufgrund des chiralen  $\alpha$ -C-Atoms in zwei, nach Cahn-Ingold-Prelog bezeichneten enantiomeren Formen als (R)- und (S)-Mosher-Säure oder zur leichteren Umsetzung als Säurechlorid vorkommt. Setzt man nun einen einfachen Alkohol, der entweder (R)- oder (S)-konfiguriert ist, mit den Mosher-Reagenzien um, so erhält man in beiden Fällen diastereomere Mosher-Ester. Ist der Alkohol beispielsweise (R)-konfiguriert, erhält man mit dem (R)-Mosher-Reagenz einen (R,R)- und mit dem (S)-Mosher-Reagenz einen (S,R)-konfigurierten Ester. Bei (S)-konfigurierten Alkoholen ergeben sich entsprechend die (R,S)- und (S,S)-Esterderivate. Da Diastereomere, im Gegensatz zu Enantiomeren, in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften voneinander abweichen, sind auch die NMR Spektren dieser beiden Diastereomere verschieden. Durch Vergleich der Spektren und Auswertung der Shiftdifferenzen lässt sich so ermitteln ob ein (R)- oder (S)-konfigurierter Alkohol vorlag. Bei Verbindung **1** ergaben sich mit nach der Reaktion mit beiden chiralen Mosher-Reagenzien keine reinen Verbindungen, sondern jeweils ein Gemisch zweier Diastereomere. So führte die Umsetzung von Verbindung **1** mit dem (R)-konfigurierten  $\alpha$ -Methoxytrifluoromethylphenylacetylchlorid zu einem Gemisch der beiden (R,S)- und (R,R)-konfigurierten Mosher-Ester. Im anderen Fall erhielt man das Diastereomergemisch der (S,R)- und (SS)-Esterderivate. Daraus konnte abgeleitet werden, dass es sich bei Verbindung **1** um ein Gemisch der beiden enantiomeren (R)- und (S)-Alkohole an C-2'' handeln muss. Da der Drehwert  $[\alpha]$  echter Racemate (1:1-Gemische zweier Enantiomere) Null ist und der im Polarimeter ermittelte Drehwert von **1**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.2^\circ$  (c 0.2, MeOH); betrug, muss davon

ausgegangen werden, dass ein Enantiomer überwiegt. Das lässt vermuten, dass die Racemisierung erst während der Isolierung stattfand. Verbindung **1** wurde somit eindeutig als (R,S)-1-[2-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-methyl-3-buten-1-yl) 4,6-dimethoxyphenyl]-ethanone identifiziert.

Diese Verbindung gehört zur Naturstoffgruppe der Acetophenone, die in der Gattung *Melicope* bereits öfters gefunden wurde. [48,50,52] Die hier isolierte und in ihrer Struktur aufgeklärte Verbindung wurde trotz ausführlicher Recherche noch nicht in der Literatur beschrieben. Verbindung **1** stellt daher einen neuen, erstmals beschriebenen Naturstoff dar. Für andere, strukturell ähnliche Acetophenone der Gattung *Melicope* wurden jeweils an die Pflanzenbezeichnung angelehnte Trivialnamen vorgeschlagen. [86] In Analogie dazu schlagen wir für dieses erstmals aus *Melicope barbiger*a isolierte Acetophenon **1** den Namen „Melibarbinon A“ vor.

**Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen**

**Tabelle 1:** <sup>13</sup>C und <sup>1</sup>H-NMR Daten von **1** (δ in ppm, 500 MHz in DMSO-d<sub>6</sub> und CDCl<sub>3</sub>)

Position	<sup>1</sup> H (J in Hz)		<sup>13</sup> C	
	DMSO-d <sub>6</sub>		DMSO-d <sub>6</sub>	CDCl <sub>3</sub>
<b>1</b>	-		203.04	203.51
<b>2</b>	2.56 s		32.90	33.30
<b>1'</b>	-		104.95	105.81
<b>2'</b>	-		163.10	163.92
<b>3'</b>	-		106.01	106.94
<b>4'</b>	-		164.14	163.80
<b>5'</b>	6.21 s		87.14	85.97
<b>6'</b>	-		161.81	162.31
<b>1''a</b>	2.62 dd (13.0 / 6.6)	2.83 dd (13.9 / 9.0)	28.60	28.95
<b>1''b</b>	2.71 dd (13.0 / 7.7)	2.94 dd (13.9 / 3.6)		
<b>2''</b>	4.14 m	4.20 dd (9.0 / 3.6)	73.49	75.91
<b>3''</b>	-		148.13	147.98
<b>4''a</b>	4.51 m	4.80 d (br.)	109.71	109.95
<b>4''b</b>	4.54 m	4.95 d (1.1)		
<b>5''</b>	1.69 s	1.81 s	16.88	18.1
<b>OCH<sub>3</sub> an C-4'</b>	3.87 s	3.87 s	55.77	55.52
<b>OCH<sub>3</sub> an C-6'</b>	3.92 s	3.90 s	55.90	55.52
<b>OH an C-2''</b>	4.63 d	n.d.	-	-
<b>OH an C-2'</b>	13.98 s	14.21 s	-	-

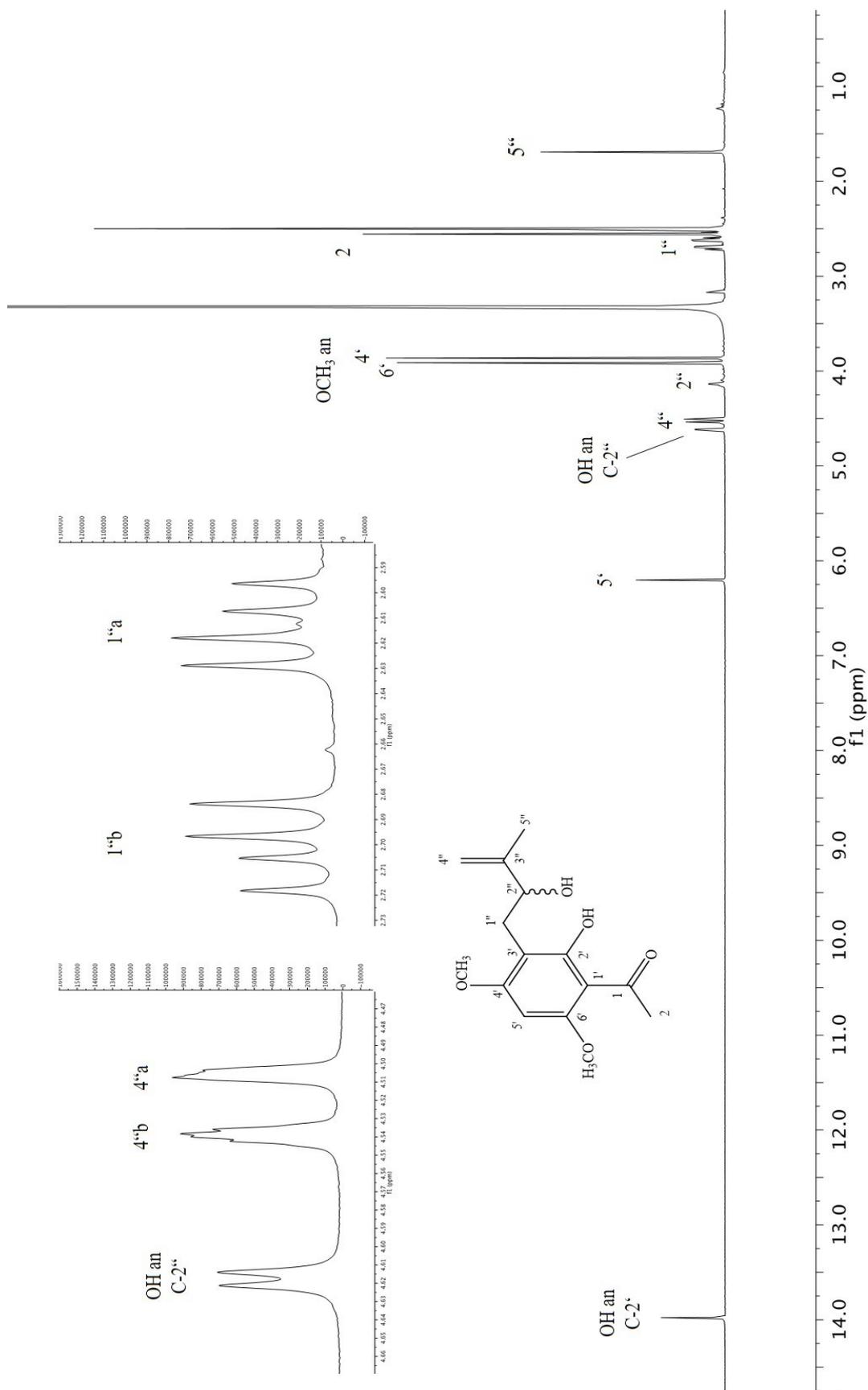


Abbildung 14:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Verbindung **1** (600 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

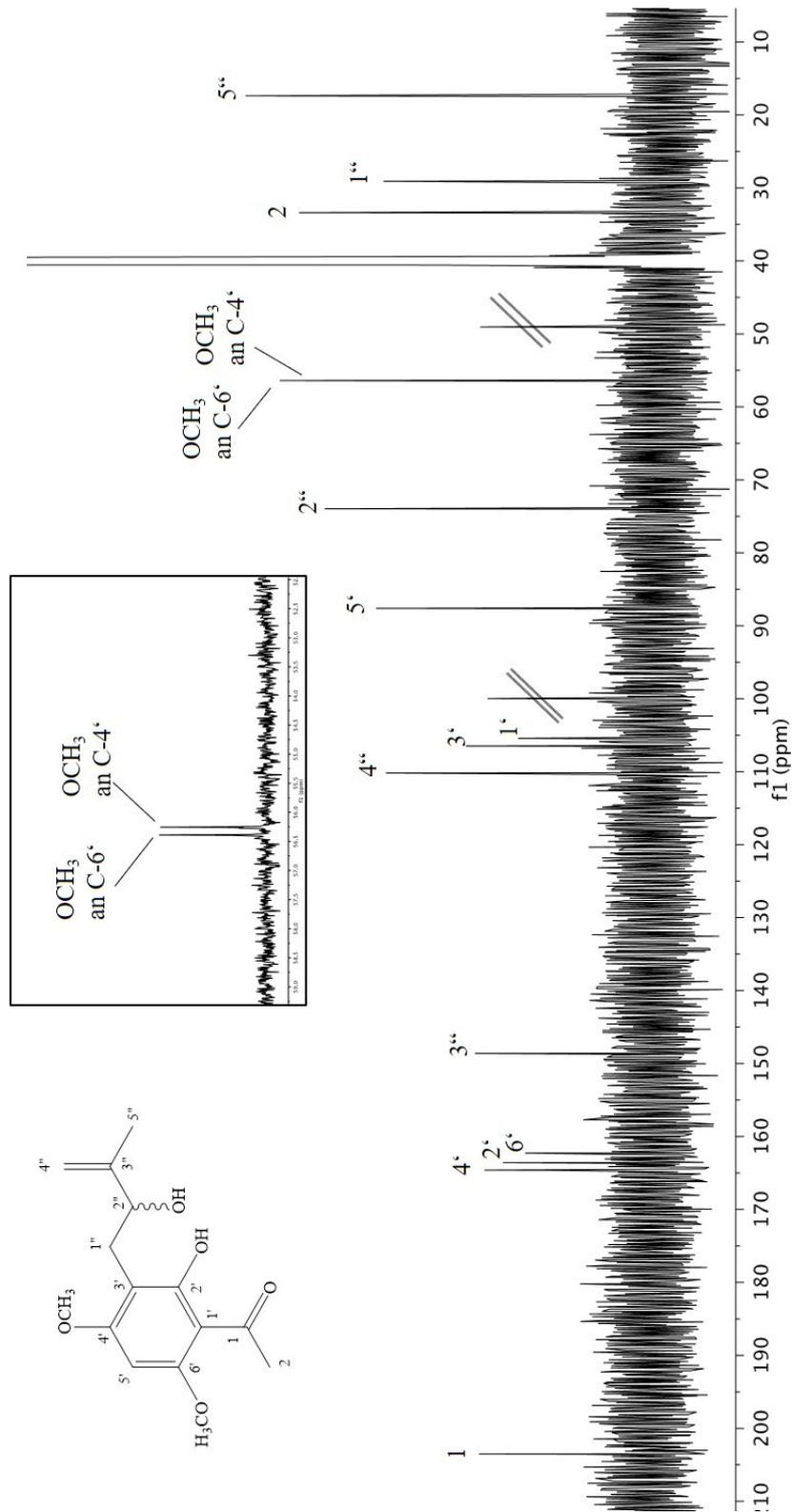


Abbildung 15:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 1 (150 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

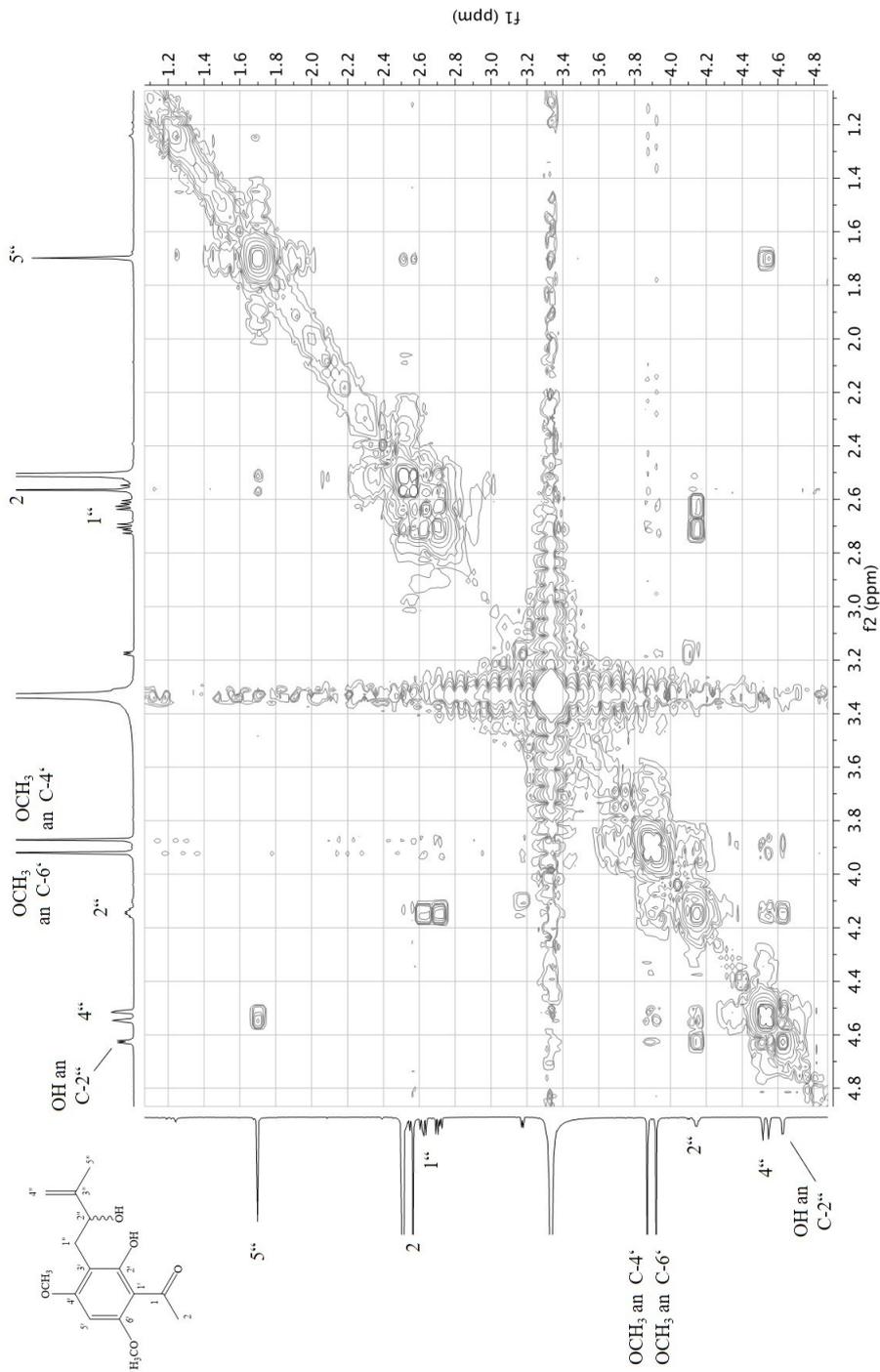


Abbildung 16: 2D-H,H-COSY-Spektrum der Verbindung **1** (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

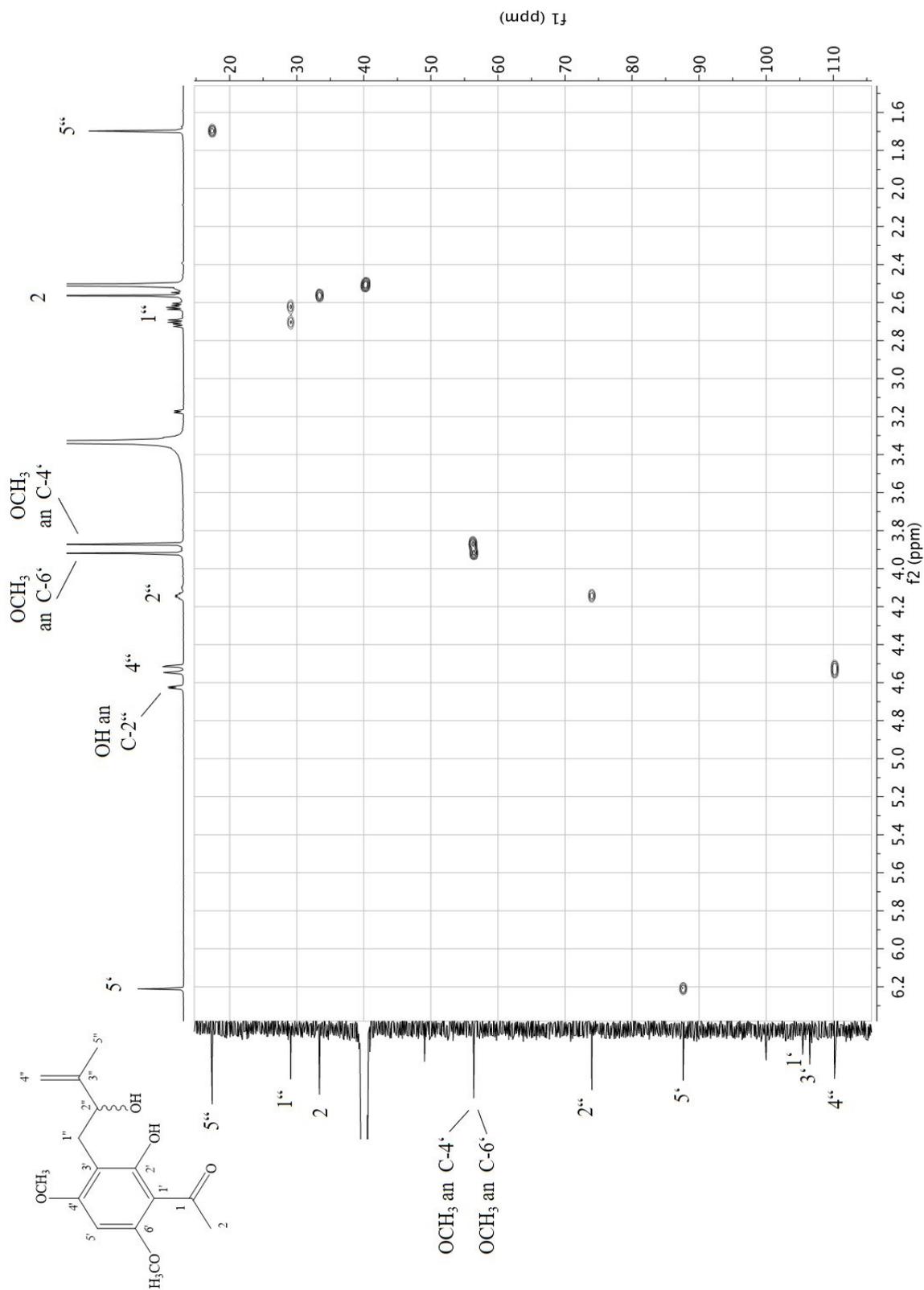


Abbildung 17: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 1 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

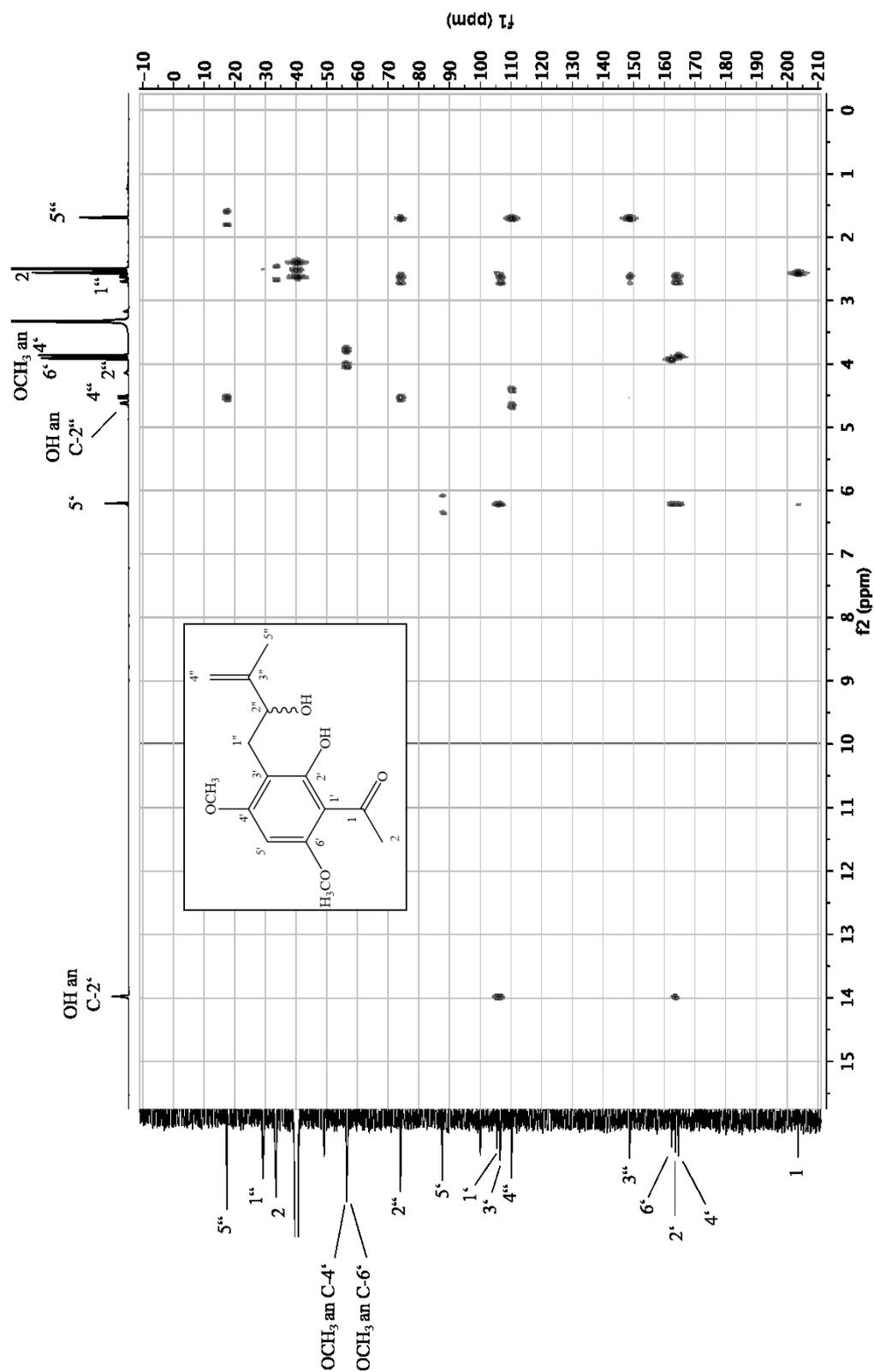
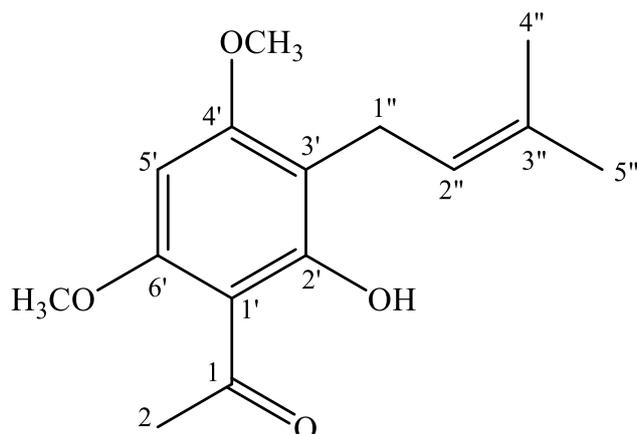


Abbildung 18: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 1 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

## 2.2 Verbindung 2 (Melibarbinon B)



Verbindung **2** wurde als weißliche, amorphe Substanz aus der Fraktion MB.D-IV-10-4 in einer Ausbeute von 3,2 mg isoliert.

Auf der DC-Platte zeigte die Verbindung **2** bei einem  $R_f$ -Wert von 0,83 im Fließmittel DC-3 einen löslichen Substanzfleck (siehe 6.1.1), der sich bei Detektion mit Anisaldehyd-Reagenz orange-braun färbte (siehe 6.1.1). Nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A zeigte er im Tageslicht eine gelbe Färbung und fluoreszierte ebenfalls bei 366 nm gelb (siehe 6.1.1).

Das hochauflösende ESI-Massenspektrum zeigte das Molekülion  $[M+H]^+$  von **2** bei  $m/z = 265.1435$ , woraus sich die Summenformel von  $C_{15}H_{20}O_4$  berechnen lässt.

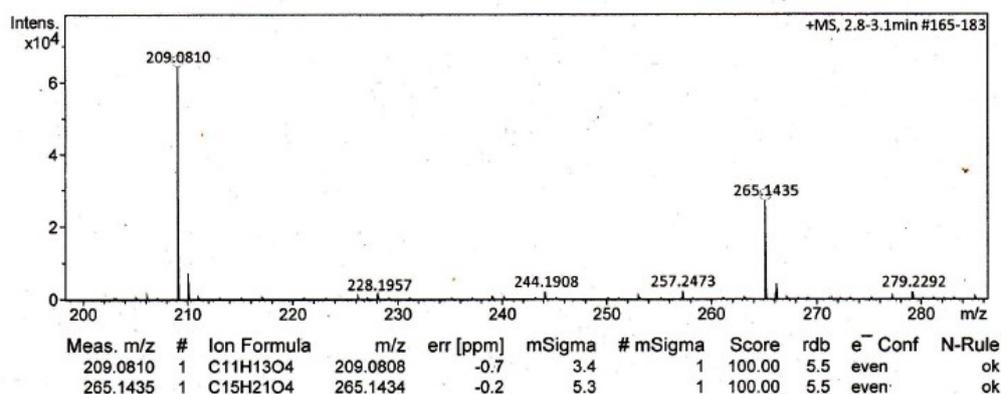


Abbildung 19: HRESIMS von Verbindung **2**

Im Vergleich zu **1** ließ sich bereits zu diesem Zeitpunkt vermuten, dass diese Verbindung einen Sauerstoff weniger besitzt, was durch das Fehlen einer der beiden OH-Gruppen erklärt werden könnte. Auch von **2** wurden ein- und zweidimensionale NMR-Spektren zur weiteren Aufklärung der Struktur aufgenommen. Bei der Auswertung des in deuteriertem Chloroform aufgenommenen  $^{13}C$ -NMR-Spektrums (Abbildung 21 und Tabelle 2) von **2** fiel auf, dass 10 der,

aufgrund des HRESIMS erwarteten, 15 Kohlenstoffsignale bei Shiftwerten registriert wurden, die sich um weniger als 1 ppm von den für **1** in CDCl<sub>3</sub> gemessenen Werten unterschieden (Tabelle 1). an. Bei den Signalen von **1**, die gegenüber **2** abweichende Shiftwerte zeigten, handelt es sich um die Signale der hydroxylierten Seitenkette (C-1“ bis C-4“) und das aromatische C-Atom C-3‘, an dem die Seitenkette gebunden ist. Einzig zum Methylkohlenstoff C-5“ bei  $\delta=18.10$  ppm in **1** findet sich ein entsprechendes Signal im Spektrum von **2** bei 17.96 ppm. Verbindung **2** sollte damit ein Derivat von **1** sein, bei dem der 2-Hydroxy-3-methyl-3-buten-Rest durch einen nicht hydroxylierten C-5 Rest ersetzt ist. Da das <sup>1</sup>H-NMR, neben den 2 Singulets für die drei äquivalenten Methylprotonen der beiden Methoxygruppen ( $\delta = 3.86$  und 3.87 ppm, s. Abbildung 20 und Tabelle 2), zwei weitere Singulets für je 3 Methylprotonen zeigte ( $\delta = 1.46$  und 1.75 ppm, Abbildung 20 und Tabelle 2), sollte der Prenylrest in **2** zwei statt einer Methylgruppen besitzen, die keine weitere Kopplung zeigen. In Verbindung mit dem Triplet für ein ungesättigtes Methinproton (H-2“,  $\delta = 5.15$  ppm, Abbildung 20 und Tabelle 2) und dem Dublett für eine Methylengruppe (H-1“,  $\delta = 3.25$  ppm, Abbildung 20 und Tabelle 2) sollte es sich um einen 3-Methyl-2-buten-Rest handeln, der mit seinem C-1 am Aromat des Acetophenons angeknüpft ist. Dieser Befund wird durch die korrespondierenden Signale der C-Atome im <sup>13</sup>C NMR bestätigt. Über die Korrelationen im H,H-Cosy (Abbildung 22) und den beiden heteronuklearen Korrelationspektren (HSQC und HMBC, Abbildung 23 und Abbildung 24) wird die Struktur insgesamt bestätigt und die Position des Prenylrestes an C-3“ über die Korrelationen von H-1“ mit C-3‘, C-2‘ und C-4‘ eindeutig bestätigt. Solche einfachen Prenylreste sind in der Natur sehr weit verbreitet. Man findet sie sehr häufig als Substituenten von phenolischen Verbindungen in ortho Position zu phenolischen Hydroxylgruppen, zum Beispiel bei prenylierten Flavonoiden. [78] 2-+\*Bei Verbindung **2** handelt es sich demnach um das 2-Hydroxy-4,6-dimethoxy-3-prenylacetophenon, das als Zwischenprodukt für die Synthese von 4‘-O-Methylxanthohumol beschrieben wurde [87]. Die dort publizierten NMR Daten stimmen insgesamt mit den von uns gefundenen Daten überein, die Signale wurden aber nur gelistet und nicht den Protonen und Kohlenstoffen genau zugeordnet [87].

Da **2** erstmals von uns aus einer Pflanze isoliert wurde, es sich also um einen neuen Naturstoff handelt, schlagen wir für Verbindung **2** in Analogie zu **1** den Trivialnamen „Melibarbinon B“ vor.

**Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen**

**Tabelle 2:** <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C-NMR Daten von Verbindung **2** (δ in ppm, 500/125 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

<b>Position</b>	<b><sup>1</sup>H</b>	<b>(J in Hz)</b>	<b><sup>13</sup>C</b>
<b>1</b>	-		203.51
<b>2</b>	2.59 s		33.30
<b>1'</b>	-		106.31
<b>2'</b>	-		163.48
<b>3'</b>	-		110.11
<b>4'</b>	-		163.81
<b>5'</b>	5.93 s		86.17
<b>6'</b>	-		161.96
<b>1''</b>	3.25 d	(7.1)	21.55
<b>2''</b>	5.15 t	(7.1/1)	122.96
<b>3''</b>	-		131.53
<b>4''</b>	1.64 s		26.00
<b>5''</b>	1.75 s		17.96
<b>OCH<sub>3</sub> an C-4'</b>	3.86 s		55.59
<b>OCH<sub>3</sub> an C-6'</b>	3.87 s		55.71
<b>OH an C-2''</b>	13.90 s		-

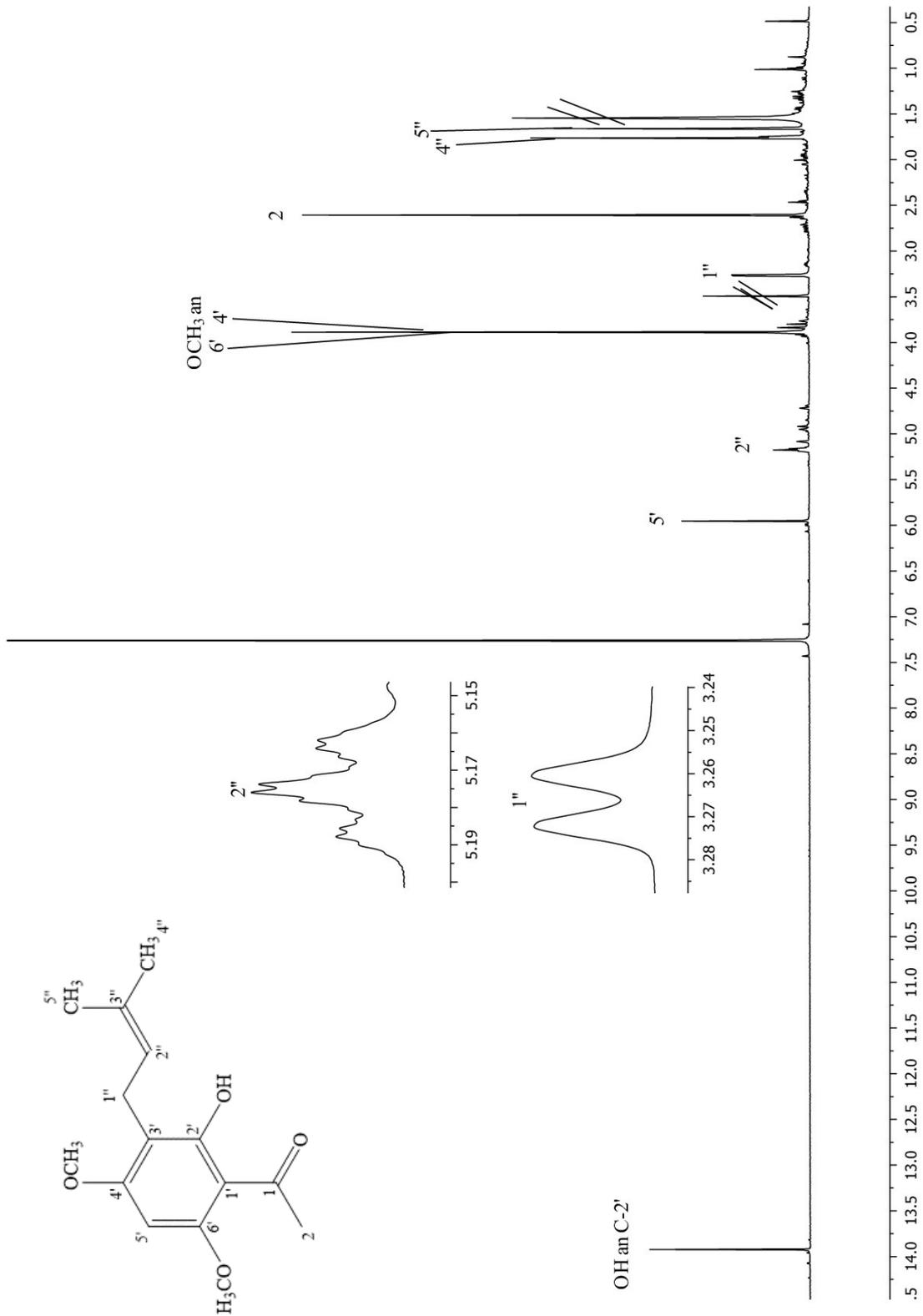


Abbildung 20:  $^1\text{H-NMR}$  von Verbindung **2** (500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

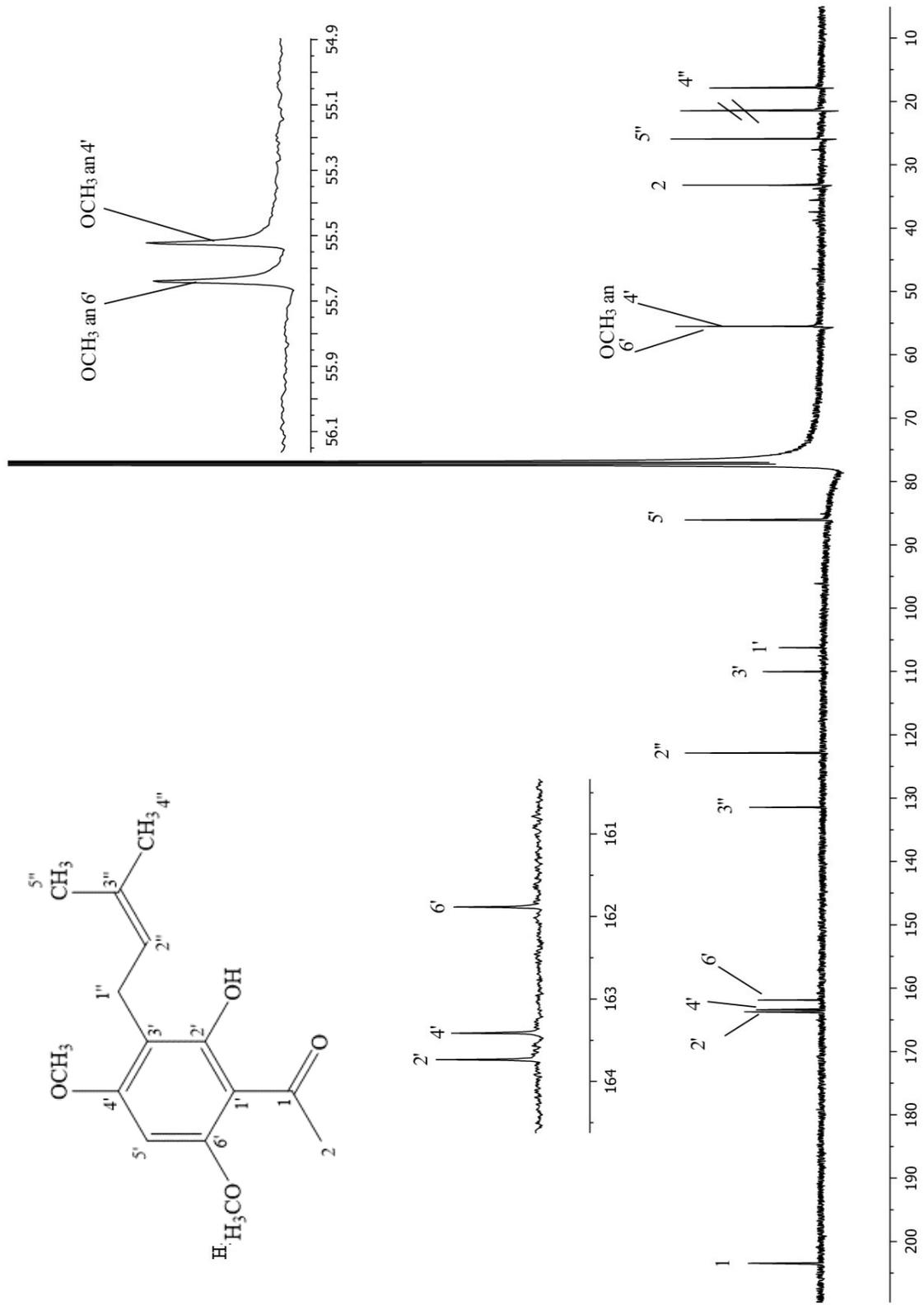
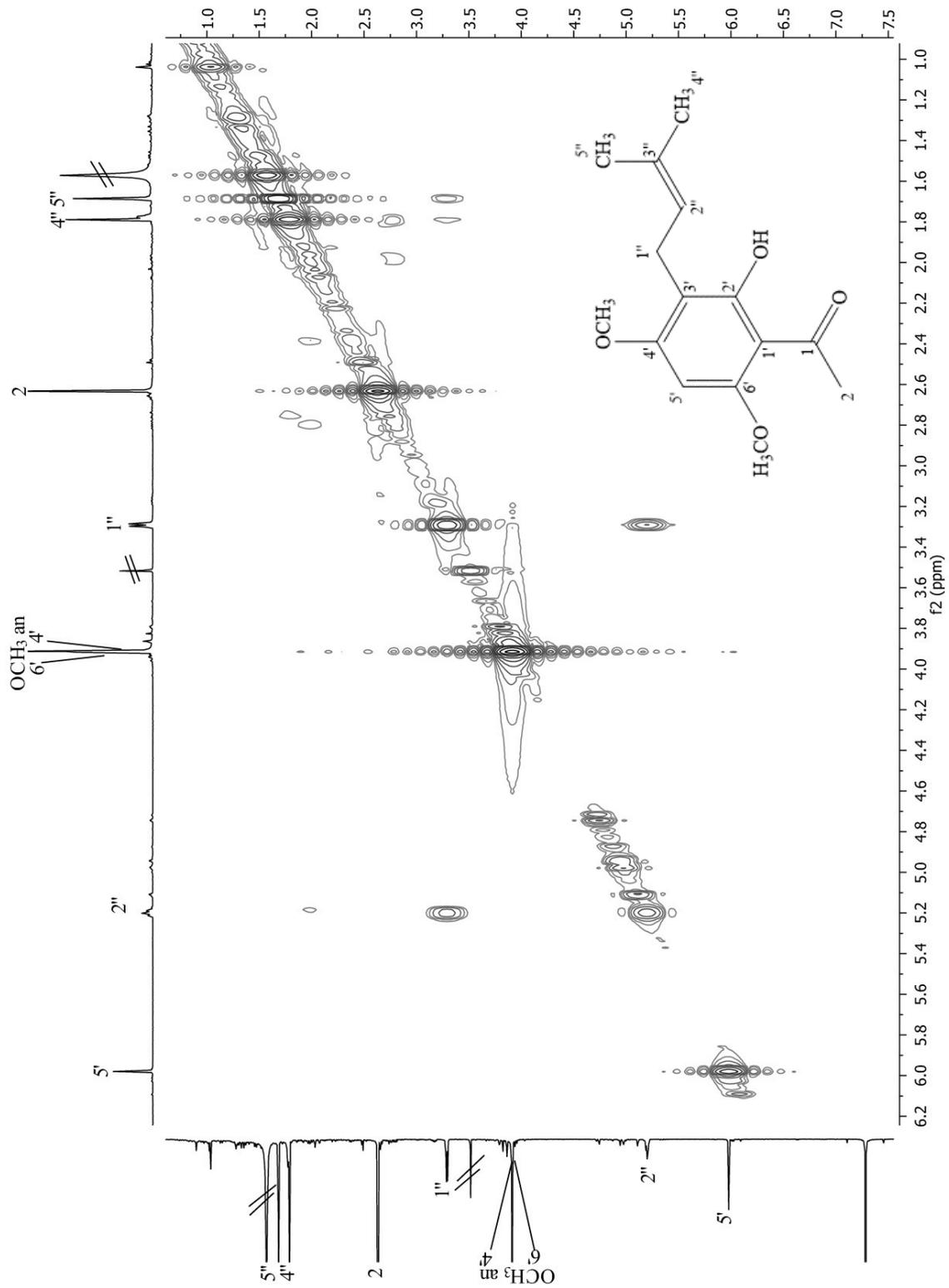


Abbildung 21:  $^{13}\text{C}$ -NMR von Verbindung 2 (125 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



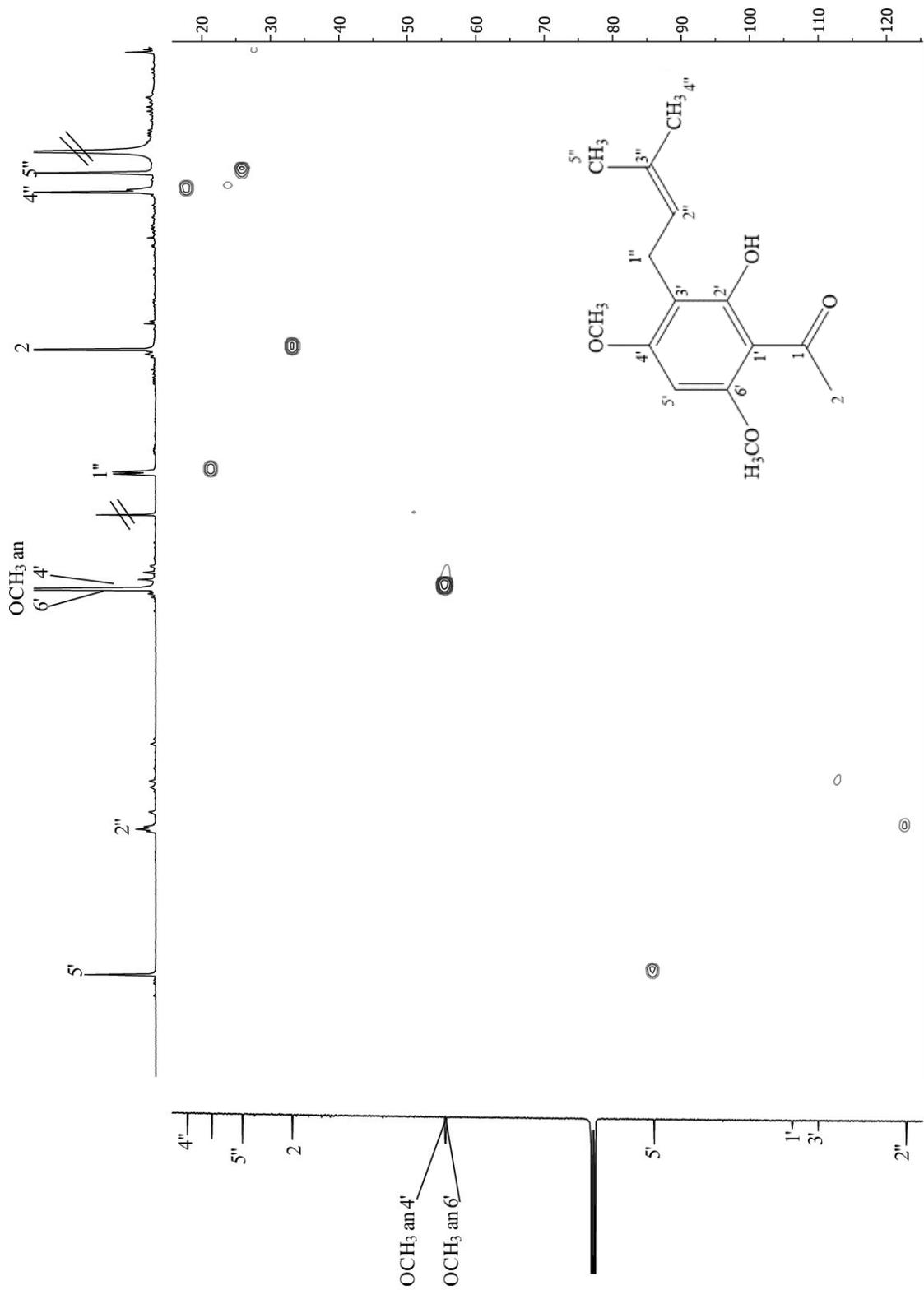


Abbildung 23: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 2 (500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

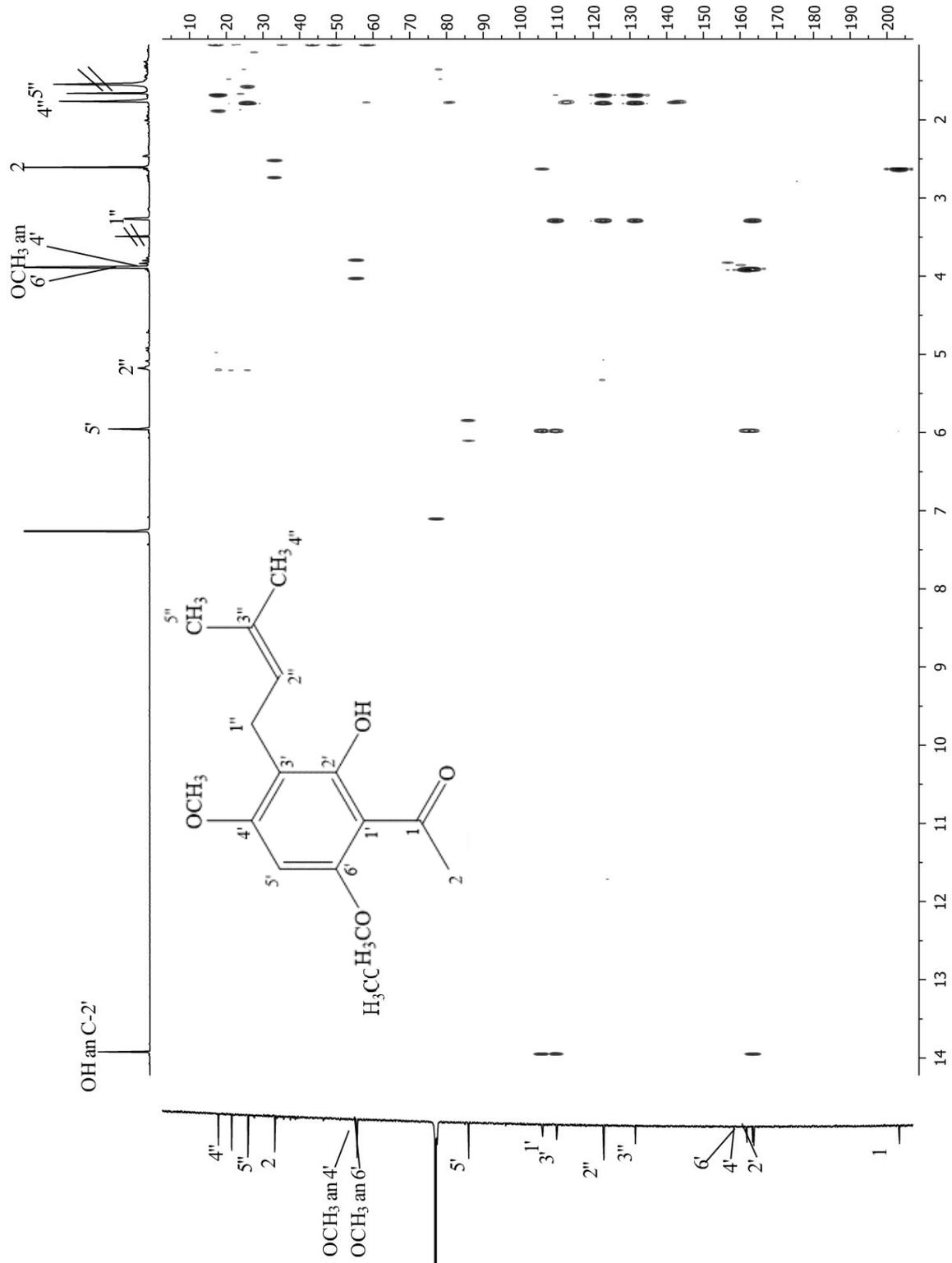
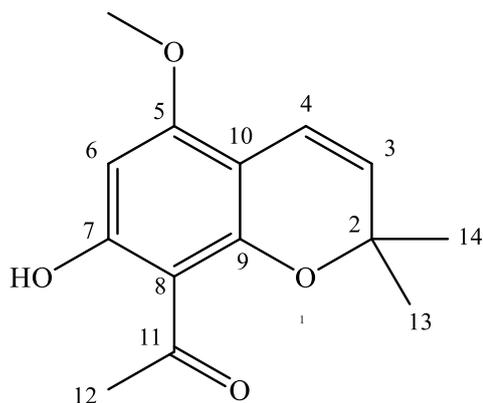


Abbildung 24: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 2 (500 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

## 2.3 Verbindung 3 (Alloevodionol)



Verbindung **3** wurde als gelbe, kristalline Substanz aus der Fraktion (MB-II-5) in einer Ausbeute von 23 mg isoliert. Im DC (Fließmittel DC-3) wurde **3** bei einem  $R_f$ -Wert von 0,56 detektiert. Im Gegensatz zu den Verbindungen **1** und **2** zeigte sich bei **3** vor dem Besprühen mit Naturstoffreagenz A eine dunkle Substanzzone bei Betrachtung im langwelligen UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm), die nach Besprühen als eine gelb-orangene Fluoreszenz auffiel. Mit Anisaldehyd-Sprühreagenz ergab sich eine grau-blaue Farbe (s. 6.1.1).

Die Aufnahme eines hochauflösenden ESI-Massenspektrums ergab ein Molekülion  $[M+H]^+$  mit einer Masse von  $m/z = 249.1128$ , woraus sich die Summenformel  $C_{14}H_{16}O_4$  ableiten lässt. (Abbildung 25)

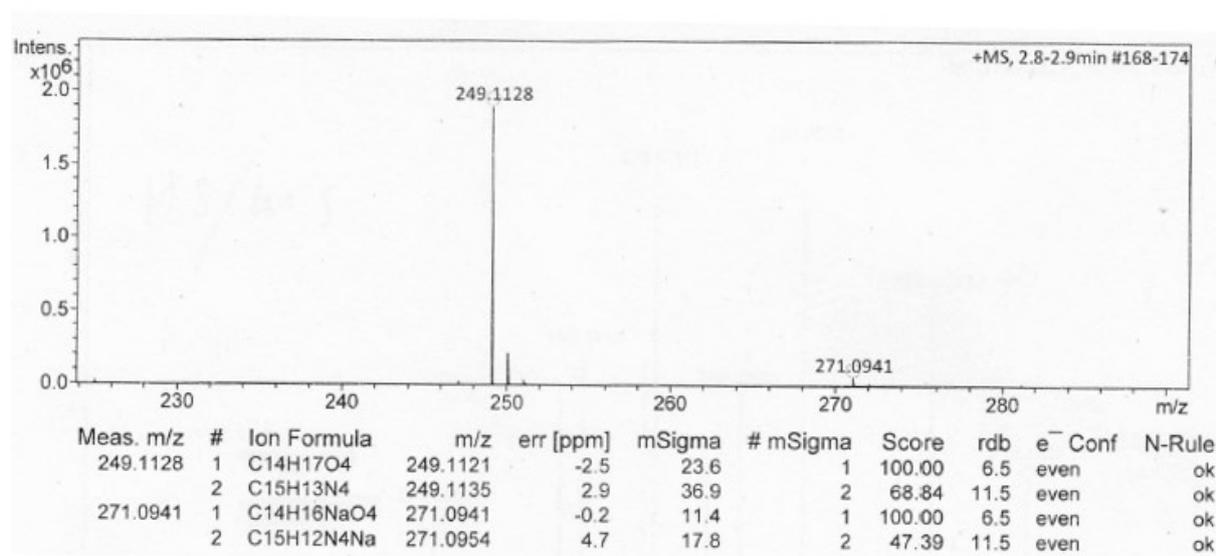


Abbildung 25: HRESIMS von Verbindung **3**

Damit besitzt Verbindung **3** einen Kohlenstoff und vier Protonen weniger als Verbindung **2**, was auf das Fehlen eines Methylethers (-CH<sub>2</sub>) und das Vorhandensein eines weiteren Doppelbindungsäquivalentes (-2 H) hindeutet. Ausgehend von der Struktur von Verbindung **2** könnte bei **3** ein Ringschluss zum Benzopyran erfolgt sein, was bei Acetophenonen in *Melicope* species häufig vorkommt. [88,89]

Zur weiteren Aufklärung der Struktur von **3** wurden ebenfalls ein- und zweidimensionale NMR Spektren aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 26 bis Abbildung 30, und Tabelle 3). Nach Betrachtung und Integration der Signale im <sup>1</sup>H NMR-Spektrum (Abbildung 26) konnte zunächst festgestellt werden, dass es sich um insgesamt sieben Signale für 16 Protonen handelt. Während die Anzahl der detektierten Protonen mit den bei der Massenspektrometrie ermittelten Zahl übereinstimmte, fanden sich im <sup>13</sup>C NMR Spektrum (Abbildung 27) nur 13 Signale für die 14 Kohlenstoffe. Aufgrund der Korrelationen im HSQC Spektrum (Abbildung 29) zwischen dem Singulett für 6 äquivalente Protonen bei  $\delta = 1.49$  ppm konnte das Kohlenstoffsignal bei  $\delta = 27.84$  ppm als ein Signal für zwei Methylkohlenstoffe erkannt werden. Fünf weitere Kohlenstoffe konnten aufgrund der im HSQC-Spektrum auftretenden Korrelationen mit ihren korrespondierenden Protonensignalen als ein Methyl- ( $\delta = 55.90$  ppm) und drei Methin-Kohlenstoffe ( $\delta = 92.43, 116.69, 124.73$  ppm) ermittelt werden. Bei dem Methylkohlenstoff sollte es sich aufgrund der Tieffeldverschiebung des Kohlenstoff- und Protonensignals wie bei **1** und **2** um einen aromatischen Methylether handeln. Bei den anderen acht Signalen ohne Protonen-Korrelationen handelt es sich um quartäre Kohlenstoffe.

Wie bei den Verbindungen **1** und **2** tritt bei  $\delta = 13.91$  ppm im <sup>1</sup>H NMR Spektrum ein Signal auf, das aufgrund seiner Lage auf eine phenolische OH-Gruppe hindeutet, welche eine Wasserstoffbrücke mit einer benachbarten Carbonylfunktion ausbildet. Das Signal dieses Carbonylkohlenstoffs (C-11) findet sich bei  $\delta = 204.29$  ppm im <sup>13</sup>C NMR Spektrum. Aufgrund der im HMBC (s.

Abbildung **30**) auftretenden Kopplung mit dem tieffeldverschobenen Signal für drei Protonen bei  $\delta = 2.67$  ppm (H-12), besitzt Verbindung **3**, in Analogie zu **1** und **2**, ebenfalls eine am Aromaten gebundene Acetylgruppe. Das Signal des zugehörigen Methylkohlenstoffs der Acetylgruppe (C-12) findet sich bei  $\delta = 34.77$  ppm im <sup>13</sup>C NMR-Spektrum.

Im HMBC zeigte das Hydroxylproton bei 13.81 ppm <sup>2</sup>J- und <sup>3</sup>J-Korrelationen zu drei Kohlenstoffen bei  $\delta = 166.54, 107.11$  und 92.43 ppm. Während es sich bei den ersten beiden Kohlenstoffen um quartäre aromatische Kohlenstoffe handelte, konnte der Kohlenstoff bei

$\delta = 92.3$  ppm aufgrund der Korrelation im HSQC mit dem Singulett für ein Proton bei  $\delta = 6.01$  ppm als aromatischer Methinkohlenstoff erkannt werden. (Abbildung 29 und Tabelle 3). Aufgrund der  $^3\text{J}$ -Kopplung des Kohlenstoffs bei 107.11 ppm mit den Methylprotonen der Acetylgruppe (H-12,  $\delta = 2.67$  ppm) handelte es sich um das aromatische C-Atom, an dem die Acetylgruppe gebunden ist (C-8), wodurch das Signal bei  $\delta = 166.54$  gleichzeitig als C-7 erkannt wurde, an dem die phenolische OH-Gruppe gebunden ist. (Abbildung 30)

Diese Zuordnung wird durch die Korrelationen des aromatischen Protons bei  $\delta = 6.01$  ppm (H-6) im HMBC-Spektrum bestätigt, das entsprechende Kreuzsignale mit C-7 ( $^2\text{J}$ ) und C-8 ( $^3\text{J}$ ) zeigt. H-6 besitzt zwei weitere Crosspeaks mit den Kohlenstoffsignalen bei  $\delta = 161.14$  und 102.93 ppm. Bei beiden Kohlenstoffen handelt es sich um quartäre aromatische C-Atome, die ihrerseits long-range Korrelationen mit den Methoxyprotonen bei  $\delta = 3.84$  ppm und einem von zwei Dubletts für je ein Proton bei  $\delta = 5.42$  ppm zeigten. Somit konnte das Kohlenstoffsignal  $\delta = 161.14$  dem methoxylierten C-5 und das Signal bei  $\delta = 102.93$  ppm dem Brückenkopfatom C-10 zugeordnet werden. Bei den beiden zum Dublett aufspaltenden Protonen handelt es sich um zwei Protonen an einer Doppelbindung, was durch ihre Kopplung im H,H-COSY-Spektrum und die für vicinale, cis-konfigurierte Protonen typische Kopplungskonstante (J) in Höhe von 9.91 Hz bestätigt wird.

Die Signale beider Protonen (H-3, H-4) zeigen im HMBC eine Korrelation mit dem Signal eines quartären Kohlenstoffs bei  $\delta = 77.79$  ppm, der zusätzlich mit dem Signal für die 6 Protonen der oben angesprochenen äquivalenten Methylgruppen korreliert. Aufgrund der chemischen Verschiebung dieses Signals handelt es sich um das C-2 eines Benzopyrans, das bei den meisten Chromenen, aufgrund der biosynthetischen Abstammung von prenylierten Acetophenonen, dimethyliert vorliegt. Über die Korrelation mit H-3 kann das Kohlenstoffsignal bei  $\delta = 156.2$  ppm als das zweite Brückenkopfatom des Benzopyranringsystems zugeordnet werden.

Bei Verbindung **3** handelt es sich demnach um 7-Hydroxy-5-methoxy-8-acetyl-2,2-dimethylbenzopyran. Diese Substanz ist auch unter dem Namen Alloeovodionol bekannt und wurde bereits in den Blättern der verwandten Arten *Melicope pteleifolia* [33,90] und *Melicope lunu-ankenda* [33] gefunden. In weiteren *Melicope*-Arten wurde Alloeovodionol als Bestandteil des ätherischen Öls beschrieben. [91] In den Blättern der in dieser Arbeit untersuchten *Melicope barbiger*a wurde diese Verbindung erstmals isoliert und identifiziert. Die hier ermittelten NMR Daten von Verbindung **3** stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten überein (s. Tabelle 3).

**Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen**

**Tabelle 3:**  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$ -NMR Daten von Verbindung **3** ( $\delta$  in ppm, 600/125 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	$^1\text{H}$ (J in Hz)		$^{13}\text{C}$	
	<b>3</b>	Alloevodionol [90]	<b>3</b>	Alloevodionol [90]
<b>2</b>	-	-	77.79	77.87
<b>3</b>	5.42, d (9.91)	5.42 d (10.0)	124.73	124.45
<b>4</b>	6.55, d (9.91)	6.55 d (10.0)	116.69	116.02
<b>5</b>	-	-	161.14	160.93
<b>6</b>	6.01 s	6.01 s	92.43	92.08
<b>7</b>	-	-	166.54	166.33
<b>8</b>	-	-	107.11	105.90
<b>9</b>	-	-	156.37	156.15
<b>10</b>	-	-	102.93	102.78
<b>11</b>	-	-	204.29	203.22
<b>12</b>	2.67 s	2.67 s	34.77	33.04
<b>13</b>	1.49 s	1.49 s	27.84	27.78
<b>14</b>	1.49 s	1.49 s	27.84	27.78
<b>OCH<sub>3</sub> an C-5</b>	3.84 s	3.84 s	55.90	55.68
<b>OH an C-7</b>	13.81 s	13.83 s	-	-

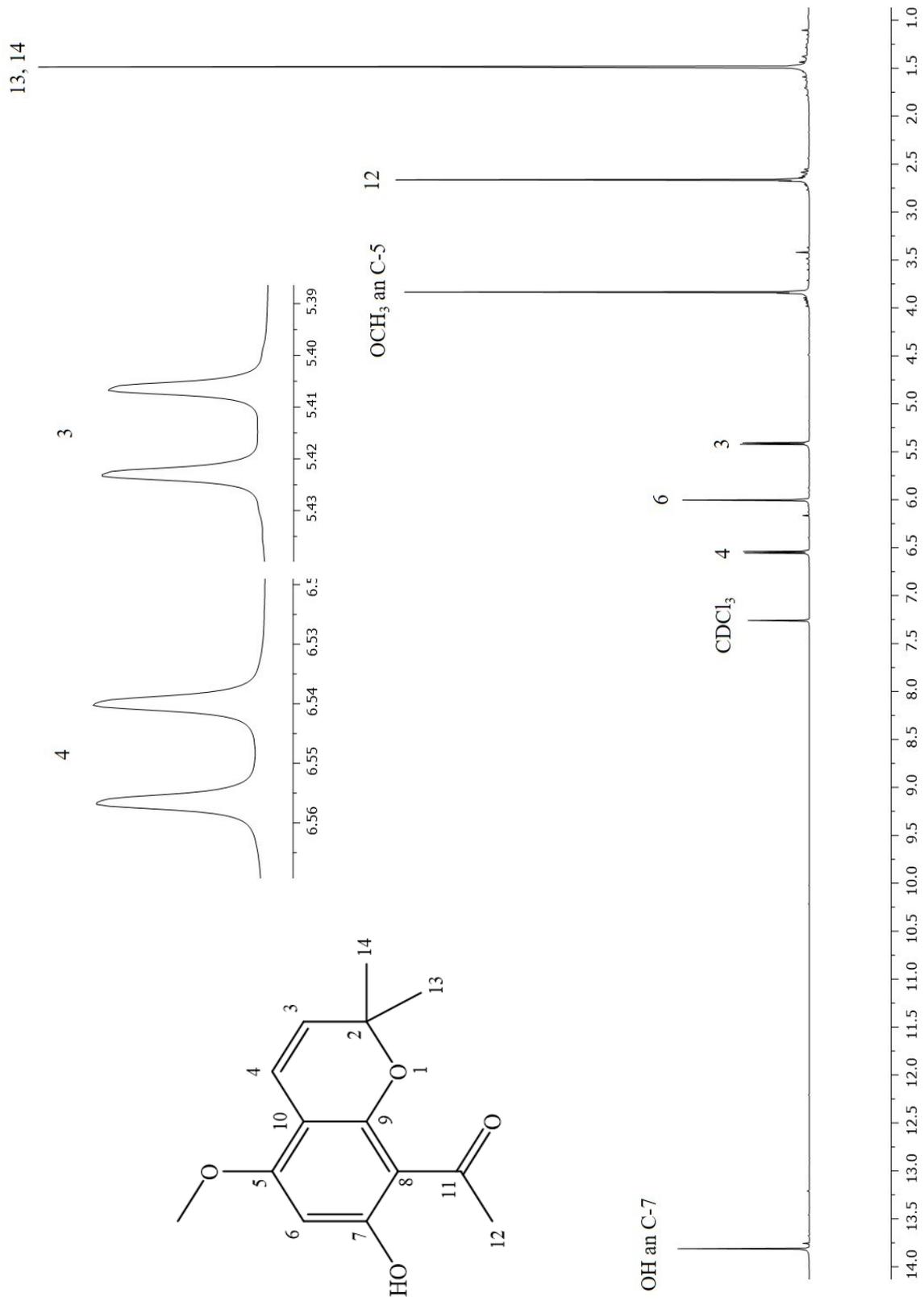


Abbildung 26: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Verbindung 3 (600MHz in CDCl<sub>3</sub>)

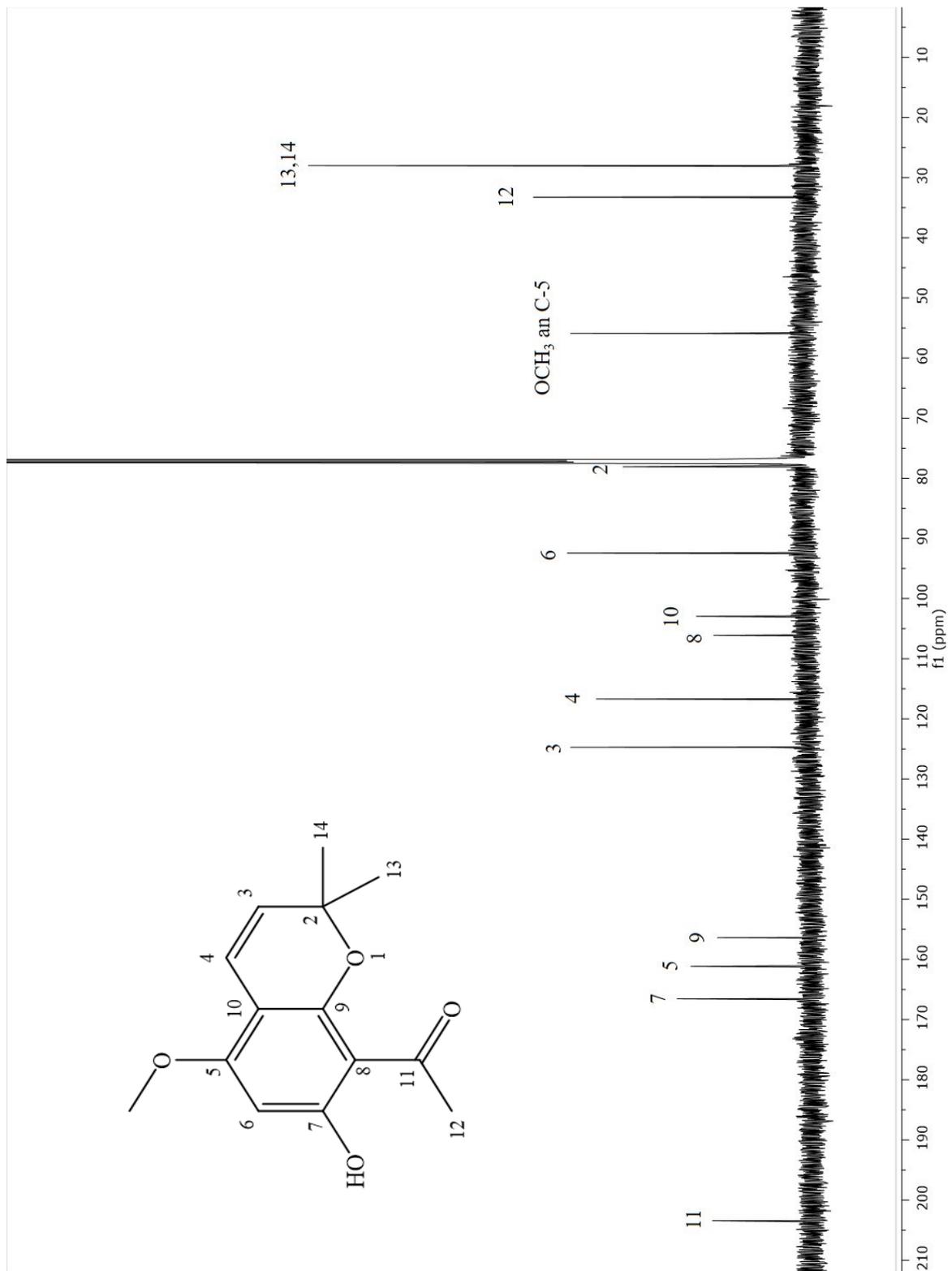


Abbildung 27:  $^{13}\text{C}$ NMR von Verbindung **3** (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

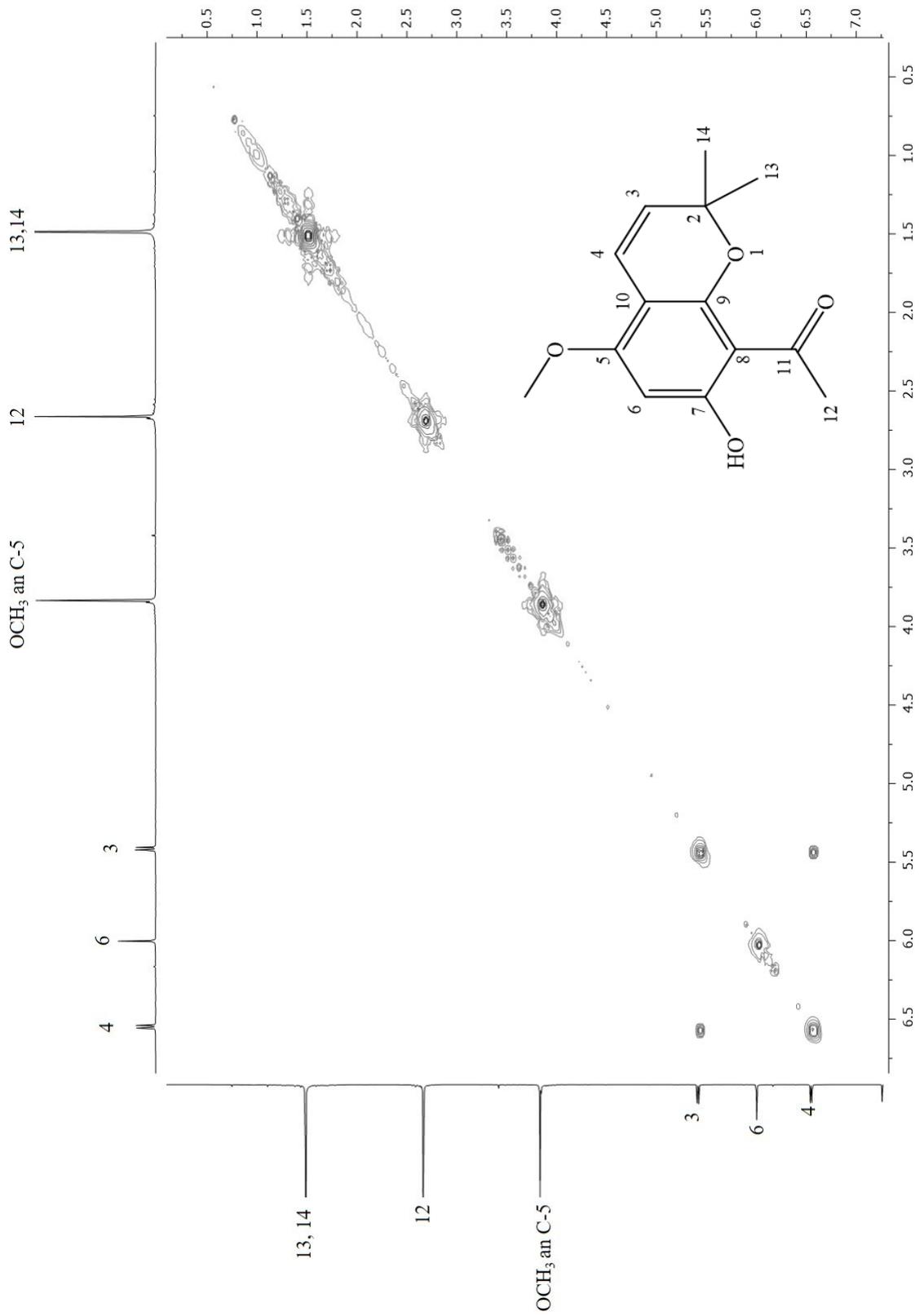


Abbildung 28: 2D-H,H-COSY-Spektrum von Verbindung 3 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

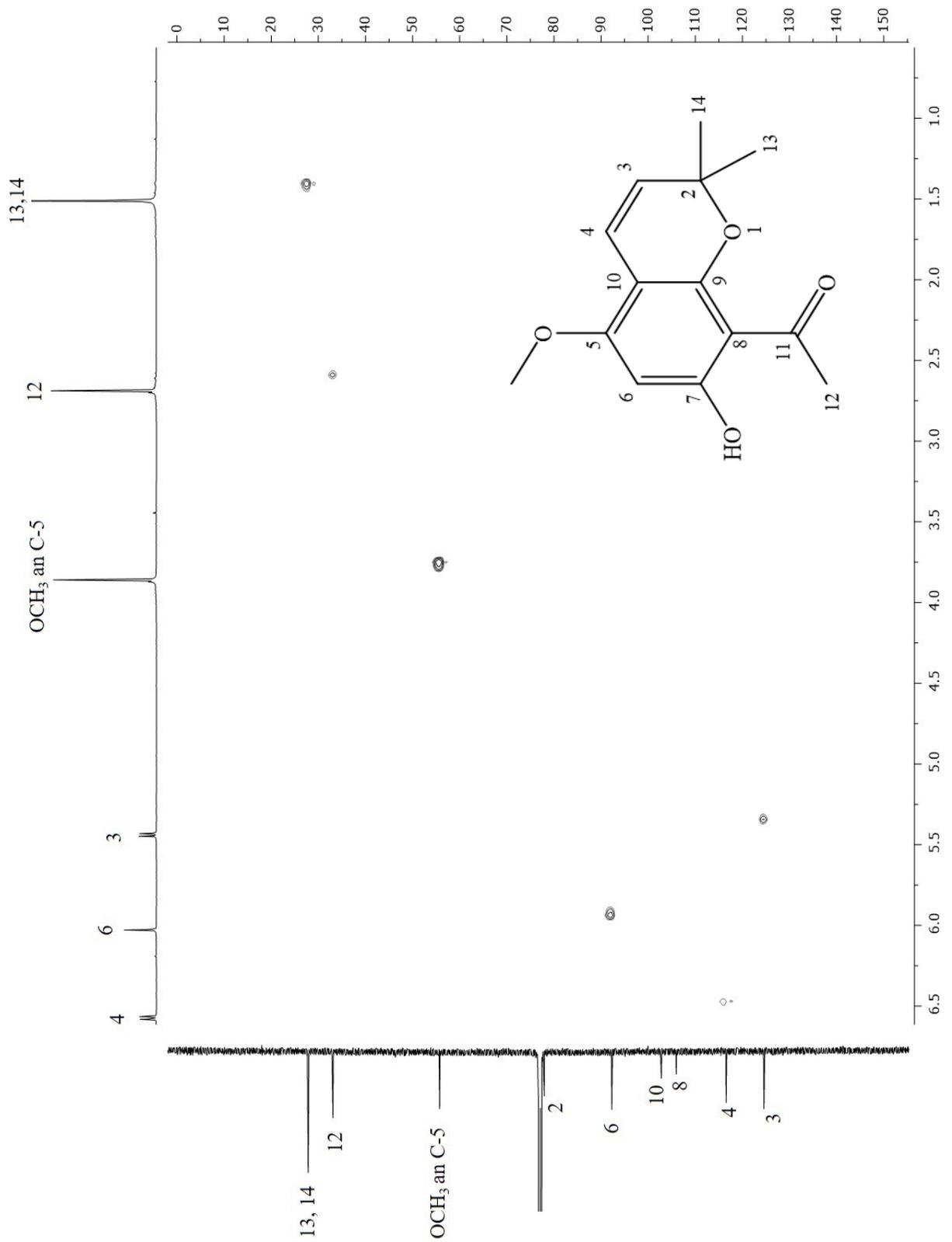


Abbildung 29: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 3 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

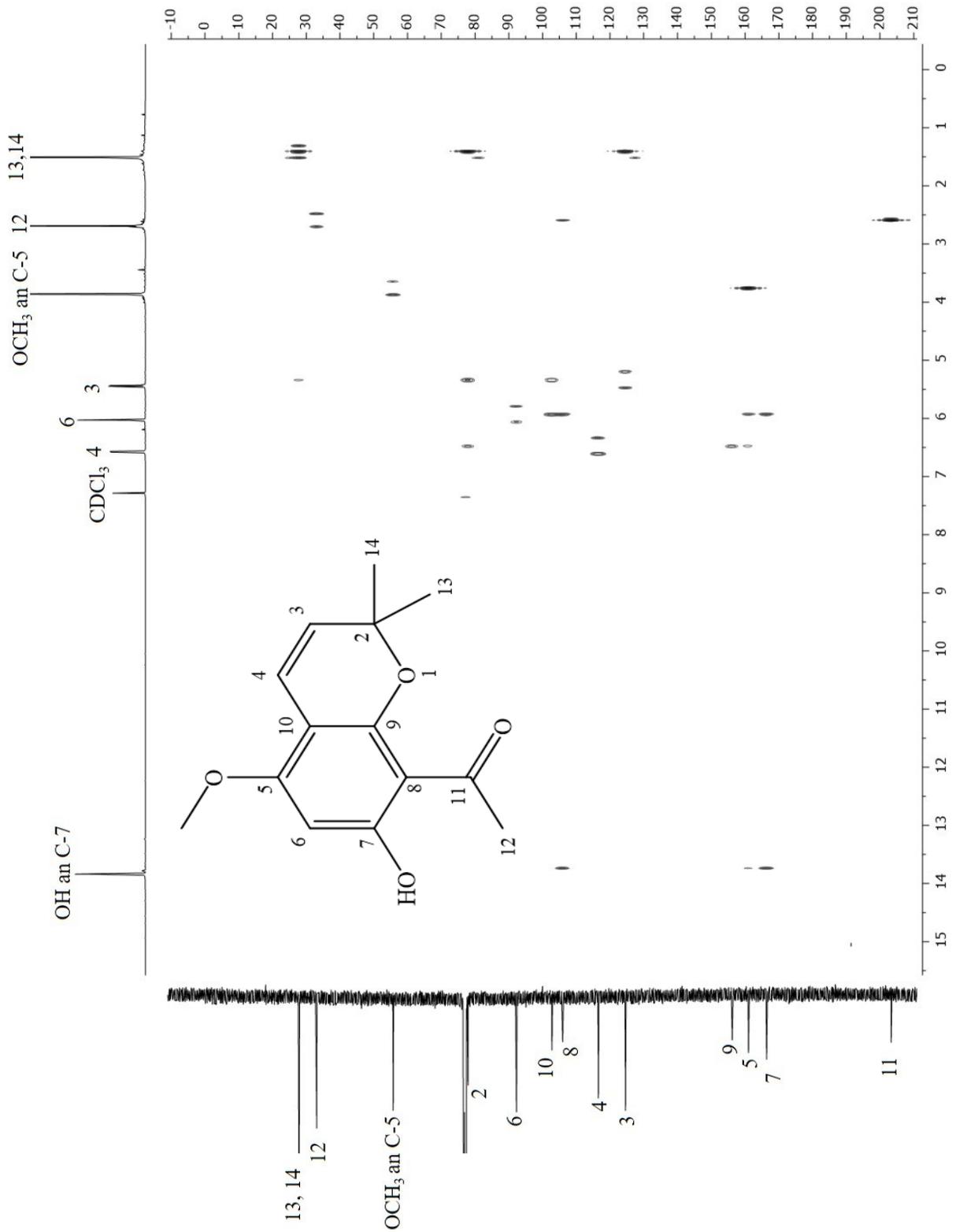
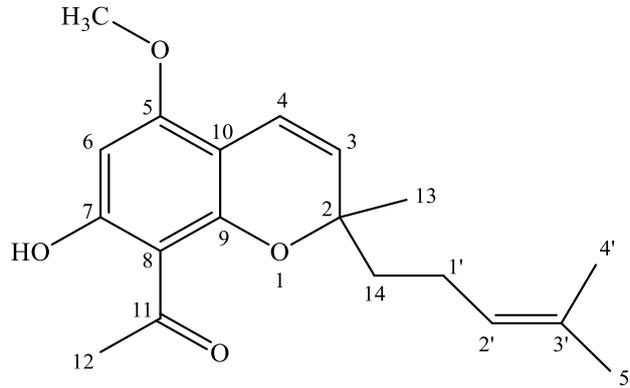


Abbildung 30: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 3 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

## 2.4 Verbindung 4 (Melibarbichromen A)



Verbindung **4** wurde als gelber, öliger Rückstand wie Verbindung **3** aus der Fraktion MB-II-4 in einer Ausbeute von 2,2 mg isoliert. Auf der DC im Fließmittel DC-3 trat **4** als dunkle Substanzzone bei einem  $R_f$ -Wert von 0,88 auf (s. Kap. 6.8). Dieser Substanzfleck zeigte nach Detektion mit Naturstoff-Reagenz A eine gelb-orange Fluoreszenz im UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm) und entwickelte nach dem Besprühen mit Anisaldehyd/ $H_2SO_4$ -Reagenz eine grau-blaue Farbe bei Betrachtung im Tageslicht. Die Substanz wies daher große Ähnlichkeit zu Verbindung **3** auf. Auch das UV-Absorptionsspektrum mit seinem Maximum bei 290 nm ähnelt dem von **3** (s. Kap. 6.8).

Mit Hilfe des hochauflösenden ESI-Massenspektrums konnte die Summenformel  $C_{19}H_{24}O_4$  für das Molekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z = 317.1752$  ermittelt werden.

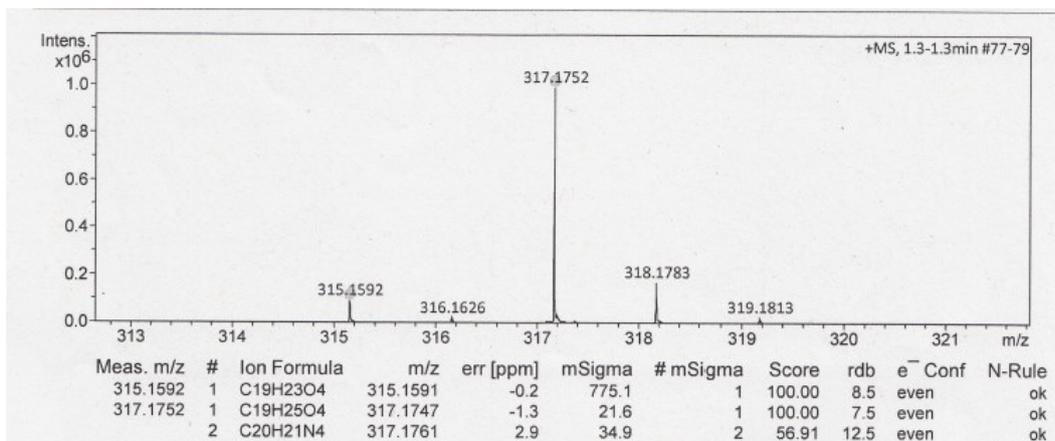


Abbildung 31: HRESIMS von Verbindung **4**

Verbindung **4** besitzt demnach fünf Kohlenstoffe und 9 Protonen mehr als **3**, was die Vermutung nahelegt, dass es sich bei **4** um ein prenyliertes Derivat von Verbindung **3** handeln könnte.

Für die Aufklärung der Struktur von **4** wurden ebenfalls ein- und zweidimensionale NMR Spektren aufgenommen (Abbildung 32 bis Abbildung 37). Das  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **4** zeigte erwartungsgemäß die Signale für 19 Kohlenstoffe (Abbildung 34), von denen neun Signale annähernd identische Shiftwerte aufwiesen, wie sie bei **3** gefunden worden waren (Tabelle 3). Wie bei Verbindung **3** konnte durch die Korrelation mit den im  $^1\text{H}$  NMR auftretenden Protonensignalen ein an 5,7,8-trisubstituiertes Benzopyran nachgewiesen werden. Auch bei **4** zeigt das Spektrum die Signale für eine Acetylgruppe an C-8 (Tabelle 4), die von einer in ortho Position angeordneten Hydroxylgruppe an C-7 begleitet wird. Das wasserstoffbrückengebundene Proton, befindet sich charakteristischerweise bei  $\delta = 13.84$  ppm. Das einzige im Spektrum auftretende aromatische Proton H-6 tritt bei  $\delta = 5.99$  ppm auf, beim annähernd gleichen Shiftwert wie er für **3** gefunden wurde. Demnach befindet sich auch der letzte noch fehlende Substituent, die  $\text{OCH}_3$ -Gruppe, wie bei **3** an C-5. Neben den drei Kohlenstoffsignalen der genannten Substituenten, finden sich im  $^{13}\text{C}$  NMR von **4** auch die sechs aromatischen Kohlenstoffe, die über die entsprechenden long-range Korrelationen im HMBC-Spektrum eindeutig zugeordnet werden konnten, bei fast Identischen Shiftwerten. Unterschiede fanden sich in den Spektren von **4** nur bei den Signalen der Protonen und Kohlenstoffe des Pyranrings sowie den dort vorhandenen Substituenten. Während die beiden Methylgruppen am C-2 von **3** jeweils nur ein Singulett für sechs äquivalente Protonen im  $^1\text{H}$ - ( $\delta = 1.49$  ppm) und nur ein Signal für zwei identische Kohlenstoffe ( $\delta = 27.8$  ppm) im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum verursachten, enthielten die Spektren von **4** nur ein Singulett für drei Protonen einer Methylgruppe bei  $\delta = 1.43$  ppm und ein korrespondierendes Methylkohlenstoffsignal bei  $\delta = 26.7$  ppm (Abbildung 34 und Tabelle 4). Die zweite Methylgruppe fehlt bei **4**, woraus geschlossen werden konnte, dass die anfangs vermutete Prenylierung an dieser Position erfolgt sein musste. Bestätigt wurde dies durch die typischen Signale für zwei endständige Methylgruppen und ein Methinproton bei  $\delta = 1.57$  ppm,  $\delta = 1.66$  ppm und  $\delta = 5.09$  ppm (H-4', H-5' und H-2'). Aufgrund des Kreuzsignals zwischen H-2' und dem Proton bei  $\delta = 2.10$  ppm im H,H-COSY Spektrum konnte das Signal für H-1' im deutlich höheren Feld gefunden werden als bei Verbindung **2** (Abbildung 20 und Tabelle 2). H-1' koppelt seinerseits mit dem Multiplett für zwei Protonen bei  $\delta = 1.79$  ppm, welches H-14 zugeordnet werden konnte. Dies wurde zusätzlich durch die im HMBC-Spektrum von **4** gefundenen Korrelationen bestätigt.

Verbindung **4** konnte daher zweifelsfrei als [7-Hydroxy-5-methoxy-2-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-2*H*-chromen-8-yl]-ethan-1-on identifiziert werden. Eine Literaturrecherche in den Chemical Abstracts ergab mit Scifinder® [49], dass diese Verbindung bis dato lediglich als Zwischenprodukt in der Synthese von Boesenbergin B aus der Pflanze *Boesenbergia pandurata* (Zingiberaceae) beschrieben wurde. [92] Daher handelt es sich bei **4** um eine erstmals in der Natur gefundene Verbindung, für die der Trivialname „Melibarbichromen A“ vorgeschlagen wird.

Wenn man die Struktur von **4** mit dem Alloevodionol **3** vergleicht, ausgehend von der Annahme, dass **3** unter Ringschluss aus einem prenylierten Acetophenon entsteht, dann wird die Vorstufe von **4** wahrscheinlich ein mit einem Monoterpen substituiertes Acetophenon sein (s. Abbildung 246, Kap. 5.1. Diskussion). Eine Prenylierung an einer Methylgruppe eines 2,2-Dimethylchromens ist eher unwahrscheinlich.

**Tabelle 4:**  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$ -NMR Daten von Verbindung **4** ( $\delta$  in ppm, 600 MHz/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	-	80.9
<b>3</b>	5.38 d (10.1)	122.9
<b>4</b>	6.59 d (10.1)	116.79
<b>5</b>	-	161.19
<b>6</b>	5.99 s	91.85
<b>7</b>	-	166.70
<b>8</b>	-	106.01
<b>9</b>	-	156.66
<b>10</b>	-	102.69
<b>11</b>	-	202.91
<b>12</b>	2.66s	33.12
<b>13</b>	1.43 s	26.7
<b>14</b>	1.79 m	41.72
<b>1'</b>	2.10m	23.04
<b>2'</b>	5.09 tt (7.1/1.5)	123.62
<b>3'</b>	-	132.85
<b>4'*</b>	1.57 s	17.34
<b>5'*</b>	1.66, s	25.93
<b>OCH<sub>3</sub> an C-5</b>	3.83 s	55.68
<b>OH an C-7</b>	13.84 s	-

\*Zuordnung austauschbar

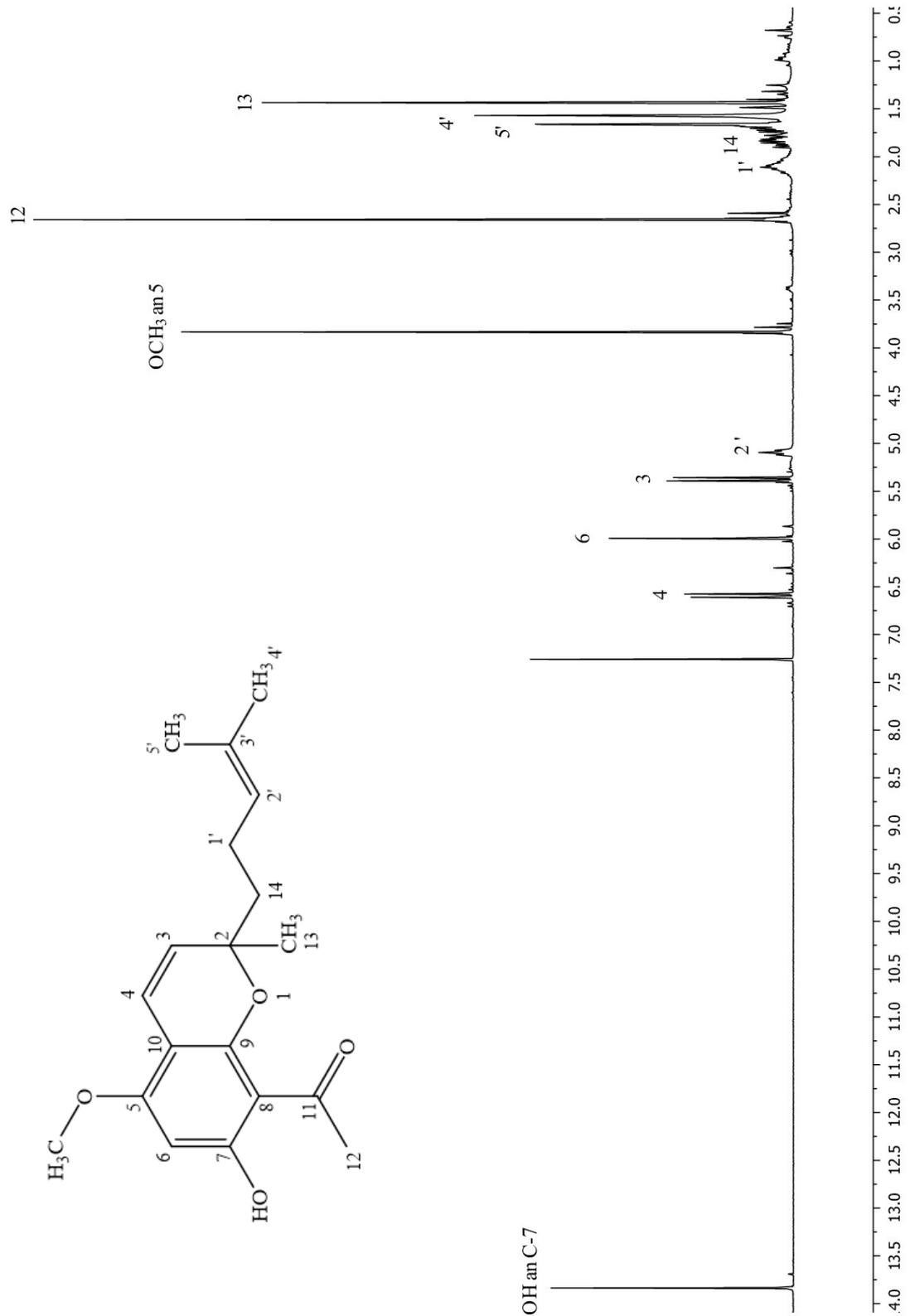


Abbildung 32: <sup>1</sup>H NMR Spektrum von Verbindung 4 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

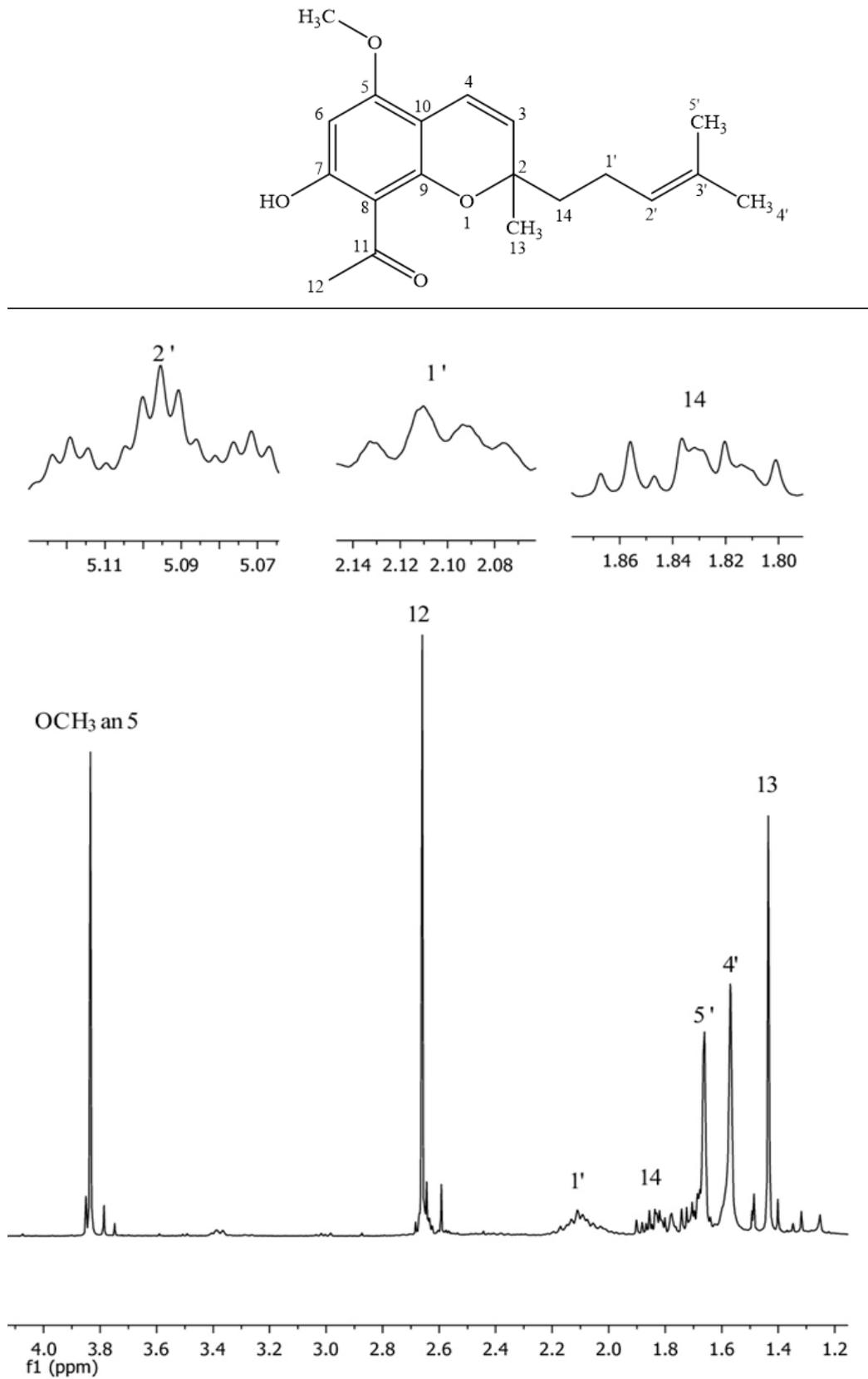


Abbildung 33: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von Verbindung 4 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

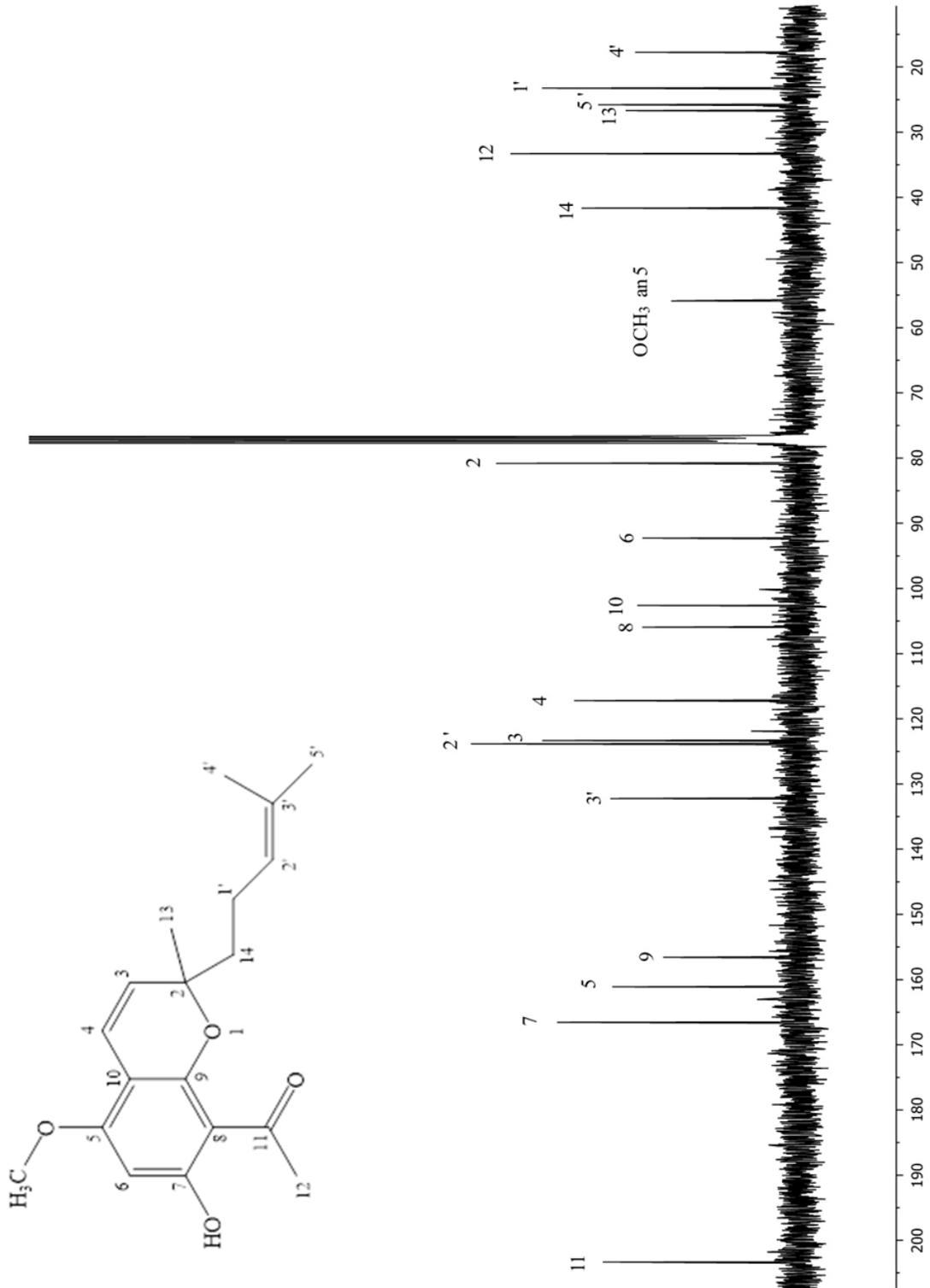


Abbildung 34: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Verbindung 4 (150 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

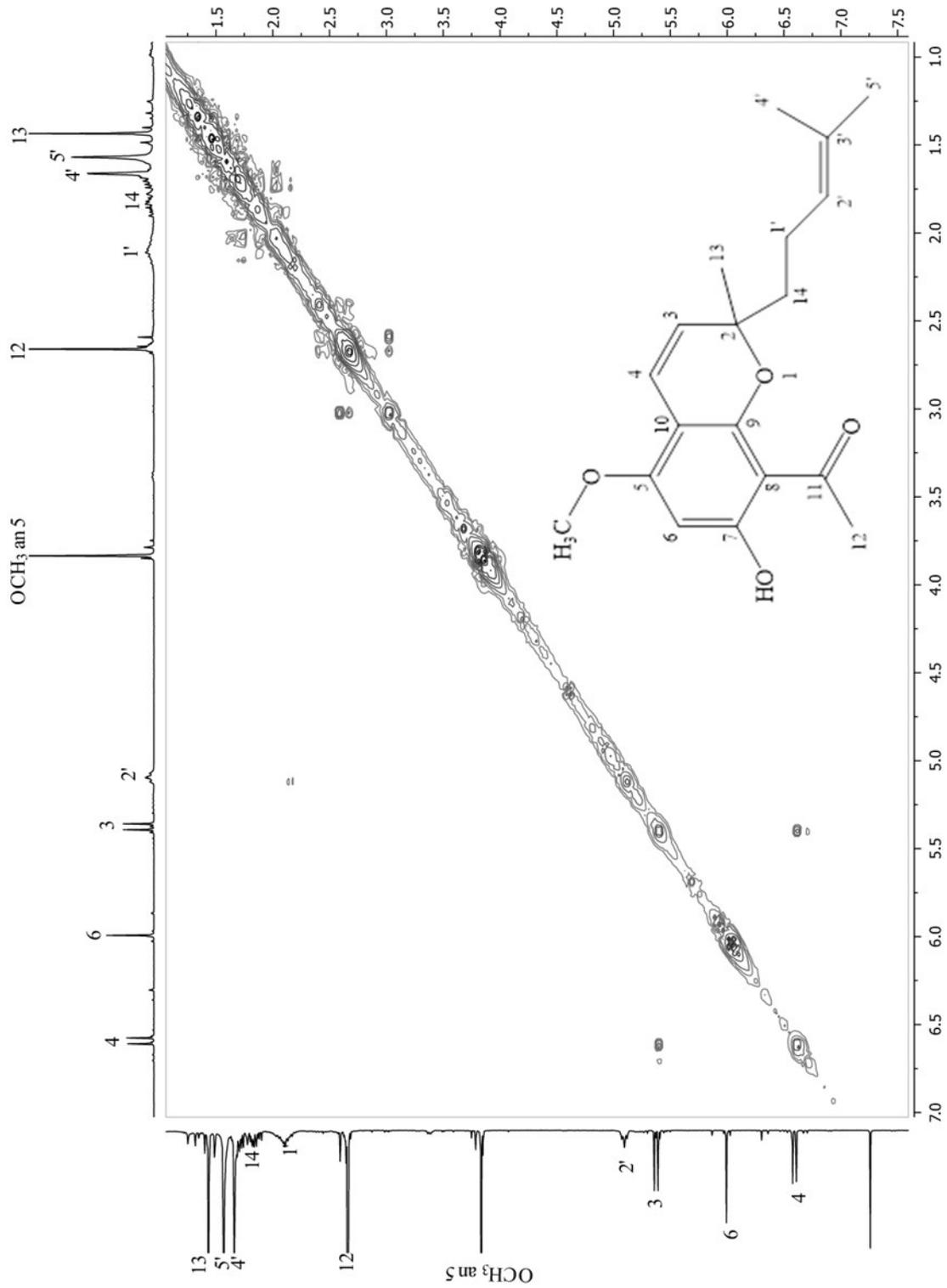


Abbildung 35: 2D-H,H-COSY-Spektrum der Verbindung 4 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

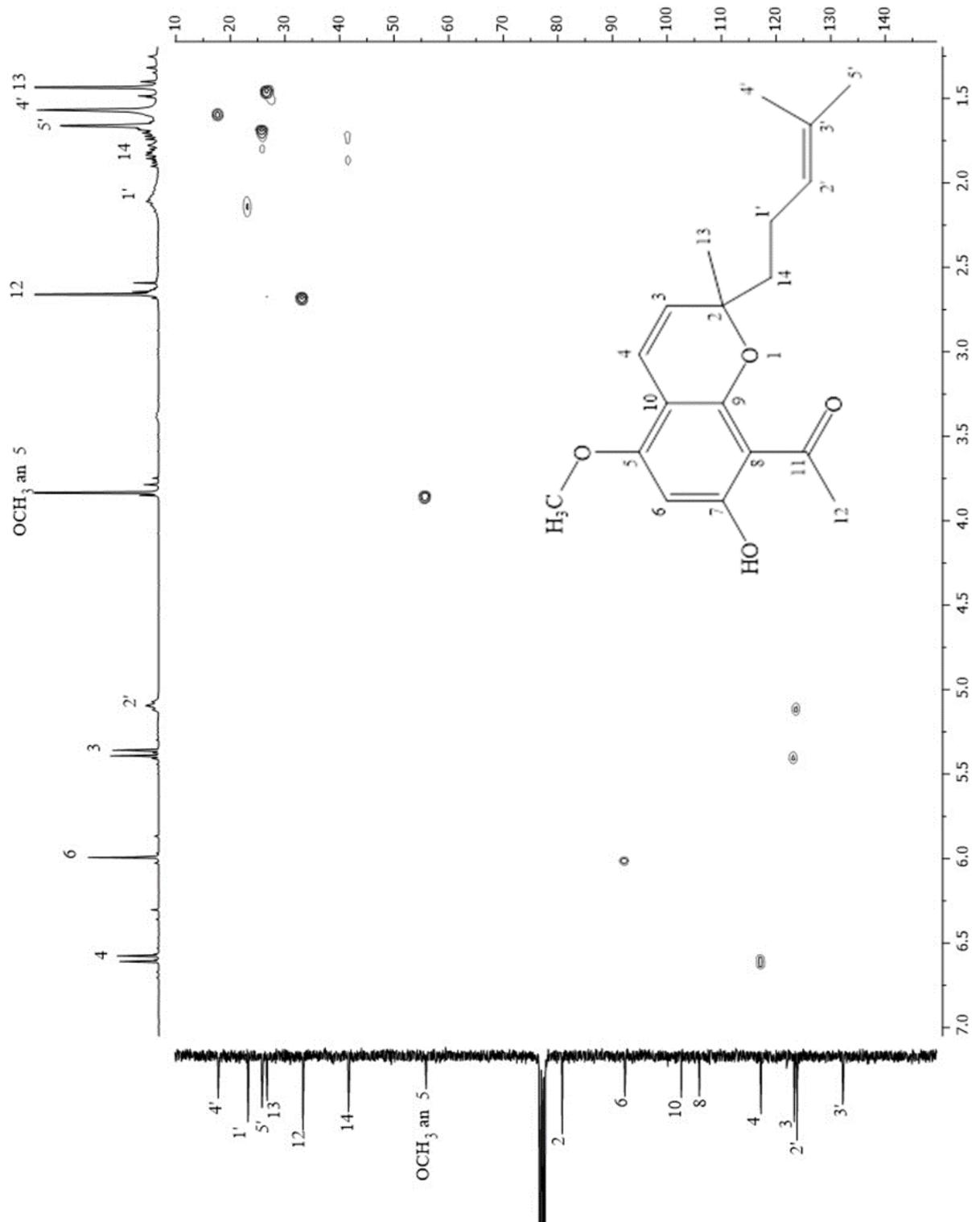


Abbildung 36: 2D-HSQC-Spektrum der Verbindung 4 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

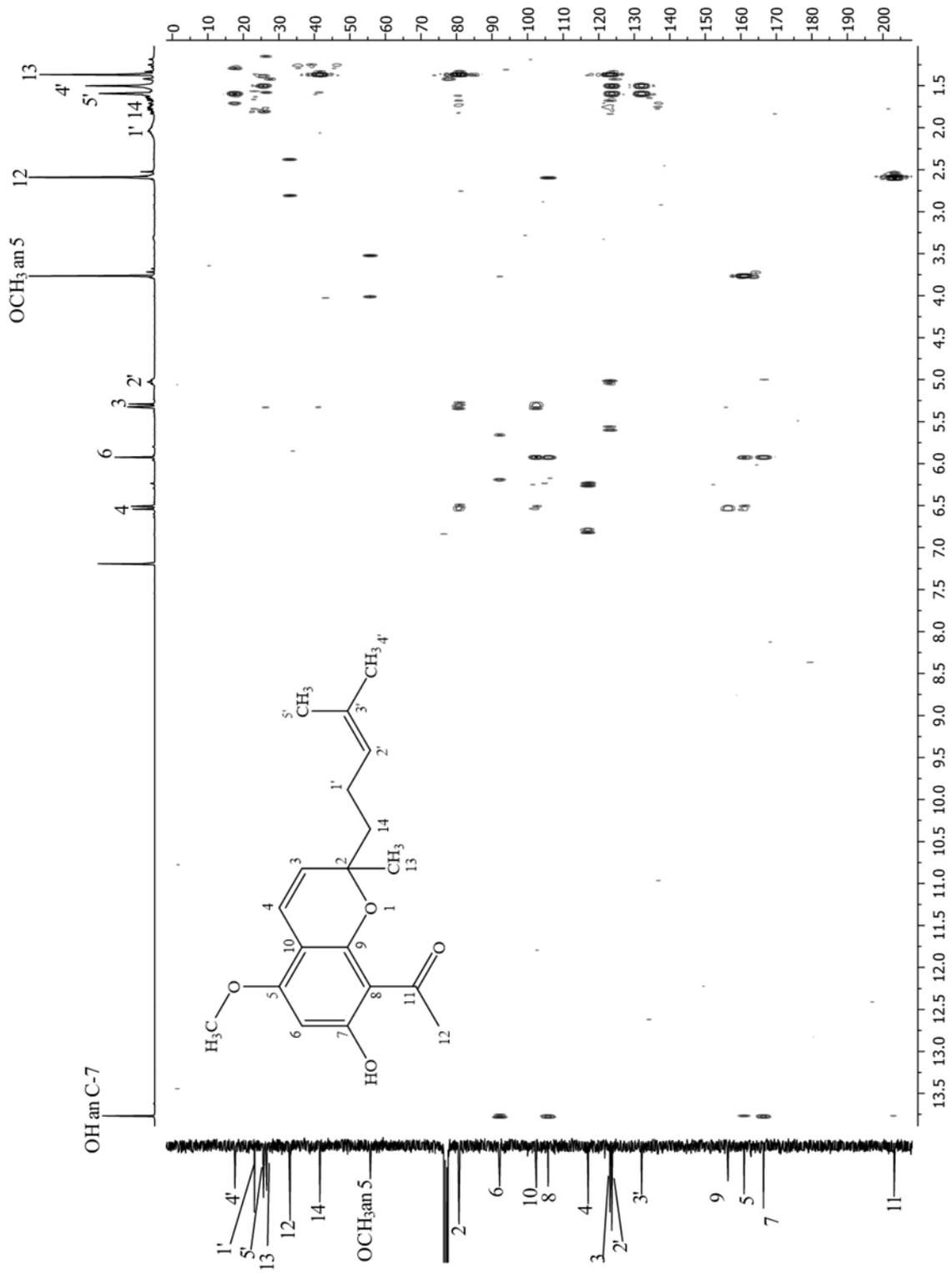
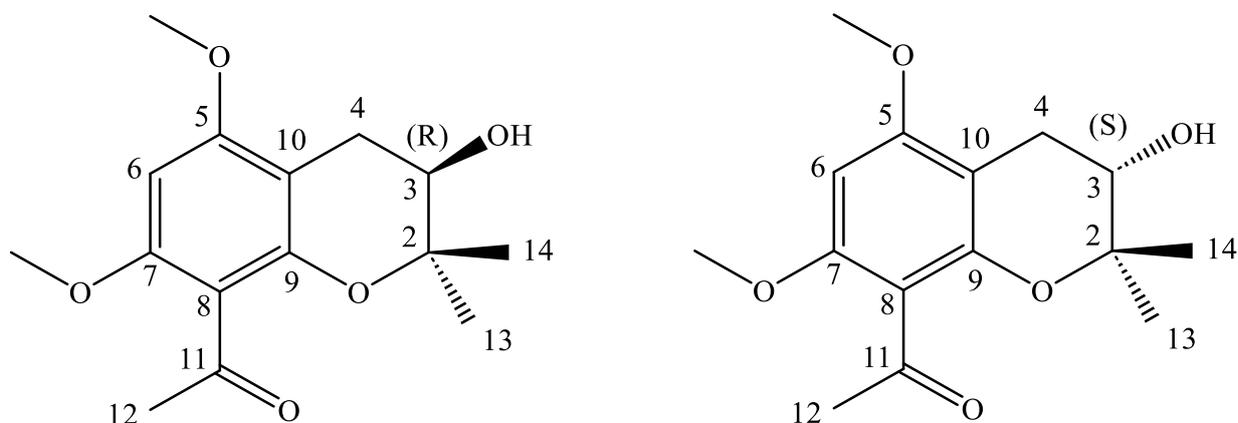


Abbildung 37: 2D-HMBC-Spektrum der Verbindung 4 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

## 2.5 Verbindung 5 (Melibarbichromen B)

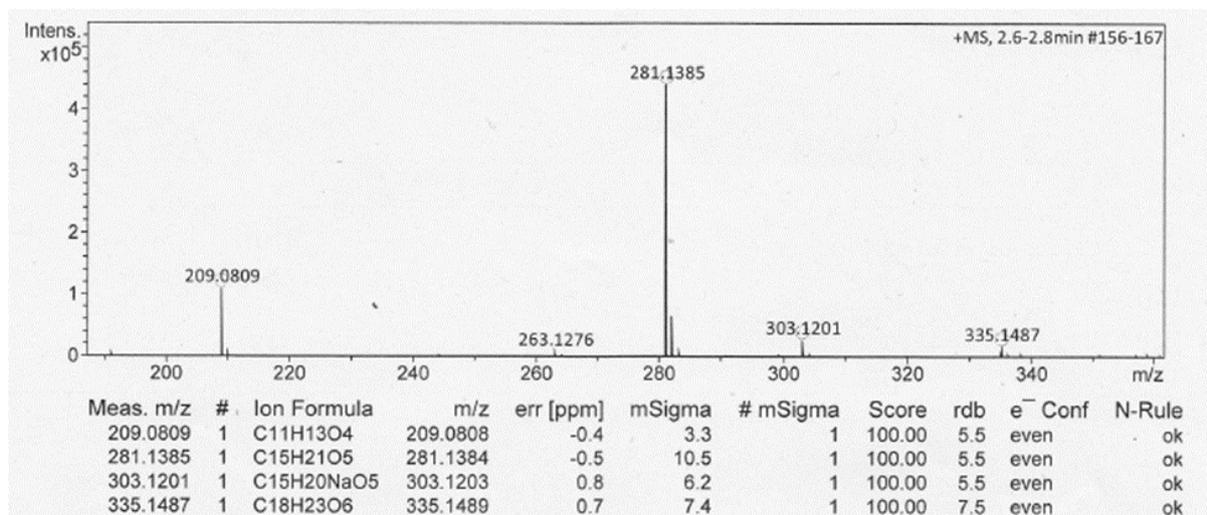


Verbindung **5** wurde als farbloser, öliger Rückstand aus der Fraktion MB.D-IV-10-4 in einer Ausbeute von 1,8 mg isoliert. Im DC (Fließmittel DC-3) fand sich **5** bei einem  $R_f$ -Wert von 0,44. Im Vergleich zu den Verbindungen **3** und **4** lief diese Substanz deutlich niedriger, was als ein Indiz für eine höhere Hydrophilie gedeutet werden konnte (siehe Kap. 6.1.1).

Im Gegensatz zu den beiden prenylierten Acetophenonen **1** und **2** und den Benzopyranen **3** und **4** zeigte sich bei **5** nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz A keine gelbe oder gelb-orange Substanzzone im UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm), sondern es trat eine hellblaue Fluoreszenz auf. Durch Besprühen der Dünnschichtplatte mit Anisaldehyd/ $H_2SO_4$  Reagenz ergab sich eine hellbraune Färbung der Substanzzone von **5** (siehe Kap. 6.1.1).

Wie bei den Verbindungen **3** und **4** liegt das UV-Maximum von **5** bei 280 nm, was vermuten ließ, dass es sich bei Verbindung **5** ebenfalls um ein Benzopyran handeln könnte. (siehe Kap. 6.9).

Das hochauflösende ESI-MS-Spektrum zeigte das Molekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z = 281.1385$  (s. Abbildung 38) Ausgehend von dieser genauen Masse konnte die Summenformel  $C_{15}H_{20}O_5$  ermittelt werden.



**Abbildung 38:** HRESIMS von Verbindung **5**

Verbindung **5** war um 31 Masseneinheiten schwerer als Alloevodionol (**3**), welches einen Kohlenstoff-, einen Sauerstoff- sowie vier Wasserstoffe weniger im Molekül besitzt. Die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente von **5** ergab, dass die Substanz nur sechs Doppelbindungsäquivalente besitzt und damit eines weniger als Verbindung **3**. Dies ließ vermuten, dass es sich bei **5** um ein Tetrahydrobenzopyran handeln könnte.

Die endgültige Struktur von **5** wurde anschließend mit Hilfe der <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR-Spektren sowie der zweidimensionalen HSQC-, HMBC- und H,H-COSY-Spektren aufgeklärt.

Das <sup>13</sup>C-NMR zeigte die Signale für insgesamt 15 Kohlenstoffe, wie es durch die ermittelte Summenformel zu erwarten war. Bezüglich der Lage der Signale wies das Spektrum insgesamt große Ähnlichkeit zum Spektrum von **3** auf, bei genauerer Betrachtung fiel aber auf, dass im Spektrum von **5** zwei Kohlenstoffsignale bei  $\delta_C = 55.65$  ppm und  $\delta_C = 56.22$  ppm auftreten, woraus gefolgert werden konnte, dass **5** im Gegensatz zu **3** eine aromatisch gebundene Methoxygruppe mehr besitzt. Die korrespondierenden Protonensignale wurden als Singulets für jeweils drei Protonen über die Korrelation im HSQC-Spektrum (Abbildung 43) bei  $\delta = 3.80$  ppm und  $\delta = 3.84$  ppm erkannt. Darüber hinaus fiel ebenfalls auf, dass Verbindung **5** im Gegensatz zu Alloevodionol keine Kohlenstoff- und Protonensignale im typischen Shiftbereich für ungesättigte Kohlenstoffe besitzt, so dass es sich um ein 2,3-Dihydrobenzopyran handeln sollte. Im Gegensatz zu Alloevodionol konnten dementsprechend keine olefinischen Protonen (H-3 und H-4) gefunden werden. Stattdessen fanden sich zwei Dublett vom Dublett Signale für eine CH<sub>2</sub>-Gruppe bei  $\delta = 2.62$  ppm und  $\delta = 2.84$  ppm (H-4a und H-4b) und ein Triplett für ein Proton bei  $\delta = 3.77$  ppm (H-3) als jeweiligen Kopplungspartner. Aufgrund der Lage dieses

Protonensignals und des zugehörigen Kohlenstoffs bei  $\delta = 69.3$  ppm musste es sich um einen hydroxylierten Kohlenstoff handeln (s. Abbildung 40 und Abbildung 42).

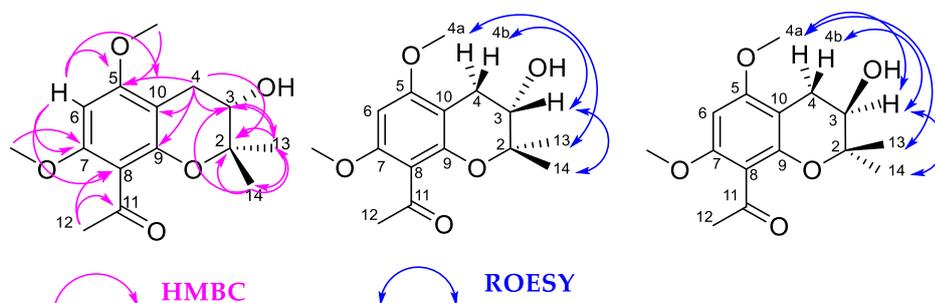
Die Protonen H-4a und H-4b zeigten jeweils eine geminale Kopplung von 17.1 Hz zueinander und eine vicinale Kopplung von 5.50 Hz (H-4a) und 5.2 Hz (H-4b) mit dem Proton an C-3, die sich beim Dublett vom Dublett mit Tripletthabitus im Signal von H-3 wiederfanden. Aufgrund der ungefähr gleich großen vicinalen Kopplung kann davon ausgegangen werden, dass H-3 räumlich etwa in der Mitte zu H-4a und H-4b angeordnet ist bzw. den ungefähr gleichen Abstand zu beiden Protonen besitzt.

Die Auswertung der 2D-COSY, HSQC und HMBC Spektren (Abbildung 42, Abbildung 43 und Abbildung 44) bestätigte, dass es sich bei **5** um ein hydroxyliertes 2,2-Dimethyltetrahydropyran handelt. Aufgrund der  $^3\text{J}$ -Kopplung im HMBC zwischen den Protonen der Methylgruppen an C-2 und dem Methinkohlenstoff bei  $\delta = 69.3$  ppm, konnte zweifelsfrei geklärt werden, dass es sich bei C-3 um den hydroxylierten Kohlenstoff im Benzopyranring handelt. Alle übrigen Kopplungen bestätigen diesen Befund. Das Hydroxylproton konnte durch Austausch mit Deuterium nicht identifiziert werden, das Vorhandensein der Hydroxylgruppe wurde aber später durch Bildung von Mosherestern zweifelsfrei bestätigt (s. unten).

Die Substitution des aromatischen Rings wies große Ähnlichkeit zu Verbindung **3** auf. Auch bei **5** befindet sich eine aromatische gebundene Acetylgruppe am C-8, deren Kohlenstoffsignale bei  $\delta = 201.6$  ppm (C=O, C-11) und 32.7 ppm (CH<sub>3</sub>, C-12) auftreten und sich nur in Bezug auf das Carbonylsignal geringfügig von den bei **3** ermittelten Werten unterscheiden. Dieser Unterschied ist durch die Methylierung der ortho-ständigen OH-Gruppe am C-7 erklärbar, da bei **5** durch die Methoxygruppe an dieser Position keine Wasserstoff Brücke zwischen der aromatischen Hydroxylgruppe und dem Carbonylsauerstoff am C-11 mehr gebildet werden kann. Durch die wegfallende Entschirmung verschiebt sich das Signal für den Carbonylkohlenstoff um ca. 2 ppm zum höheren Feld. Als weitere Substituenten am Aromaten wurden wie bei **3** eine Methoxygruppe am C-5 ( $\delta_{\text{C}} = 55.7$  ppm und  $\delta_{\text{H}} = 6.07$  ppm) und ein Proton am C-6 ( $\delta_{\text{C}} = 88.1$  ppm und  $\delta_{\text{H}} = 3.84$  ppm) gefunden.

Die Abbildung 39 zeigt die im HMBC und COSY Spektrum gefundenen Schlüsselsignale für die Strukturaufklärung. Das aromatische Proton H-6 zeigt  $^2\text{J}$ - und  $^3\text{J}$ -Korrelationen mit den quartären Kohlenstoffen C-5, C-7, C-8 und C-10 im HMBC-Spektrum (Abbildung 44 und Tabelle 5). Während die Kohlenstoffe C-5 und C-7 jeweils eine  $^3\text{J}$ -Korrelation mit den dort gebundenen Methoxygruppen aufweisen, gibt es eine entsprechende Korrelation zwischen der Methylgruppe des Acetylrestes (H-12) und dem C-8 bei  $\delta_{\text{C}} = 113.8$  ppm. Über eine  $^3\text{J}$

Korrelation zwischen den Protonen bei  $\delta = 2.62$  und  $\delta = 2.84$  ppm (H-4a und H-4b) mit den Kohlenstoffsignalen bei  $\delta = 113.8$  ppm und  $100.9$  ppm, konnten diese Signale den quartären Kohlenstoffen C-8 und C-10 zugeordnet werden, wodurch sich auch die anderen aromatischen C-Atome sowie die Positionen der beiden Methoxygruppen eindeutig zuordnen ließen.



**Abbildung 39:** Key HMBC Korrelationen und ROESY Korrelationen der Verbindung **5**; entnommen aus [93]

Die Zuordnung der Protonen und Kohlenstoffe des Pyranrings wurden ebenfalls durch Auswertung von COSY, HSQC sowie HMBC bestätigt. (s. Abbildung 41 bis Abbildung 44)

Um die Stereochemie des sekundären Alkohols an C-3 aufzuklären, wurde zunächst ein ROESY Spektrum aufgenommen (Abbildung 46). Beim ROESY Experiment wird der Nuclear-Overhauser-Effekt im rotierenden Koordinatensystem gemessen. Anhand der auftretenden Cross-Peaks, die die Wechselwirkungen von benachbarten Protonen anzeigen, ist es möglich die relative Konfiguration solcher Protonen zueinander zu bestimmen. Über das ROESY Spektrum, konnte gezeigt werden, dass die beiden Methylenprotonen H-4a und H-4b mit jeweils einer der beiden Methylgruppen an C-2 koppelten. Dabei zeigte das H-4a eine Korrelation mit den Protonen bei  $\delta = 1.31$  ppm ( $\text{CH}_3$ , H-14) während H-4b mit der anderen Methylgruppe bei  $\delta = 1.33$  ppm (H-13) korrelierte, sodass ausgehend von diesen Daten die relative Konfiguration aufgeklärt werden konnte.

Um die absolute Konfiguration zu ermitteln, wurden jeweils 0,5 mg der Verbindung **5** mit den enantiomeren Säurechloriden der  $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylphenyllessigsäure (R- und S-Mosherchlorid) umgesetzt. Wird ein chiraler Alkohol, mit einer unbekanntem Konfiguration (R oder S) mit diesen Reagenzien umgesetzt, so erhält man nach erfolgreicher Umsetzung je nach Konfiguration des Alkohols entweder ein R,R- und R,S- oder S,R- und S,S- Mosheresterpaar. Da die beiden Ester bei Umsetzung eines chiralen Alkohols ein Diastereomerenpaar darstellen, lässt sich anhand der Differenzen der NMR-Shifts berechnen, ob der umgesetzte Alkohol R- oder S-konfiguriert ist. Wird ein Racemat umgesetzt, das heißt eine Mischung des R- und S-

konfigurierten Alkohols, dann erhält man mit beiden Mosherchloriden ein racemisches Gemisch zweier R,R- und S,R- bzw. R,S- und S,S-Mosherester.

Die Abbildung 45 zeigt das  $^1\text{H}$  NMR Spektrum nach Umsetzung der Verbindung **5** mit dem R-Mosherchlorid. Die Auswertung ergab, dass die Signale H-6, H-3, H-12, H-13 und H-14 jeweils doppelt statt einfach auftraten. Somit konnte abgeleitet werden, dass es sich um ein Diastereomerengemisch der R,R- und S,R-Mosherester handeln musste. Bei der Verbindung **5** sollte es sich daher um ein Racemat handeln.

Die anschließende Messung der optischen Drehung zeigte einen  $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$  Wert von nahezu Null (-9.9 [c 0.2, MeOH]). Da der Wert nicht Null ist, sollte es sich bei der Verbindung **5** um ein Racemat mit einem Enantiomerenüberschuss handeln.

Auch Verbindung **5** ist ein neuer Naturstoff, der bisher noch nicht beschrieben wurde und hier erstmals aus *Melicope barbiger* isoliert worden ist. Daher wurde, analog zur Verbindung **4**, der Trivialname „Melibarbichromen B“ vorgeschlagen. [93]

**Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen**

**Tabelle 5:** <sup>13</sup>C und <sup>1</sup>H-NMR Daten von Verbindung **5** (δ in ppm, 600/150 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H ( <i>J</i> in Hz)
	ppm	Assignment	
<b>2</b>	77.7	C	-
<b>3</b>	69.3	CH	3.77 t (5.2/5.5)
<b>4a</b>	26.2	CH	2.62 dd (17.1/5.5)
<b>4b</b>	26.2	CH	2.84 dd (17.1/5.2)
<b>5</b>	159.7	C	-
<b>6</b>	88.1	CH	6.07 s
<b>7</b>	156.8	C	-
<b>8</b>	113.8	C	-
<b>9</b>	151.5	C	-
<b>10</b>	100.9	C	-
<b>11</b>	201.6	C	-
<b>12</b>	32.7	CH <sub>3</sub>	2.47 s
<b>13</b> *	22.0	CH <sub>3</sub>	1.33 s
<b>14</b> *	24.8	CH <sub>3</sub>	1.31 s
<b>1'</b>	-		-
<b>2'</b>	-		-
<b>3'</b>	-		-
<b>4'</b> *	-		-
<b>5'</b> *	-		-
<b>OCH<sub>3</sub> an C-5</b>	55.7	CH <sub>3</sub>	3.84 s
<b>OCH<sub>3</sub> an C-7</b>	56.2	CH <sub>3</sub>	3.80 s

\*Zuordnung sind austauschbar

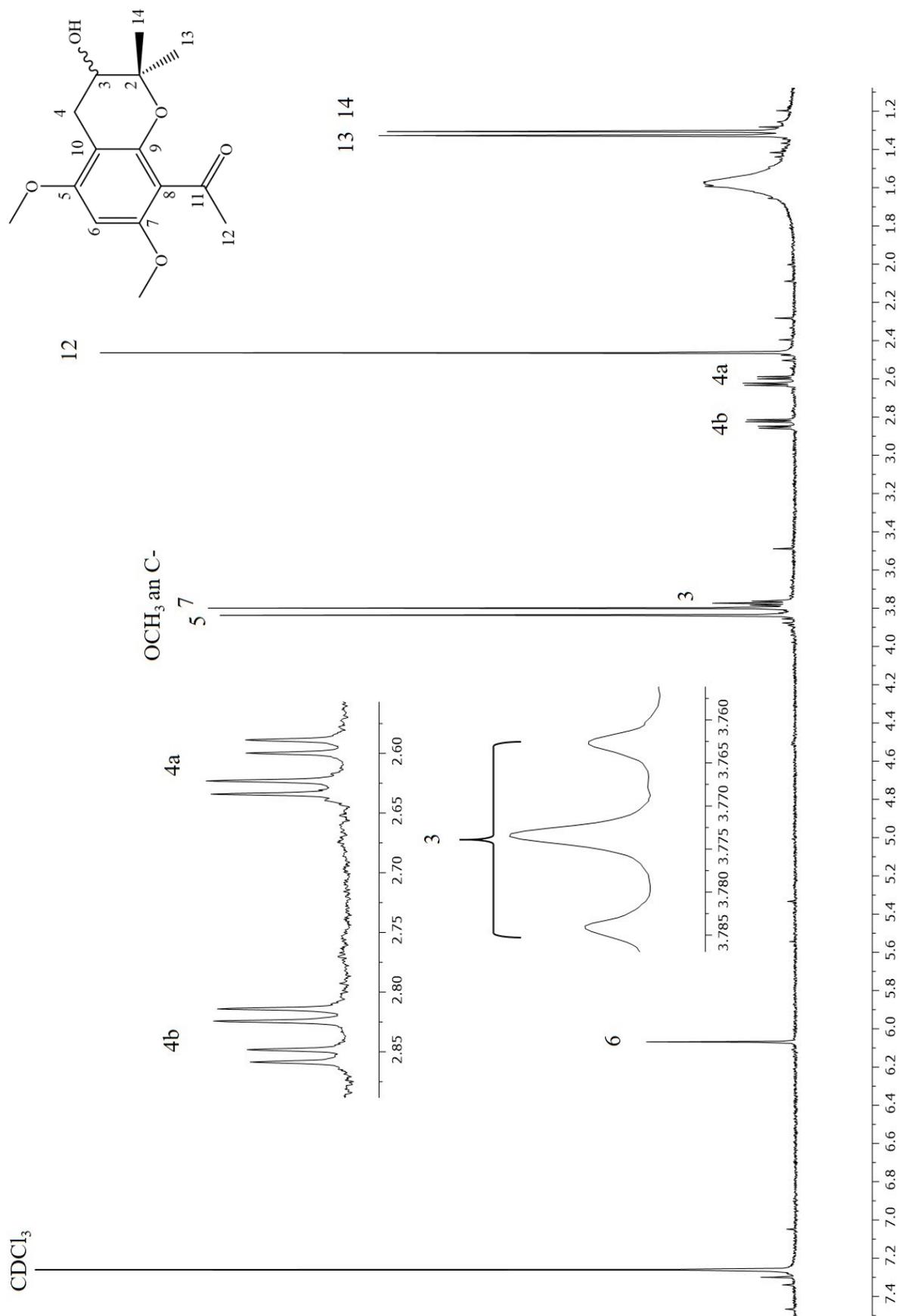


Abbildung 40:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von Verbindung 5 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

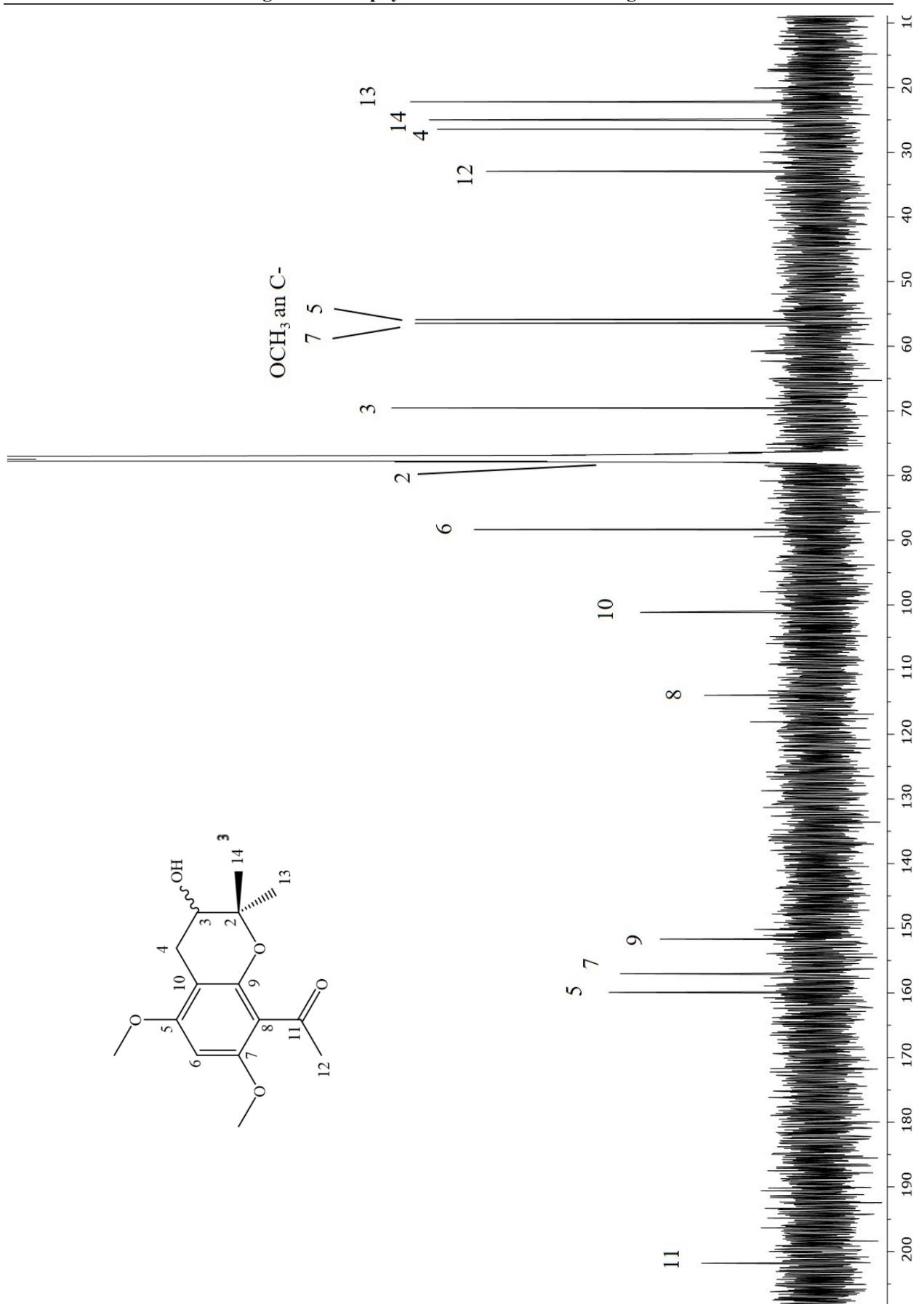


Abbildung 41:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von Verbindung 5 (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

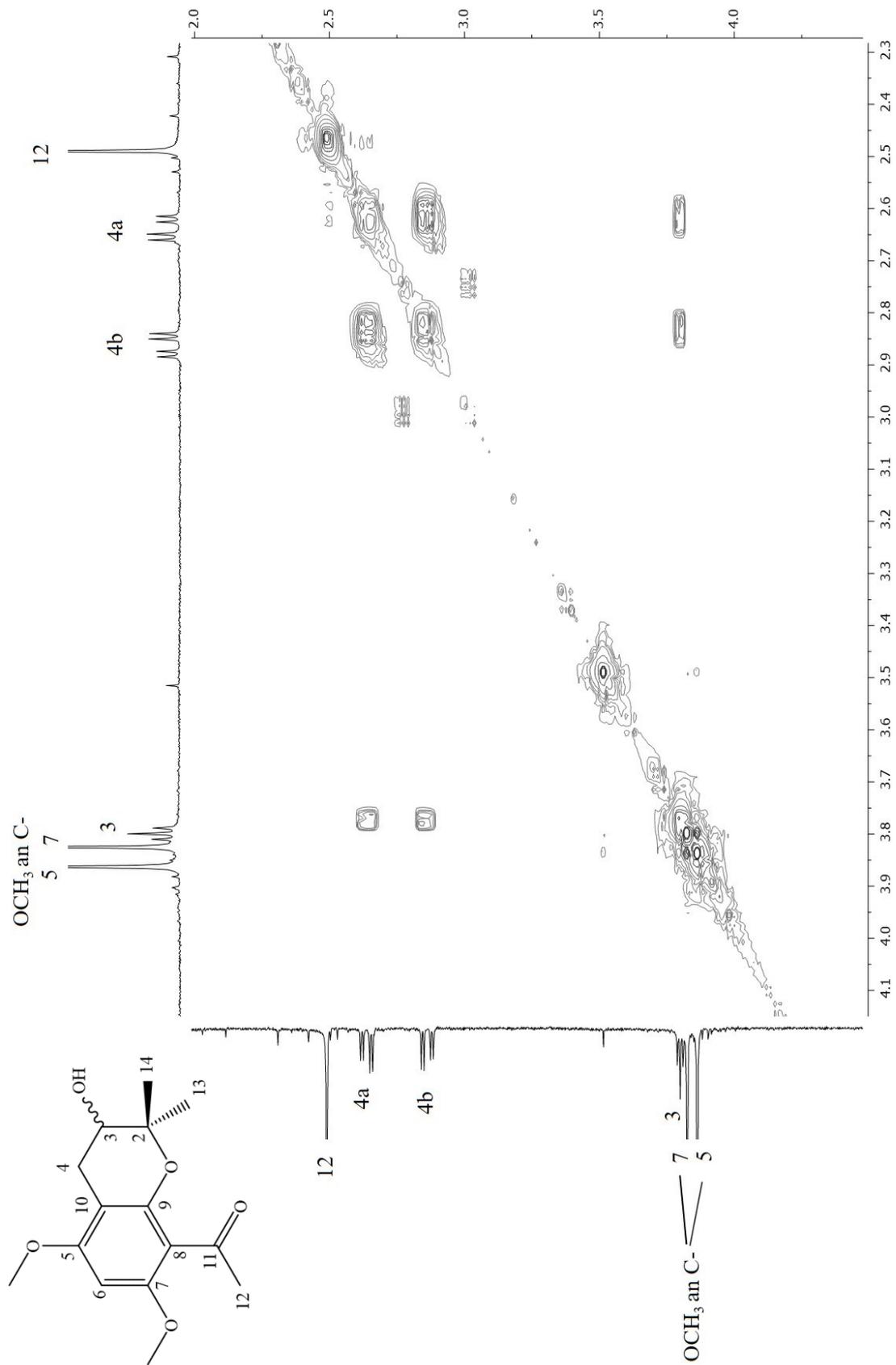


Abbildung 42: 2D-H,H-COSY-Spektrum der Verbindung **5** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

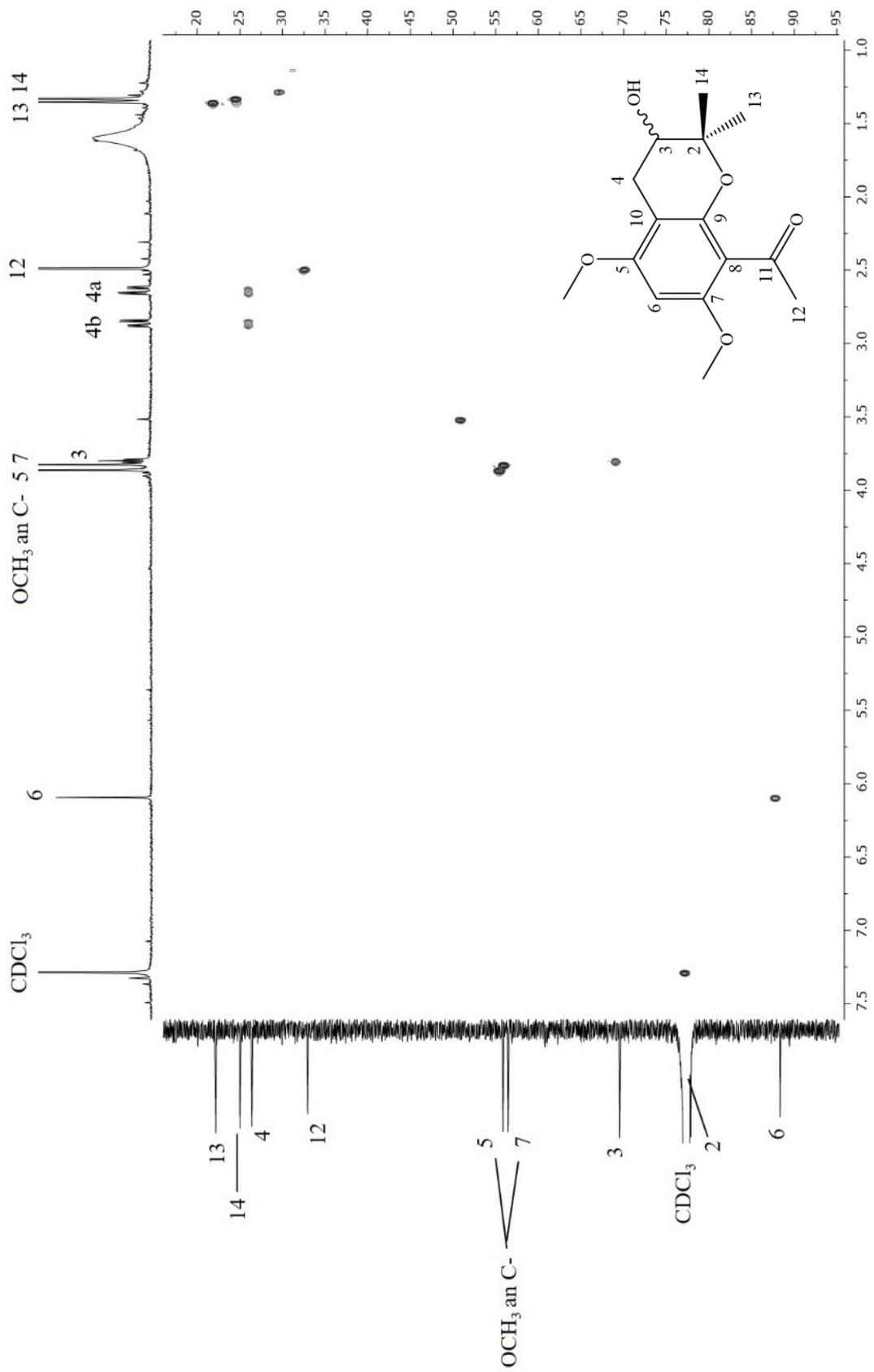


Abbildung 43: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 5 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

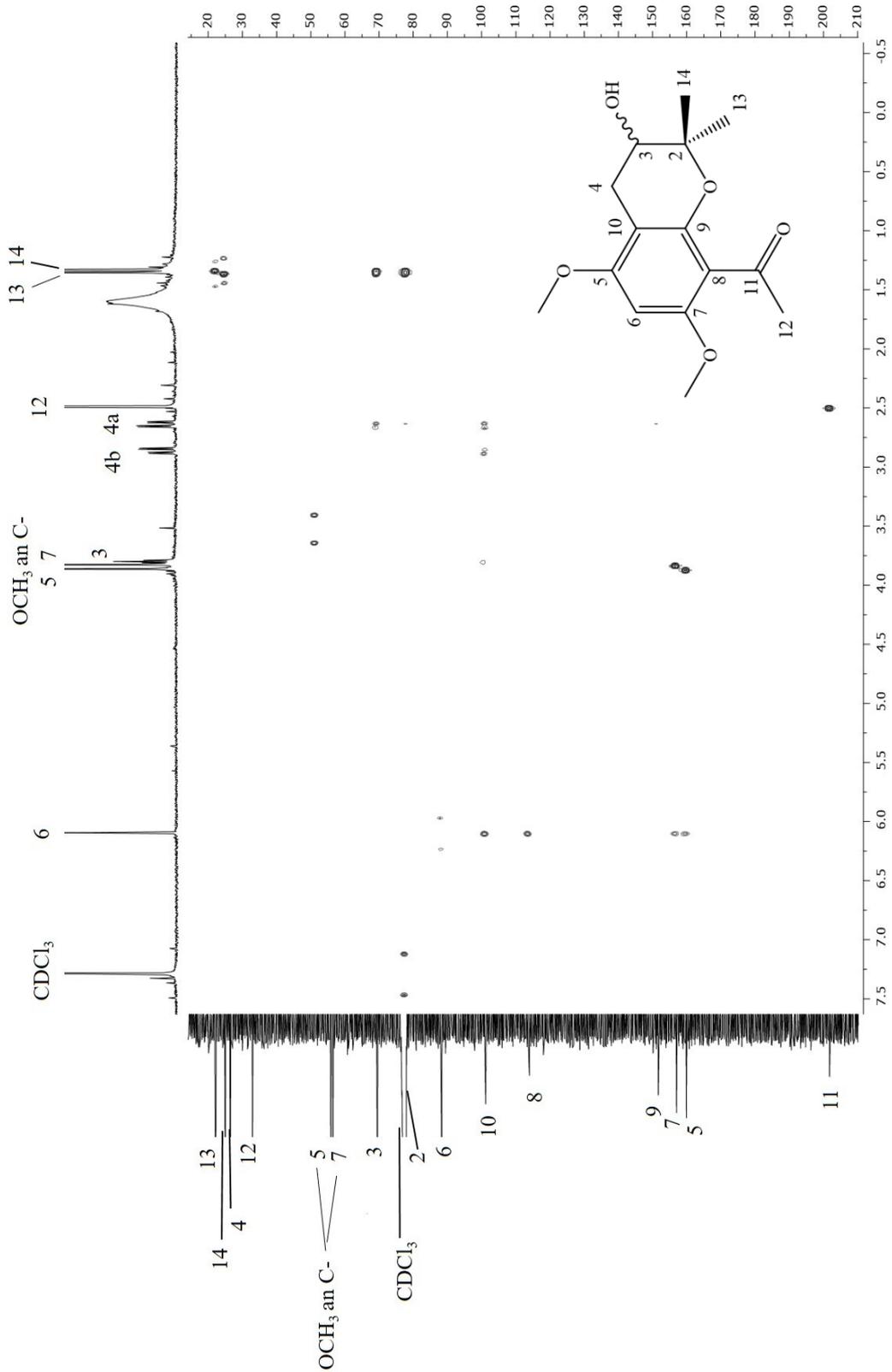
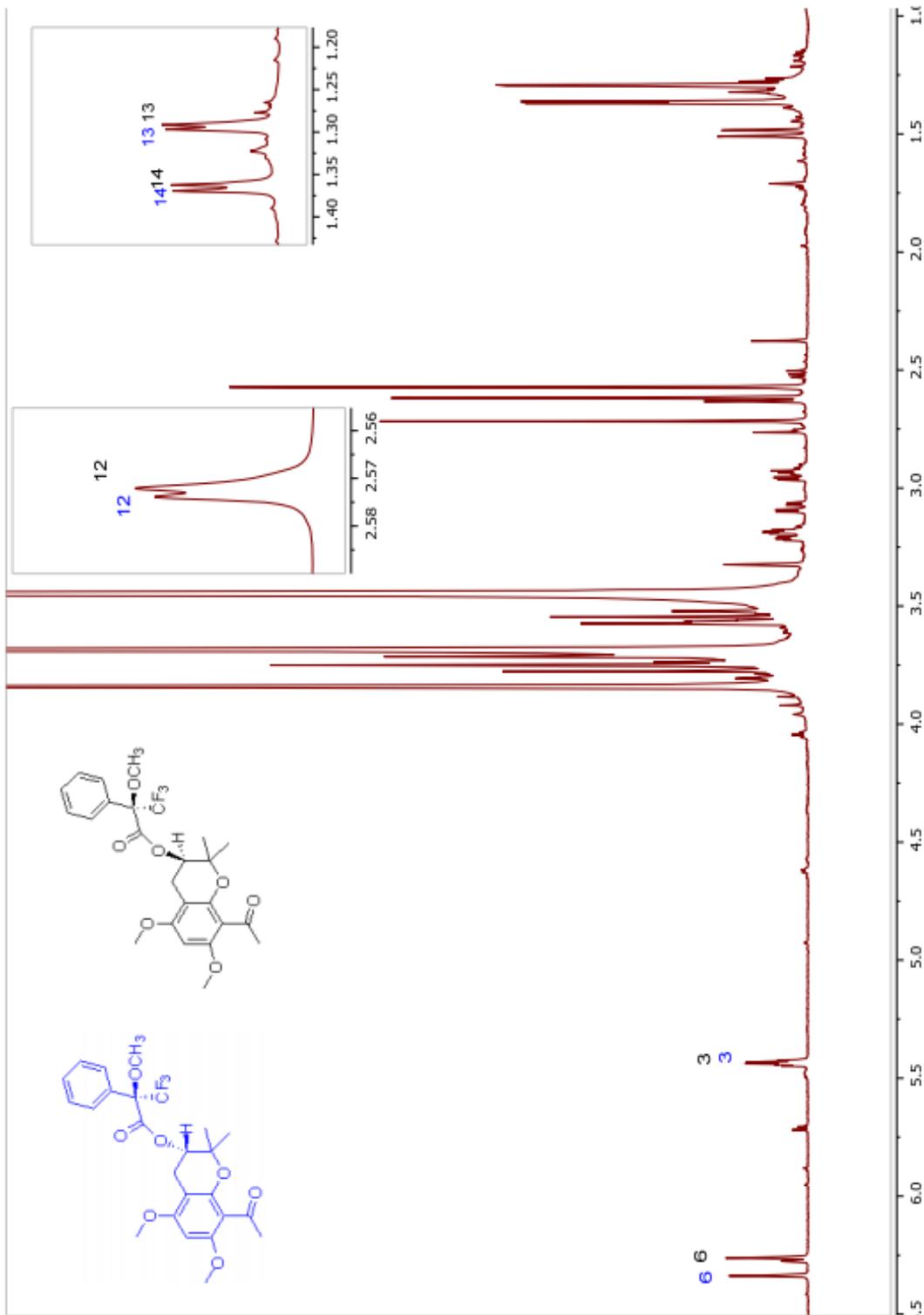


Abbildung 44: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **5** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)



**Abbildung 45:** <sup>1</sup>H NMR-Spektrum von Verbindung 5 als MTPA-Ester nach Mosher (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Diastereomere Verbindungen und ihre Signale sind in blau bzw. schwarz dargestellt)

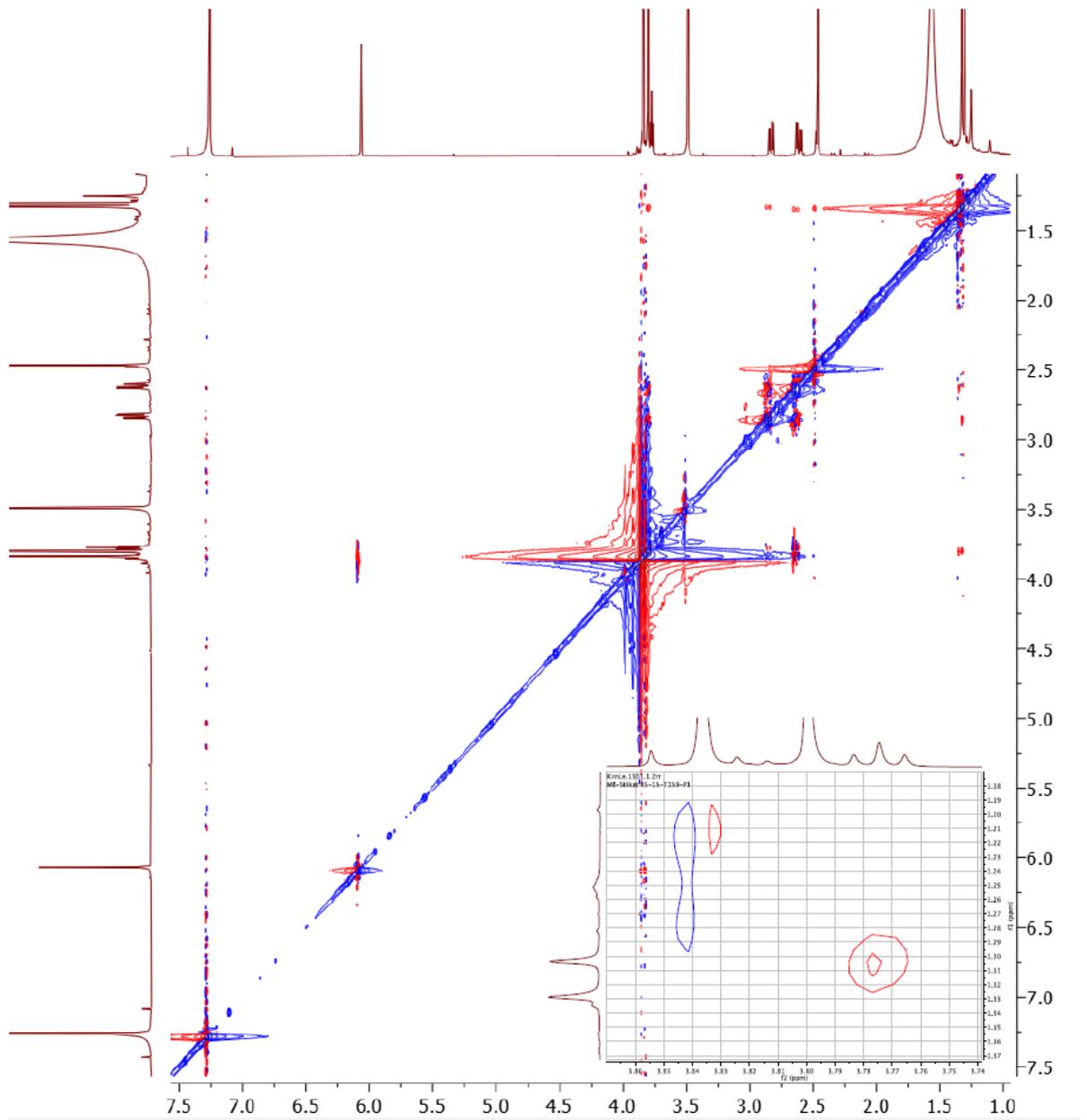
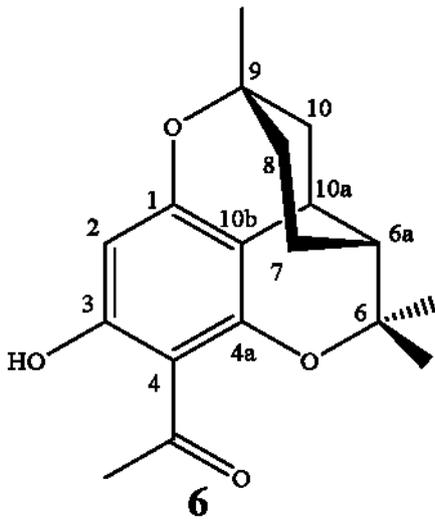
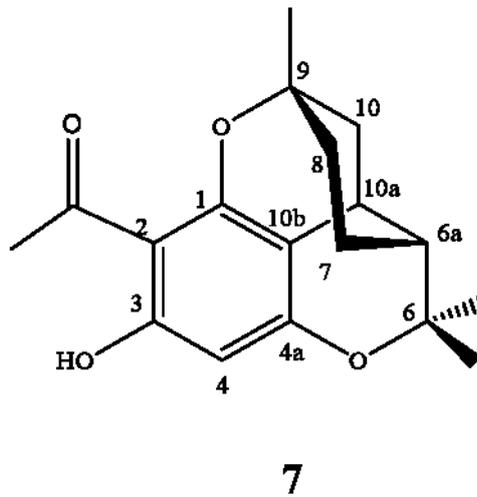


Abbildung 46: 2D-ROESY-Spektrum von Verbindung 5 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

2.6 Verbindung 6 + 7 (Melifolione A und B)



Melifolione A



Melifolione B

Die Isolierung und Strukturaufklärung der Verbindungen **6** und **7** gestaltete sich schwierig. Die nach der HPLC zunächst erhaltene Fraktion (MB-III-10), fiel in einer Menge von 3,1 mg als hellbraune, ölige Substanz an. Im DC (Fließmittel DC-3) zeigte sich die Substanzzone bei einem  $R_f$ -Wert von 0,47. Nach Besprühung der DC mit Naturstoffreagenz A erschien der Substanzfleck im Tageslicht gelblich und bei 365 nm fluoreszierte er gelblich. Mit Anisaldehyd/ $H_2SO_4$  Reagenz färbte sich der Substanzfleck, der bei 254 nm eine Fluoreszenzlöschung zeigte, rot-braun. Das HRESIMS zeigte mit einem  $m/z$  von 303.1593 für  $[M+H]^+$  die Bruttoformel von  $C_{18}H_{23}O_4$  (Abbildung 47) an. Dies entspricht acht Doppelbindungsäquivalenten.

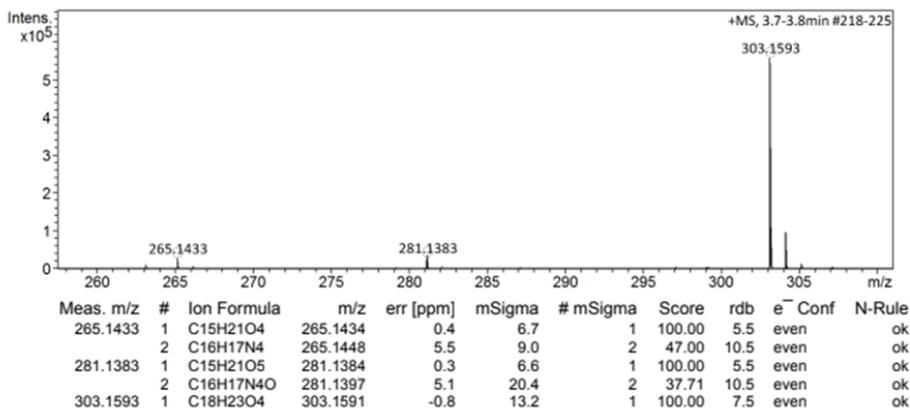
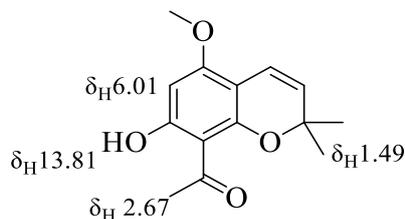


Abbildung 47: HRESIMS des Gemisches von **6** und **7**

Bei erneuter HPLC dieser Fraktion wurden nach einer Retentionszeit von 33,2 Minuten zwei kaum voneinander getrennte Peaks mit einem UV-Maximum von 280 nm detektiert. Ein ähnliches UV-Maximum zeigt auch die aus der gleichen Pflanze isolierte Verbindung **3**

(Alloevodionol), so dass vermutet wurde, dass es sich bei **6** und **7** ebenfalls um phenolische Benzopyrane oder Acetophenone handeln könnte.



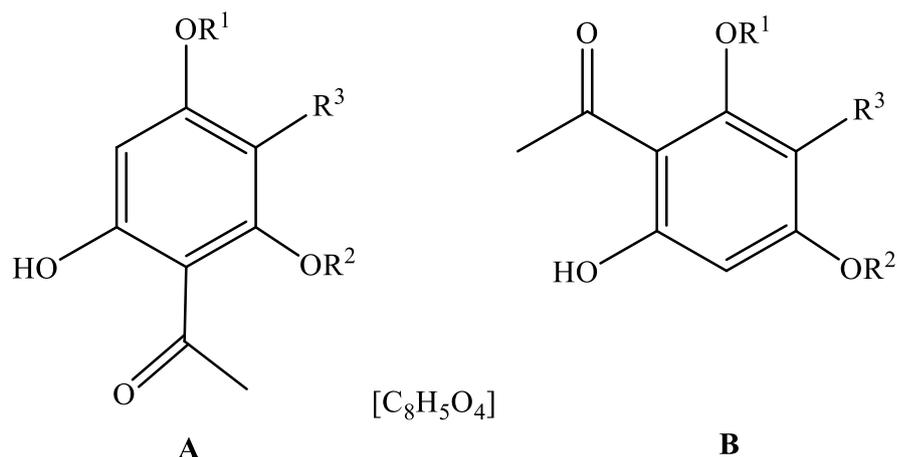
**Abbildung 48:** Verbindung **3** = Alloevodionol

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 51) erscheinen fast alle Resonanzsignale im Verhältnis von ca. 2,5:1 verdoppelt, was auch für ein Gemisch von zwei ähnlichen Strukturen sprach. Deutliche Unterschiede für die chemische Verschiebung der „Satelliten“ ergaben sich in folgenden Bereichen: 13.5 ppm (s), 6.0 ppm (s), 2.8 ppm (br. s), 2.2 ppm (m), 2.1 ppm (m), 1.6 ppm (s), 1.4 ppm (s) und 1.1 ppm (s)

Alle anderen Signale im Bereich von 0.8 bis 2.0 ppm zeigen komplexe Aufspaltungen und ließen zunächst keine weiteren Rückschlüsse zu.

Im breitbandenkoppelten  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (Tabelle 8 und Abbildung 53) kann man die meisten der von der Bruttoformel geforderten 18 C-Signale direkt erkennen, während einige erst durch die Auswertung der 2D-NMR-Spektren identifiziert werden konnten. Auch hier werden fast alle Signale von Satelliten mit verminderter Intensität begleitet. Bei tiefem Feld fallen neben einem Signal im Bereich von 202 ppm für eine Carbonylgruppe drei intensivere Signale im Bereich von ca. 160 ppm sowie drei weitere zwischen 95 und 110 ppm auf, die charakteristisch sind für einen Benzolring mit drei metaständigen Sauerstoff-Substituenten und einer Acetylgruppe, wie sie im Phloroacetophenon vorliegen, zumal auch das entsprechende C-Signal für eine Acetyl-Methylgruppe bei ca. 33 ppm detektiert werden konnte.

Da aber im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für jedes Isomer nur je ein Signal für eine freie OH-Gruppe als intramolekulare H-Brücke bei ca. 13 ppm auftritt, müssen die beiden übrigen OH-Gruppen als Phenoläther vorliegen. Zusammen mit dem einzigen aromatischen Proton bei ca. 6 ppm, ergab sich demnach die folgende Partialstruktur A oder B [ $\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4$ ], in der bereits 5 der 8 geforderten DBÄ enthalten sind. (Abbildung 49)



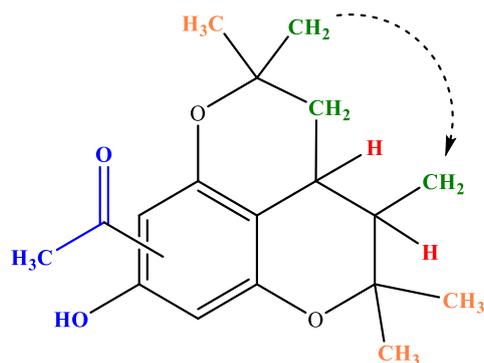
**Abbildung 49:** Partialstrukturen A und B

Aufgrund der kompletten Summenformel von C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> konnte der „Rest“ des Moleküls als Summe von R<sup>1</sup> + R<sup>2</sup> + R<sup>3</sup> nur noch aus 10 Kohlenstoff- und 17 Wasserstoff-Atomen bestehen.

Tatsächlich findet man im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum im Bereich von 0,8 bis 2,9 ppm die Signale für insgesamt 20 Protonen. Vermindert um die drei, bereits erwähnten Methylprotonen der Acetylgruppe verbleiben somit 17 aliphatische Protonen, die sich wie folgt aufteilen: 9 Protonen für drei Methylgruppen, die mit „verdoppelten“ Singulets zwischen 1,0 und 1,7 ppm erscheinen, 2 Protonen für zwei Methin-Gruppen als „verdoppelte“ Multipletts bei ca. 2,1 bzw. bei ca. 2,8 ppm, 6 Protonen für drei Methylengruppen, deren Signale als überlagerte Multipletts zunächst schwer zu erkennen waren und erst mit Hilfe eines HSQC-Spektrums im Bereich von 0,8 bis 2,3 ppm eindeutig detektiert werden konnten (Abbildung 55 und Abbildung 56).

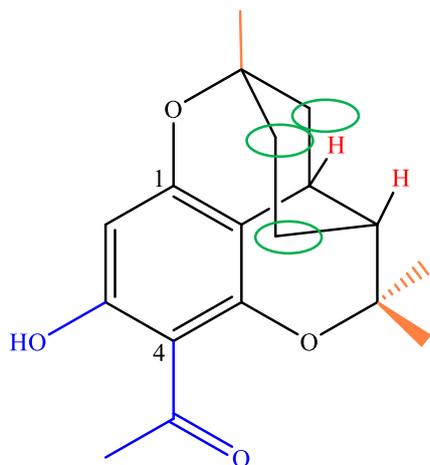
Die für die restliche Struktur erforderlichen 10 C-Signale findet man im <sup>13</sup>C-Spektrum in folgenden Bereichen (Abbildung 53): zwei Signale bei ca. 76 und 86 ppm, wie sie für tertiäre C-Atome aliphatischer Phenoläther typisch sind und acht Signale zwischen 20 und 50 ppm (ohne Berücksichtigung des Signals für die Acetyl-Methylgruppe bei ca. 32 ppm)

Damit sollten die Substituenten R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> ein System von *drei* zusätzlichen Ringen ergeben, da sich nur so die noch fehlenden *drei* DBÄ für die Gesamtstruktur erklären lassen. Aufgrund der übrigen spektroskopischen Ähnlichkeiten mit dem Benzopyran **3** wurde deshalb die folgende Struktur als Target ausgewählt, um damit eine Sci-Finder-Struktur-Recherche in der CAS-Datenbank durchzuführen:

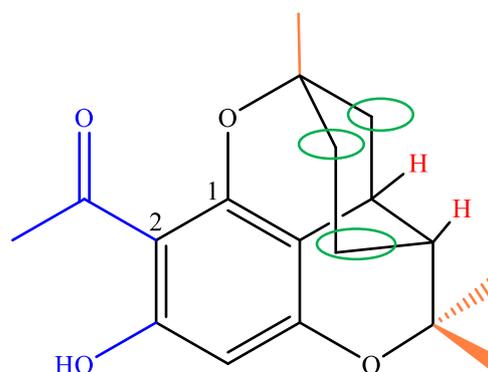


Dabei ergaben sich insgesamt 168 registrierte Verbindungen mit der geforderten Teilstruktur, von denen aber lediglich zwei alle notwendigen Kriterien für die gesuchte Struktur erfüllten:

- Eine **Acetylgruppe** und eine **freie Hydroxylgruppe** am Benzolring
- Drei **Methylgruppen** an quartären C-Atomen
- Drei **Methylengruppen**
- Zwei **Methingruppen**
- Erforderliche Summenformel von  $C_{18}H_{22}O_4$



CAS-Nr. : 31653-44-8

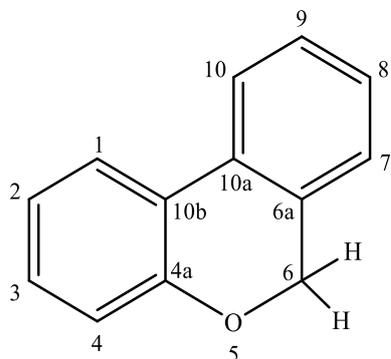


CAS-Nr. : 37464-54-3; 128572-40-7

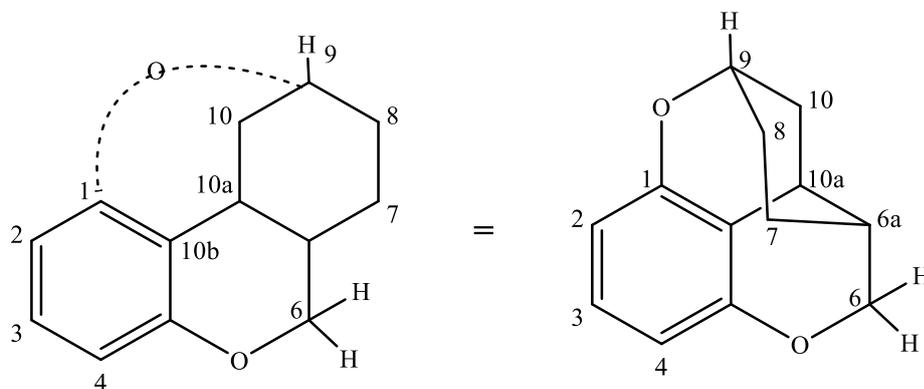
Dabei handelt es sich um zwei strukturisomere Verbindungen. Sie weisen ein tetracyclisches Ringsystem auf, zu dem ein Benzolring, zwei teilhydrierte Pyran-Ringe sowie ein Cyclohexan-Ring gehören. Sie werden in der Literatur als Melifolione A und Melifolione B bezeichnet. [94] Die korrekte IUPAC-Nomenklatur für diese Verbindungen lautet: 1-(9-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-6,15-dioxatetracyclo[9.3.1.0<sup>4,13</sup>.0<sup>7,12</sup>]]pentadeca-7,9,11-trien-**X**-yl)ethanon.

Für Melifolione A: **X** = 8 und für Melifolione B: **X** = 10.

Übersichtlicher ist die CAS-Nomenklatur. Dort wird das tetracyclische Ringsystem vom tricyclischen 6*H*-Dibenzo[*b,d*]pyran abgeleitet und als 1,9-Epoxy-6*a*,7,8,9,10,10*a*-hexahydro-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran bezeichnet.



6*H*-Dibenzo[*b,d*]pyran



6*a*,7,8,9,10,10*a*-Hexahydro-1,9-epoxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran

Dementsprechend werden die beiden Strukturisomere in der CAS-Nomenklatur wie folgt benannt:

1-(6*a*,7,8,9,10,10*a*-Hexahydro-3-hydroxy-6,6,9-trimethyl-1,9-epoxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-4-yl)-ethanon (**6**)

1-(6*a*,7,8,9,10,10*a*-Hexahydro-3-hydroxy-6,6,9-trimethyl-1,9-epoxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-2-yl)-ethanon (**7**)

Beide Verbindungen sind schon seit 1970 bekannt [95], doch wurden sie erst 1990 von Goh und Mitarbeitern hinreichend spektroskopisch charakterisiert. Diese Autoren isolierten sie als ein Gemisch von Melifolione A (**6**) und Melifolione B (**7**) aus *Euodia latifolia*. Die Autoren konnten die Isomere durch fraktionierte Kristallisation trennen und von **6** auch eine Röntgenstruktur-Analyse anfertigen. [94]

Die von Goh und Mitarbeitern angegebenen  $^1\text{H}$ -NMR-Daten stimmen nahezu exakt mit den Werten überein, die in dieser Arbeit mit dem Substanzgemisch von **6** und **7** aus *Melicope barbiger* ermittelt wurden, so dass dessen Identität gesichert war. [94]

**Tabelle 6:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der isomeren Verbindungen **6** und **7** in  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  ppm)

Position	$^1\text{H}$ -NMR (Melifolione A)		$^1\text{H}$ -NMR (Melifolione B)	
	<b>6</b>	Literaturwerte nach [96]	<b>7</b>	Literaturwerte nach [96]
<b>1</b>	-	-	-	-
<b>2</b>	6.04 s	6.04 s		
<b>3</b>	-	-	-	-
<b>4</b>			6.01 s	6.01 s
<b>5</b>	-	-	-	-
<b>6a</b>	2.09 ddd	2.09 ddd	2.02 ddd	2.05 ddd
<b>7*</b>	0.86 m	1.31 m	1.30 dt	1.35 dt
	1.31 m	0.86 m	0.87 ddt	0.87 ddt
<b>8*</b>	1.45 m	1.48 dd	1.45 m	1.48 dd
	1.80 m	1.82 - 1.88 dt	1.80 m	1.82 - 1.88 m
<b>9</b>	-	-	-	-
<b>10*</b>	1.86 dd	1.87 m	1.86 dd	1.87 m
	2.19 ddd	2.20 m	2.19 ddd	2.20 m
<b>10a</b>	2.73 br s	2.74 s	2.83 br s	2.83 t
<b>6-CH<sub>3</sub> ax</b>	1.13 s	1.13 s	1.07 s	1.10 s
<b>6-CH<sub>3</sub> eq</b>	1.59 s	1.59 s	1.51 s	1.52 s
<b>9-CH<sub>3</sub></b>	1.40 s	1.37 s	1.45 s	1.43 s
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>	2.60 s	2.62 s	2.62 s	2.62 s
<b>OH</b>	13.30 s	13.32 s	13.60 s	13.63 s

\*Die geminalen Protonen H<sub>2</sub>-7, H<sub>2</sub>-8 und H<sub>2</sub>-10 zeigen große Unterschiede in der chemischen Verschiebung.

Die pseudo-axiale Position führt in allen Fällen zu einer deutlichen diamagnetischen Verschiebung gegenüber den pseudo-equatorial angeordneten Protonen. Die in der Tabelle angegebenen Werte wurden mit Hilfe des HSQC-Spektrums als Zentren der jeweiligen Multipletts für das Gemisch der beiden Verbindungen **6** und **7** bestimmt, da diese Signale der Isomeren nicht getrennt erscheinen.

**Tabelle 7:** HMBC Korrelationen von Verbindung 7 (Melifolione B)

Position	<sup>13</sup> C NMR (Melifolione B)	HMBC Korrelationen
1	158.8	Korrelation zu 10a nicht zu sehen
2	106.5	C-2/3-OH; C-2/H-4; C-2/ <u>CH</u> <sub>3</sub> CO
3	165.2	C-3/3-OH
4	98.5	C-4/3-OH
4a	163.3	Korrelation zu H-10a nicht zu sehen
6	85.1	C-6/6- <u>CH</u> <sub>3</sub> ax; C-6/6- <u>CH</u> <sub>3</sub> eq
6a	46.0	C-6a/6- <u>CH</u> <sub>3</sub> ax und 6- <u>CH</u> <sub>3</sub> eq; C-6a/H-8; C-6a/H-10
7	22.0	C-7/H-8
8	37.7	C-8/9- <u>CH</u> <sub>3</sub>
9	76.5**	C-9/9- <u>CH</u> <sub>3</sub> ; C-9/H-7
10	34.7	C-10/9- <u>CH</u> <sub>3</sub>
10a	27.4	
10b	107.6	C-10b/H-10; C-10b/H-6a
6-CH <sub>3</sub> ax	24.2	6- <u>CH</u> <sub>3</sub> ax/6- <u>CH</u> <sub>3</sub> eq
6-CH <sub>3</sub> eq	29.6	6- <u>CH</u> <sub>3</sub> ax/6- <u>CH</u> <sub>3</sub> eq
9-CH <sub>3</sub>	28.8	9- <u>CH</u> <sub>3</sub> /H-8
<u>CH</u> <sub>3</sub> CO	32.4	-
CH <sub>3</sub> <u>C</u> O	202.8	CH <sub>3</sub> <u>C</u> O/CH <sub>3</sub> CO

\*\* Signal teilweise durch das CDCl<sub>3</sub>-Signal verdeckt.

**Tabelle 8:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **6** und **7** in  $\text{CDCl}_3$

Position	$^{13}\text{C}$ NMR (Melifolione A)		$^{13}\text{C}$ NMR (Melifolione B)	
	<b>6</b>	Literaturwerte nach [96]	<b>7</b>	Literaturwerte nach [96]
1	162.8*	158.8	158.8	159.4
2	96.9	106.3	106.5	106.4
3	164.4	165.3	165.2	164.3
4	107.4	98.3	98.5	96.9
4a	159.4	163.3	163.3	162.7
6	86.5	76.6	85.1	76.0
6a	46.9	32.3	46.0	32.0
7	21.9	22.0	22.0	21.8
8	37.5	34.8	37.7	34.8
9	76.0	85.0	76.5**	86.6
10	34.8	37.7	34.7	37.5
10a	27.5	45.9	27.4	46.2
10b	107,4	106.5	107.6	107.5
6-CH <sub>3</sub> ax	24.4	24.2	24.2	24.3
6-CH <sub>3</sub> eq	29.9	28.8	29.6	28.6
9-CH <sub>3</sub>	28.6	29.6	28.8	29.9
<u>CH</u> <sub>3</sub> CO	32.0	27.4	32.4	27.5
CH <sub>3</sub> <u>C</u> O	202.0	202.7	202.8	201.1

\*) Signal nur als „Anspaltung“ erkennbar.

\*\* Signal teilweise durch das  $\text{CDCl}_3$  – Signal verdeckt und nur durch HMBC-Korrelation gesichert.

Die in der obigen Tabelle vorgenommene Zuordnung für C-2, C-3, C-4 und C-10b erfolgte aufgrund der HMBC-Korrelationen, während die Zuordnung von C-1 und C-4a mit Hilfe von Inkrement-Rechnungen erfolgte, da hier keine der möglichen Korrelationen mit H-10 detektiert werden konnten. Die Acetylgruppe verschiebt das para-ständige C-4a am Benzolring um +4,2 ppm, während der Effekt auf das ortho-ständige C-1 nur +0,2 ppm beträgt.

Die von Goh et al. angegebenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **6** und **7** stimmen numerisch mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten weitgehend überein.

Allerdings stellte sich nach eingehender Analyse des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums und der entsprechenden 2D-NMR-Spektren heraus, dass die von Goh vorgenommene Zuordnung der Signale zu den einzelnen Positionen nicht korrekt war.

Da seinerzeit keine entsprechende Messtechnik zum Einsatz gekommen war, wurden die Signale mehr oder weniger willkürlich zugeordnet. Mithilfe der stark gespreizten 2D-NMR-Spektren war es nunmehr möglich, die Signale der beiden Isomere **6** und **7** nebeneinander zu lokalisieren und den einzelnen Positionen zweifelsfrei zu zuordnen.

Die in dieser Arbeit angegebenen Werte stimmen mit den in der jüngeren Literatur angegebenen Daten für die vom Typ her vergleichbaren Verbindungen Empetrifranzinan A (mit gleicher Grundstruktur wie **6** [97]) und Empetrifranzinan D (mit gleicher Grundstruktur wie **7** [98]) sehr gut überein.

Mit Hilfe von *DREIDING*-Stereo-Modellen lässt sich zeigen, dass der überbrückte Cyclohexan-Ring im tetracyclischen Ringsystem nicht vollkommen starr ist, sondern eine konformative Beweglichkeit durch Rotation um die Bindungsachse C-7/C-8 aufweist. So scheint es möglich, dass er in Lösung leicht verzerrten Sessel-Konformation, wie sie im Kristallgitter vorliegt, in eine Twist-Konformation „umklappen“ kann. In beiden Formen nimmt das Proton H-6a eine pseudo-axiale Position im Cyclohexan-Ring ein und zeigt eine relativ große vicinale Kopplung mit dem pseudo-axial angeordneten H-7 von 11,7 Hz, da der Dieder-Winkel entweder annähernd  $0^\circ$  oder  $180^\circ$  beträgt. Diese trans-diaxiale Kopplung ist auch im H,H-COSY-Spektrum (Abbildung 54) als intensives Kreuzsignal zu sehen. Das daraus resultierende Dublett wird durch zwei weitere vicinale gauche-Kopplungen mit dem equatorial orientierten H-7 sowie mit H-10a aufgespalten. Diese Kopplungskonstanten sind aufgrund der bestehenden Diederwinkel kleiner aber unterschiedlich ( $^3J_{\text{H-6a, H-7eq}} = 5,3 \text{ Hz}$  und  $^3J_{\text{H-6a, H-10a}} = 2,7 \text{ Hz}$ ), so dass je ein Doppel-Dublett resultiert. Die Halbwertsbreite des gesamten Signals (ddd) beträgt demnach ca. 20 Hz.

Dagegen hat das Signal für das Proton H-10a eine deutlich geringere Halbwertsbreite (ca. 12 Hz) und erscheint als verbreitertes „Singulett“. Bei extremer Vergrößerung dieses Signals kann man ein Multiplett erkennen, in dem nur die drei inneren Linien noch aufgelöst sind, während die äußeren Linien nur noch als schwache Schultern zu erahnen sind (Abbildung 52). Die aus den Signalen der Kopplungspartner ermittelten Kopplungskonstanten von H-10a betragen mit

H-10ax ca. 1,5 Hz, H-10eq ca. 4,5 Hz und H-6a ca. 3 Hz.

Da die Halbwertsbreite des Signals von H-10a jedoch ca. 12 Hz beträgt, muss es eine weitere Kopplung von ca. 3 Hz enthalten. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um eine long-range-Kopplung („W“-Kopplung) mit dem pseudo-equatorialen H-7, die sich allerdings im breiten Multipllett für dieses Signal nicht identifizieren lässt.

Der konformativ bewegliche Cyclohexan-Ring führt zu einer weiteren Besonderheit im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum: Die geminalen Protonen an den drei Methylengruppen nehmen im zeitlichen Mittel entweder eine pseudo-axiale oder pseudo-equatoriale Position ein. Dies führt zu einer stark unterschiedlichen Ausrichtung im Anisotropie-Bereich des aromatischen Rings. So „taucht“ jeweils eines der beiden Protonen an C-7 und C-8 in den abschirmenden Ringstrom und erfährt deshalb eine große diamagnetische Verschiebung des Resonanzsignals.

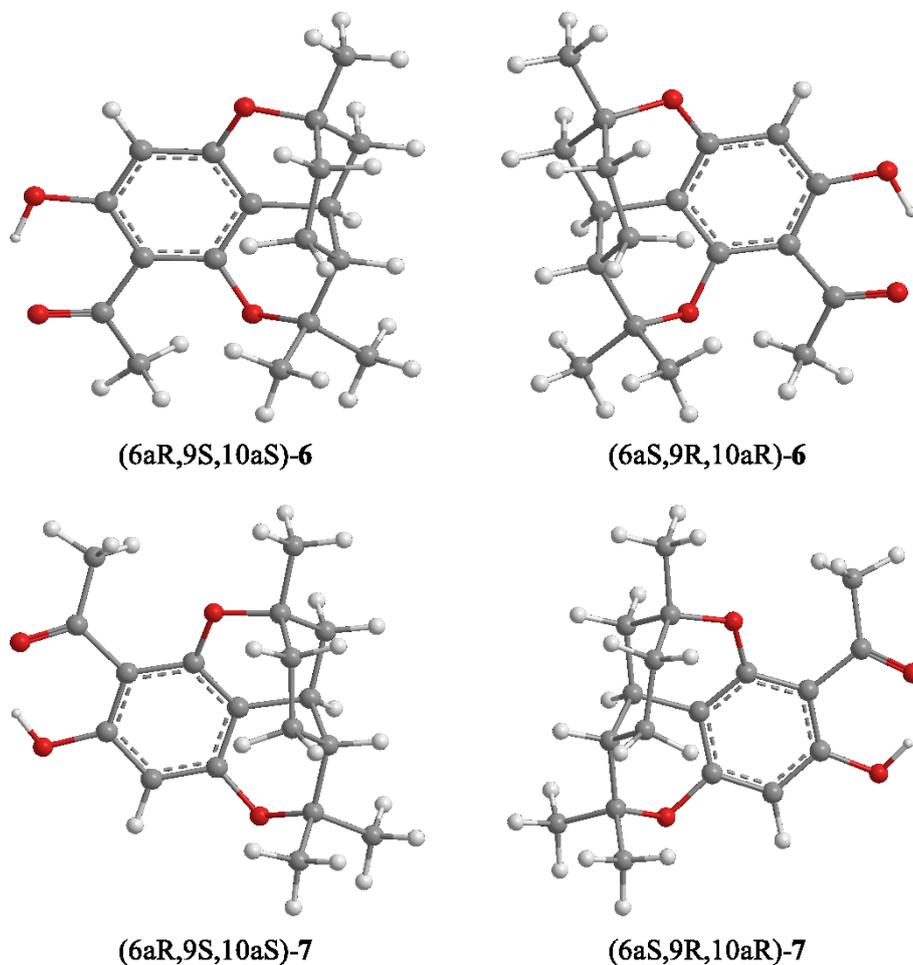
Der Unterschied ist bei den beiden geminalen Protonen an C-7 mit  $\Delta \delta = 0,47$  ppm am größten und verringert sich bei C-8 auf nur noch 0,37 ppm. Mit größer werdender Entfernung aus dem Bereich des abschirmenden Ringstroms wird der Unterschied geringer, so dass die Differenz bei den beiden Protonen an C-10 nur noch 0,33 ppm beträgt.

Außerdem fällt auf, dass H-7 und H-8 jeweils komplexe Multipletts ergeben, während die Signale der beiden Protonen an C-10 klare, aber unterschiedliche Kopplungsmuster zeigen: Bei H-10ax ergibt sich ein Dublett mit der geminalen Kopplungskonstante von ca. 13 Hz, das bei genauer Betrachtung leicht angespalten ist, da die vicinale Kopplungskonstante mit H-10a wegen des Diederwinkels von ca.  $90^\circ$  nur 1,6 Hz beträgt (Abbildung 52). Dagegen weist H-10eq ein Dublett vom Triplet auf, das neben der geminalen Kopplung auch noch die vicinale Kopplung zu H-10a (ca. 4,5 Hz) und eine long-range-Kopplung (W-Kopplung) zum equatorialen H-8eq (ca. 3,5 Hz) aufweist, so dass quasi ein doppeltes Triplet resultiert.

Eine weitere Besonderheit zeigen die beiden Methylgruppen an C-6. Auch hier wirkt sich der Ringstromeffekt des Aromaten nur auf die pseudoaxiale Position am teilhydrierten Pyran-Ring aus, der im *DREIDING*-Stereo-Modell eine starre Boot-Konformation einnimmt und kaum eine Beweglichkeit zeigt. So ergibt sich für beide Isomeren jeweils ein Unterschied in der chemischen Verschiebung von über 0,4 ppm (siehe Tabelle 8)

Die Melifolione-Isomere weisen je 3 Asymmetrie-Zentren an den Positionen 6a, 9 und 10a auf, so dass theoretisch von jedem Isomeren acht Enantiomere (vier Paare von Diastereomeren) denkbar sind: 1. S/S/S und R/R/R; 2. S/S/R und R/R/S, 3. S/R/S und R/S/R oder 4. R/S/S und S/R/R (s. Abbildung 50).

Aus Modellbetrachtungen an DREIDING-Stereo-Modellen geht allerdings hervor, dass tatsächlich nur ein einziges Paar konstruierbar ist, da bei allen anderen Konfigurationen ein Ringschluss zum Cyclohexan mit einer Ethylenbrücke „über“ den beiden teilhydrierten Pyranringen aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Deshalb können die beiden Isomeren auch nur in der Konfiguration [6aR,9S,10aS] oder [6aS,9R,10aR] existieren.



**Abbildung 50:** Enantiomerenpaare von **6** und **7**

In der Literatur sind bisher keine optisch aktiven Formen der Melifolione-Isomere mit den entsprechenden experimentellen Angaben beschrieben worden. Goh und Mitarbeiter berichten lediglich, dass die isolierten Verbindungen eine „optische Aktivität nahe Null“ besitzen, so dass man von einem Racemat ausgehen kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass aus dem Dichlormethan-Extrakt der Blätter von *Melicope barbiger* (Rutaceae) ein Gemisch von Konstitutionsisomeren **6** und **7** isoliert werden konnte, die identisch mit den in der Literatur beschriebenen Verbindungen Melifolione A und Melifolione B sind. Die isolierte Menge war zu gering für eine präparative Trennung,

doch konnte die Struktur der Isomeren auch im Gemisch mit Hilfe der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren eindeutig bestimmt werden. Dabei ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung der  $^1\text{H}$ -NMR-Daten mit den Angaben in der Literatur. [94] Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten wurden mit Hilfe der HSQC- sowie der HMBC-Spektren durch extremes Spreizen der verschiedenen Bereiche ausgewertet.

Alle Signale konnten detektiert und zweifelsfrei den einzelnen Positionen der Isomeren zugeordnet werden. (Tabelle 8).

Dabei zeigte sich, dass die von Goh getroffene Zuordnung korrigiert werden muss.

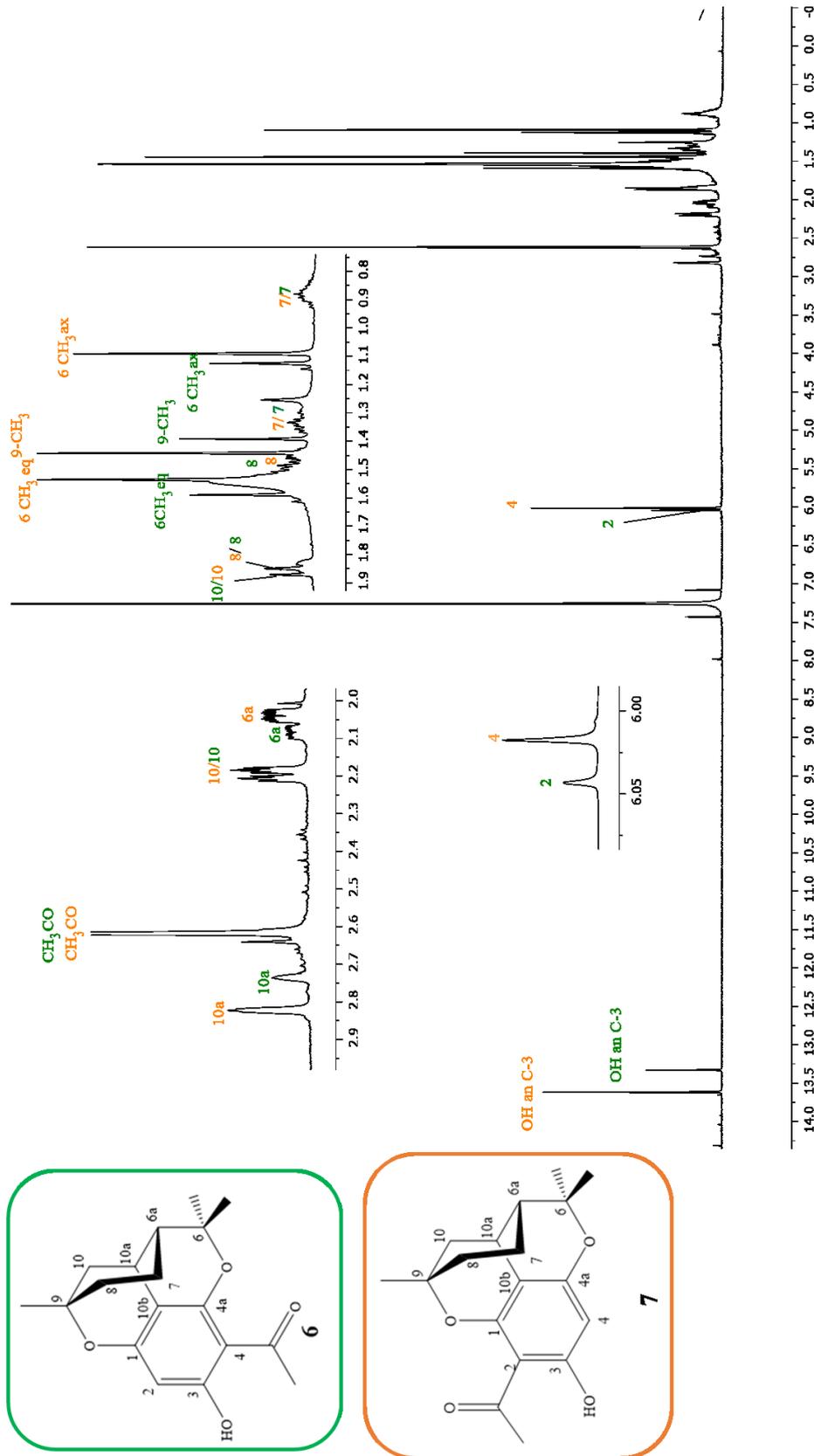


Abbildung 51:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 6 und 7 im Gemisch

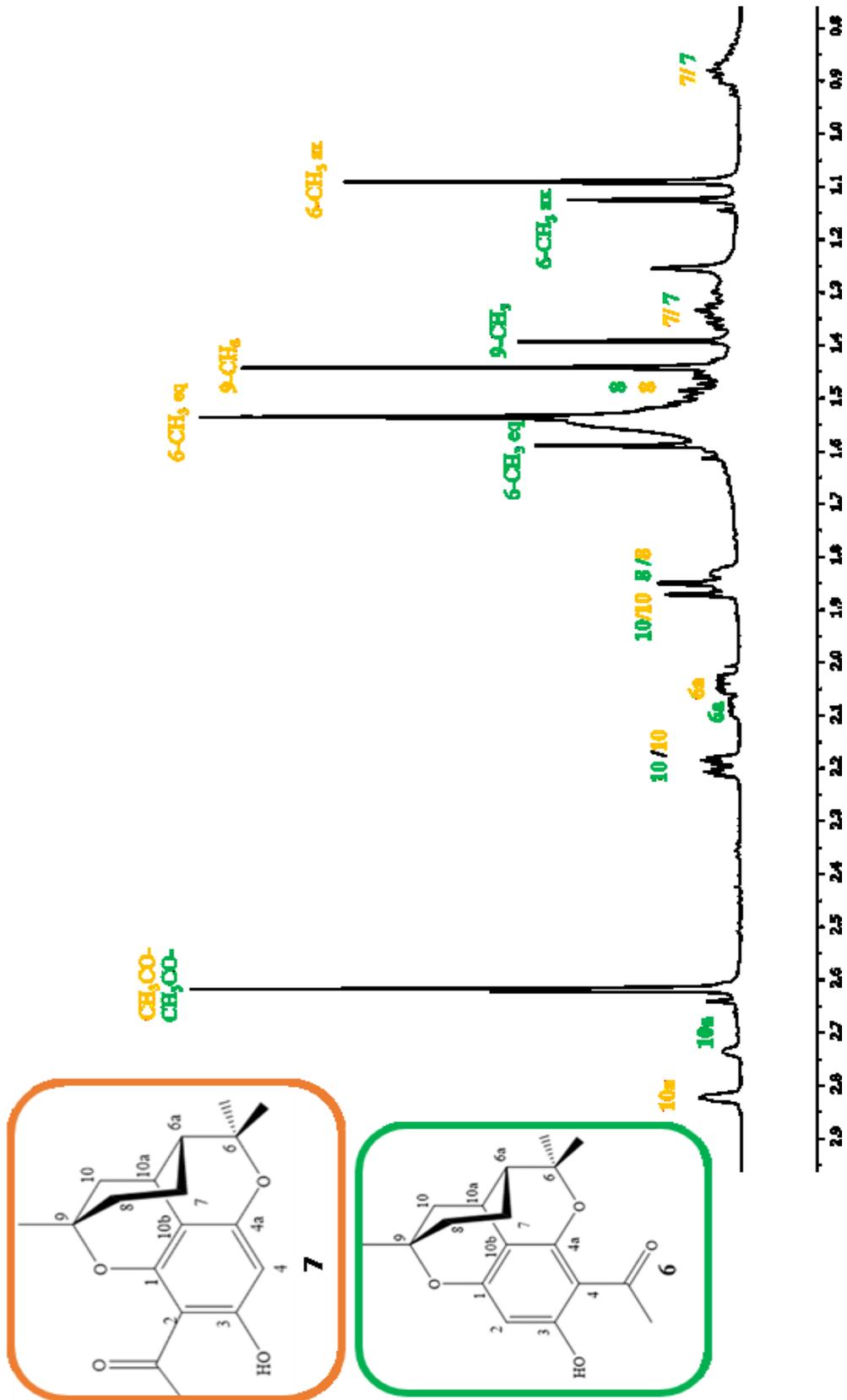


Abbildung 52:  $^1\text{H-NMR}$ -Ausschnitt von Verbindung 6 und 7 im Gemisch

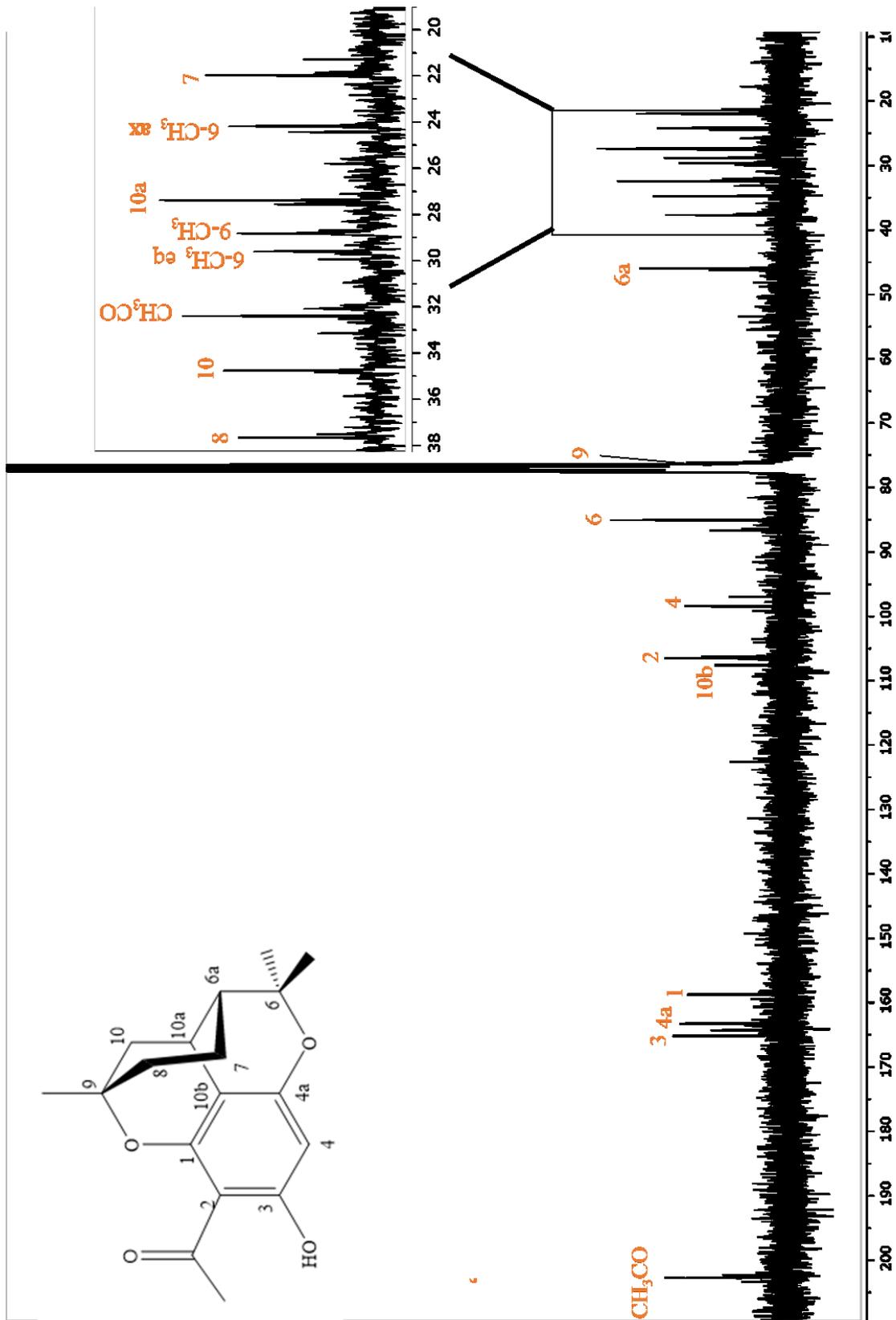


Abbildung 53:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum des Gemisches 6 und 7, Zuordnung bezogen auf 7

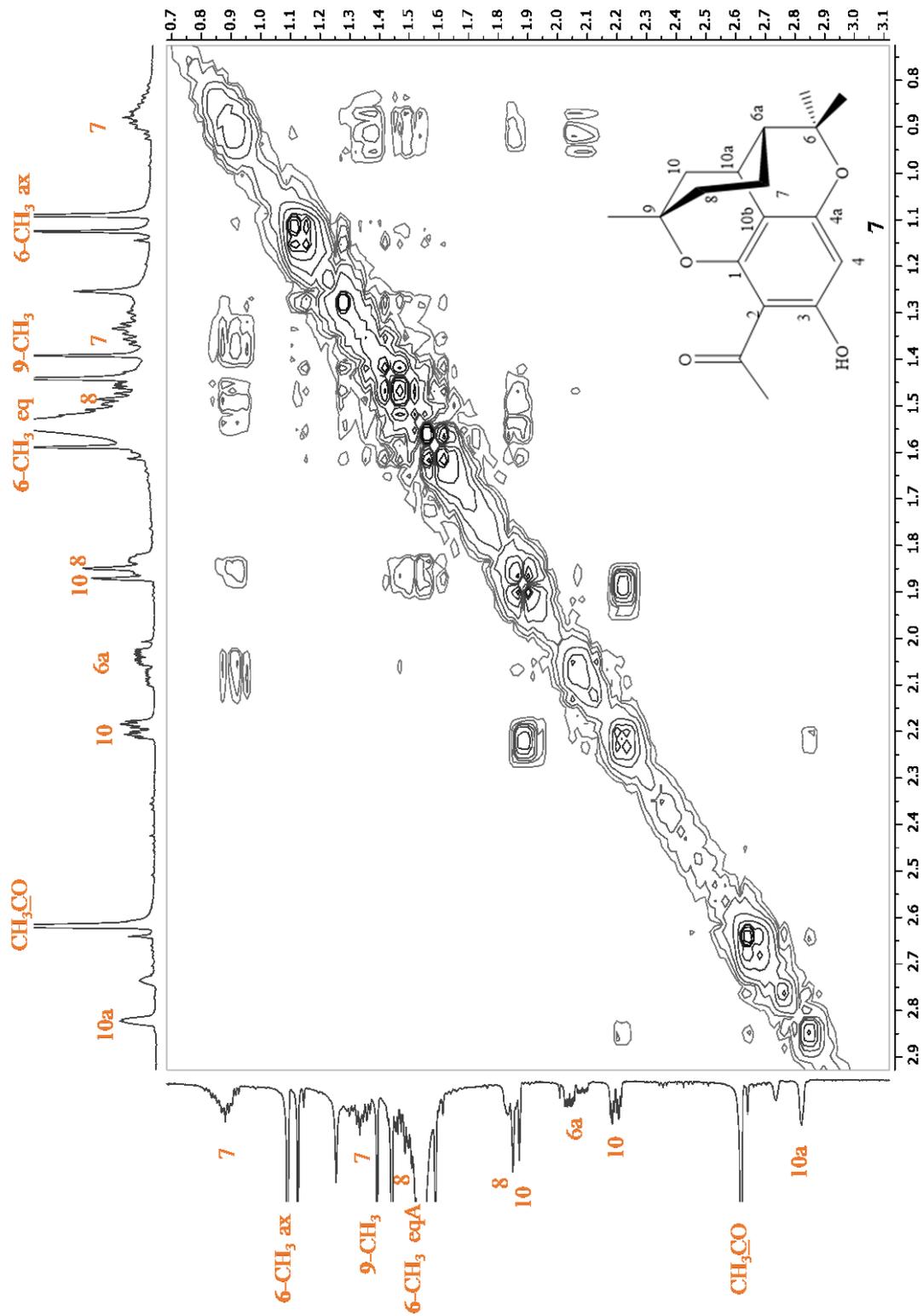


Abbildung 54: 2D-H,H-COSY-Spektrum von Verbindung 6 und 7

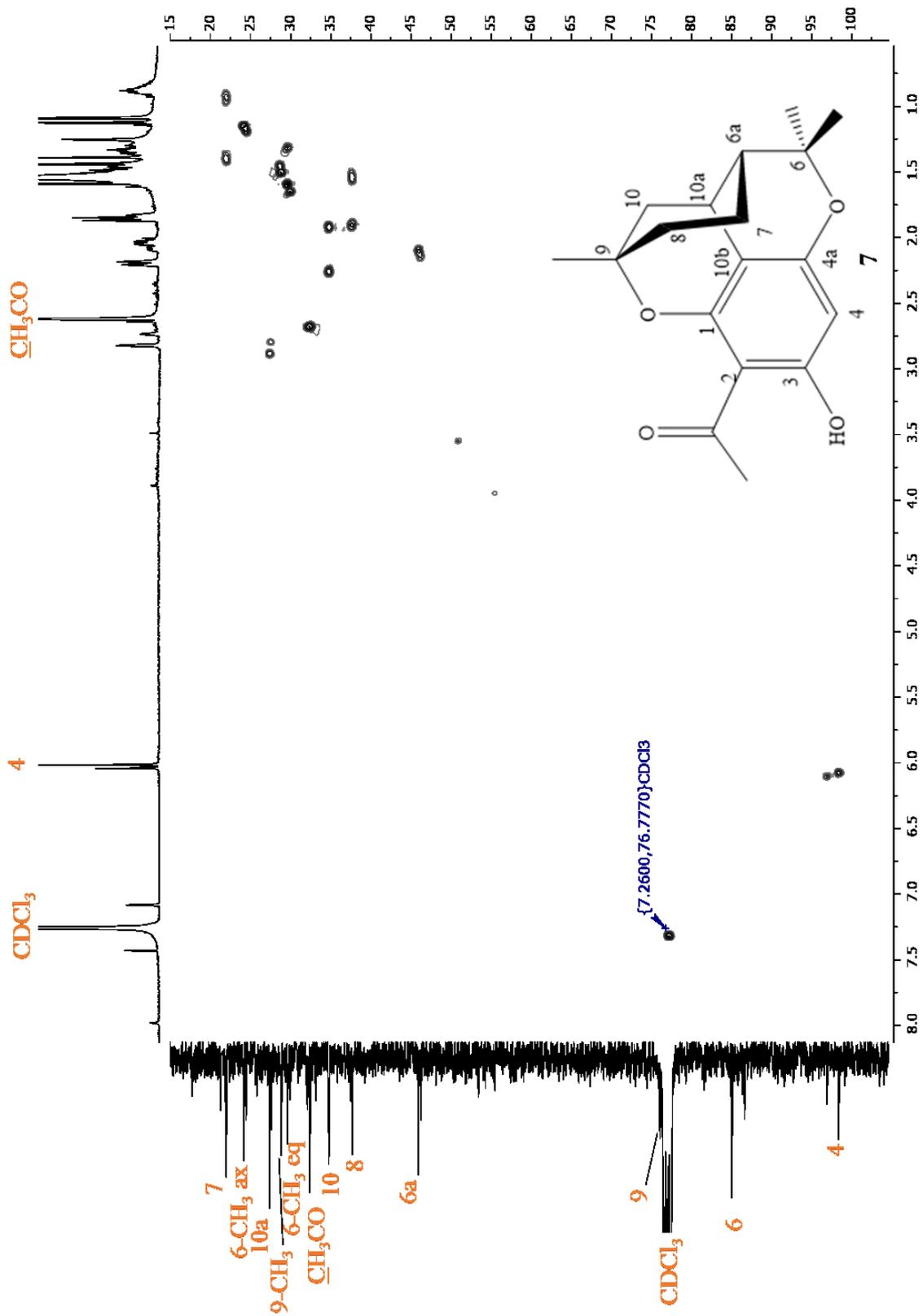


Abbildung 55: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 6 und 7, Zuordnung nur für 7

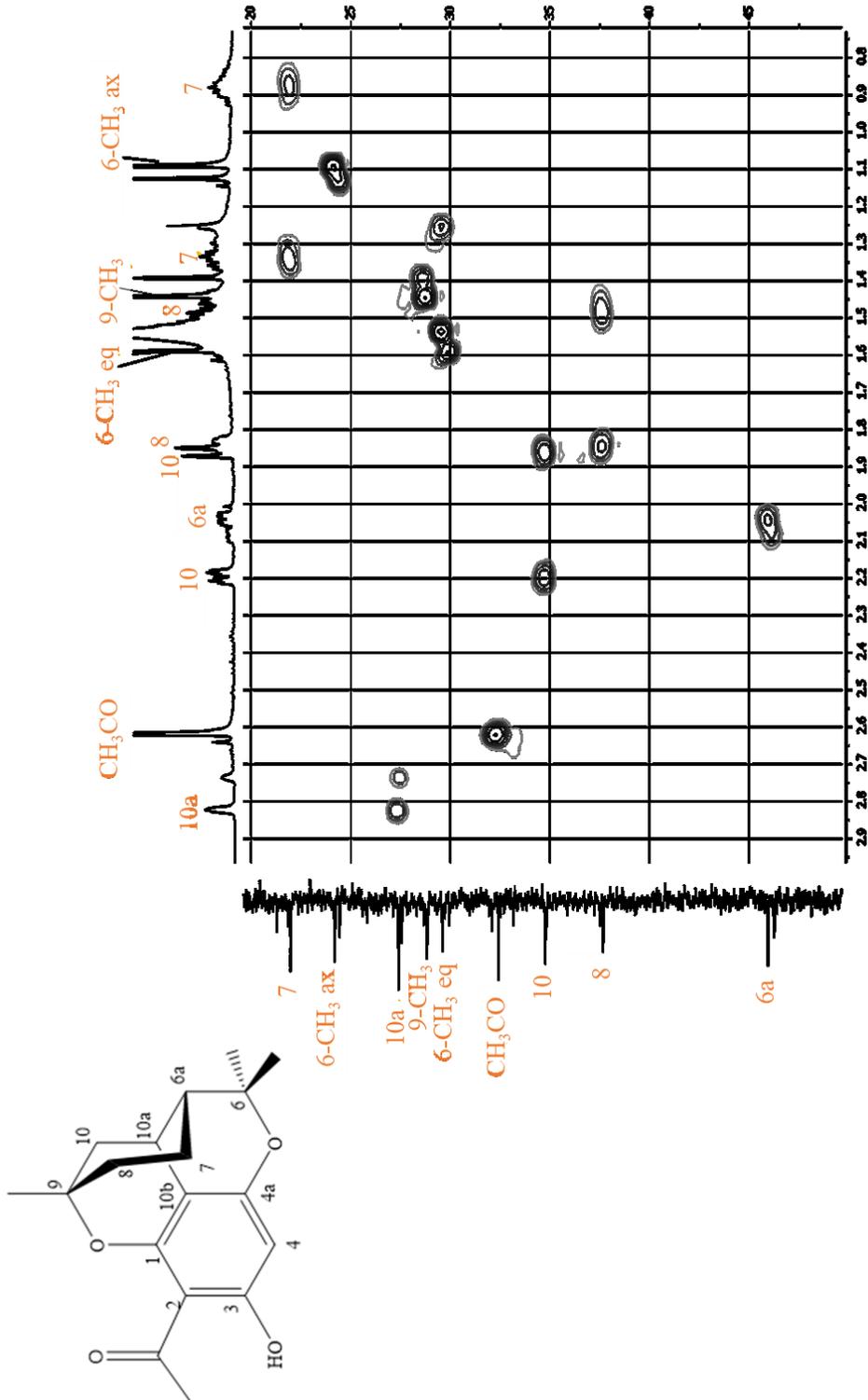


Abbildung 56: 2D-HSQC-Spektrum-Ausschnitt von Verbindung 6 und 7, Zuordnung nur für 7

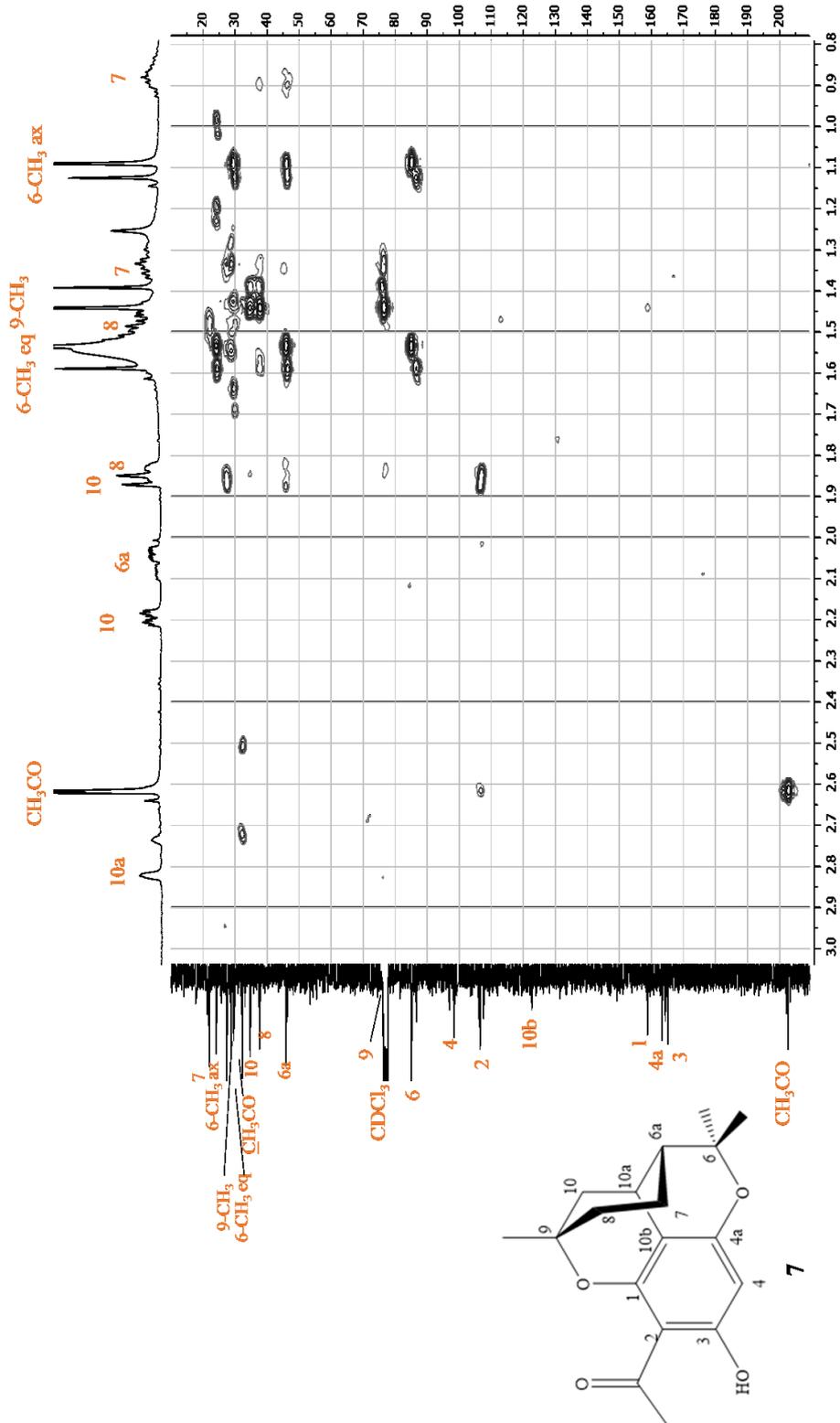


Abbildung 57: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 6 und 7, Zuordnung nur für 7

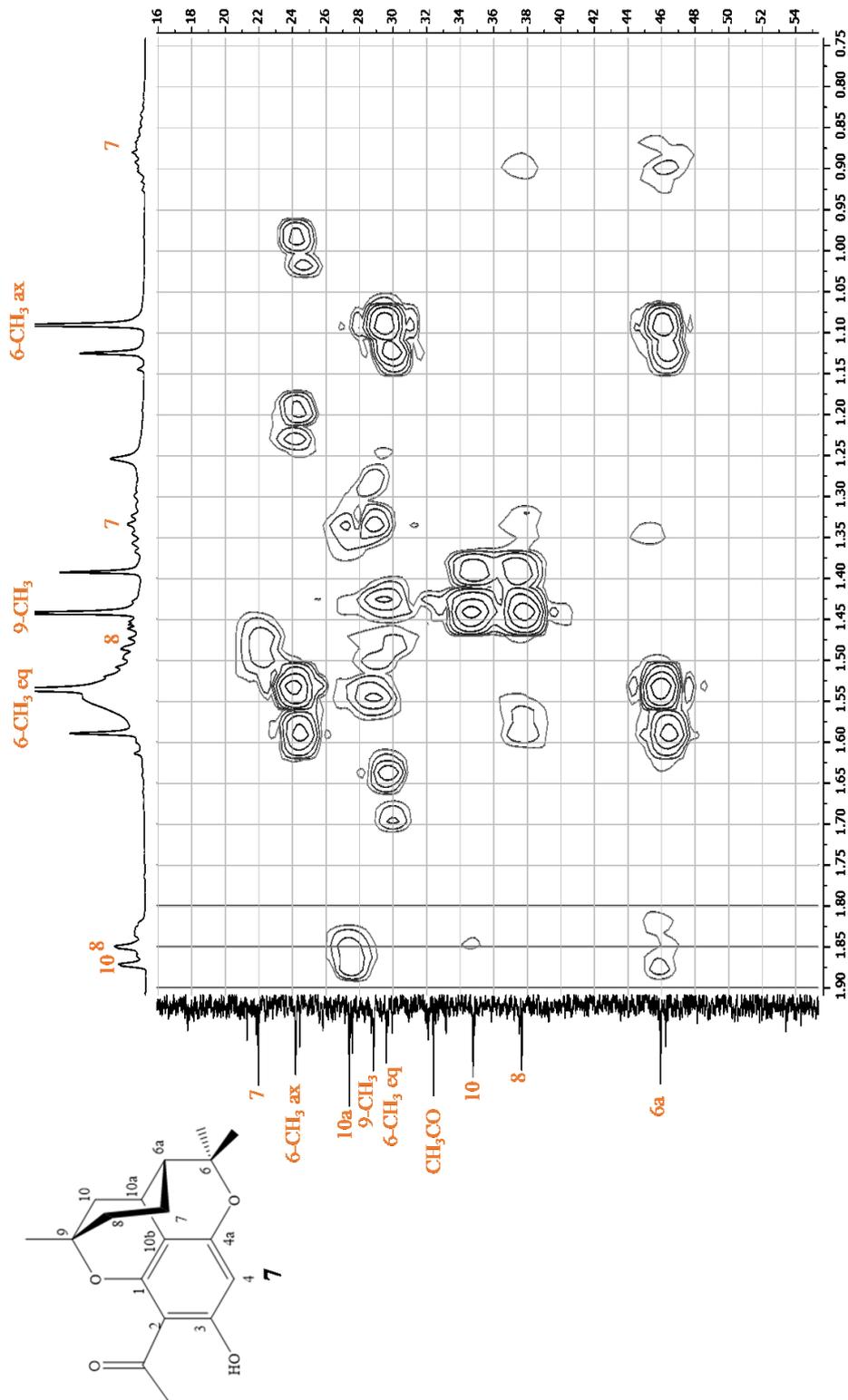


Abbildung 58: 2D-HMBC-Spektrum-Ausschnitt von Verbindung 6 und 7, Zuordnung nur für 7

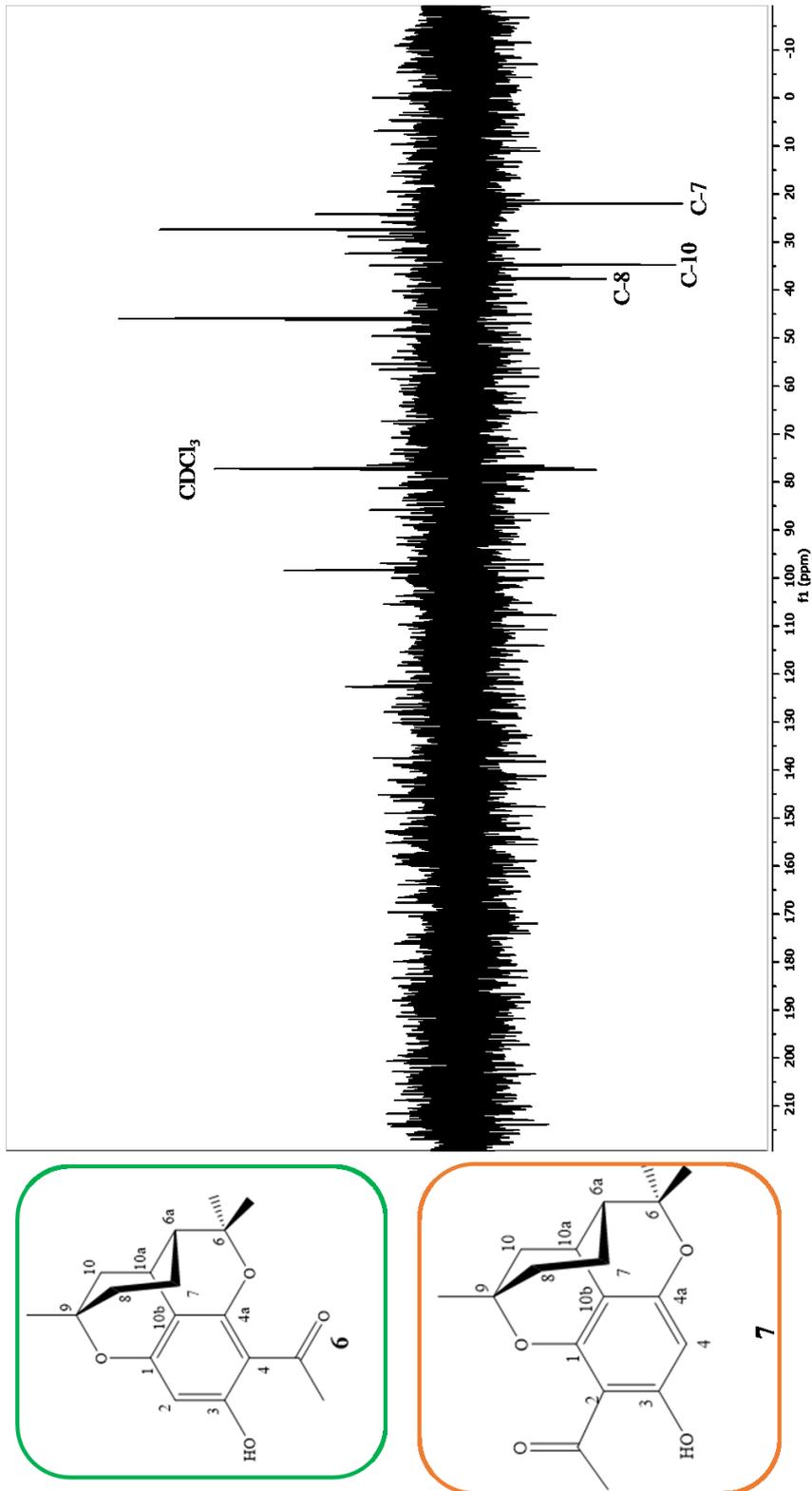
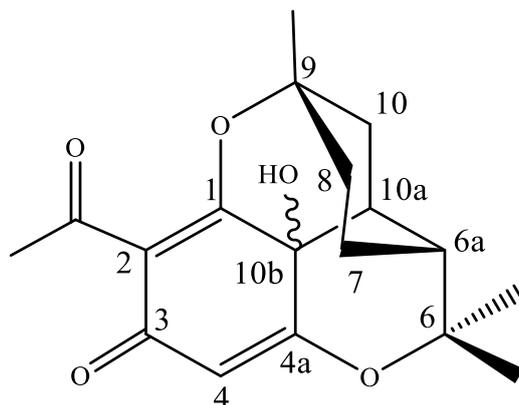


Abbildung 59: DEPT-Spektrum von Verbindung 6 und 7

## 2.7 Verbindung 8 (Melifoliox B)



Die Verbindung **8** wurde als weißliche, amorphe Substanz aus der Fraktion MB-IX-5 in einer Menge von 3,4 mg isoliert. Auf der DC-Platte zeigte **8** bei einem  $R_f$ -Wert von 0,58 im Fließmittel DC-3 einen löschtenden Substanzfleck (siehe 6.1.1). Mit Anisaldehyd/  $H_2SO_4$  zeigte sich ein hellbrauner Fleck, der mit Naturstoffreagenz A hellblau fluoreszierend erscheint. Das HRESIMS-Spektrum (Abbildung 60) zeigte das protonierte Molekülion mit einer Masse von  $m/z = 319.1542$ , aus dem die Bruttosummenformel  $C_{18}H_{22}O_5$  abgeleitet werden konnte, die gegenüber Melifolione A oder Melifolione B ein zusätzliches Sauerstoffatom enthält.

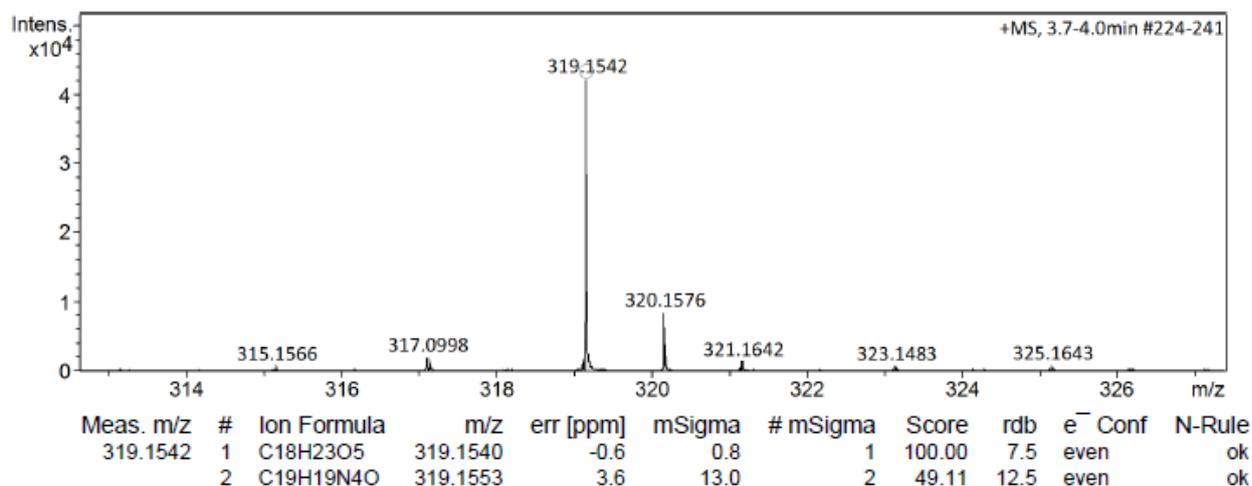
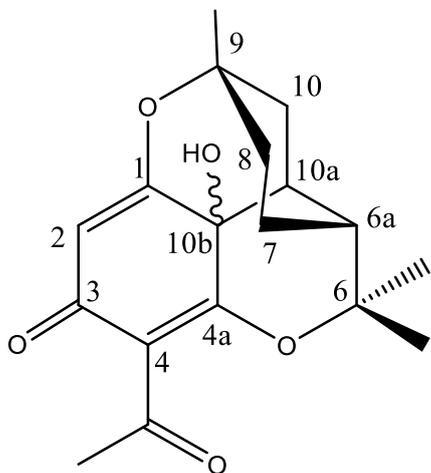


Abbildung 60: HRESIMS von Verbindung **8**

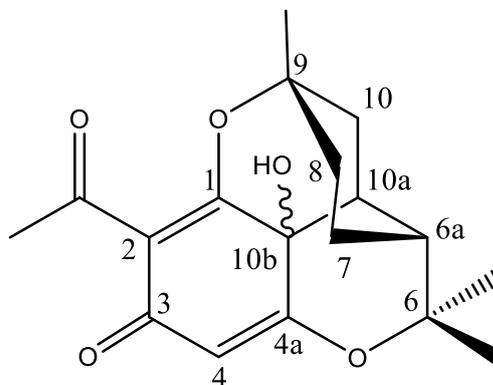
Im UV-Spektrum von **8** ist das Maximum der phenolischen Melifolione-Isomeren bei 290 nm deutlich hypsochrom nach 250 nm verschoben und spricht für die Anwesenheit einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonyl-Struktur.

Daraus wurde abgeleitet, dass es sich bei der isolierten Verbindung um ein Oxidationsprodukt eines der beiden Melifolione-Isomeren handeln könnte, bei dem die Phenolstruktur in eine para-Chinol-Struktur umgewandelt wurde.

Somit kamen grundsätzlich folgende isomere Strukturen für Verbindung **8** infrage:



Oxidationsprodukt von Melifolione A



Oxidationsprodukt von Melifolione B

Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (Abbildung 62, Abbildung 63 und Tabelle 9) zeigt Signale für insgesamt 22 Protonen, wobei ein Singulett bei 5.77 ppm für ein einzelnes olefinisches Proton sowie vier Singulett für jeweils drei Protonen registriert werden: Bei 2.61 ppm für eine Acetyl-Methylgruppe sowie bei 1.27, 1.46 und 1.54 ppm für drei Methylgruppen am quartären Kohlenstoff. Außerdem fällt ein breites Signal bei ca. 2.9 ppm ins Auge, das für tertiäre Carbinole typisch ist. Im Bereich von 2.3 bis 2.8 ppm werden zwei separate Signale mit gut aufgelöster Feinstruktur für jeweils ein Proton registriert. Bei höherem Feld erscheinen im Bereich der drei Singulett eine Reihe schlecht aufgelöster Multipletts für insgesamt 6 Protonen.

Im breitbandentkoppelten  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 64 und Tabelle 10) werden abgesehen von den beiden Signalen bei 30 und bei 110 ppm, die sich als Verunreinigungen erwiesen, insgesamt 18 C-Signale registriert, wobei die beiden Signale bei ca. 28 ppm erst nach starkem Spreizen der ppm-Skala erkannt werden konnten.

Die grobe Aufteilung der Signalbereiche nach der chemischen Verschiebung gleicht auf den ersten Blick den  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren der Melifolione, doch erkennt man auch deutliche Unterschiede.

Drei der bei tiefem Feld abgesetzten Signale sind stark paramagnetisch verschoben und erscheinen bei ca. 195 ppm für C-1, 190 ppm für C-3 und 172 ppm für C-4a. Sie passen damit

zu der angenommenen Struktur eines para-Chinols mit einer zusätzlichen Acetylgruppe, deren Carbonylgruppe bei ca. 202 ppm zur Resonanz kommt.

Die beiden Signale bei ca. 107 ppm für die zur Chinol-Carbonylgruppe ortho-ständigen Atome C-2 und C-4 können als Bestätigung für die angenommene para-Chinolstruktur gewertet werden. Auch die drei Signale im Bereich zwischen 70 und 90 ppm für die C-Atome in den Positionen 6, 9 und 10b in direkter Nachbarschaft zum Sauerstoff stehen im Einklang mit der postulierten Struktur. Die verbleibenden 9 C-Signale im Bereich von 25 bis 45 ppm konnten erst nach Auswertung der 2D-NMR-Spektren zugeordnet werden.

Das HSQC-Spektrum (Abbildung 65) lieferte die entscheidenden Informationen über die im normalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nur schlecht erkennbaren Multipletts für die 6 Protonen der 3 Methylengruppen, deren Zentren paarweise den Signalen von C-7, C-8 und C-10 zugeordnet werden konnten. Die chemische Verschiebung dieser geminalen Protonen unterscheidet sich deutlich von den entsprechenden Werten bei den Melifolione-Isomeren und außerdem beträgt der Unterschied zwischen der pseudo-axialen (ax) und pseudo-equatorialen (eq) Position jetzt nur noch ca. 0.1 ppm (Tabelle 10). Die Lage der drei Methyl-Singulets bei höherem Feld ähnelt auf den ersten Blick denen der Melifolione-Isomeren. Allerdings stellte sich bei der Analyse des HMBC-Spektrums von **8** (Abbildung 66 und Abbildung 67) heraus, dass die Reihenfolge eine andere ist: Die 9-Methylgruppe kommt bei höchstem Feld zur Resonanz ( $\delta = 1.27$  ppm), und die Signale für die geminalen Methylgruppen an C-6 liegen näher beieinander (Tabelle 10).

Der größte Unterschied zu den Melifolionen zeigte sich jedoch bei den Signalen für die Methinprotonen H-6a (2.74 ppm) und H-10a (2.34 ppm), die quasi ihren Platz getauscht haben. Eine Analyse des H,H-COSY-Spektrums (Abbildung 68) lässt jedoch keine andere Interpretation zu. Es ist geprägt durch intensive Kreuzsignale von H-6a/H-7ax, H-6a/H-10a und H-10a/H-10eq, während jene für die geminalen Protonen an C-7, C-8 und C-10 wegen der geringen Unterschiede in der chemischen Verschiebung nur wenig von der Diagonalen abweichen.

Die Position der Acetylgruppe an C-2 konnte durch das HMBC-Spektrum und NOESY-Spektrum abgesichert werden. Im HMBC-Spektrum (Abbildung 66) gibt es einen Cross-Peak zwischen C-2 und den Protonen der Acetyl-Methylgruppe.

Im NOESY-Spektrum ergeben sich Wechselwirkungen zwischen der Acetyl-Methylgruppe und der 9-CH<sub>3</sub>-gruppe (Abbildung 69) sowie zwischen H-4 und der (pseudo)axialen 6-CH<sub>3</sub>-gruppe (Abbildung 69).

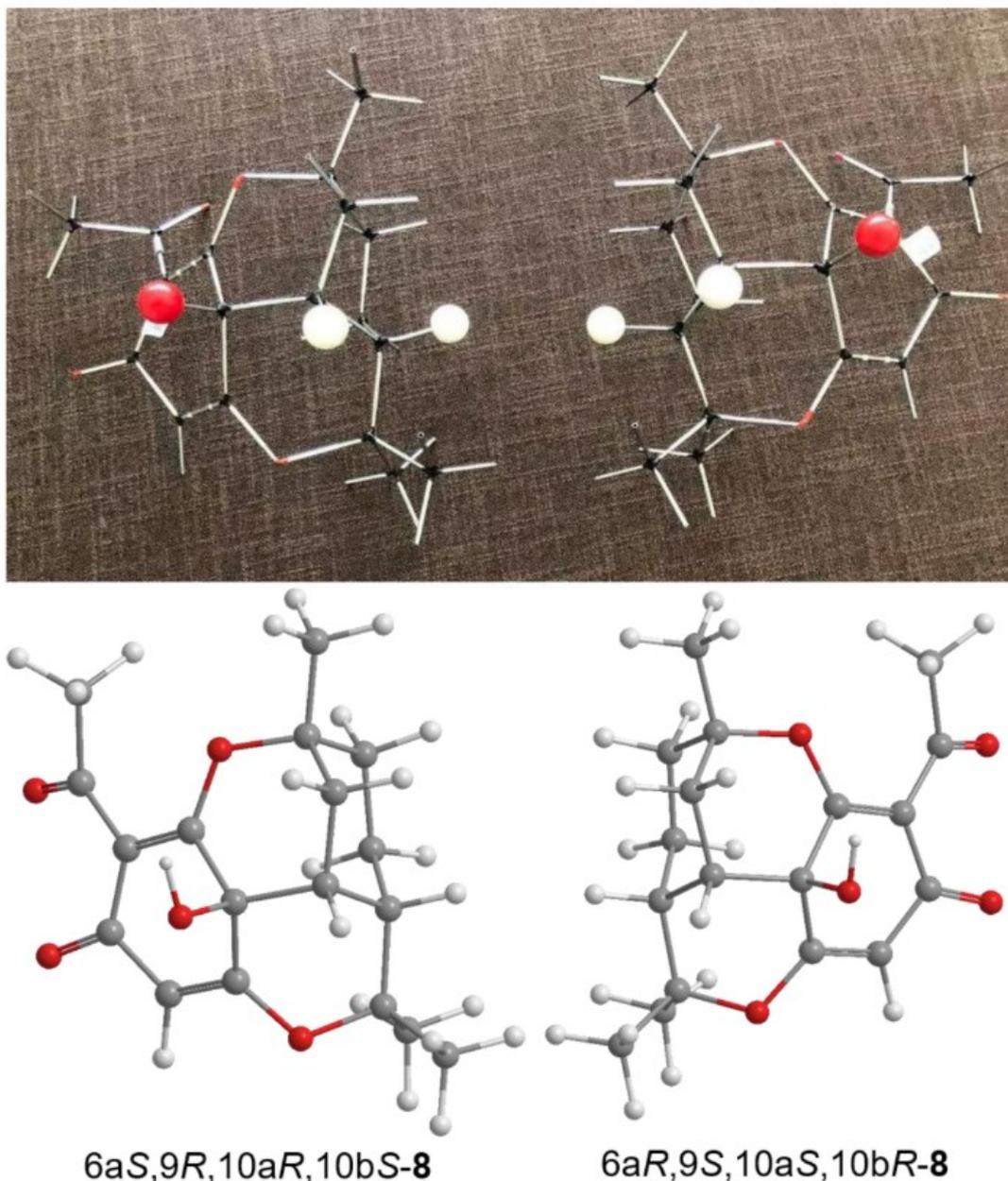
Damit konnte die Struktur von **8** als ein Oxidationsprodukt von Melifolione B eindeutig aufgeklärt werden. In Anlehnung an die CAS-Nomenklatur für Melifolione wird folgender

Vorschlag für die Benennung gemacht: 2-Acetyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-10b-hydroxy-6,6,9-trimethyl-1,9-epoxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-3(10bH)-on. Die Verbindung ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Da es sich um einen neuen Naturstoff handelt, wird der Name „Melifoliox-B“ vorgeschlagen.

Die Konstruktion eines *Dreiding*-Stereo-Modells der Verbindung **8** ist nur dann möglich, wenn die Asymmetrie-Zentren 6a, 9, und 10a die gleiche Konfiguration wie Melifolione B aufweisen, also entweder (6aR, 9S, 10aS) oder (6aS, 9R, 10aR). Außerdem müssen die beiden teilhydrierten Pyran-Ringe cis-verknüpft sein, so dass das neu hinzu gekommene Asymmetriezentrum an C-10b die umgekehrte Konfiguration wie 10a besitzt.

Aus diesen Erfordernissen geht hervor, dass die beiden möglichen Enantiomere von **8** nur die Konfigurationen (6aR, 9S, 10aS, 10bR) und (6aS, 9R, 10aR, 10bS) aufweisen können.

Anhand des *Dreiding*-Stereo-Modells ergaben sich außerdem wichtige Hinweise zum besseren Verständnis der NMR-Spektren von **8**. Im Gegensatz zu dem planaren Benzol-Ring von Melifolione B nimmt der para-Chinol-Ring bei **8** eine starre Boot-Konformation an. (Abbildung 61) Das sp<sup>3</sup>-hybridisierte C-10b führt jedoch zu einer größeren Beweglichkeit des übrigen Moleküls. Deshalb ist es im Vergleich zu Melifolione noch leichter möglich, dass der Cyclohexan-Ring von der Sesselform abweicht und durch Drehung um die Achse C-7/C-8 in eine „twisted“-Boot-Konformation übergeht. Dabei wechselt die räumliche Orientierung der geminalen Protonen an C-7, C-8 und C-10 zwischen pseudo-axial (ax) und pseudo-equatorial (eq) schneller als bei Melifolione B, so dass die Unterschiede in der chemischen Verschiebung geringer werden (Tabelle 1). Die größte Veränderung gegenüber Melifolione B erfahren allerdings die geminalen Protonen an C-7 und C-10 von **8**. Während bei Melifolione B die Protonen an C-7 durch den aromatischen Ringstrom stark abgeschirmt sind und daher bei höchstem Feld erscheinen, fällt dieser Effekt bei **8** aus, so dass hier die Protonen an C-10 bei relativ höchster Feldstärke zur Resonanz kommen (Tabelle 10).



**Abbildung 61:** Dreidimensionales Modell der beiden Enantiomere von Verbindung **8**

Mit der größeren Flexibilität des Cyclohexan-Ringes erhöht sich auch die konformative Beweglichkeit des doppelt methylierten Pyran-Rings, so dass die Methylgruppen an C-6 im Gegensatz zu Melifolione B leichter umklappen können, um so der sterischen Hinderung durch die Ethanbrücke über den Pyran-Ringen auszuweichen. Deshalb kommen sie, im Gegensatz zu Melifolione B, bei ähnlicher Feldstärke zur Resonanz (Tabelle 9).

Die Hochfeldverschiebung von H-10a bei **8** erklärt sich durch den Wegfall der benzyllischen Position im Vergleich zu Melifolione B.

Auch die starken Effekte auf die chemische Verschiebung der Signale von C-6a und C-10a im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **8** lassen sich aus der veränderten Struktur gegenüber Melifolione B

erklären: So wird C-6a wegen der  $\gamma$ -Position zur neu hinzugekommenen OH-Gruppe an C-10b deutlich diamagnetisch verschoben (von 46,0 nach 35,8 ppm), während bei C-10a wegen der  $\beta$ -Position zu dieser OH-Gruppe der umgekehrte Effekt auftritt (von 27,2 nach 44,1 ppm).

**Tabelle 9:**  $^1\text{H}$ -NMR- Daten von Verbindung **8** ( $\delta$  in ppm, 600/125 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	$^1\text{H}$ (J in Hz)	H,H-COSY
1	-	
2	-	
3	-	
4	5.77 s	
4a	-	
6-CH <sub>3</sub> ax	1.46 s	
6-CH <sub>3</sub> eq	1.54 s	
6a	2.74 t	H-6a/H-10a; H-6a/H-7ax
7ax	1.69 m	H-7eq/H-7ax; H-7ax/H <sub>2</sub> -8
7eq	1.79 m	
8ax	1.55 m	H-8ax/H-7ax; H-8ax/H-8eq
8eq	1.68 m	
9-CH <sub>3</sub>	1.27 s	
10ax	1.26 m	H-10ax/H-10a; H-10eq/H-10a
10eq	1.36 m	
10a	2.34 dt	H-10a/H-6a; H-10a/H-10eq; H-10a/H-10ax
10b-OH	2.88 s	
CH <sub>3</sub> -CO	2.61 s	

Tabelle 10:  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von **8** in  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  in ppm)

Position	$^{13}\text{C}$	HSQC	HMBC
<b>1</b>	195.2	--	C-1/H-10a
<b>2</b>	107.5	--	C-2/H-4; C-2/ $\underline{\text{CH}}_3$ -CO
<b>3</b>	190.5	--	C-3/H-4
<b>4</b>	106.3	C-4/H-4	--
<b>4a</b>	171.5	--	C-4a/H-4 C-4a/H-10a
<b>6</b>	88.5	--	C-6/6- $\underline{\text{CH}}_3$ eq; C-6/6- $\underline{\text{CH}}_3$ ax; C-6/H-6a
<b>6a</b>	35.8	C-6a/H-6a	C-6a/6- $\underline{\text{CH}}_3$ eq; C-6a/6- $\underline{\text{CH}}_3$ ax; C-6a/H-10a
<b>7</b>	24.7	C-7/H <sub>2</sub> -7	C-7/H-6a
<b>8</b>	36.2	C-8/H <sub>2</sub> -8	C-8/H-6a; C-8/9- $\underline{\text{CH}}_3$ ; C-8/H <sub>2</sub> -7
<b>9</b>	70.6	--	C-9/9- $\underline{\text{CH}}_3$ ; C-9/H-7eq; C-9/H-8; C-9/H-10
<b>10</b>	37.0	C-10/H <sub>2</sub> -10	C-10/H-10a; C-10/9- $\underline{\text{CH}}_3$
<b>10a</b>	44.1	C-10a/H-10a	C-10a/H-6a; C-10a/H-7eq; C-10a/H <sub>2</sub> -10
<b>10b</b>	72.5	--	C-10b/H-4
<b>6-<math>\underline{\text{CH}}_3</math>ax</b>	28.3	6- $\underline{\text{CH}}_3$ ax/6- $\underline{\text{CH}}_3$ ax	6- $\underline{\text{CH}}_3$ ax/H-6a; 6- $\underline{\text{CH}}_3$ ax/6- $\underline{\text{CH}}_3$ eq
<b>6-<math>\underline{\text{CH}}_3</math>eq</b>	31.7	6- $\underline{\text{CH}}_3$ eq/6- $\underline{\text{CH}}_3$ eq	6- $\underline{\text{CH}}_3$ eq/H-6a; 6- $\underline{\text{CH}}_3$ eq/6- $\underline{\text{CH}}_3$ ax
<b>9-<math>\underline{\text{CH}}_3</math></b>	26.5	9- $\underline{\text{CH}}_3$ /9- $\underline{\text{CH}}_3$	9- $\underline{\text{CH}}_3$ /H-8; 9- $\underline{\text{CH}}_3$ /H <sub>2</sub> -10
<b><math>\underline{\text{CH}}_3</math>-CO</b>	28.2	$\underline{\text{CH}}_3$ -CO/ $\underline{\text{CH}}_3$ -CO	
<b><math>\underline{\text{CH}}_3</math>-<math>\underline{\text{C}}\text{O}</math></b>	201.5	--	$\underline{\text{CH}}_3$ - $\underline{\text{C}}\text{O}$ / $\underline{\text{CH}}_3$ -CO

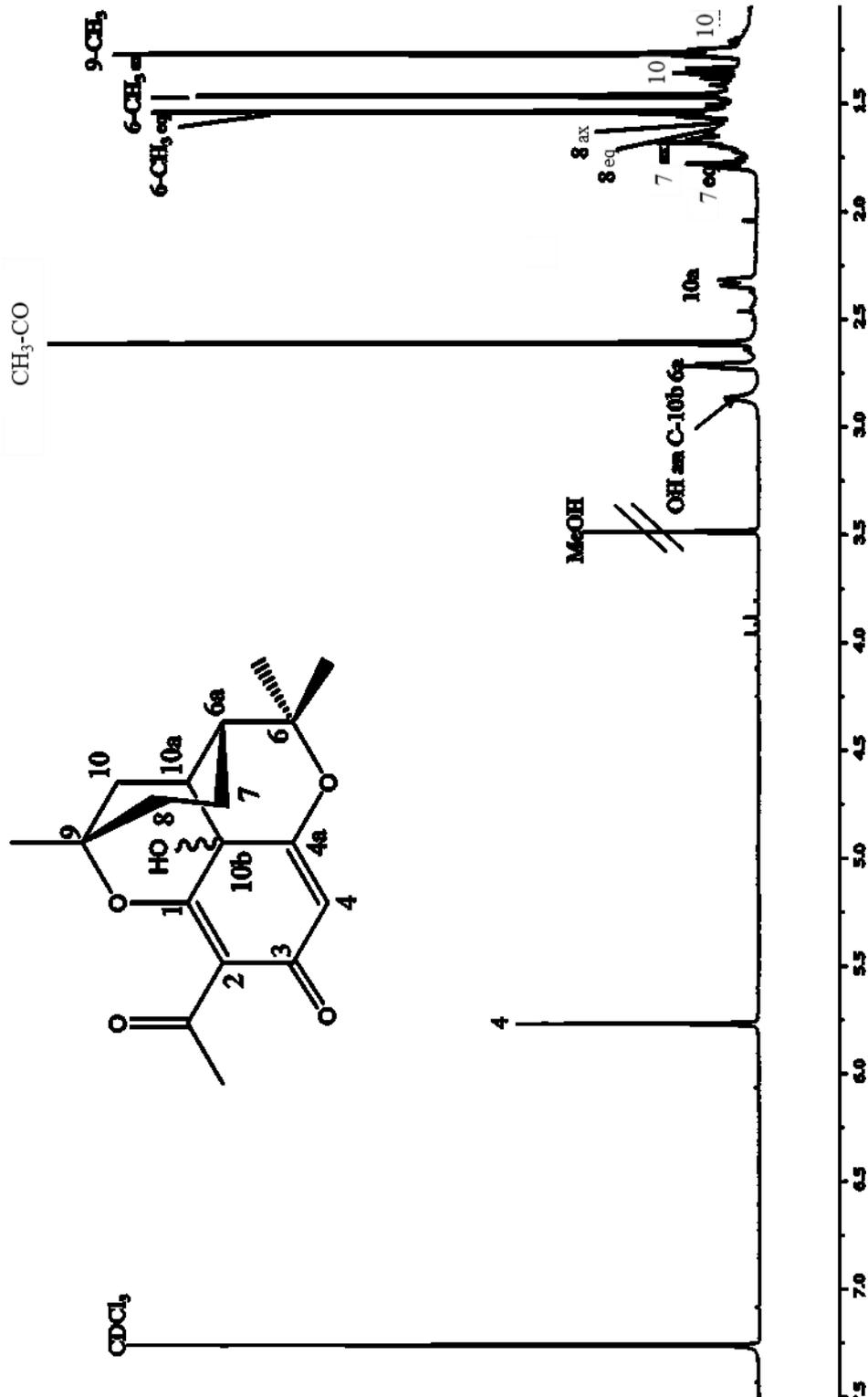


Abbildung 62:  $^1\text{H-NMR}$  von **8** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

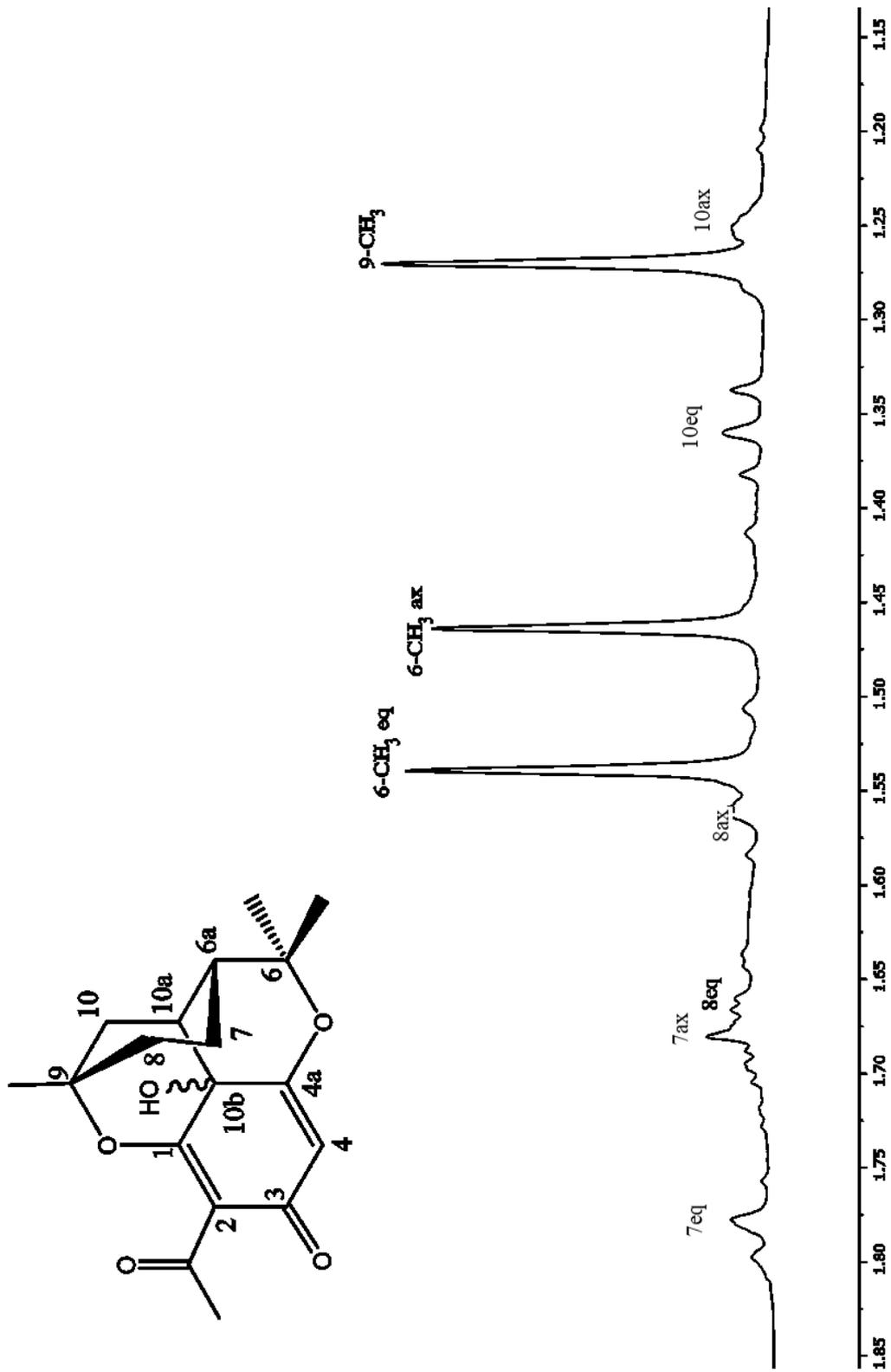


Abbildung 63:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Ausschnitt) von **8** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

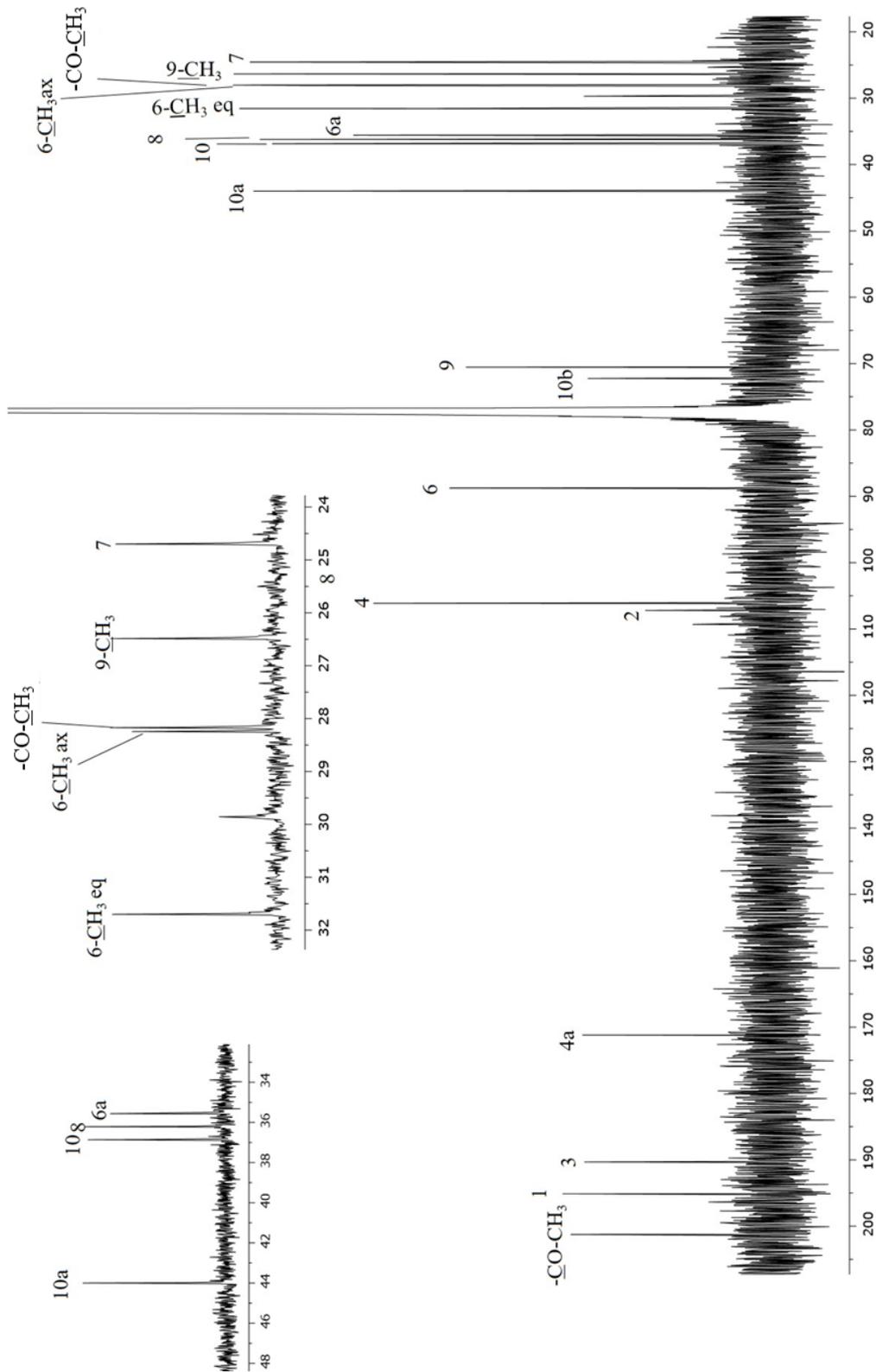


Abbildung 64:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **8** (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

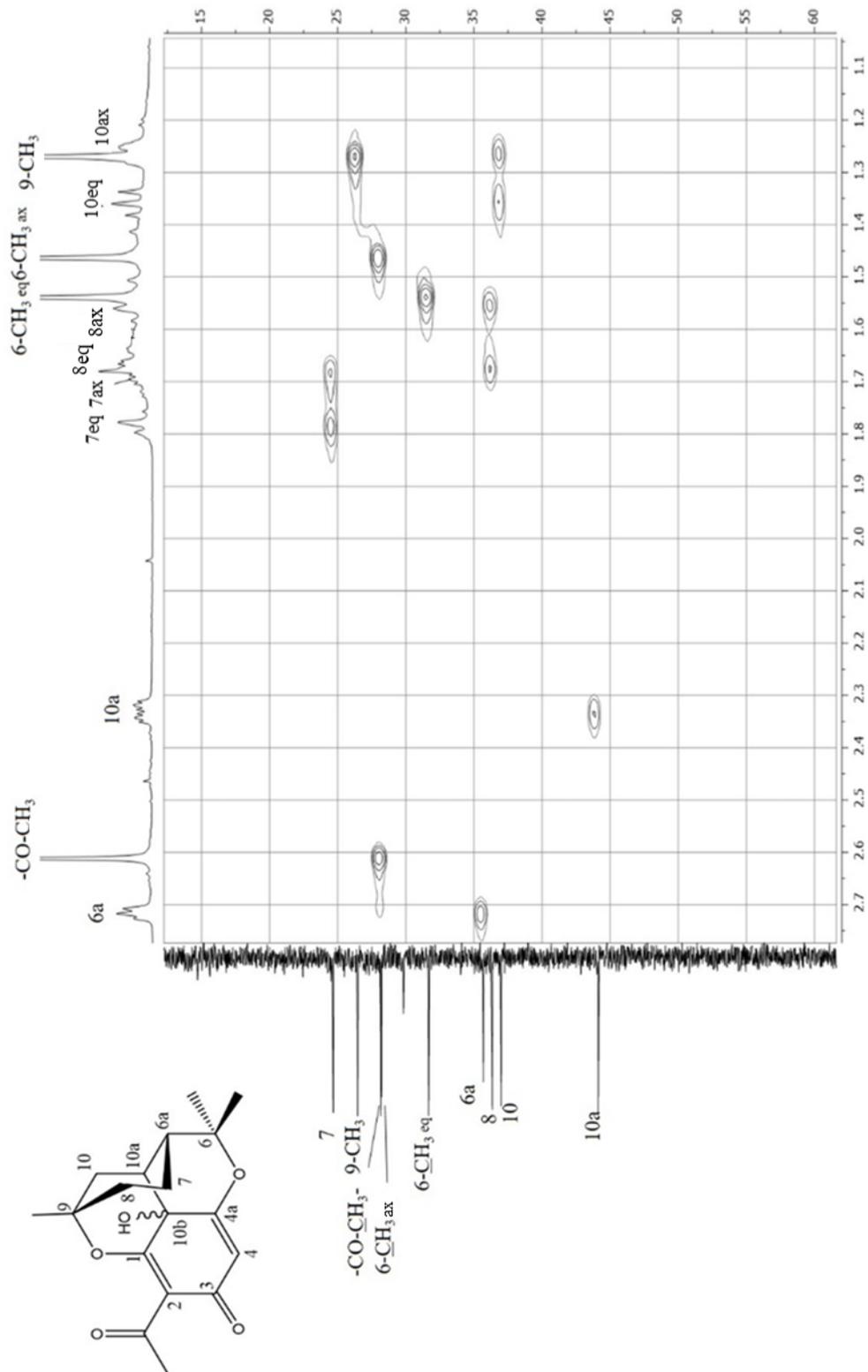


Abbildung 65: 2D-HSQC-Spektrum von **8** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

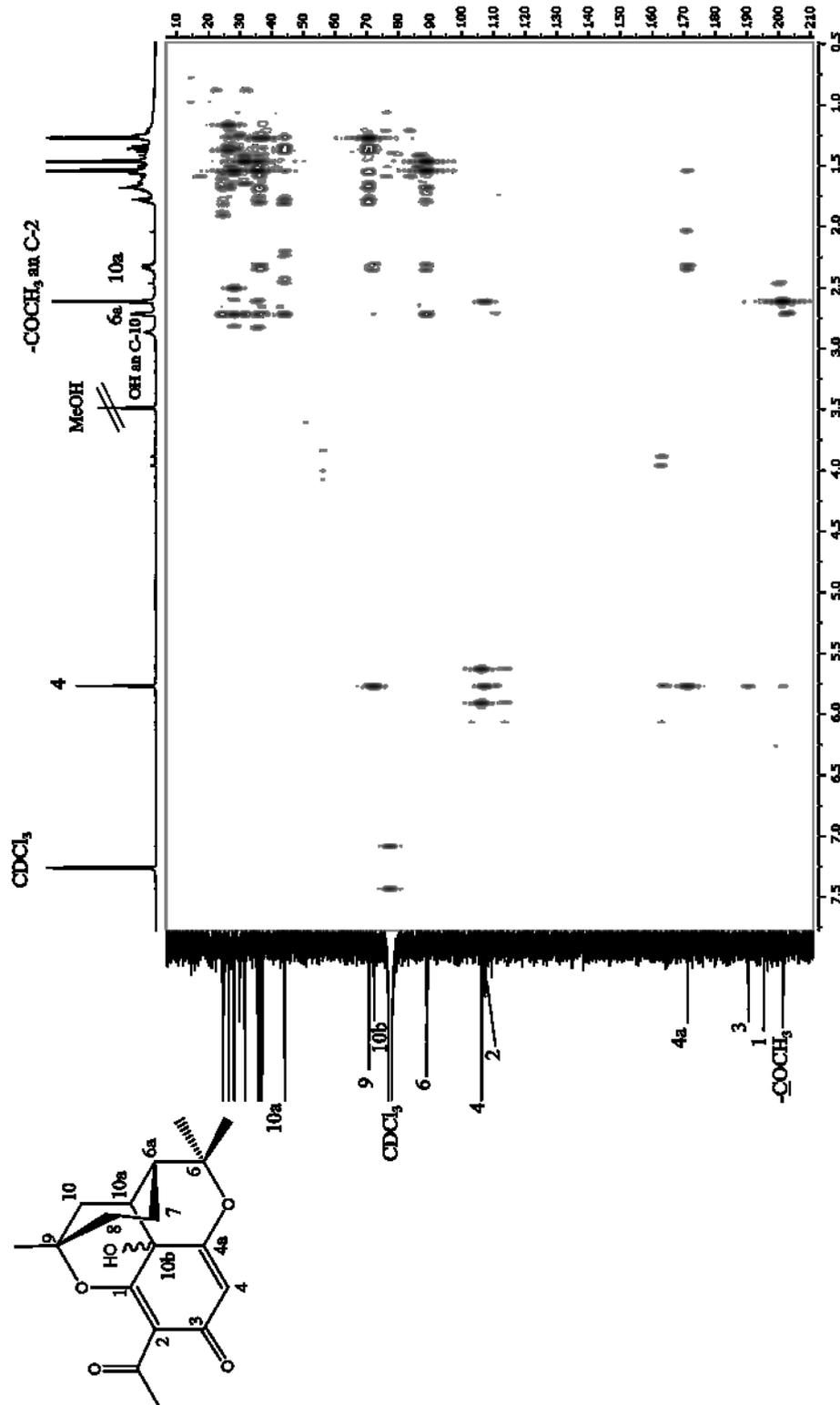


Abbildung 66: 2D-HMBC-Spektrum von **8** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

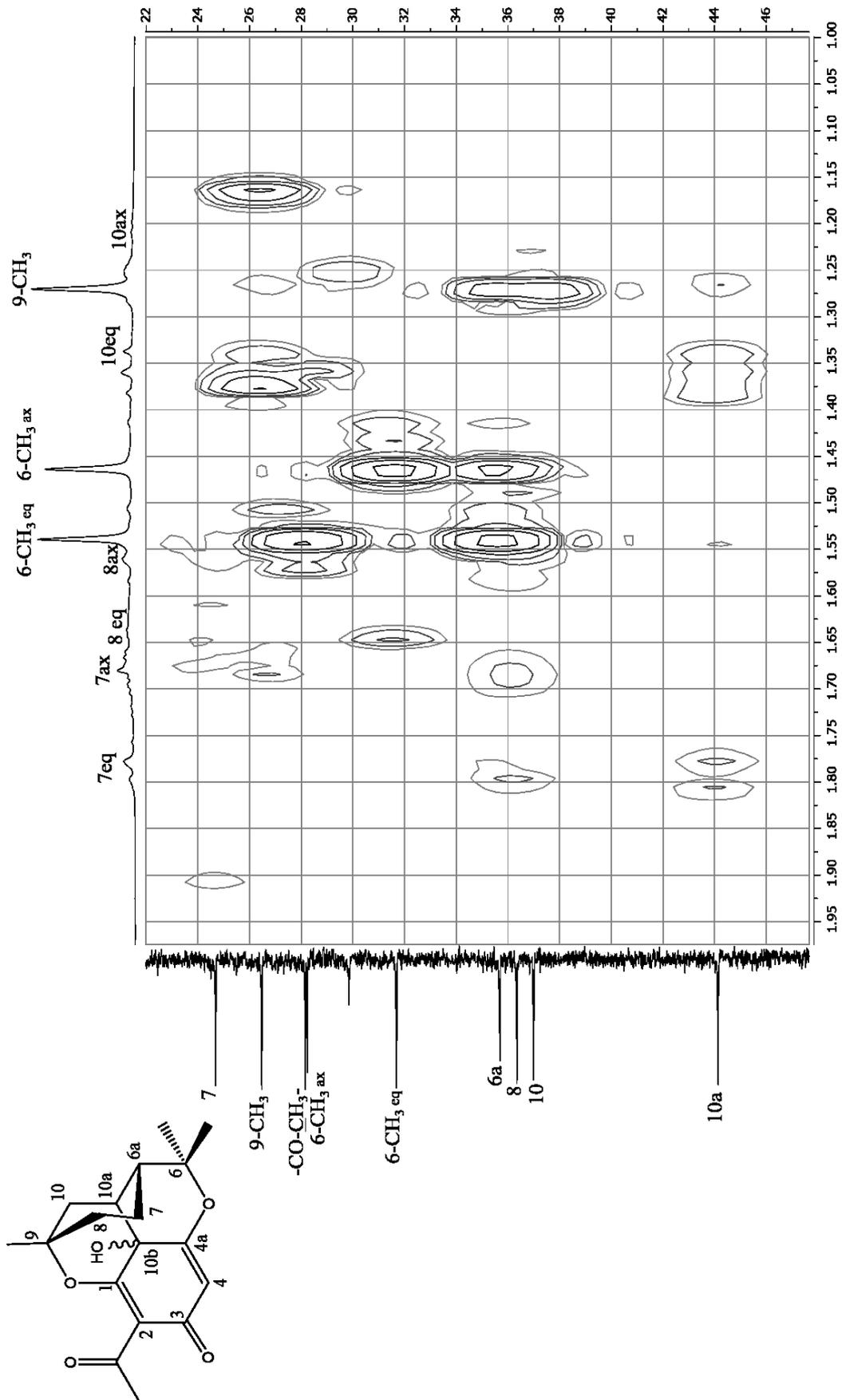


Abbildung 67: 2D-HMBC-Ausschnitt von **8** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

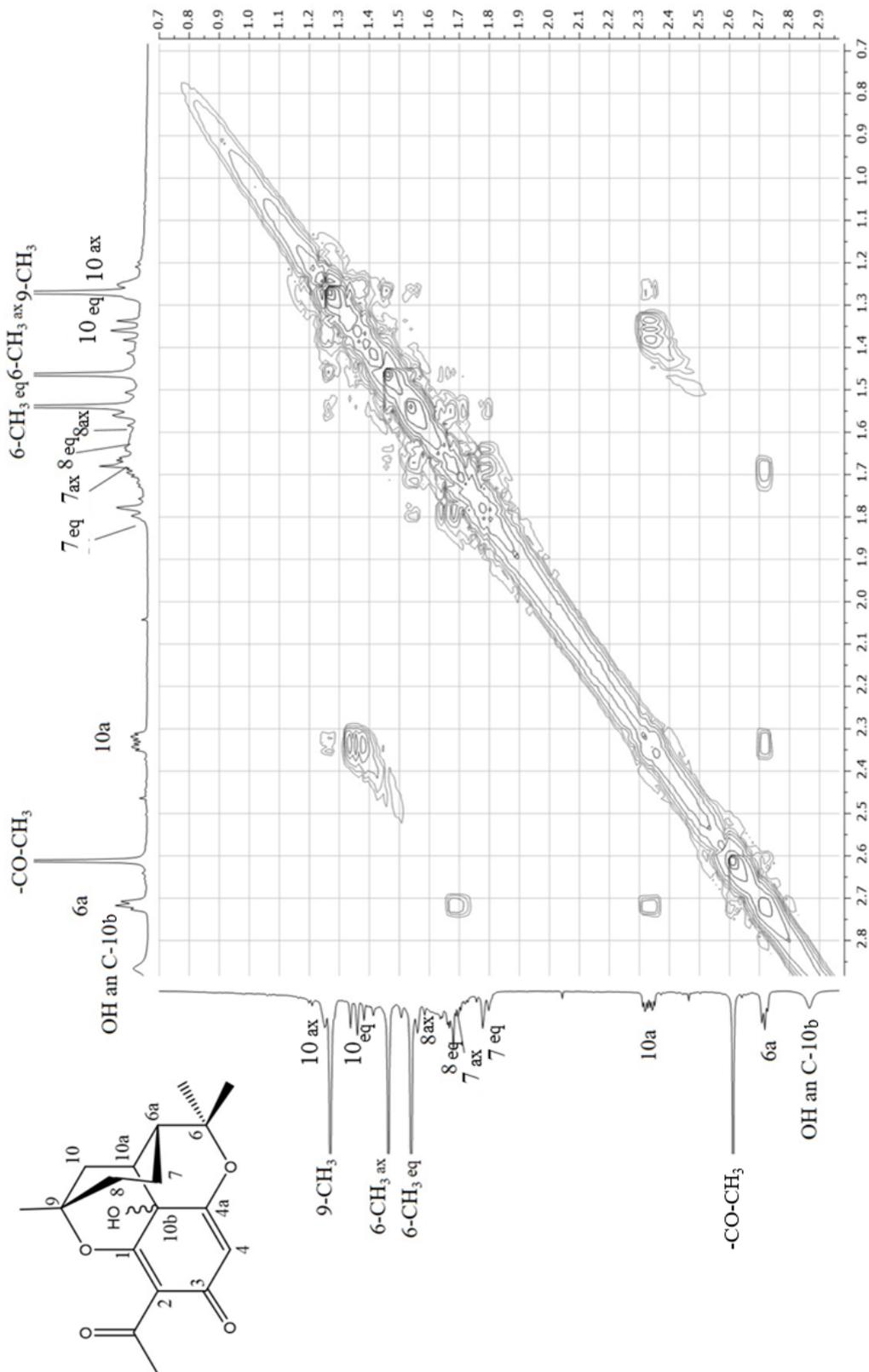


Abbildung 68: 2D-H,H-COSY von Verbindung **8** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

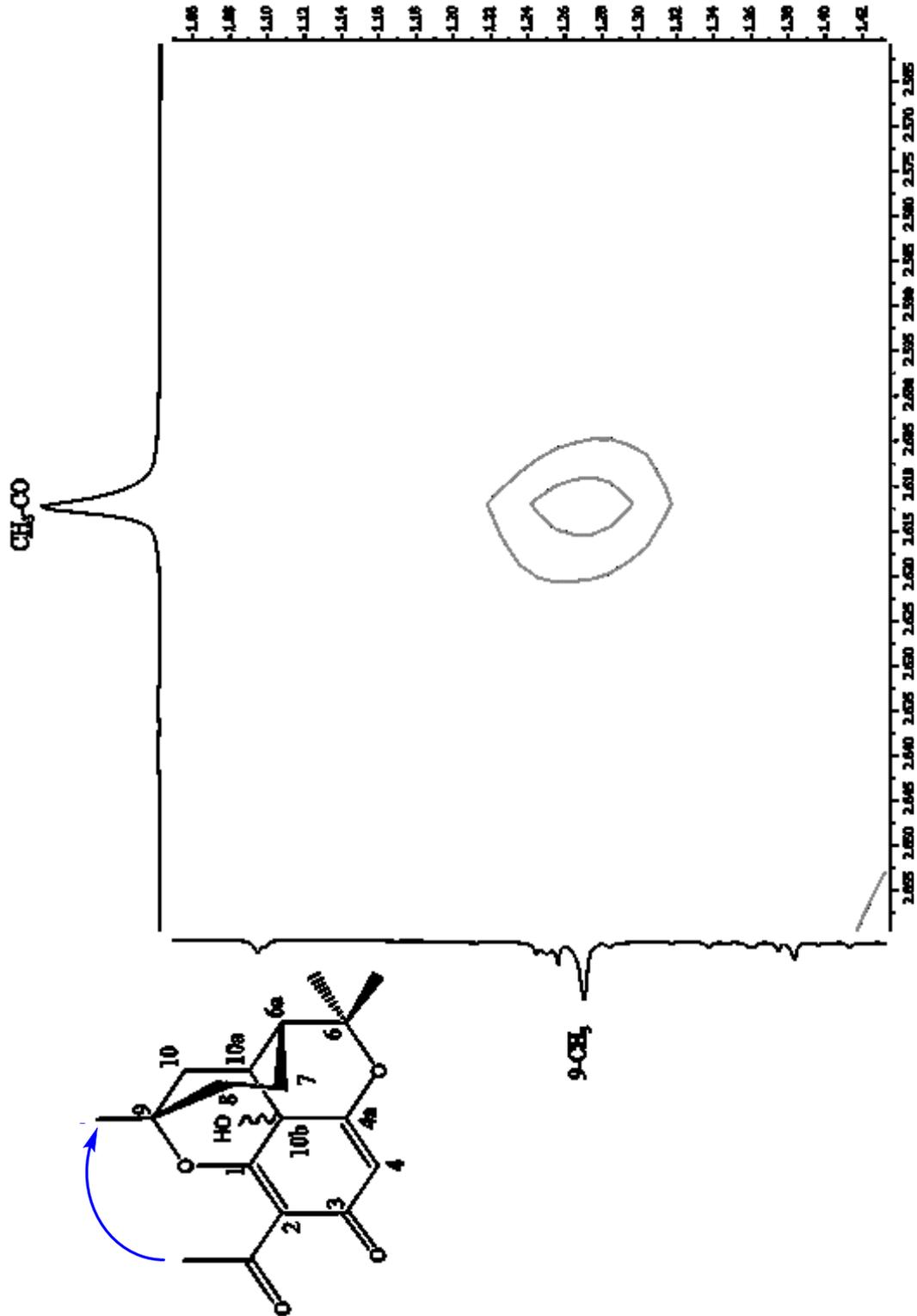


Abbildung 69: Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **8** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

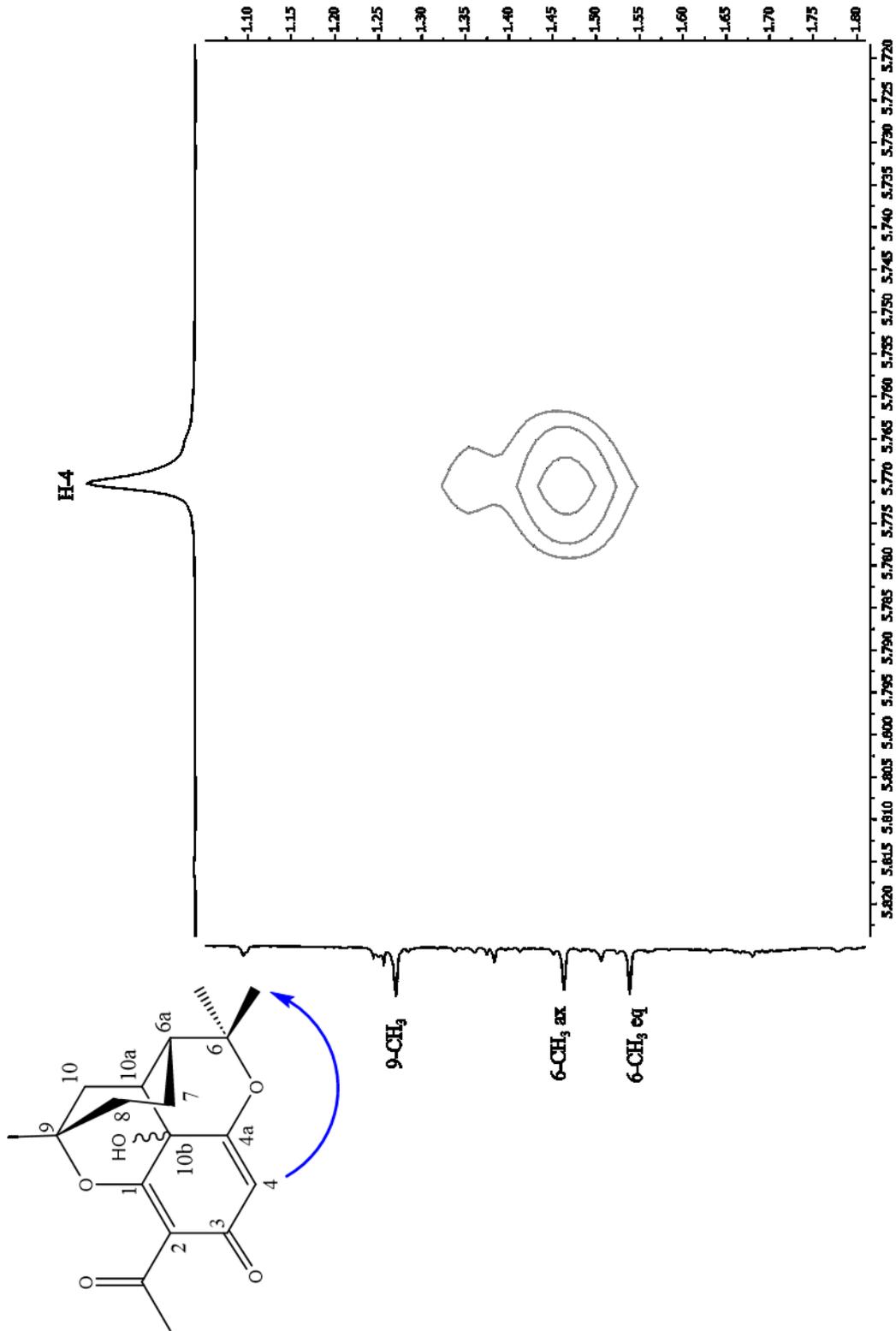
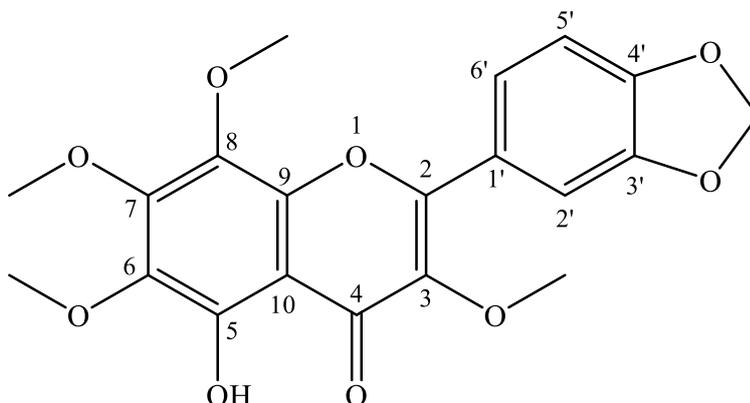


Abbildung 70: Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **8** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

## 2.8 Verbindung 9 (5-Hydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon)



Aus der Fraktion MB.D-VI-6 wurde Verbindung **9** rein als gelblicher, amorpher Rückstand in einer Menge von 2,5 mg isoliert. Die Verbindung war außerdem als Gemisch mit **10** in der Fraktion MB.D-V-4 enthalten. Bei der Dünnschichtchromatographie im Fließmittel DC-3 fiel die Substanzzone von **9** bei einem R<sub>f</sub>-Wert von 0,6 als ein den Fluoreszenzindikator bei  $\lambda = 254$  nm löschender Fleck auf. Nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A färbte sich diese Zone im Tageslicht gelb, bei Betrachtung im UV bei  $\lambda = 366$  nm trat sie gelb-leuchtend in Erscheinung. Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz führte ebenfalls zu einer Gelbfärbung. (s. Kap. 6.1.1)

Im HPLC wurde der Substanzpeak bei einer Retentionszeit von 32,46 min gefunden (s. Kap. 6.1.3). Das dabei, mit Hilfe des Diodenarray-Detektors, aufgenommene UV-Spektrum von **9** ließ aufgrund der charakteristischen Maxima im Bereich von  $\lambda = 300 - 380$  nm (Bande I) und  $\lambda = 240 - 280$  nm (Bande II) vermuten, dass sich bei **9** um ein Flavonoid handelte. [99] Das hochauflösende ESI-MS (Abbildung 71) zeigte das Molekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z = 403.1025$ , woraus sich die Summenformel  $C_{20}H_{18}O_9$  ableiten lässt.

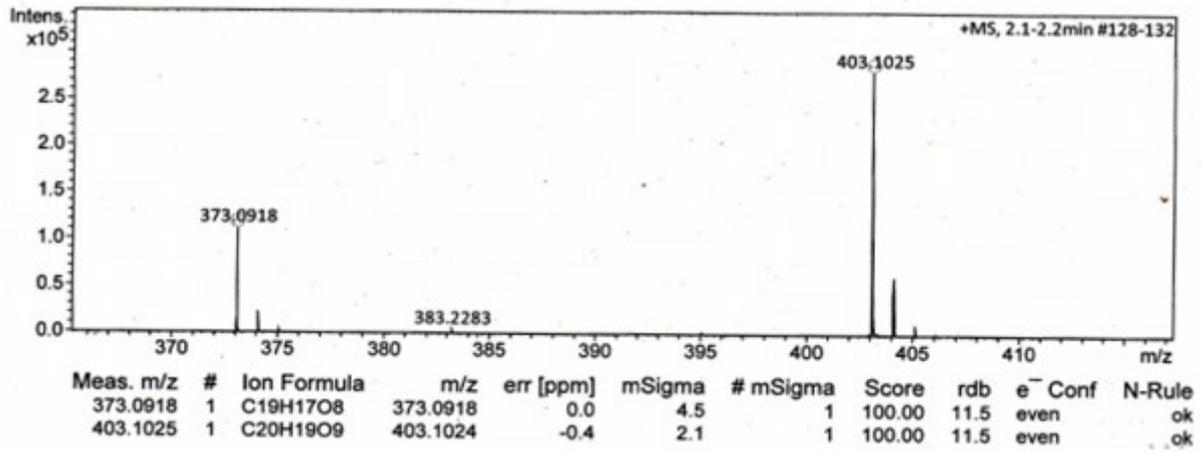


Abbildung 71: HRESIMS von Verbindung 9

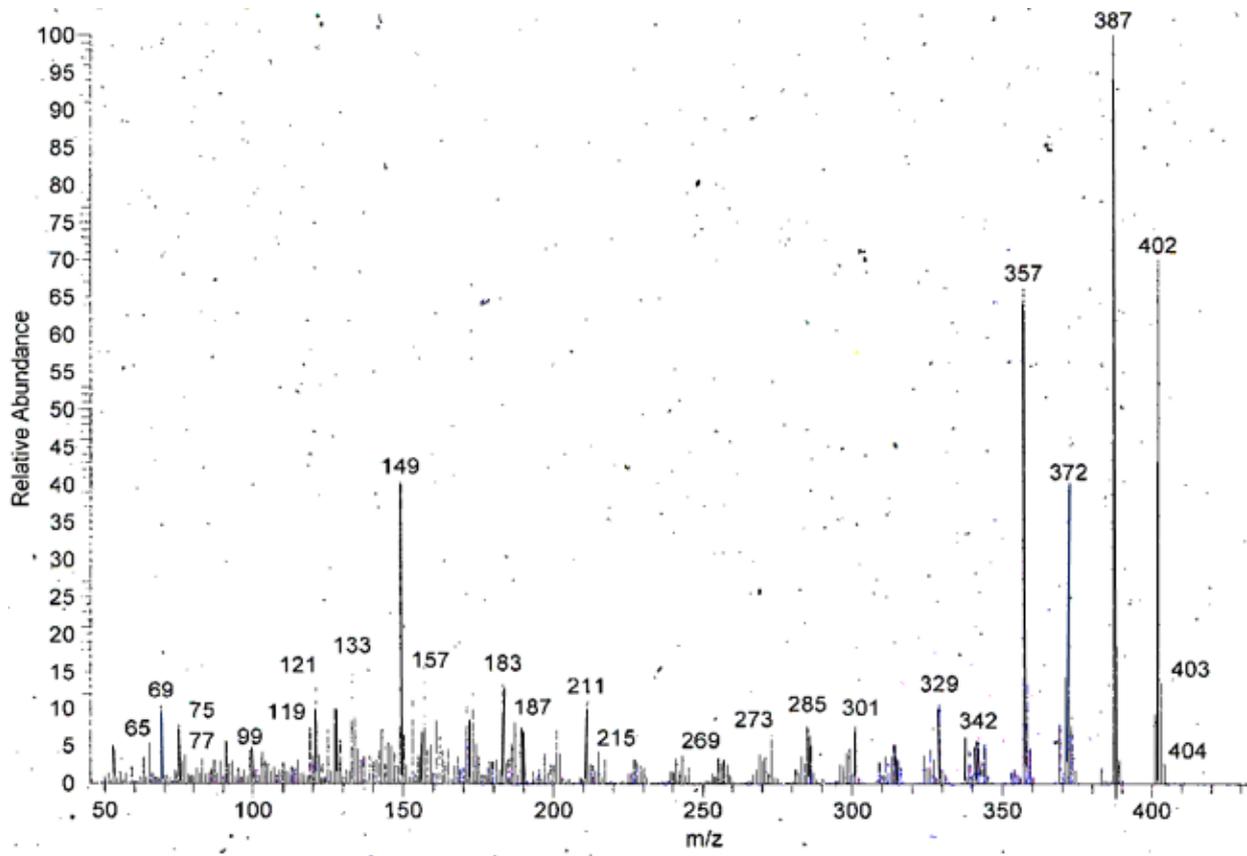
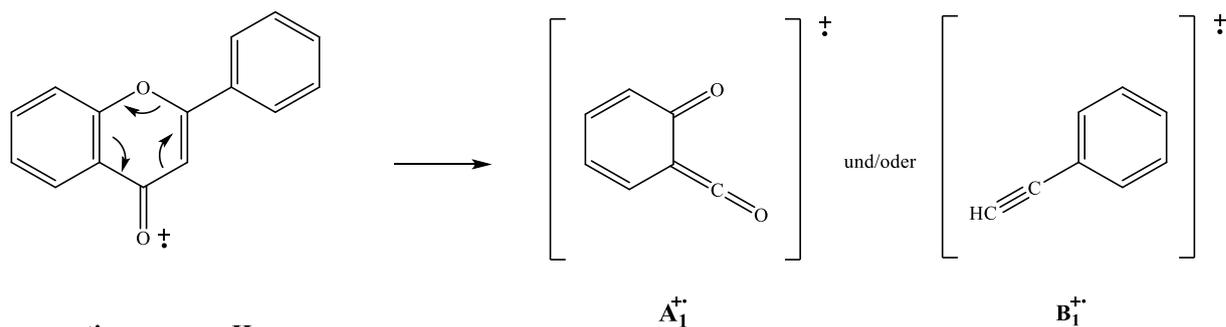


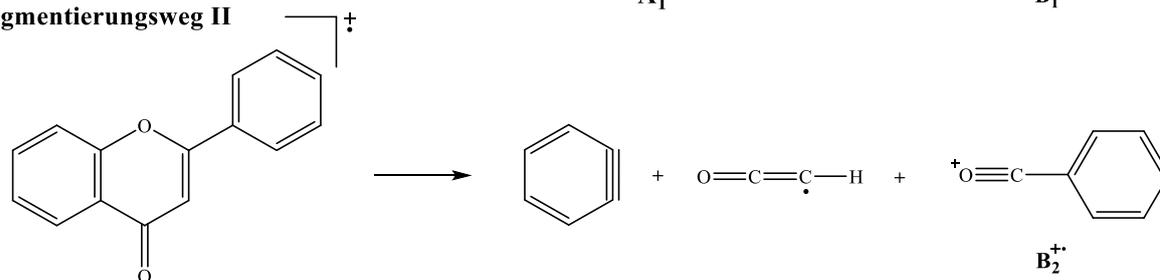
Abbildung 72: EI-Massenspektrum von Verbindung 9

Im Gegensatz zum mit weicher Ionisation mittels Elektrospray erhaltenen Massenspektrum, zeigte das MS mit Elektronenstoßionisation neben dem Molekülion bei  $m/z = 402$  weitere charakteristische Fragmente (Abbildung 72), die bereits viele Rückschlüsse auf die Struktur des Flavonoids zulassen. [99] Im bereits 1975 von Jeffrey B Harborne, Tom J. Mabry und Helga Mabry herausgegebenen Buch „The Flavonoids“ befindet sich ein von Tom J. Mabry and Ken R. Markham verfasstes Kapitel zur Massenspektrometrie von Flavonoiden. [100] Dort wird beschrieben, dass viele Flavonoide mehr oder weniger stabile Molekülionen im EI-Spektrum zeigen und dass sich methoxylierte Flavonoide durch die Abspaltung einer oder mehrerer Methylgruppen auszeichnen. Im EI-Massenspektrum von **9** (Abbildung 72) findet man neben dem Molekülion drei weitere Fragmente bei  $m/z = 387$  ( $M^+ - CH_3$ ), gleichzeitig der Basispeak (100%), 372 ( $M^+ - 2 \times CH_3$ ) und 357 ( $M^+ - 3 \times CH_3$ ), die auf mindestens drei im Molekül vorhandene Methoxygruppen hindeuten. Ein weiteres, weniger intensives Fragment bei  $m/z = 342$  könnte aus der Abspaltung des Methyls ( $CH_3$ ) aus einer vierten Methoxygruppe resultieren. Da es sich bei den bisher in der Gattung *Melicope* gefundenen Flavonoiden meist um höher methoxylierte Derivate handelte [101,102], passt das Fragmentierungsmuster von **9** gut zu einer solchen Verbindung. In vielen der bisher isolierten Substanzen finden sich aber auch orthoständige Hydroxylgruppen, die zur Methylendioxygruppe ( $-O-CH_2-O$ ), dem Vollacetal des Formaldehyds umgewandelt wurden. Da solche Strukturen unter Abspaltung von Formaldehyd reagieren können, ließen sich die Fragmente bei  $m/z = 372$  und 357 auch als  $M^+ - CH_2O$  bzw.  $M^+ - CH_3 - CH_2O$  erklären. Unter Berücksichtigung der mit Hilfe des hochauflösenden ESI-MS ermittelten Summenformel  $C_{20}H_{18}O_9$ , sollte es sich bei Verbindung **9** um ein vierfach methyliertes Flavonol mit einer zusätzlichen Methylendioxygruppe im A- oder B-Ring handeln. Mabry und Markham beschreiben auch die Spaltung der Flavonoide in intakte A- und B-Ringfragmente (Abbildung 73), die auf zwei verschiedenen Fragmentierungswegen I und II entstehen können. Bei Weg II handelt es sich um eine Retro-Diels-Alder Reaktion. [100,103] Ein besonders auffälliges Fragment im EI-Spektrum von **9** tritt bei  $m/z = 149$  auf. Unter Berücksichtigung der möglichen Substitution des B-Rings mit einem oder mehreren der oben genannten Substituenten, könnte es sich bei diesem Fragment um das  $B_2^+$ -Fragment eines 3'4'-Methylendioxyflavonols handeln (Abbildung 74). Ausgehend von der Annahme, dass es sich um ein vierfach methoxyliertes Flavonol mit einer Methylendioxystruktur im B-Ring handelt, können die im EI-Spektrum von **9** auftretenden Fragmente nach den von Markham und Mabry aufgestellten Regeln weiter charakterisiert werden (Abbildung 74)

Fragmentierungsweg I



Fragmentierungsweg II

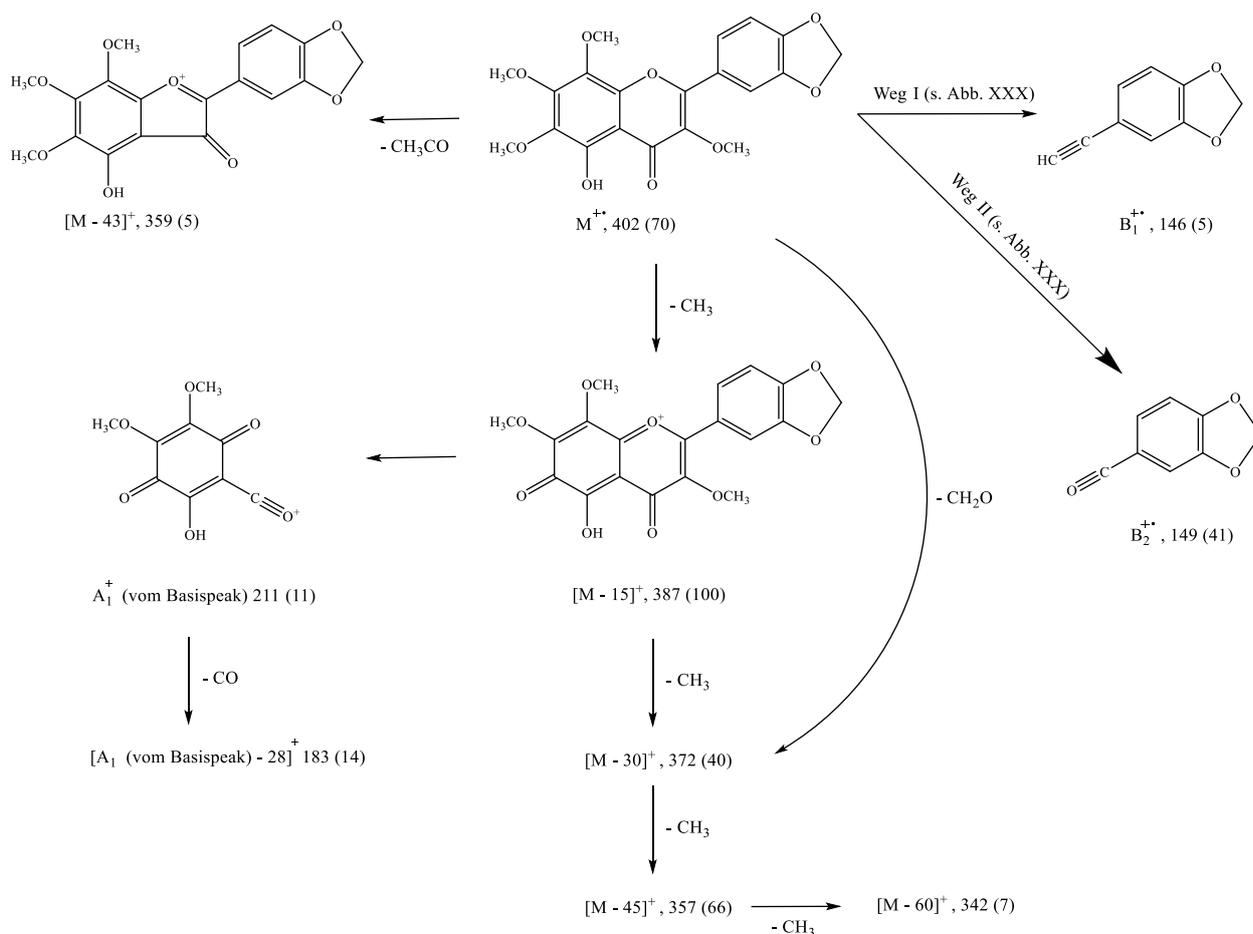


**Abbildung 73:** Allgemeine Fragmentierungswege von Flavonoiden nach [100]

Im Gegensatz zu dem auf dem Fragmentierungsweg II entstandenen, intensiven  $\text{B}_2^+$ -Fragment bei  $m/z = 149$ , ist das  $\text{B}_1^+$ -Fragment bei  $m/z = 146$  als Resultat des Fragmentierungswegs I weit weniger auffällig (s. Abbildung 74). Auf diesem Weg entsteht auch das  $\text{A}_1^+$ -Fragment, das bei Verbindung **9** bei  $m/z = 226$  zu erwarten wäre, im Spektrum von **9** aber nicht gefunden wurde. Hier findet sich, im Einklang zu den bei Markham und Mabry beschriebenen Fragmentierungen von methoxylierten Flavonolen ein solches  $\text{A}_1^+$ -Fragment ausgehend von Basispeak bei  $m/z = 387$  (100) bei  $m/z$  211. Nach Abspaltung der Carbonylgruppe resultiert dann das Fragment bei  $m/z = 183$  (Abbildung 72 und Abbildung 74).

Aufgrund der aus den MS-Untersuchungen ableitbaren Strukturelementen, sollte Verbindung **9** eine freie Hydroxylgruppe besitzen, deren Position noch nicht geklärt ist. Deshalb wurde zur weiteren Aufklärung der Struktur das UV-Spektrum in Methanol aufgenommen und mit den von Mabry et al. vorgeschlagenen Shiftreagenzien (s. 6.2.4) umgesetzt. [100]

In reinem Methanol fanden sich Maxima bei  $\lambda = 349$  nm (Bande I) und zwei weitere bei  $\lambda = 271$  und  $256$  nm (Bande II).



**Abbildung 74:** Mögliche Fragmentierung von **9** nach Mabry und Markham [100,103]

Nach Zugabe von Natriummethylatlösung wurde die Bande I um 20 nm bathochrom verschoben, während die Bande II nur geringfügig beeinflusst wurde (s. 6.2.4). Diese Shiftdifferenz deutete auf ein höher oxygeniertes Flavonol mit freier Hydroxylgruppe an C-5 hin. Eine freie 3-OH Gruppe, die ebenfalls bei vielen Flavonolen vorkommt, würde sich durch einen wesentlich größeren Shift (ca. 60 nm) zu erkennen geben. Ebenfalls charakteristisch für 5-Hydroxy- aber nicht für 3-Hydroxyflavonole ist ein geringer Shift nach Zugabe von AlCl<sub>3</sub>-Lösung. Bei Verbindung **9** betrug er 11 nm. Aluminiumchlorid bildet mit 5-Hydroxysubstituierten Flavonoiden sechsgliedrige Komplexe, die gegenüber Salzsäure instabil sind. 3-Hydroxy-substituierte Flavonoide bilden mit Aluminiumchlorid hingegen fünfgliedrige Chelatkomplexe, die durch Salzsäure nicht hydrolysiert werden können und daher die Intensität der Bande I nicht verändern. Die Säurelabilität bestätigt somit die Position der freien phenolischen OH-Gruppe an C-5.

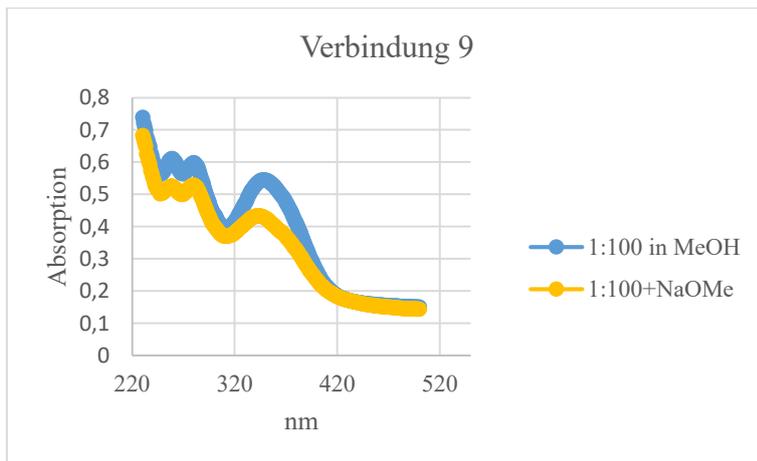
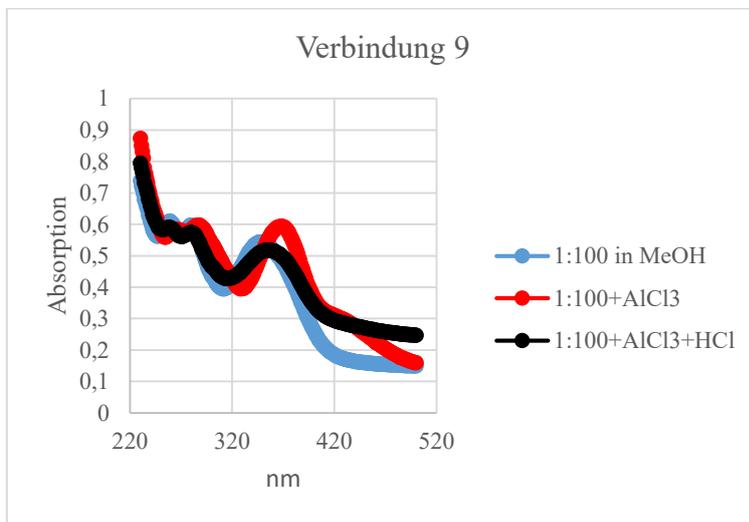
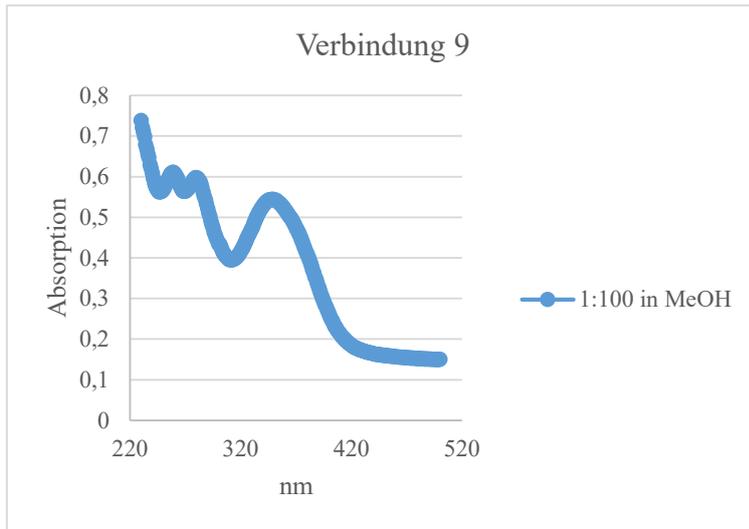
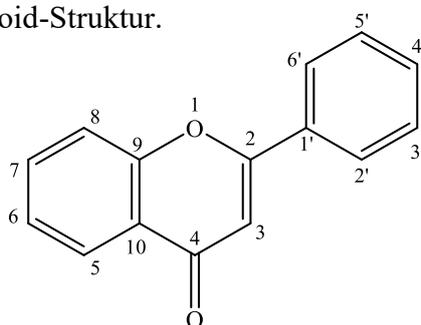


Abbildung 75: UV Spektren von Verbindung 9 mit verschiedenen Shift-Reagenzien

Zur endgültigen Strukturaufklärung von Verbindung **9** wurden eindimensionale  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  NMR-Spektren sowie zweidimensionale HSQC-, HMBC- und H,H-COSY-Spektren in deuteriertem Chloroform aufgenommen (Abbildung 79 bis Abbildung 84). Das bereitbandenkoppelte  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum (Abbildung 80) zeigte die Signale für 20 Kohlenstoffe. Aufgrund der im HSQC-Spektrum gefundenen, direkten H,C-Kopplungen handelte es sich dabei um die Signale von einem Methylen-, drei Methin- und vier Methylkohlenstoffen. Die restlichen zwölf Signale stammen demnach von quartären Kohlenstoffen.

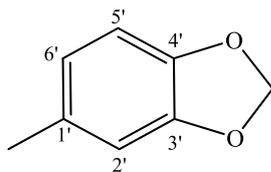
Das bei tiefstem Feld registrierte Signal bei 179.5 ppm ist typisch für die Carbonylgruppe eines  $\gamma$ -Pyrons als Teil einer Flavonoid-Struktur.



**Abbildung 76:** Flavonoid-Struktur

Die Signale aller vier Methyl-Kohlenstoffe lagen bei ca. 60 ppm und konnten deshalb sämtlich als Methoxy-Gruppen identifiziert werden, was sich im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abbildung 79) durch vier Singulets bei ca. 4 ppm bestätigte. Dieser Befund bestätigte die bereits nach Auswertung der Massenspektren vermutete Präsenz von vier Methoxygruppen. Die bereits durch die Abspaltung eines Moleküls Formaldehyd im EI-MS vermutete Dioxo-Methylen-Gruppe bestätigte sich ebenfalls durch das charakteristische  $^{13}\text{C}$ -Signal des Methylenkohlenstoffs bei 102 ppm in Verbindung mit dem zugehörigen  $^1\text{H}$ -Signal bei ca. 6 ppm (Abbildung 79 und Tabelle 11).

Die chemische Verschiebung der drei Methin-Protonen bei  $\delta_{\text{H}} = 6.95, 7.65$  und  $7.76$  ppm mit dem Kopplungsmuster eines ABX-Systems und den Kopplungskonstanten von 8.3 Hz für eine ortho- und 1.8 Hz für eine meta-Kopplung spricht für einen 1,3,4-trisubstituierten Phenylring. Zusammen mit der bereits erwähnten Dioxo-Methylen-Gruppe und den beiden tieffeldverschobenen  $^{13}\text{C}$ -Signalen bei ca. 150 ppm ergab sich damit ein substituiertes 1,3-Benzodioxol mit folgender Struktur:

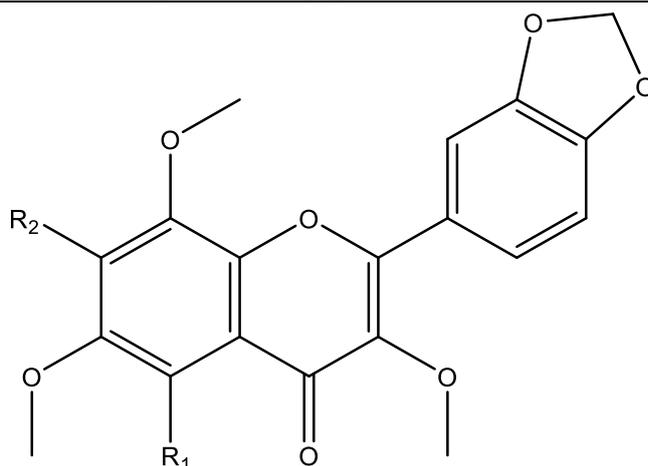
**Abbildung 77** Benzodioxol

Bei Flavonoiden sind solche ABX-Systeme in der Regel im B-Ring zu finden, da der A-Ring aufgrund der Biosynthese als gemischtes Polyketid normalerweise an den Kohlenstoffen 5 und 7 hydroxyliert vorliegt. Durch nachträgliche Reduktion der phenolischen Hydroxylgruppe an C-5 ist ein solches Strukturelement im A-Ring zwar auch möglich, eine Dioxo-Methylen-Gruppe ist dann aber nicht als Substituent denkbar, weil der A-Ring in diesem Fall nur einfach oxygeniert vorliegen kann.

Daraus folgte zwangsläufig, dass im Chromon-Teil alle Positionen substituiert sein müssen, wobei dort eine OH-Gruppe und vier Methoxy-Gruppen zu verteilen waren. Die UV-Untersuchungen hatten ergeben, dass die Hydroxylgruppe mit der Carbonylgruppe ein 6-gliedriges Protonen-Chelat bildet, so dass dafür nur die Position 5 im Flavonoid infrage kam und die Methoxy-Gruppen demnach die Positionen 3, 6, 7 und 8 einnehmen müssen.

Das HMBC-Spektrum bestätigte die abgeleitete Struktur insbesondere durch die Korrelationen von C-5, C-6 und C-10 mit dem Proton der OH-Gruppe an C-5. Außerdem ergaben sich die eingezeichneten Korrelationen mittels HMBC. (Abbildung 83)

Während die Methoxy-Gruppe an C-6 durch das HMBC-Spektrum eindeutig zugeordnet werden konnte, war dies für die Positionen 3, 7 und 8 nicht ohne weiteres möglich, da sich im HMBC-Spektrum keine long-range-Korrelationen fanden. Aus der Literatur [104] war jedoch bekannt, dass C-7 bei einer vergleichbaren Verbindung mit einer längeren Alkoxygruppe an dieser Position bei ca. 153 ppm zur Resonanz kommt und damit gegenüber C-8 und C-3 deutlich paramagnetisch verschoben ist. Als mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die zu C-7 para-ständige Carbonylgruppe des  $\gamma$ -Pyrons in Frage kommen, die auch für die Tieffeldverschiebung von C-2, C-5 und C-9 verantwortlich ist (Tabelle 11).



1:  $R_1 = -OH$ ;  $R_2 = -OCH_2CHC(CH_3)_2$

4:  $R_1 = -OH$ ;  $R_2 = -OCH_3$

**Abbildung 78:** Verbindungen 1 und 4 von Liu et al. [104]

So blieb am Ende nur noch das Problem einer sicheren Zuordnung von C-3 und C-8. Aus Modellbetrachtungen wurde abgeleitet, dass die Methylprotonen der 3-Methoxygruppe dem abschirmenden Ringstromeffekt des Benzodioxol-Substituenten an C-2 ausgesetzt sind und deshalb im Vergleich zu den Protonen der 8-Methoxy-Gruppe bei relativ höherem Feld zur Resonanz kommen sollten ( $\delta_H = 3.80$  für  $OCH_3$  an C-3 vs.  $3.86$  ppm für  $OCH_3$  an C-8, Abbildung 79 und Tabelle 11). Unter dieser Prämisse konnten mit Hilfe der HMBC-Korrelationen anschließend sowohl die C-Signale der Methoxy-Gruppen als auch die Signale von C-3 bzw. C-8 der Verbindung **9** bestimmt werden. Die so getroffene Zuordnung der 3-Methoxy-Gruppe konnte schließlich mit Hilfe eines NOESY-Spektrums bestätigt werden, in dem die Wechselwirkungen der 3-Methoxy-Protonen mit den räumlich naheliegenden Protonen an C-2' und C-6' des Benzodioxol-Ringes als starke Kreuzsignale registriert wurden.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die Verbindung **9** bereits bekannt ist. T. Higa et al. isolierten diese Verbindung schon 1974 aus *Pelea barbiger*, wie *Melicope barbiger* damals noch hieß, sie veröffentlichten dort aber nur  $^1H$ -NMR-Daten. [5] In einer 2012 erschienenen Arbeit beschrieben Liu et al. diese Substanz bei ihrer Untersuchung von *Melicope patulinerva* als Verbindung 4. [104] Die dort im experimentellen Teil angegebenen  $^{13}C$ -NMR-Daten stimmen zwar numerisch sehr gut mit den in dieser Arbeit bestimmten Werten überein, doch wurden die Zuordnungen mehrfach vertauscht, da offensichtlich für diese Verbindung im Gegensatz zu einer ähnlichen Verbindung 1 (mit anderem Substituent an Position 7) keine

HMBC-Daten erhoben worden waren. Dagegen passt die hier vorgenommene Zuordnung, wenn man die von Liu intensiv untersuchte Verbindung 1 mit den Daten für **9** vergleicht (Tabelle 11). Die Angaben von Liu für dieses Flavonoid müssen daher korrigiert werden.

Verbindung **9** wurde außer in *M. barbiger*a und *M. patulinerva* auch noch in weiteren *Melicope* species gefunden. Ho et al. isolierten diese Verbindung aus *M. subunifoliolata* und konnten zeigen, dass Flavonoide mit ähnlicher Struktur starke, fraßhemmende Eigenschaften gegen *Sitophilus zeamais* Motsch. (Curculionidae) und ebenfalls sehr gut larvizid gegen *Aedes aegypti* L. (Diptera) wirken. [105,106]

Tabelle 11:  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$ -NMR Daten von Verbindung **9** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	<b>9</b>		Literaturwerte nach [104]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
<b>1</b>		-		-
<b>2</b>		155.86		155.7
<b>3</b>		139.00		138.6
<b>4</b>		179.51		179.3
<b>5</b>		149.35		149.2
<b>6</b>		136.39		138.8
<b>7</b>		153.17		153.0
<b>8</b>		133.05		132.9
<b>9</b>		145.06		144.9
<b>10</b>		107.68		107.5
<b>1'</b>		124.49		124.3
<b>2'</b>	7.65 d (1.8)	108.76	7.67 d (1.6)	108.6
<b>3'</b>	-	148.29	-	148.1
<b>4'</b>	-	150.27	-	150.1
<b>5'</b>	6.95 d (8.3)	108.85	6.96 d (8.4)	108.6
<b>6'</b>	7.76 dd (1.8/ 8.3)	124.03	7.76 dd (1.6/8.4)	123.8
<b>3-OMe</b>	3.86 s	60.38	3.88 s	60.2
<b>6-OMe</b>	3.93 s	61.38	3.95 s	61.2
<b>7-OMe</b>	4.08 s	61.93	4.10 s	62.1
<b>8-OMe</b>	3.92 s	62.38	3.95 s	61.7
<b>5-OH</b>	12.34 s	-	12.34 s	-
<b>-O-CH<sub>2</sub>-O-</b>	6.06 s	101.99	6.08 s	101.8

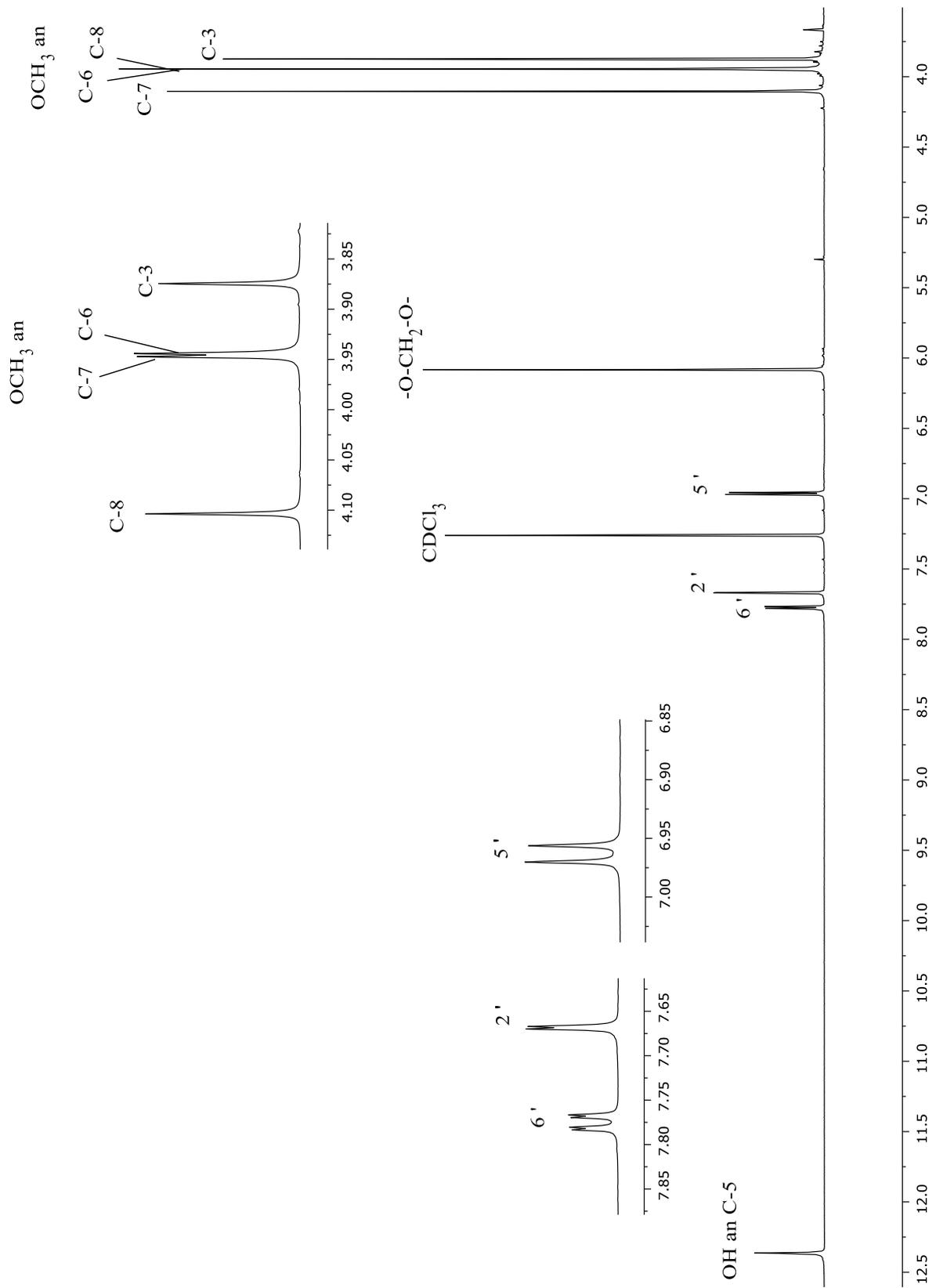


Abbildung 79:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **9** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

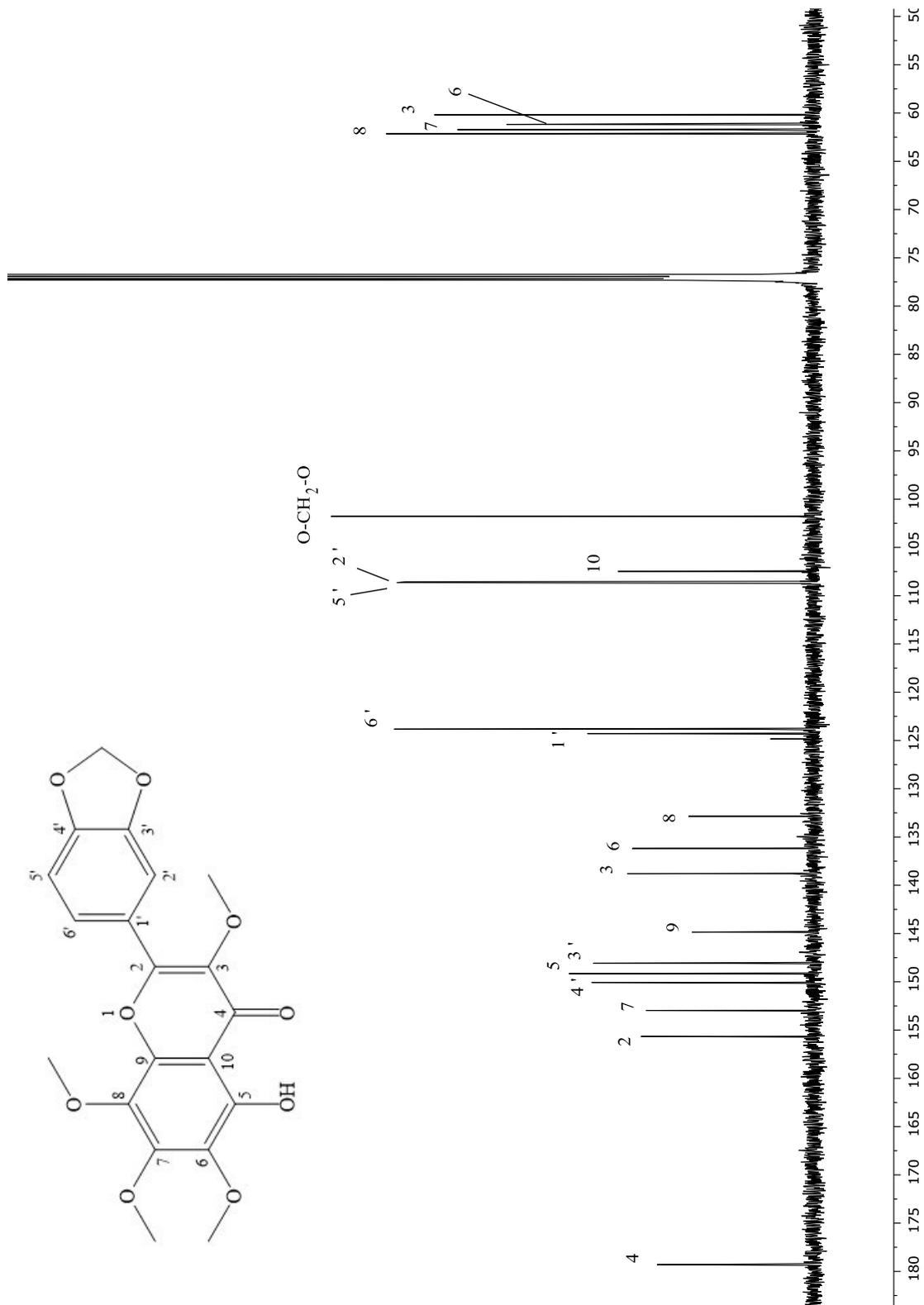


Abbildung 80:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 9 (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

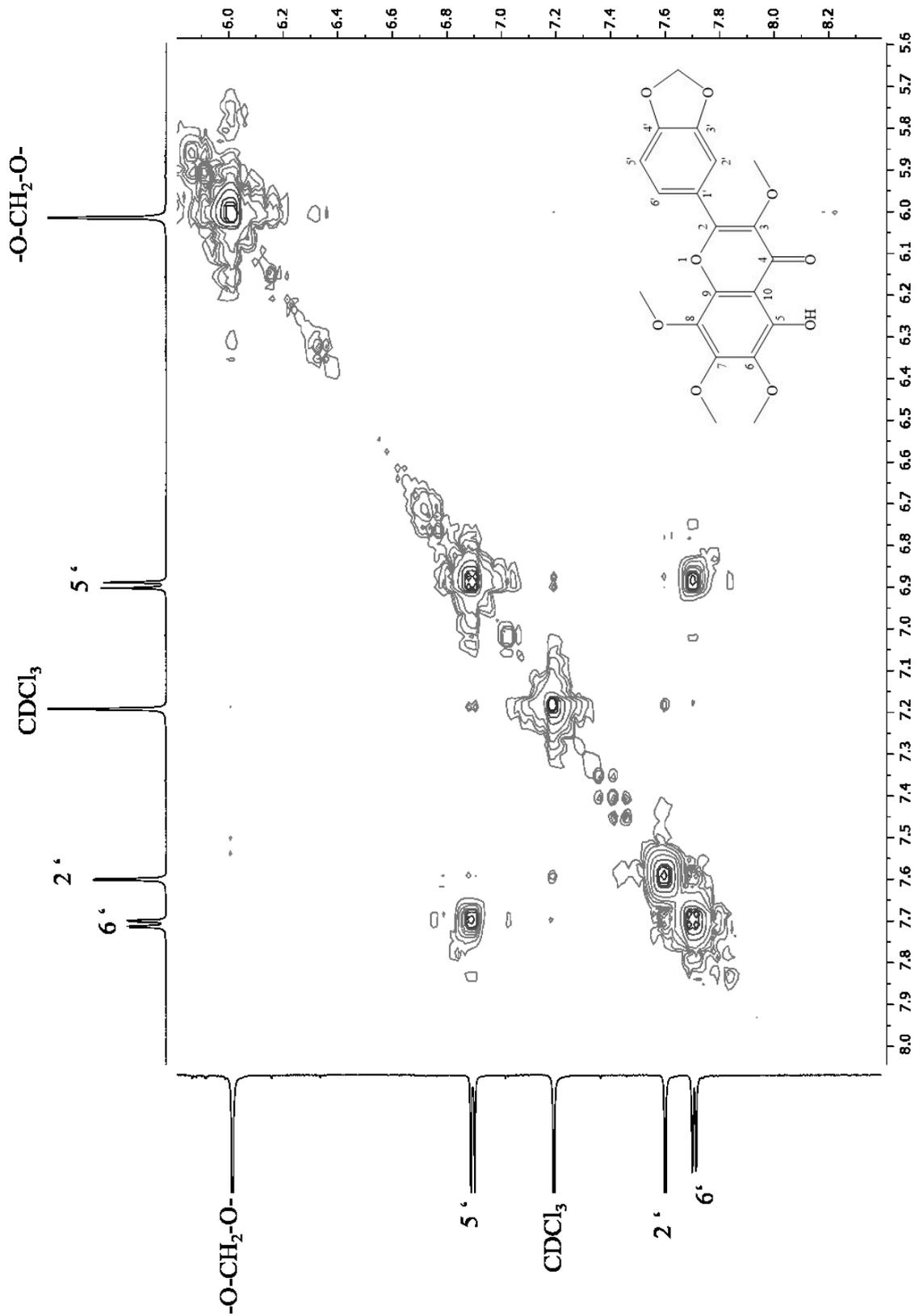


Abbildung 81: 2D-H,H-COSY-Spektrum der Verbindung 9 (600MHz in CDCl<sub>3</sub>)

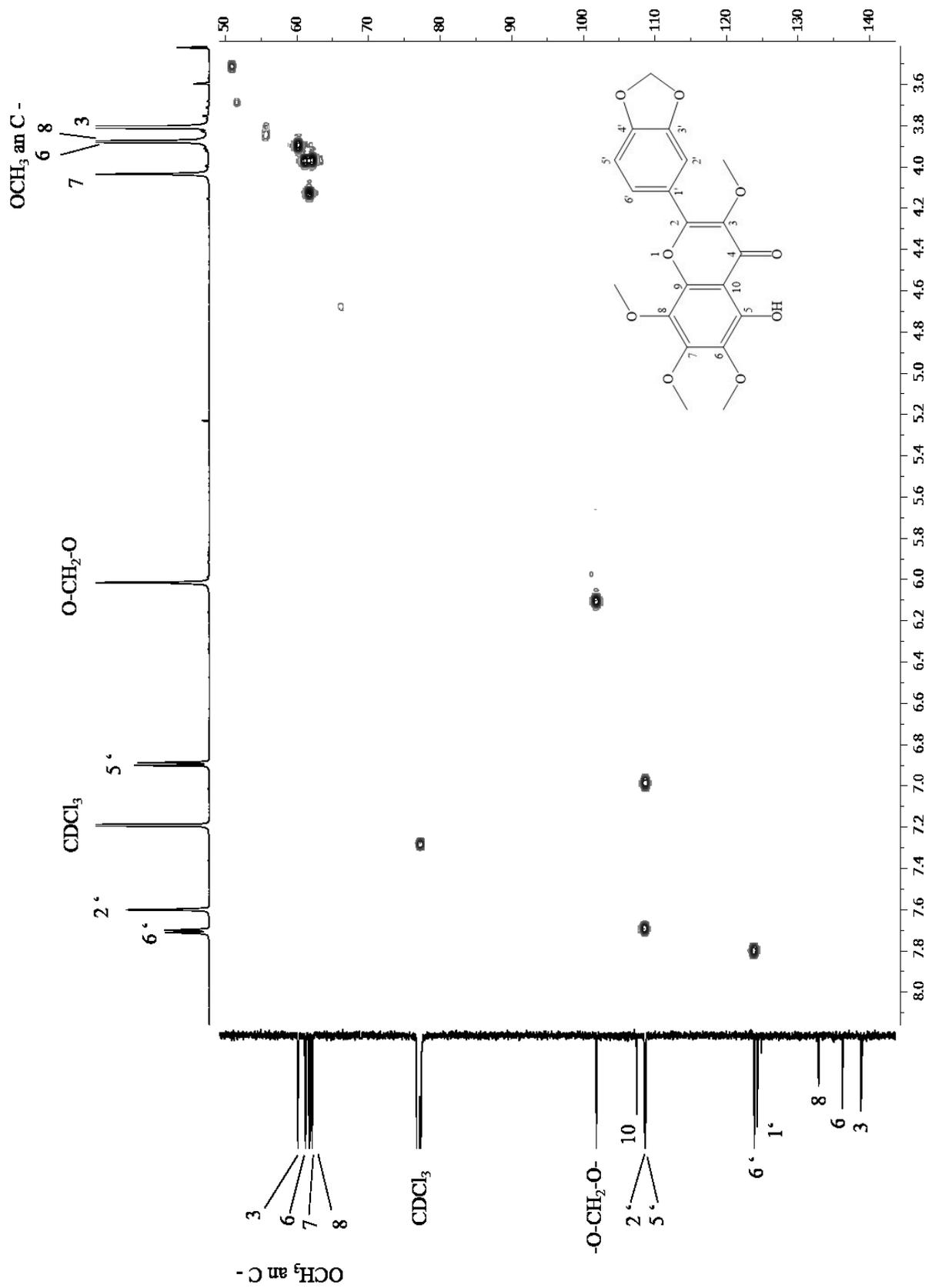


Abbildung 82: 2D-HSQC-Spektrum der Verbindung 9 (600MHz in CDCl<sub>3</sub>)

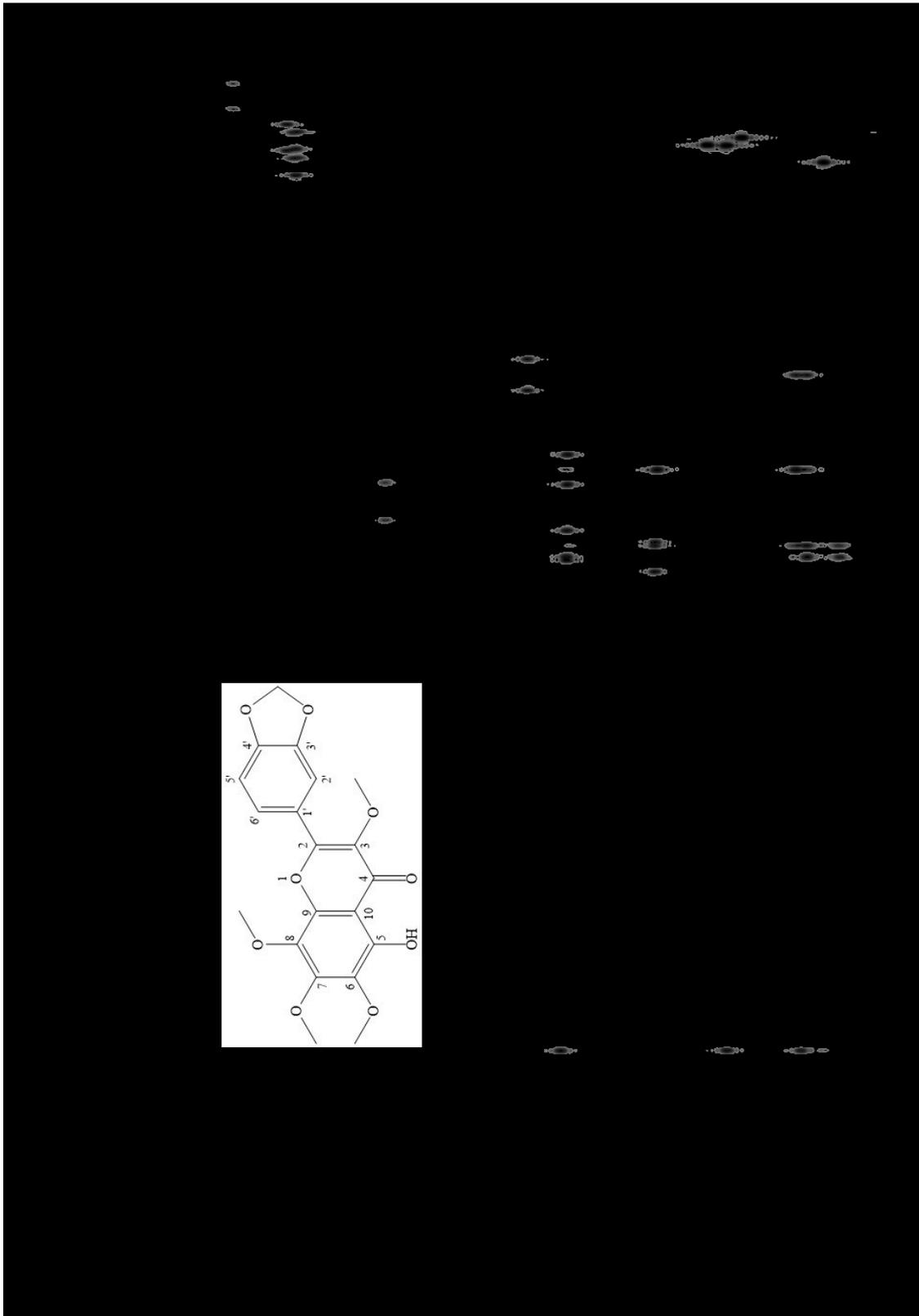


Abbildung 83: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 9 (600MHz in CDCl<sub>3</sub>)

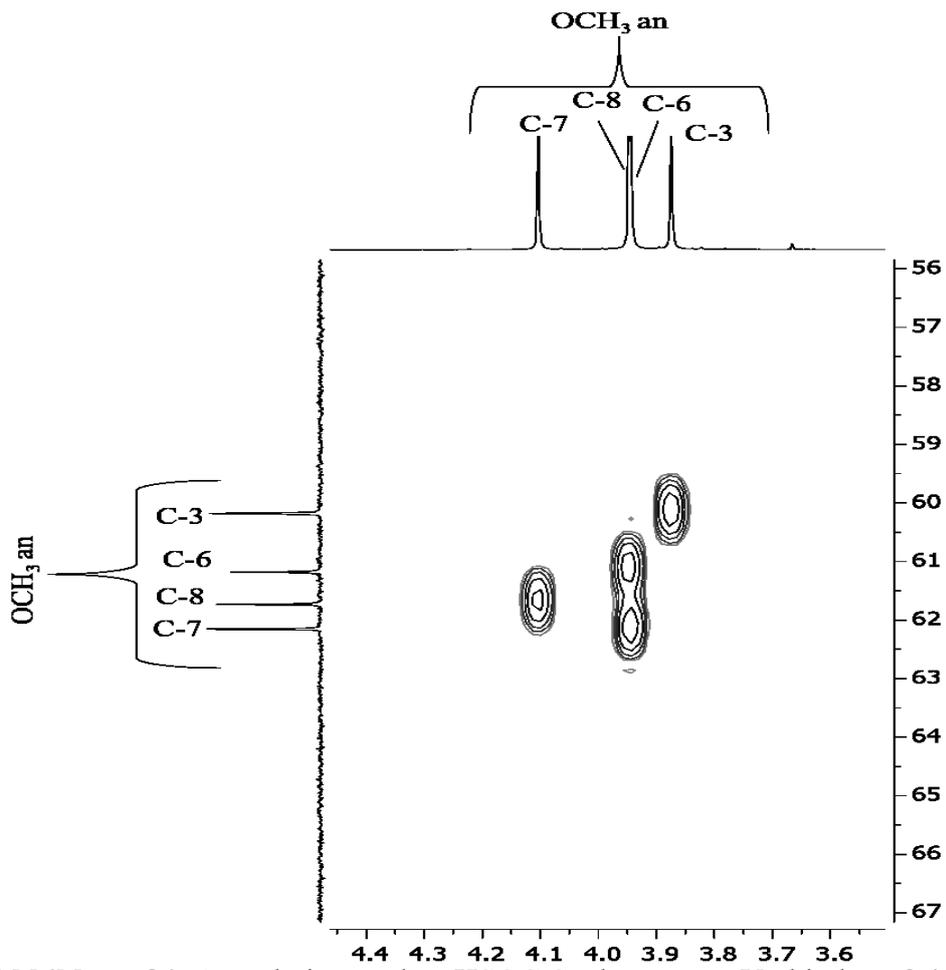
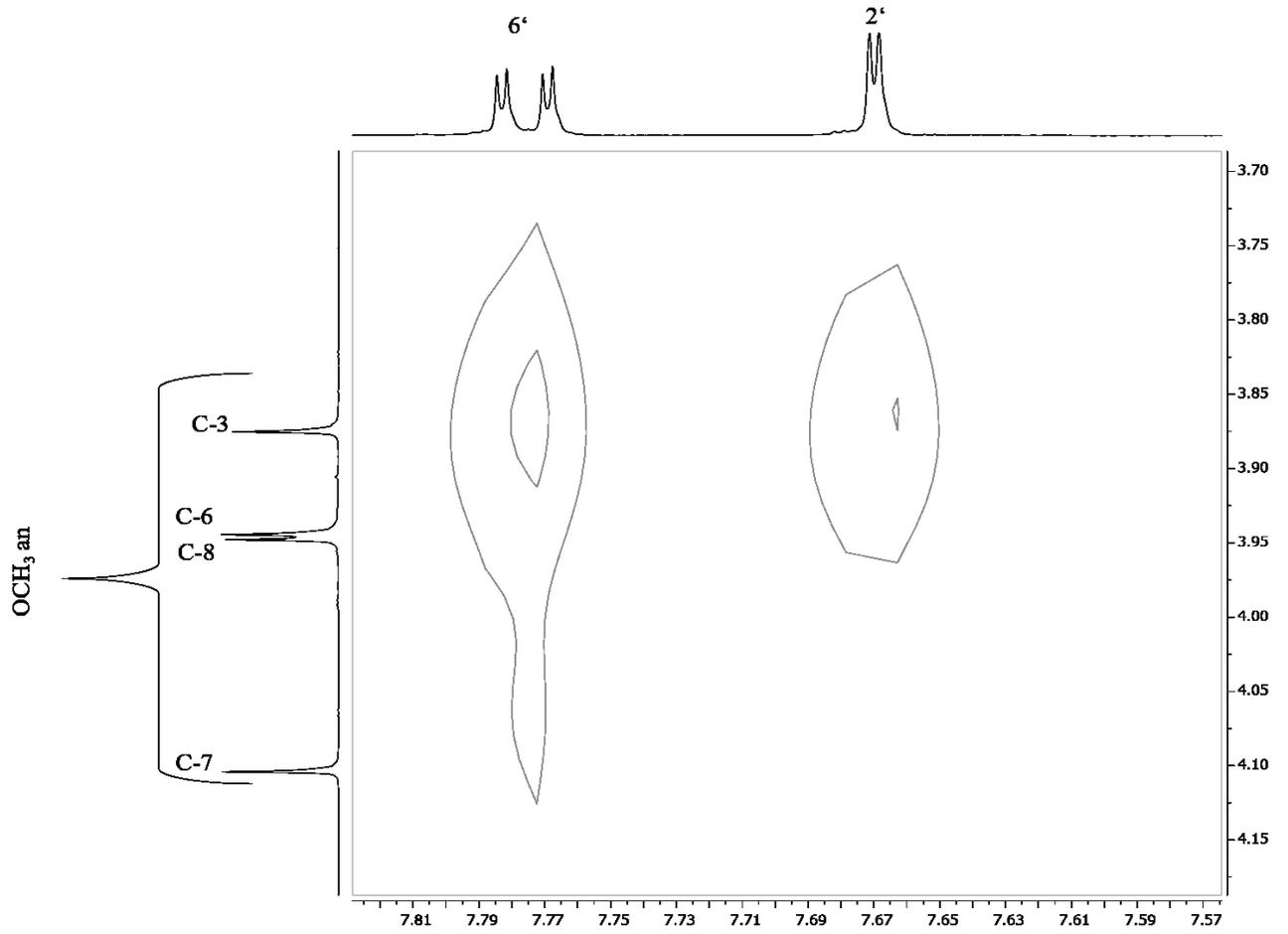


Abbildung 84: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Verbindung **9** (600MHz in CDCl<sub>3</sub>)



**Abbildung 85:** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von Verbindung **9** (600MHz in CDCl<sub>3</sub>)

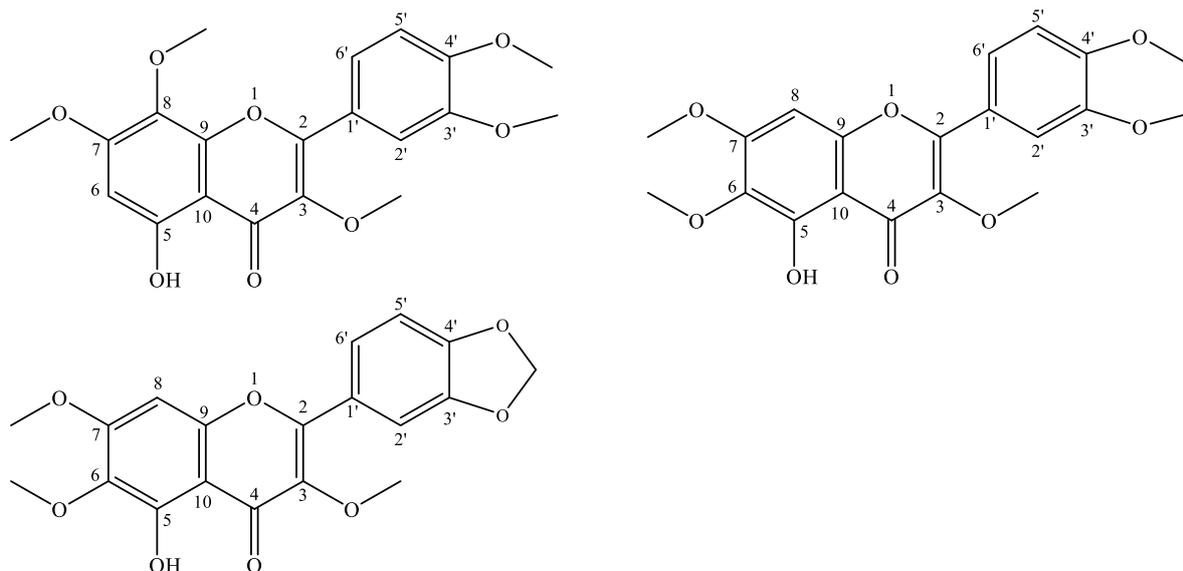
## **Verbindung 10 bis 20**

Neben Verbindung **9**, die rein aus der Fraktion MB.D-VI-6 gewonnen werden konnte wurden insgesamt 11 weitere Flavonoide aus den übrigen Fraktionen isoliert und identifiziert. Die Aufklärung der Strukturen erfolgte in Analogie zu den bei Verbindung **9** beschriebenen Methoden, mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen Kernresonanz- (NMR) und UV-Spektroskopie sowie der hochauflösenden Massenspektrometrie. Da es sich bei allen Flavonoiden um bereits bekannte Verbindungen handelt, wird hier auf die ausführliche Beschreibung der Strukturaufklärung jeder einzelnen Substanz mit Erläuterung der Spektren verzichtet. Stattdessen finden sich zu jeder Substanz eine Tabelle mit den ermittelten NMR-Shiftwerten im Vergleich zu den in der Literatur gefundenen Angaben. Die Spektren, mit den zugeordneten, beschrifteten Signalen, sind jeweils abgebildet.

## 2.9 Verbindung 10 und 11

Bei den Verbindungen **10** und **11** handelt es sich wie bei **9** um Flavonole, die ebenso wie das 5-Demethylmelibentin eine Methylendioxygruppe am B-Ring besitzen. Verbindung **10** konnte leider nicht rein gewonnen werden, sondern nur als Nebenkomponente in der Fraktion MB.D-V-4, in der auch **9** enthalten war. Im hochauflösenden Massenspektrum (Abbildung 87) findet sich daher ein zweiter Peak für **10** bei 373.0918  $[M + H]^+$ . Daraus lässt sich ableiten, dass **10** die Summenformel  $C_{19}H_{16}O_8$  besitzt, und somit um 30 Masseneinheiten leichter ist als Verbindung **9**. Aus den im NMR gefunden Signalen lässt sich sehr schnell erkennen, dass **10** im Gegensatz zu **9** eine Methoxygruppe weniger besitzt. Stattdessen findet sich ein Singulett für ein aromatisches Proton bei  $\delta = 6.4$  ppm mit einem zugehörigen Kohlenstoff bei  $\delta = 95.59$ . Die Integration der Protonensignale lässt erkennen, dass das Gemisch zu ungefähr einem Drittel aus **10** und zu 2/3-Drittel aus **9** besteht. Im Bereich der Methoxyprotonen zwischen 4.08 und 3.85 ppm finden sich insgesamt 5 Signale, von denen eines bei  $\delta = 3.92$  ppm über sein Integral als zu **10** zugehörig erkannt werden konnte. Die Protonensignale der zwei übrigen Methoxygruppen von **10** kommen mit den Signalen von **9** bei  $\delta = 3.85$  und 3.88 ppm gemeinsam zur Resonanz. Aufgrund der Korrelationen im HSQC und HMBC Spektrum (Abbildung 82 und Abbildung 83), lässt sich erkennen, dass **10** genauso wie **9** eine Methoxygruppe an C-3 besitzt ( $\delta_H$  3.85;  $\delta_C$  60.32 ppm). Das dritte Methoxysignal von **10** findet sich bei  $\delta = 3.92$  ppm unter dem Signal der Methoxygruppe an C-8 von **9**. Da die meisten Flavanonole aufgrund der Biosynthese als gemischte Polyketide Sauerstoffsubstituenten am C-5 und C-7 des A-Rings tragen sollte die Methoxygruppe an C-6 oder C-8 fehlen, was dann aber zur Verschiebung der benachbarten Kohlenstoffe und Protonensignale führen sollte. Da wir leider kein gutes  $^{13}C$  NMR Spektrum vom Gemisch der beiden Substanzen aufnehmen konnten, musste die Zuordnung der Kohlenstoffe über das HSQC und HMBC-Spektrum erfolgen. Da bisher noch keine  $^{13}C$  NMR Daten von **10** veröffentlicht wurden, wurden die NMR-Daten der drei Flavonoide in Abbildung 86 zum Vergleich herangezogen. Die oberen beiden Verbindungen unterscheiden sich von **10** durch die Substitution des B-Rings. Anstelle der 3'4'-Methylendioxygruppe finden sich zwei Methoxygruppen an diesen Positionen. Im A-Ring befindet sich das Proton an C-6 bei der einen und C-8 bei der anderen Verbindung, so dass dieses Substanzpaar bei der Aufklärung der Struktur von **10** und der Zuordnung der Kohlenstoffsignale behilflich sein kann. Darunter ist das Melisimplin abgebildet, das 8-Desmethoxyderivat von **9**, dessen NMR Daten allerdings in DMSO- $d_6$  aufgenommen wurden.

[107]



**Abbildung 86:** 5-Hydroxy-3,3',4',7,8-pentamethoxy-flavone [108] und 5-Hydroxy-3,3',4',6,7-pentamethoxy-flavone [109]

Bei Vergleich der Daten (Tabelle 12) fällt auf, dass sich die Protonenshifts in deuteriertem Chloroform des aromatischen Protons an C-6 bzw. C-8 des jeweiligen Stellungsisomeren kaum voneinander unterscheiden ( $\Delta\delta = 0.1$  ppm), während die Kohlenstoffshifts mit 95.8 ppm für das protonierte C-8 und 90.4 für das protonierte C-8 sich doch stark voneinander unterscheiden. Auch bei den Methoxygruppen lassen sich Unterschiede feststellen (s. Tabelle 12). Betrachtet man die Kohlenstoffshifts der Methoxygruppen an C-3, C-6 und C-7 des 5-Hydroxy-3,3',4',6,7-pentamethoxy-flavons so findet man zwei Signale bei ca. 60 ppm für die OCH<sub>3</sub>-Gruppen an C-3 und C-6 und eines bei ca. 56 ppm für die an C-7 gebundene Methoxygruppe. Bei einer 7,8-Dimethoxy substitution fehlt eines der Signale bei 60 ppm und es kommt das Signal für die 8-Methoxygruppe bei ca. 62 ppm dazu. Die Protonendaten allein sind hier ebenfalls schwer auszuwerten. In den Spektren von **10** findet man die Signale für die drei Methoxygruppen bei 56.44 (OCH<sub>3</sub> an C-7), 60.32 (OCH<sub>3</sub> an C-3) und 61.79 ppm (OCH<sub>3</sub> an C-8), so dass es sich bei **10** um das 5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone handeln muss.

**Tabelle 12:** NMR-Daten der A-Ring Protonen und Kohlenstoffe der Vergleichsflavonoiden

	<b>10</b>		<b>5-OH-6,7-di-OCH<sub>3</sub></b>		<b>5-OH-7,8-di-OCH<sub>3</sub></b>			<b>Melisimplin</b>
	CDCl <sub>3</sub>		Literatur in CDCl <sub>3</sub> [109]		Literatur in CDCl <sub>3</sub> [110]		Literatur in DMSO-d <sub>6</sub> [108]	Literatur in DMSO-d <sub>6</sub> [107]
<b>Position</b>	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C
5	-	n.d.	-	152.9	-	157.8	156.4	151.6
6	6.42	95.59	-	132.4	6.43	95.8	95.8	131.8
7	-	158.37	6.51	158.8	-	158.8	158.2	154.9
8	-	128.87	-	90.4	-	129.2	128.8	91.4
9	-	n.d.	-	152.4	-	148.7	147.8	158.7
10	-	105.12	3.93	106.7	-	105.8	104.5	105.7
OCH <sub>3</sub> an C-3	3.88 s	60.32	3.86	60.2	3.87	60.6	59.7	59.8
OCH <sub>3</sub> an C-6	-	-	3.93	60.9	-	-	-	60.0
OCH <sub>3</sub> an C-7	3.95 s	56.44	3.97	56.4	3.93	56.8	56.5	56.5
OCH <sub>3</sub> an C-8	3.95 s	61.79	-	-	3.91	62.0	61.0	-

Verbindung **10** wurde zusammen mit **9** bereits von Higa et al. (1974) aus *Pelea barbiger*, isoliert. [5] Durch die hier aus den HSQC- und HMBC-Spektren ermittelten <sup>13</sup>C-NMR Daten kann die Struktur der Substanz endgültig bestätigt werden. Das 5-Methoxyderivat von **10** ist auch unter dem Trivialnamen Meliternin bekannt, so dass **10** in Analogie zu 5-Demethylmelibentin (**9**) auch als 5-Demethylmeliternin bezeichnet werden kann.

Verbindung **9** wurde außer in *M. barbiger* auch in *M. triphylla*, *M. simplex*, *M. ternata*, *M. subunifoliata* und *M. patulinervia* gefunden. [106,111–113] Sharaf et al. (2000) isolierte die Verbindung aus *Ficus altissima*. [110]

Verbindung **11** wurde aus Fraktion MD.D-VIII-6 in einer Ausbeute von 6,5 mg gewonnen. Aufgrund des chromatographischen Verhaltens und bei Betrachtung im UV-Licht vor und nach dem Besprühen mit Naturstoff-Reagenz, konnte angenommen werden, dass **11** eine zu **9** und **10** ähnliche Struktur aufweist (s. Kap. 7.10, Analytische Daten) Das Fehlen eines, wenn auch

geringen bathochromen Shifts nach Zugabe von Aluminiumchlorid zur Lösung der Substanz in Methanol, deutete darauf hin, dass die Hydroxylgruppe an C-5 bei **11** im Gegensatz zu **10** nicht frei vorliegt oder ganz fehlt (s. Abbildung 94). Die Molekülionen von Verbindung **11** wurden im hochauflösenden Massenspektrum (s. Abbildung 87) bei 417.1182  $[M + H]^+$  und 439.1001  $[M + Na]^+$  registriert. Daraus errechnete sich die Summenformel  $C_{21}H_{20}O_9$ . Im Vergleich zu **9** ist Verbindung **11** daher um 24 Masseneinheiten schwerer, was vermuten lässt, dass die Hydroxylgruppe an C-5 des Demethylmelibentins (**9**) hier methyliert vorliegt und es sich bei **11** um das Melibentin handeln sollte. Zur endgültigen Ermittlung der Struktur wurden NMR-Spektren aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 96 bis Abbildung 100 und Tabelle 10). Erwartungsgemäß fehlt das Signal des wasserstoffbrückengebundenen Protons der phenolischen OH-Gruppe an C-5. Stattdessen findet man das Signal für eine weitere Methoxygruppe bei  $\delta = 4.08$  ppm, welches dem Methylether an C-5 zuzuordnen ist. Das zugehörige Kohlenstoffsignal findet man bei  $\delta = 62.51$  ppm. Durch die Methylierung der Hydroxylgruppe an C-5 verschieben sich die Signale der Methoxygruppe an C-6 von **11** im Vergleich zu **9** geringfügig, die Signale für die  $OCH_3$ -Gruppen an C-7 und C-8 bleiben praktisch unverändert. Während die Zuordnung der Kohlenstoffsignale des B-Rings über das HSQC und HMBC-Spektrum leicht gelingt, ist die Zuordnung der aromatischen Kohlenstoffe des A-Rings relativ schwierig, da hier sechs quartäre Kohlenstoffe nebeneinander vorkommen und die Korrelationen über die Hydroxylgruppe an C-5, wie bei **9** und **10**, ebenfalls fehlen. Über eine  $^3J$ -Kopplung der Methoxyprotonen an C-5, C-6, C-7 und C-8 lassen sich die zugehörigen Kohlenstoffe jedoch zweifelsfrei ermitteln.

Melibentin wurde bereits in mehreren *Melicope*-Arten gefunden. [75,113,114] Liu et al (2012) veröffentlichten  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR Daten in Chloroform, die zum Vergleich in Tabelle 14 aufgelistet sind. [113] Während die Protonendaten sehr gut übereinstimmen, gibt es bei der Zuordnung der Kohlenstoffe einige Unterschiede. Möglicherweise sind die darauf zurückzuführen, dass Liu et al. kein HSQC- und HMBC-Spektrum zur Verfügung stand.

2.9.1 Daten von **10**(5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon)

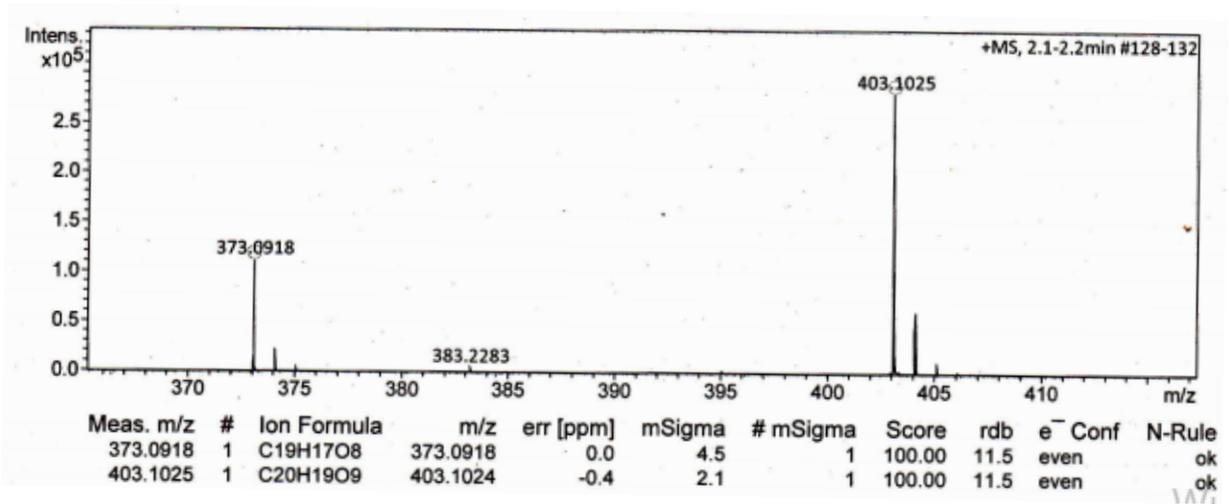
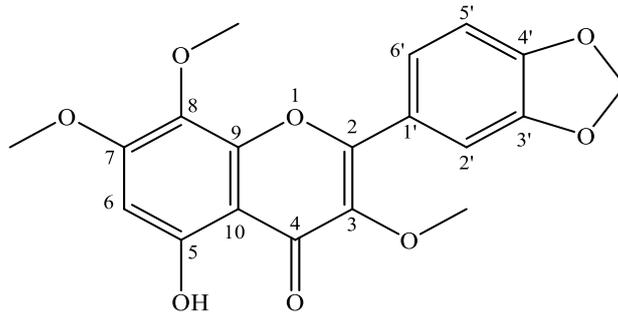


Abbildung 87: HRESIMS von Verbindung **10**

**Tabelle 13:**  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **10** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

	<b>10</b>		<b>Literaturwerte nach [37]</b>
<b>Position</b>	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)
2	-	155.86	-
3	-	138.83	-
4	-	n.d.	-
5	-	n.d.	-
6	6.42 s	95.59	6.41 s
7	-	158.37	-
8	-	128.87	-
9	-	n.d.	-
10	-	105.12	-
1'	-	124.28	-
2'	7.68 d (1.9)	108.69	7.67 dd (1.9, 0.4)
3'	-	148.16	-
4'	-	149.68	-
5'	6.96 d (8.4)	108.85	6.96 dd (8.6, 0.4)
6'	7.78 dd (8.3, 1.7)	123.89	7.77 dd (8.4, 1.9)
	<b>10</b>		<b>Literaturwerte nach [37]</b>
<b>Position</b>	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)

### Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen

---

3-OMe	3.85 s	60.32	3.88 s*
7-OMe	3.92 s	56.44	3.95 s*
8-OMe	3.88 s	61.79	3.95 s*
OCH <sub>2</sub> O	6.08 s	101.89	6.07 s*
5-OH	12.43 s	-	-

\* Shiftwerte wurden angegeben, die Signale sind jedoch nicht zugeordnet.

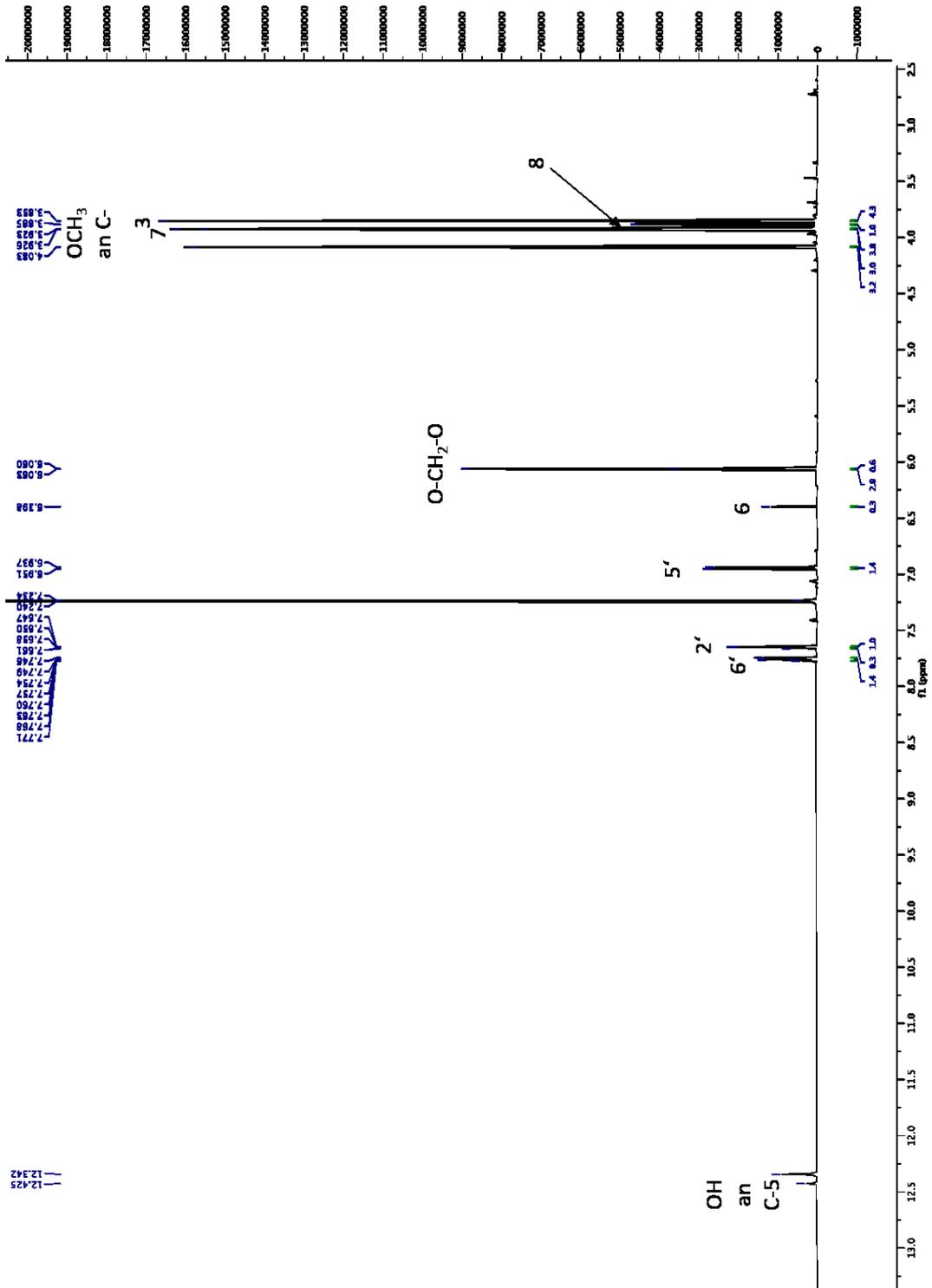
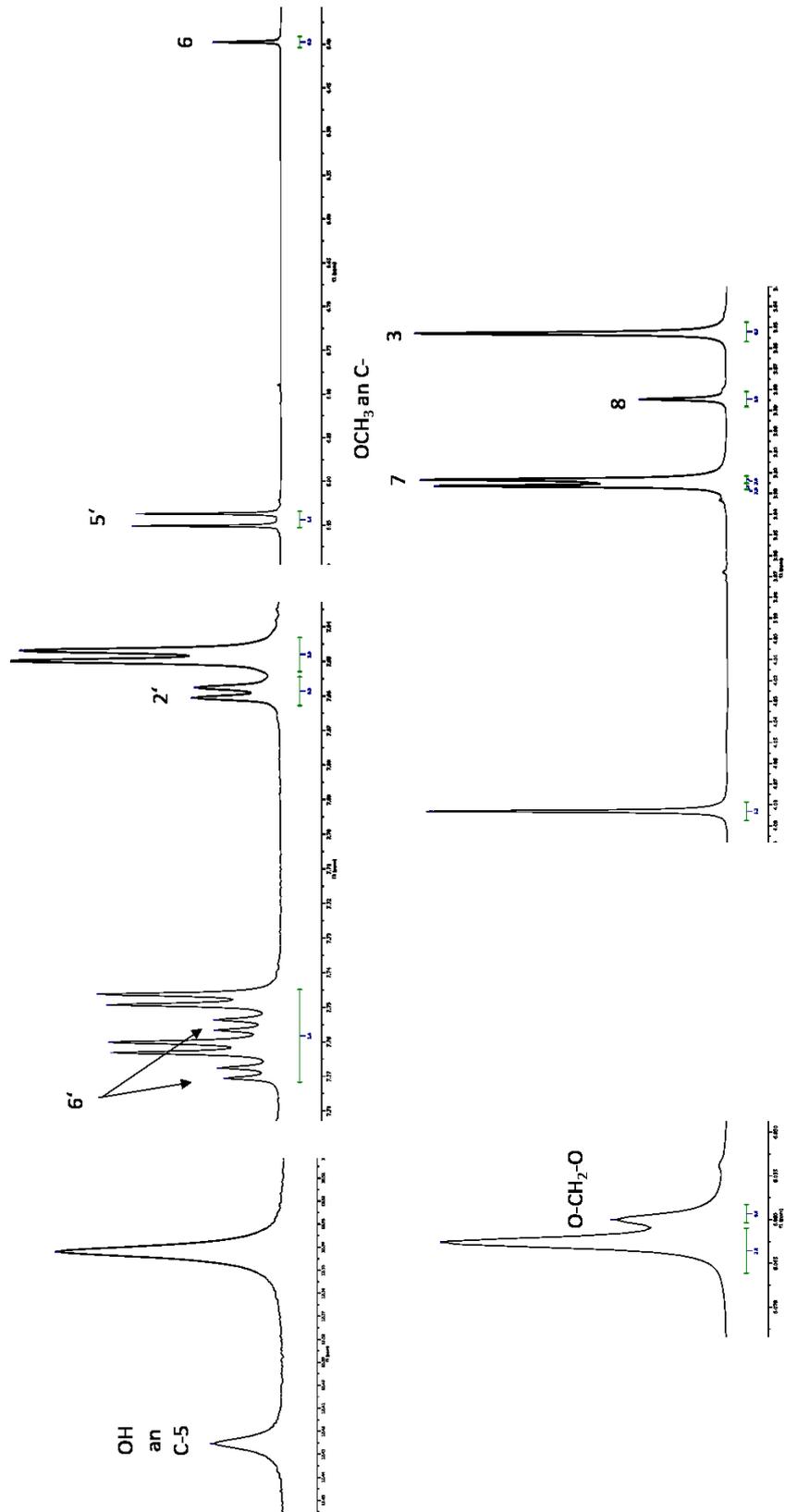


Abbildung 88:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des Gemisches 9+10, Zuordnung bezogen auf Verbindung 10 (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



**Abbildung 89:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Gemisches von **9** + **10**, Zuordnung bezogen auf Verbindung **10** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

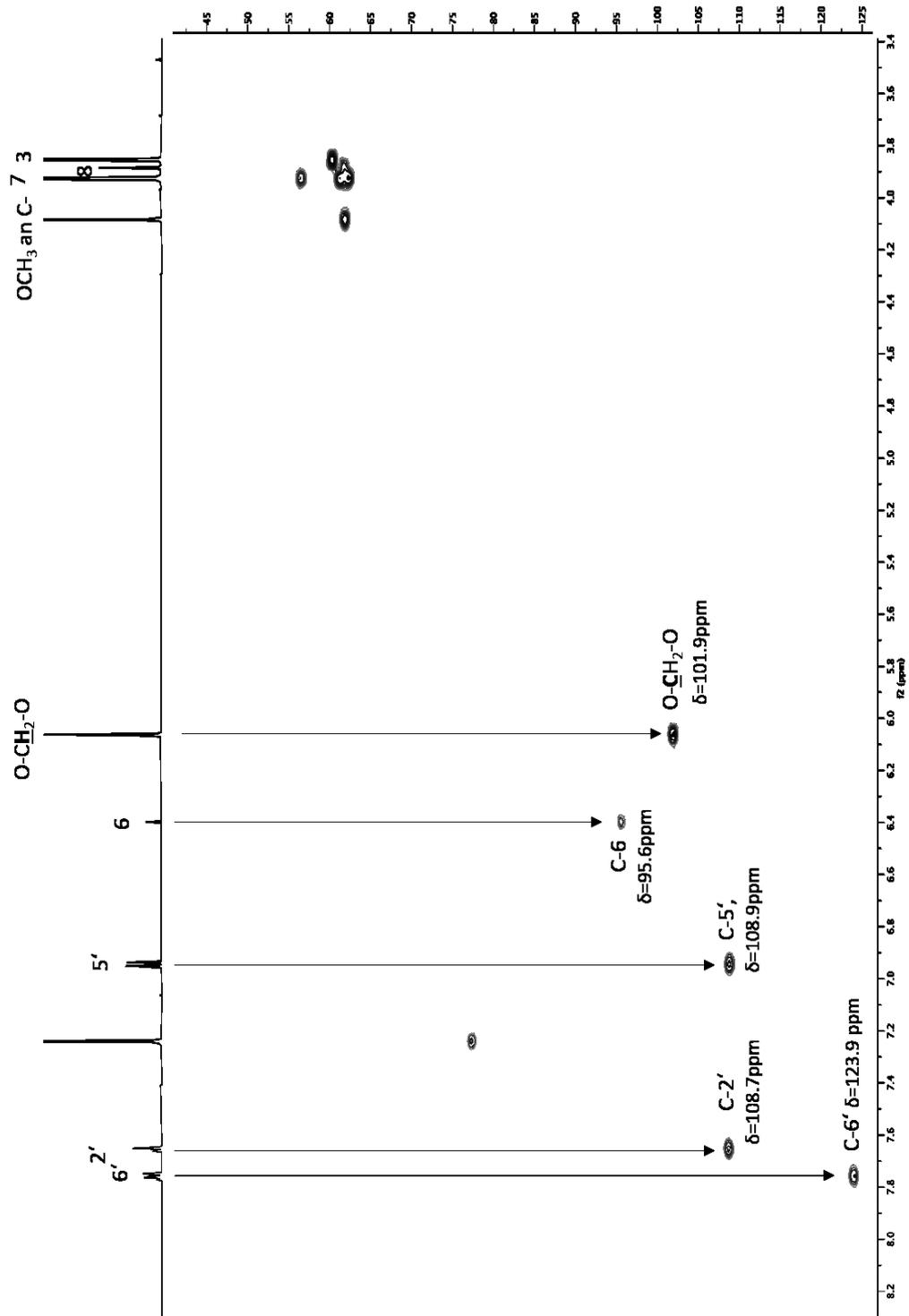
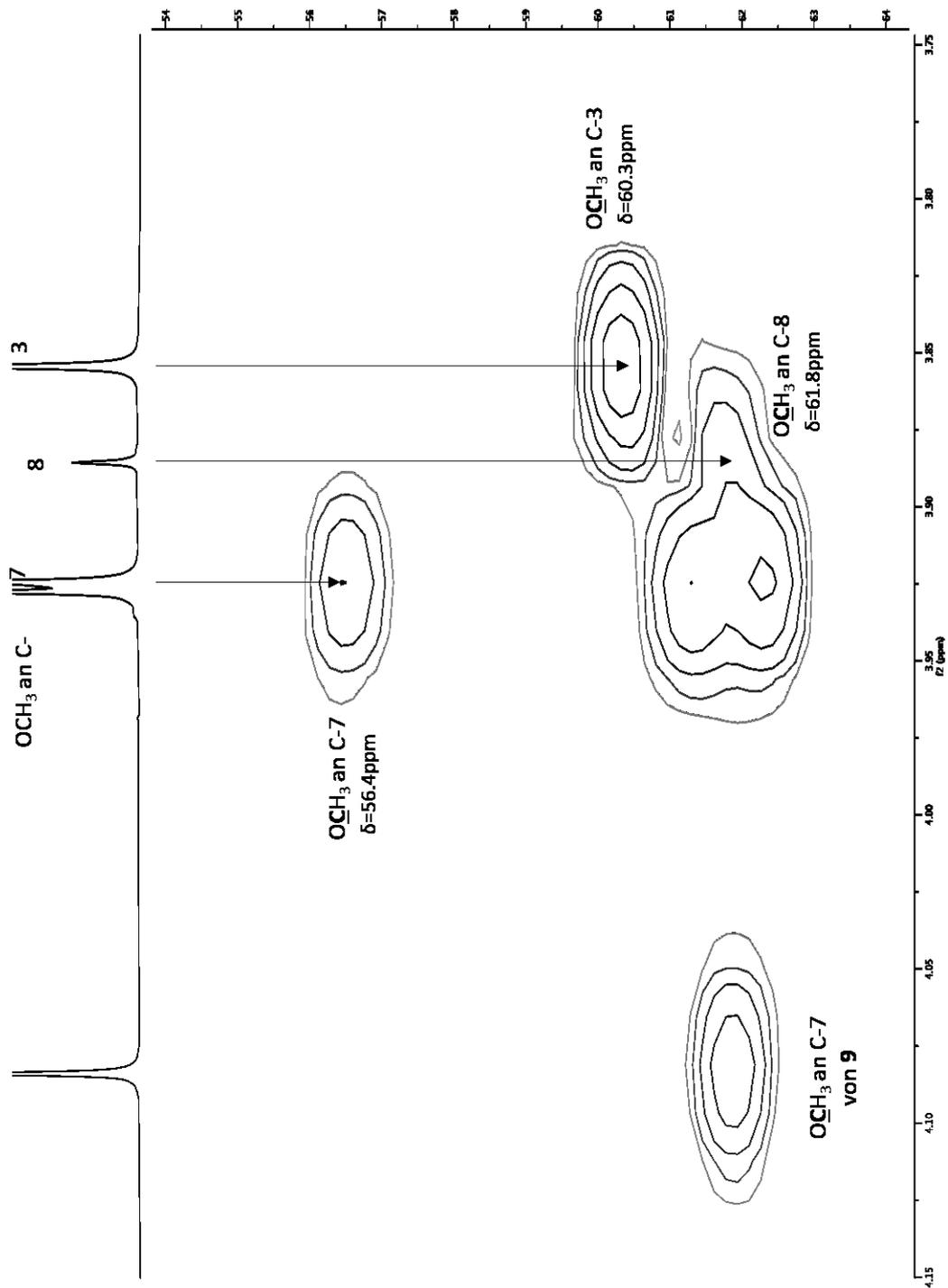


Abbildung 90: 2D-HSQC-Spektrum des Gemisches von **9** + **10**, Zuordnung bezogen auf Verbindung **10** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



**Abbildung 91:** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum des Gemisches von **9** + **10**, Zuordnung bezogen auf Verbindung **10** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

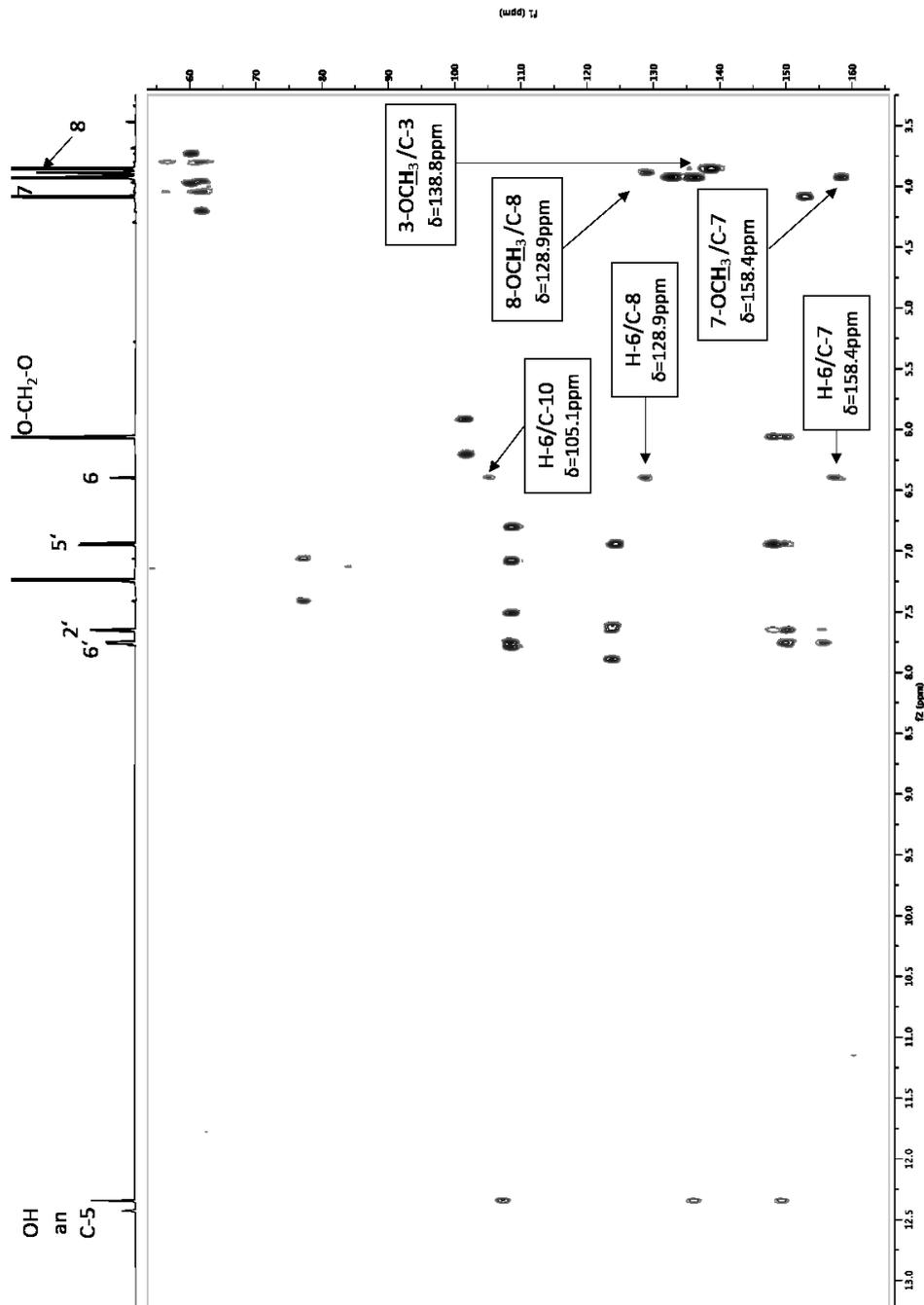


Abbildung 92: 2D-HMBC-Spektrum des Gemisches von 9 und 10, Zuordnung bezogen auf 10 (600MHz in CDCl<sub>3</sub>)

2.9.2 Daten von 11 (Melibentin)

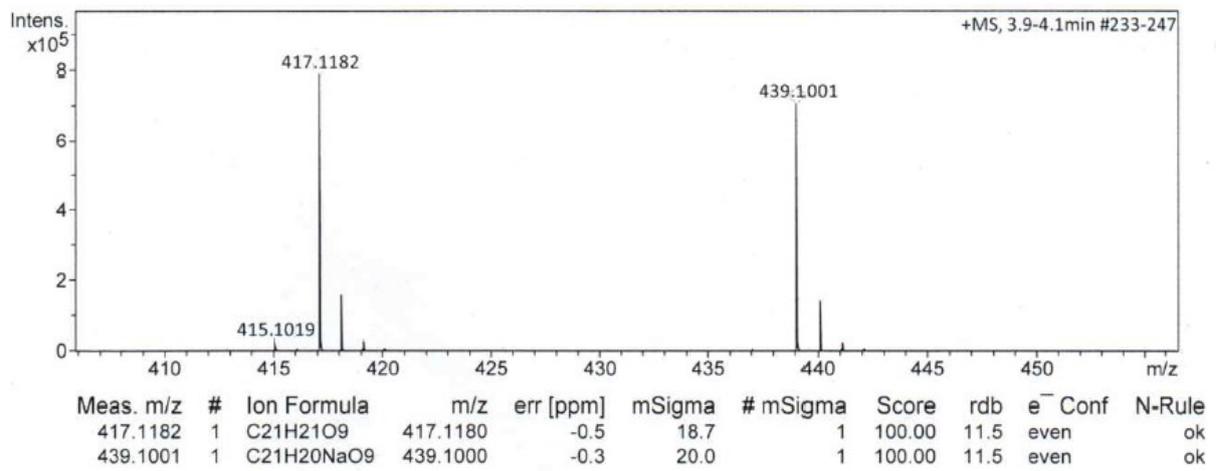
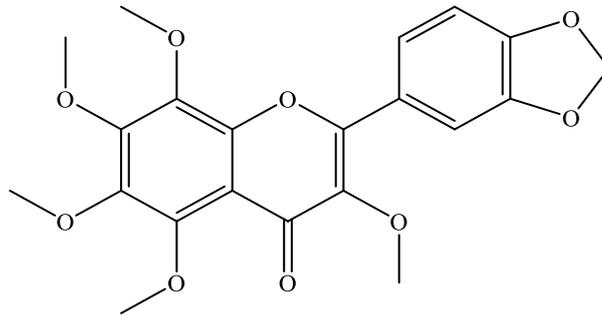
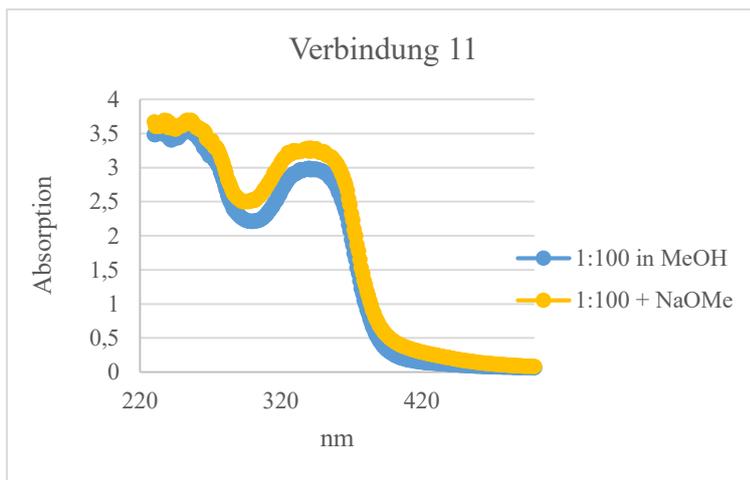
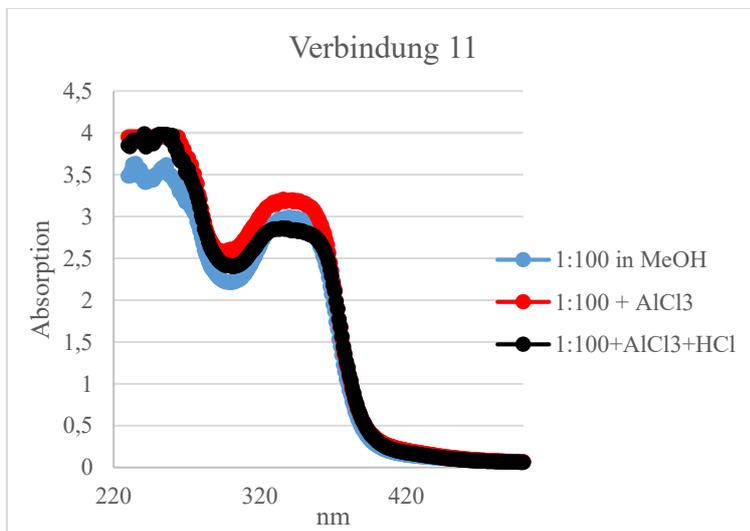
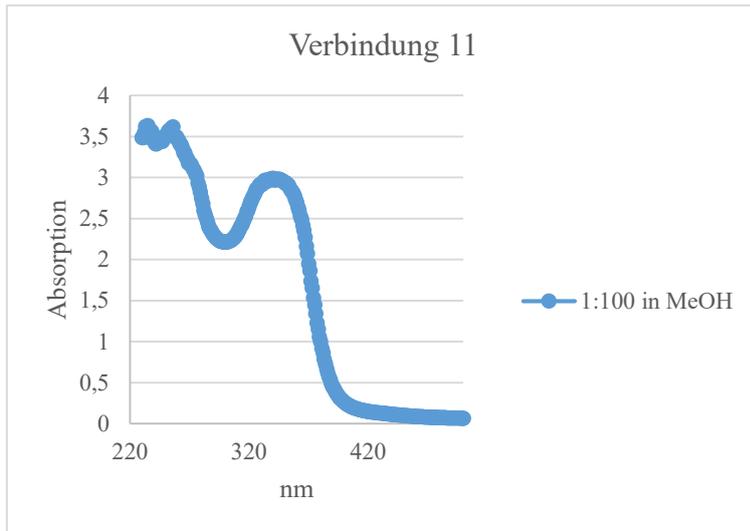


Abbildung 93: HRESIMS von Verbindung 11



**Abbildung 94:** UV-Spektren der Verbindung **11** in Methanol und unter Zusatz verschiedener Shiftreagenzien

**Tabelle 14:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **11** ( $\delta$  ppm (J in Hz), 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	$^1\text{H}$ (J in Hz)		$^{13}\text{C}$	
	<b>11</b>	Literatur [113]	<b>11</b>	Literatur nach [113]
2	-	-	153.25	152.9
3	-	-	140.97	137.8
4	-	-	174.11	173.7
5	-	-	151.56	149.4
6	-	-	148.35	143.7
7	-	-	144.10	151.2
8	-	-	138.08	140.6
9	-	-	146.92	148.0
10	-	-	115.26	114.9
1'	-	-	124.88	124.5
2'	7.65 d (1.6)	7.65 d (1.6)	108.68	108.4
3'	-	-	148.19	149.4
4'	-	-	149.79	147.8
5'	6.93 d (8.3)	6.93 d (8.4)	108.77	108.3
6'	7.74 dd (8.3, 1.7)	7.74 dd (8.4, 1.6)	123.58	123.2
3-OMe	3.85 s	3.86 s	60.10	59.8
5-OMe	4.07 s	4.08 s	61.87	61.6
6-OMe	3.95 s	3.95 s	62.51	62.2
7-OMe	3.92 s	3.93 s	62.06	61.8
8-OMe	3.97 s	3.98 s	62.25	61.9
OCH <sub>2</sub> O	6.05 s	6.05 s	101.86	101.6

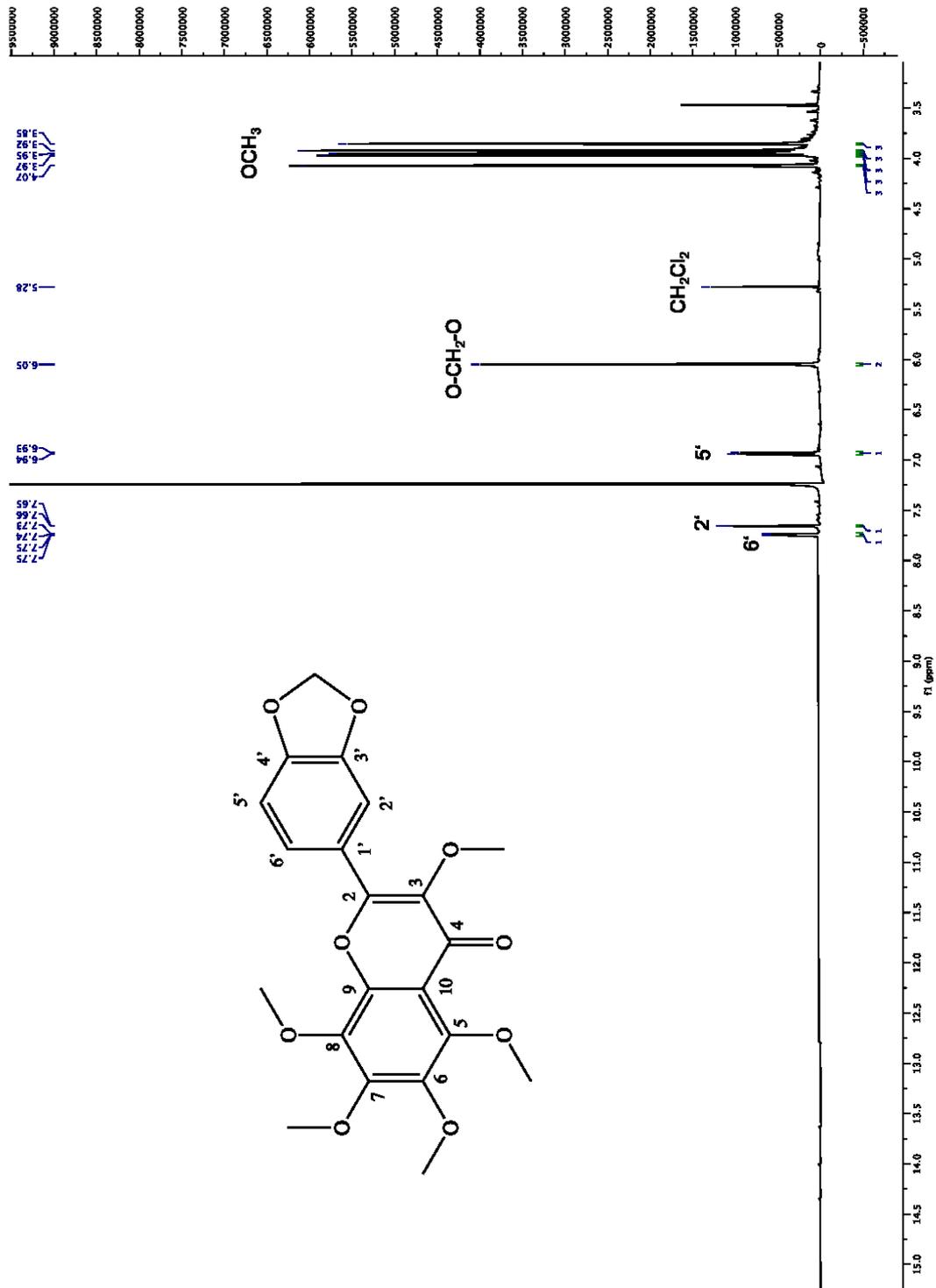


Abbildung 95:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von Verbindung 11 (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

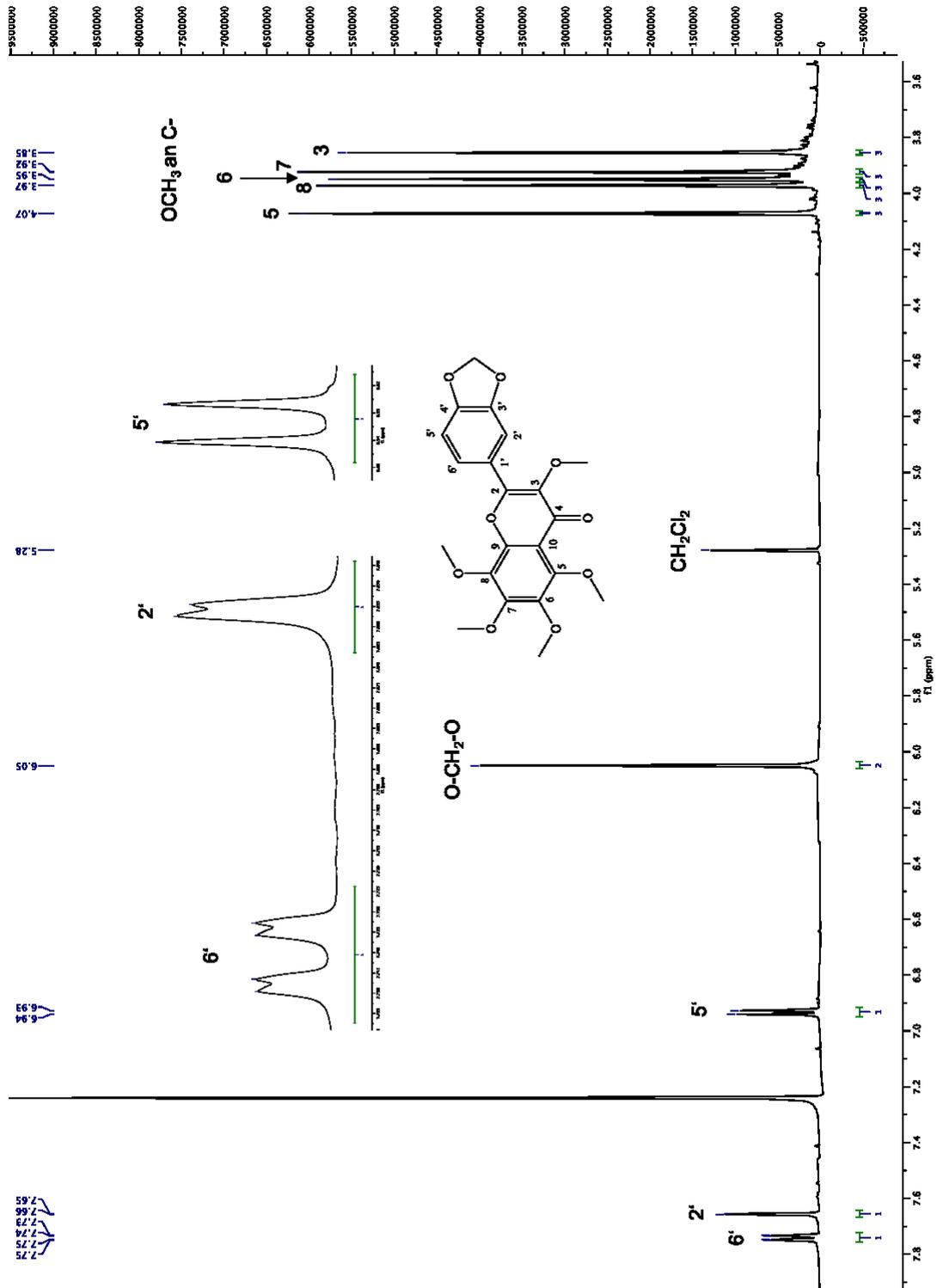


Abbildung 96: Ausschnitt des  $^1\text{H}$  NMR-Spektrums von Verbindung 11 (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

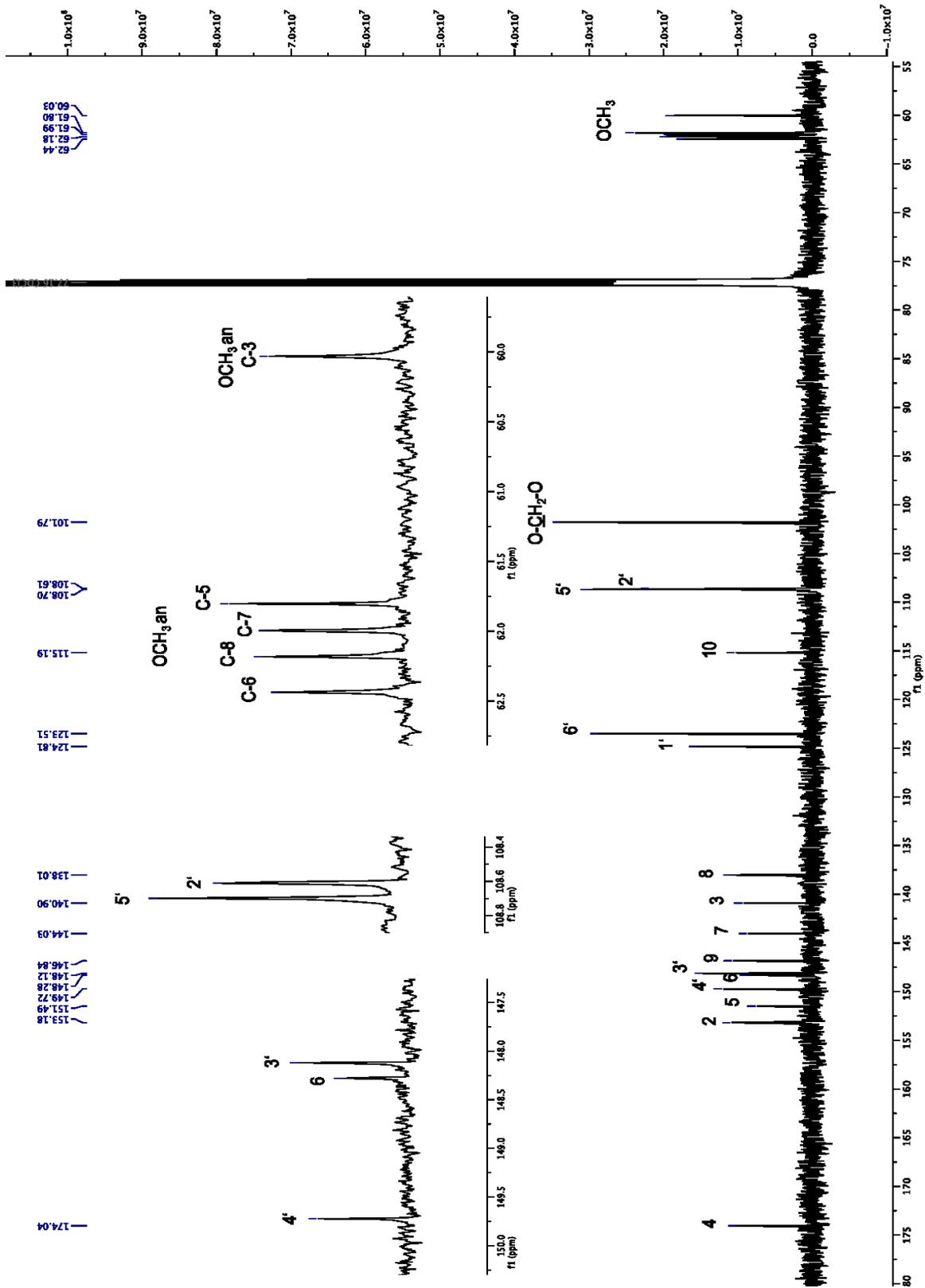


Abbildung 97:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 11 (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

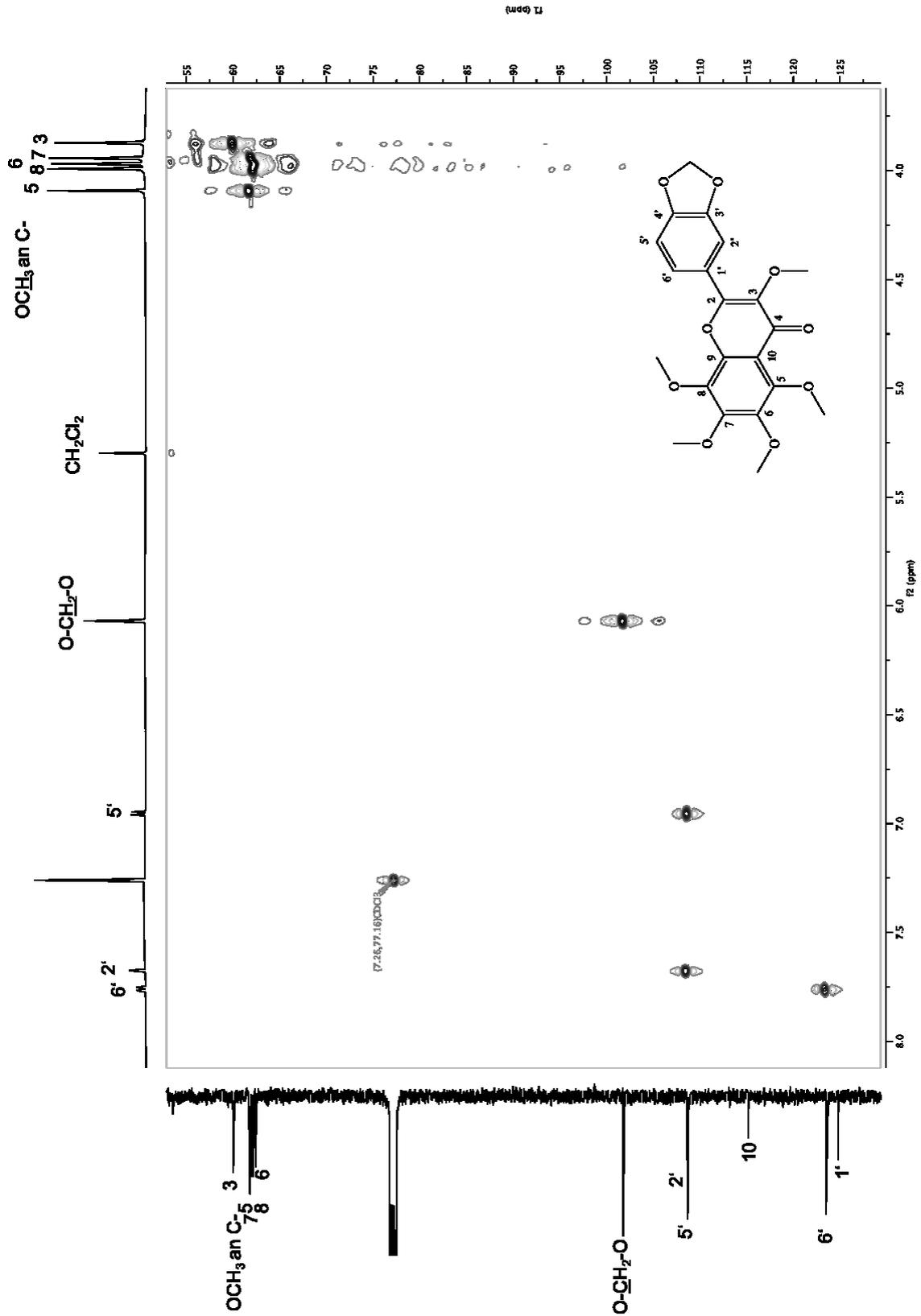


Abbildung 98: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 11 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

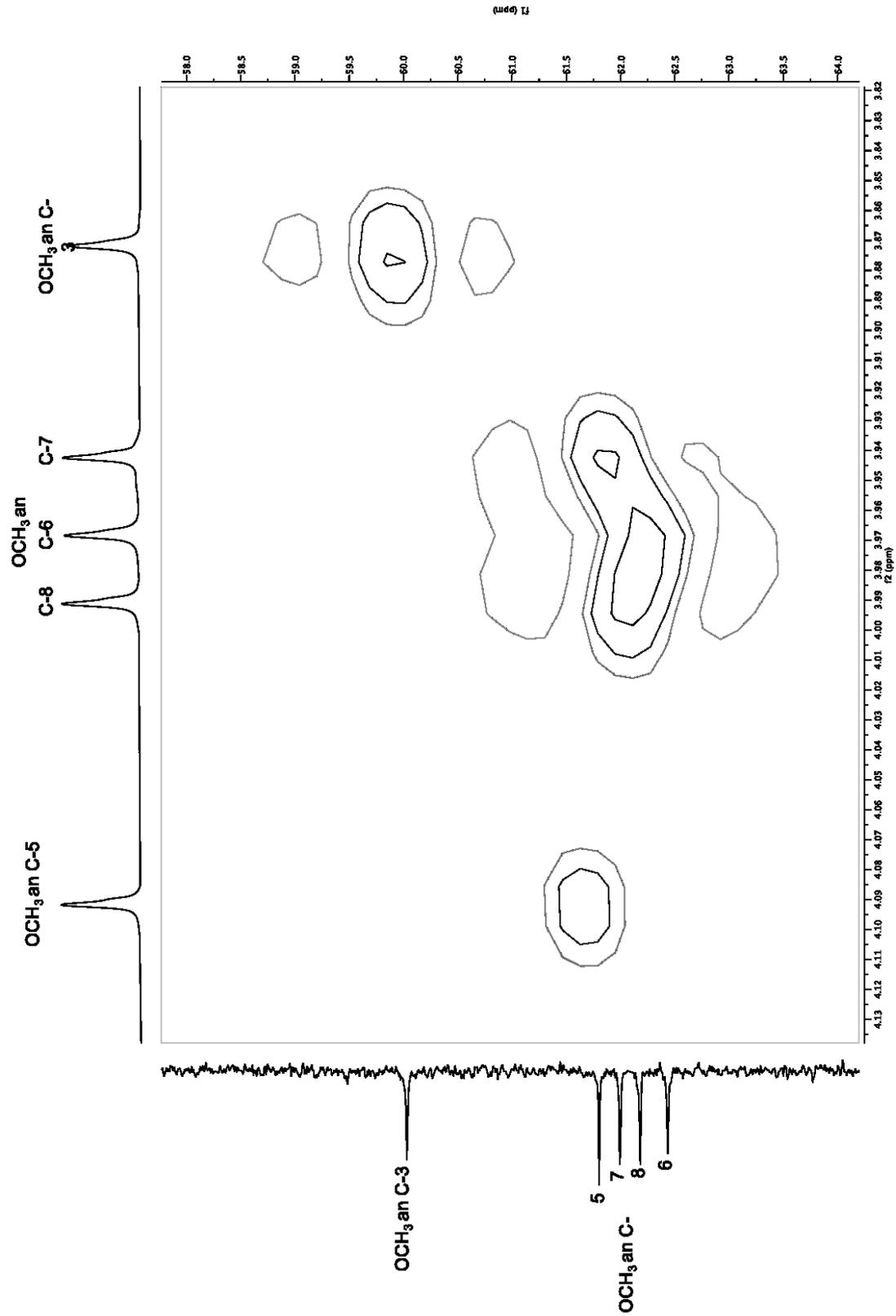


Abbildung 99: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Verbindung 11 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

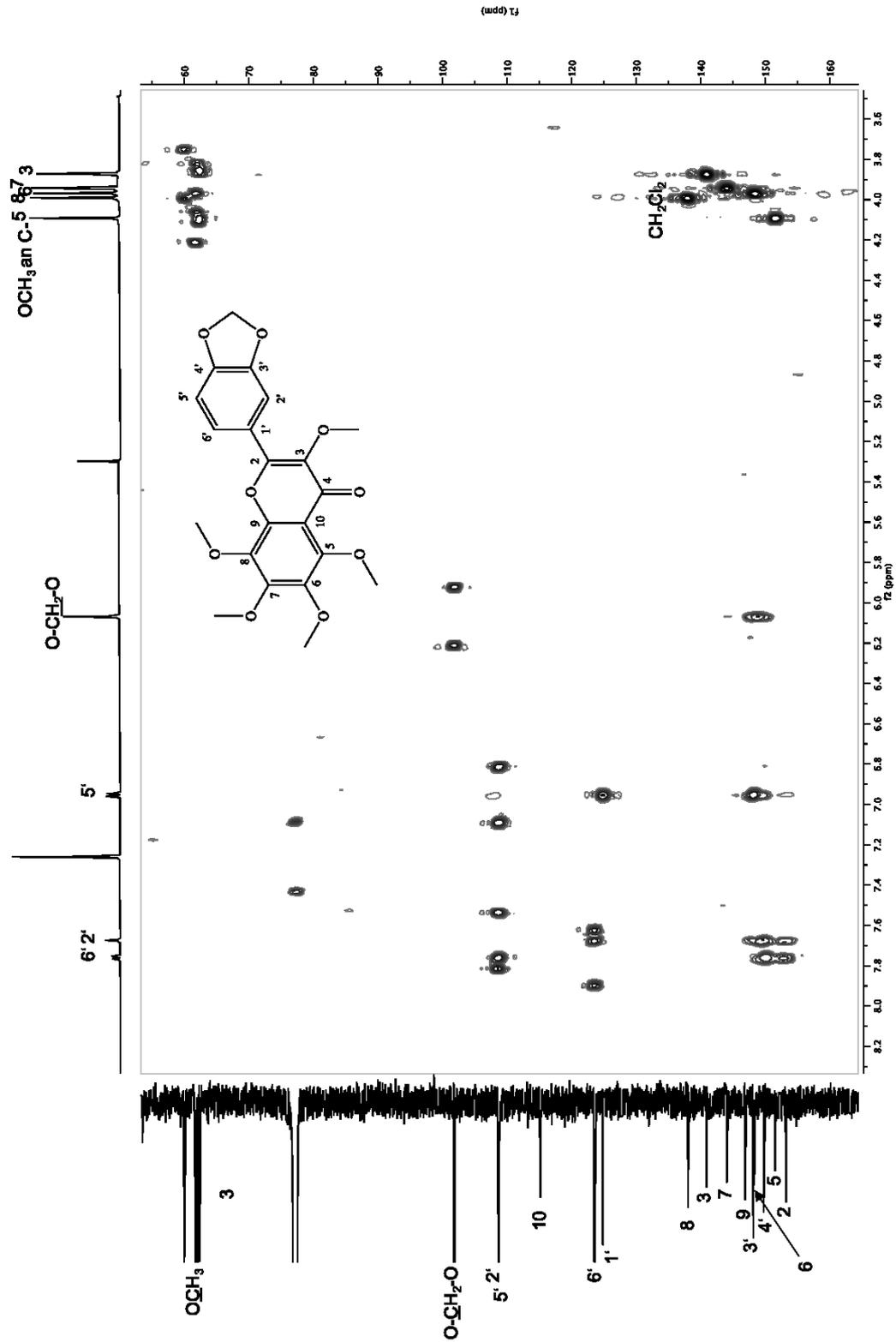


Abbildung 100: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 11 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

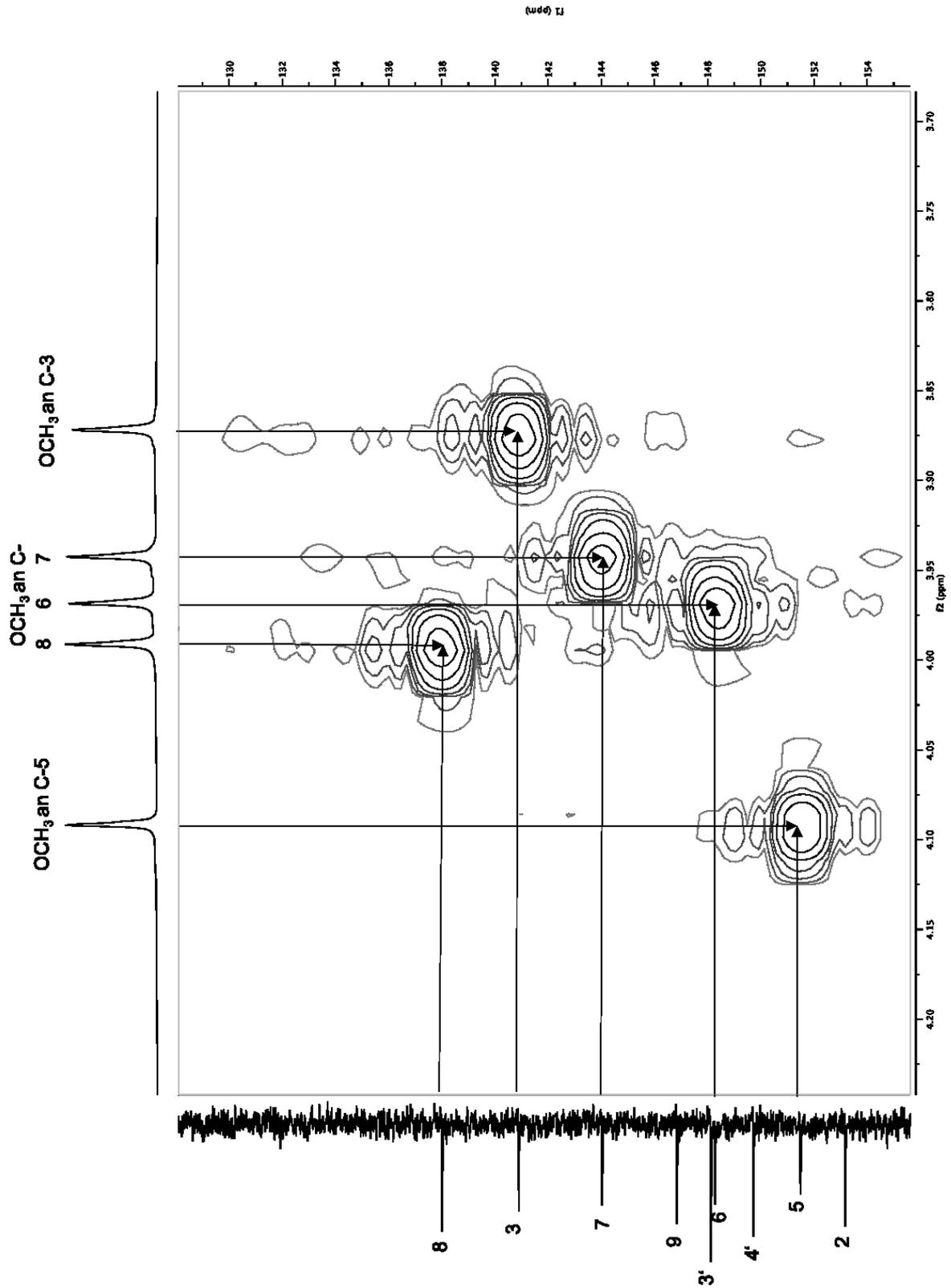


Abbildung 101: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Verbindung **11** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

## 2.10 Verbindung **12**, **13** und **14**

Bei den Verbindungen **12**, **13** und **14** handelt es sich ebenfalls um Flavonole. Verbindung **12** wurde aus der Fraktionen MB.D-VII-6-4 als Reinsubstanz und im Gemisch mit **13** aus der Fraktion MB.D-VII-10 isoliert. Verbindung **14** wurde aus Fraktion MB.D-VIII-6 als Reinsubstanz gewonnen. Bei der hochauflösenden Massenspektrometrie zeigte **12** Quasimolekülonen bei  $m/z = 419.1342 [M + H]^+$  und  $441.1153 [M + Na]^+$ , woraus sich die Summenformel  $C_{21}H_{22}O_9$  errechnen ließ. Damit besitzt **12** bei gleicher Anzahl von Sauerstoffen im Vergleich zu **9** ( $C_{20}H_{18}O_9$ ) einen Kohlenstoff und vier Wasserstoffe mehr im Molekül. Da es sich bei **9** um ein Flavonoid mit einer 3',4'-Methyldioxy substitution handelt und der A- und C-Ring bis auf die OH-Gruppe an C-5 maximal methoxyliert ist, lag die Vermutung nahe, dass **12** zwei Methoxygruppen an C-3' und C-4' anstelle der 3',4'-Methyldioxygruppe in **9** besitzt, wodurch die Massendifferenz genau zu erklären wäre. Zur endgültigen Strukturaufklärung wurden ein- und zweidimensionale Spektren wie bei den zuvor beschriebenen Verbindungen in  $CDCl_3$  aufgenommen. Leider zeigte sich das Hydroxylproton der phenolischen OH-Gruppe an C-5 nur als relativ schwaches Signal und es konnten keine Korrelationen im HMBC mit C-5, C-6 und C-10 erkannt werden (Abbildung 104 und Abbildung 107). Deshalb wurde ein zusätzlicher Satz Spektren in DMSO- $d_6$  aufgenommen, da es in diesem Lösungsmittel nicht zu einem Austausch des OH-Protons mit Deuterium kommen kann (s. Abbildung 108, Abbildung 109 und Abbildung 110). In DMSO- $d_6$  fanden sich dann auch die entsprechenden Korrelationen, mit deren Hilfe die Kohlenstoffe eindeutig zugeordnet werden konnten. Bei Auswertung der NMR-Spektren von **12** zeigte sich, dass die Verbindung die gleiche Substitution am A- und C-Ring besitzt, wie **9** (Tabelle 15). Der B-Ring ist ebenfalls 3',4'-substituiert, was am typischen ABX-System für die Protonen H-6', H-5' und H-2' erkannt werden konnte. Neben den Methoxygruppen an C-3, C-6, C-7 und C-8 traten zwei weitere Methoxysignale im Spektrum auf, die den Methoxygruppen an C-3' und C-4' zugeordnet werden konnten (Tabelle 15). Bei **12** handelte es sich demnach um das 5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxy-flavon, das bereits 1946 von Seshadri und Venkateswarlu synthetisiert wurde. [115]

Tatum und Berry konnten diese Verbindung dann 16 Jahre später aus einer Citrus Art erstmals als Naturstoff isolieren. [116] In der Gattung *Melicope* wurde **12** von Simonsen et al (2003) bereits in *Melicope obscura* gefunden. [117]

Verbindung **13** konnte leider nicht rein, sondern nur im Gemisch mit **12** in Fraktion MB-VII-10 nachgewiesen werden. Im hochauflösenden Massenspektrum (Abbildung 102) ließ sich neben dem Quasimolekülion von **12** ( $419.1342 [M + H]^+$ ) ein zweites Signal bei  $m/z = 389.1235$  für **13** erkennen, aus dem sich die Summenformel  $C_{20}H_{20}O_8$  errechnen ließ. Verbindung **13** war damit um 30 Masseneinheiten leichter als **12** (Abbildung 102). Dies ließ die Vermutung zu, dass **13** eine Methoxygruppe (minus  $CH_3O$ ) weniger besitzt als **12**, so wie es schon beim Gemisch von **9** und **10** gefunden wurde. Die Auswertung der NMR-Spektren (Abbildung 113, Abbildung 115 und Abbildung 117 und Tabelle 16) ergab, dass **13** wie **12** zwei Methoxygruppen an den Kohlenstoffen C-3' und C-4' des B-Rings besitzt, deren  $^1H$  und  $^{13}C$ -NMR-Shiftwerte zusammen mit den übrigen Protonen und Kohlenstoffen des B-Rings große Ähnlichkeit mit den für **12** ermittelten Werten zeigten. Die Hauptunterschiede zeigten sich bei den Protonen und Kohlenstoffen des A-Rings. Wie bei **10** fand sich im  $^1H$ -NMR Spektrum von **13** ein Proton bei  $\delta = 6.42$  ppm, dessen zugehöriger Kohlenstoff bei  $\delta = 95.25$  ppm zur Resonanz kam. Aufgrund der Korrelationen dieses Kohlenstoffsignals mit dem Signal der OH-Gruppe an C-5, die charakteristischerweise bei  $\delta = 12.47$  ppm etwas tieffeldverschoben zum entsprechenden Signal von **12** auftrat, konnte das Signal eindeutig dem C-6 zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen der Methoxygruppen an C-7 und C-8 traten in Shiftbereichen auf, die auch bei **10** gefunden wurden (Tabelle 13 und Tabelle 15). Bei Verbindung **13** handelte es sich daher um das 5-Hydroxy-3,3',4',7,8-Pentamethoxyflavon, dessen NMR Daten insgesamt gut mit den von Sarmiento et al. (2009) veröffentlichten Daten übereinstimmt. [118] Die hier angegebenen  $^{13}C$  NMR Daten konnten nur aus den  $^1H$ ,  $^{13}C$ -Korrelationsspektren (HSQC und HMBC, s. Abbildung 113, Abbildung 115 und Abbildung 117) entnommen werden. Leider konnten wir kein auswertbares  $^{13}C$ -NMR Spektrum von der Substanz erhalten, so dass es uns hier nicht möglich war, die Shiftwerte der Signale der quartären Kohlenstoffe C-4 und C-9, die keine Korrelationen im HMBC zeigten, zu ermitteln. Dieses methoxylierte Flavonol wurde bereits 1957 von Robert M. Horowitz in der Gattung *Citrus* gefunden [119], für *Melicope*-Arten wurde **13** bisher noch nicht beschrieben.

Verbindung **14** wurde in einer Ausbeute von 1,9 mg rein aus Fraktion MB-VII-6 gewonnen. Das HRESIMS zeigte den Molpeak  $[M + H]^+$  bei  $m/z = 433.1497$ , woraus sich die Summenformel  $C_{22}H_{24}O_9$  ableitet. Im Vergleich zu **12** ( $C_{21}H_{22}O_9$ ), das noch über eine freie OH-Gruppe an C-5 verfügte, besitzt **14** damit eine Methylengruppe mehr, was erwarten lässt, dass die im **14** alle Hydroxygruppen methyliert vorliegen. Im  $^1H$ -NMR Spektrum (Abbildung 123) war dies sofort am Fehlen des OH-Protons bei ca. 14 ppm und einem siebten Methoxysingulett zu erkennen. Die Zuordnung der  $^1H$  und  $^{13}C$ -NMR Signale gelang über die zweidimensionale Korrelationsspektren (HSQC, HMBC, s. Abbildung 126 und Abbildung 128). Da auch von **14** aufgrund der isolierten Menge kein auswertbares  $^{13}C$ -NMR Spektrum aufgenommen werden konnte, lassen sich neben den Signalen für den Carbonylkohlenstoff C-4 und den quartären Kohlenstoff C-9 auch das Signal des C-10 wegen der fehlenden Korrelationen nicht in den Spektren erkennen. Insgesamt stimmen die Daten aber sehr gut mit den von Machida und Osawa (1989) publizierten Daten für 3,3',4',5,6,7,8-Heptamethoxyflavon überein. [120] Tabelle 17 zeigt die von uns getroffene Zuordnung im Vergleich zu den Daten von 1989. Vermutlich konnten damals nur eindimensionale NMR Spektren auf einem 400 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und ausgewertet werden, mit deren Hilfe die Protonen- und Kohlenstoffsignale der Methoxygruppen nicht zugeordnet werden konnten. Vergleicht man jedoch die Shiftwerte, so findet man große Übereinstimmung. Auch bei den A- und B- Ring Kohlenstoffen war die Zuordnung damals nicht richtig und muss teilweise korrigiert werden. Einige der Signale waren bei den 400 MHz Spektren aufgrund der geringeren Auflösung auch nicht getrennt zu erkennen. Verbindung **14** wurde erstmals von Sastry et al. aus *Citrus mitis* isoliert. [121] Innerhalb der Gattung *Melicope* ist das Vorkommen von 3,3',4',5,6,7,8-Heptamethoxyflavon nur in *M. triphylla* bekannt. [89]

2.10.1 Daten von 12 (5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxyflavon)

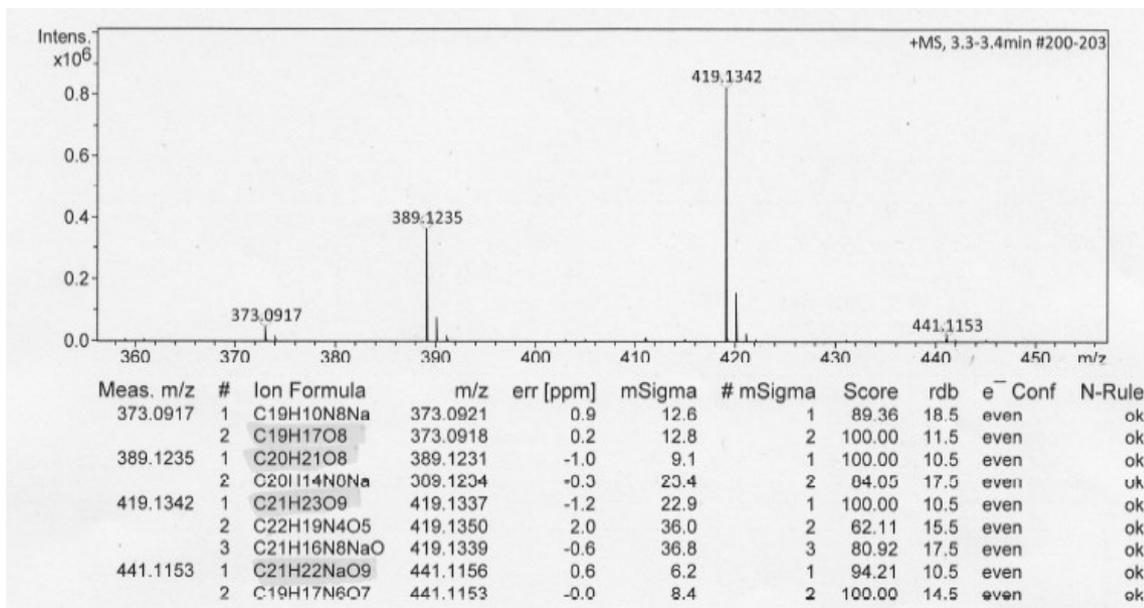
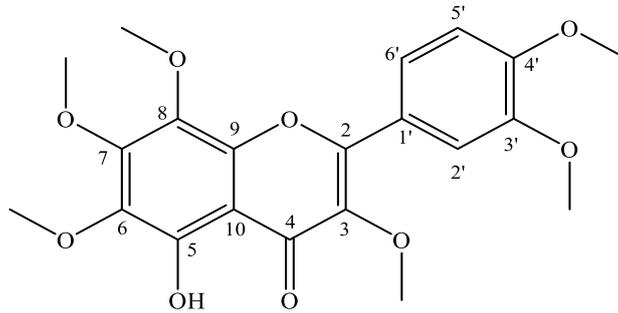
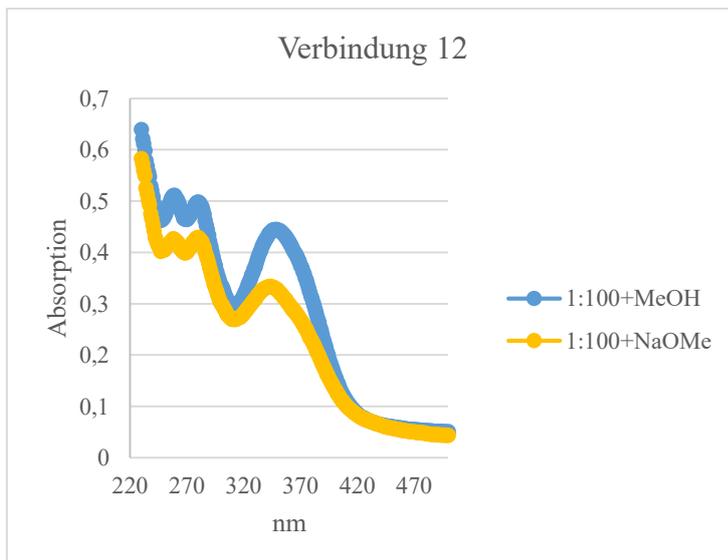
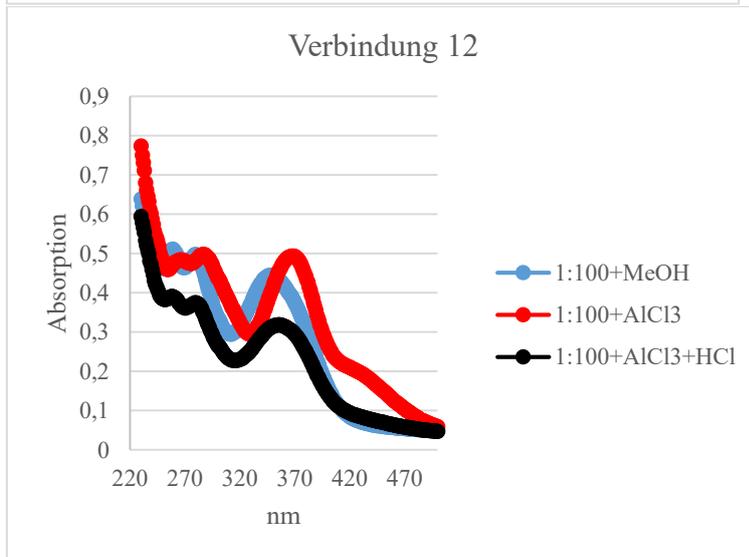
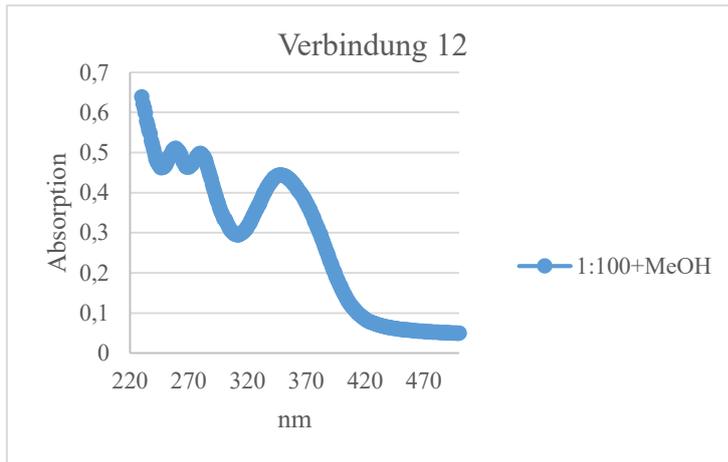


Abbildung 102: HRESIMS von Verbindung 12



**Abbildung 103:** UV-Spektren der Verbindung 12 in Methanol und unter Zusatz verschiedener Shiftreagenzien

**Tabelle 15:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **12** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in DMSO- $\text{d}_6$ )

<b>12</b>					<b>Literatur nach [108]</b>	
	$\text{CDCl}_3$		$\text{DMSO-d}_6$		$\text{DMSO-d}_6$	
<b>Position</b>	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
<b>2</b>	-	155.34	-	n.d.	-	155.60
<b>3</b>	-	138.62	-	138.07	-	138.06
<b>4</b>	-	179.50	-	178.67	-	178.66
<b>5</b>	-	149.25	-	148.10	-	148.47
<b>6</b>	-	136.23	-	135.50	-	135.49
<b>7</b>	-	152.77	-	152.47	-	152.46
<b>8</b>	-	132.75	-	132.48	-	132.44
<b>9</b>	-	n.d.	-	n.d.	-	144.42
<b>10</b>	-	107.13	-	106.79	-	106.78
<b>1'</b>	-	123.20	-	122.13	-	122.11
<b>2'</b>	7.80 d (2.1)	111.25	7.67 d (2.1)	110.91	7.65 d (2.0)	110.90
<b>3'</b>	-	149.26		148.49	-	148.09
<b>4'</b>	-	151.43		151.44	-	151.43
<b>5'</b>	7.02 d (8.7)	111.15	7.21 d (8.7)	111.80	7.15 d (9.0)	111.78
<b>6'</b>	7.86 dd (8.7, 2.1)	122.50	7.75 dd (8.6, 2.2)	122.02	7.72 dd (9.0, 2.0)	122.01
<b>OCH<sub>3</sub> an C-3</b>	3.89 s	60.29	3.84 s	59.78	4.018*	59.75
<b>OCH<sub>3</sub> an C-6</b>	3.959 s	61.32	3.82 s	60.61	3.898*	60.58
<b>OCH<sub>3</sub> an C-7</b>	4.11 s	61.89	4.03 s	61.52	3.861*	61.79
<b>OCH<sub>3</sub> an C-8</b>	3.955 s	62.21	3.91 s	61.81	3.843*	61.49
<b>OCH<sub>3</sub> an C-3'</b>	3.97 s	56.17	3.855 s	55.44	3.828*	55.42
<b>OCH<sub>3</sub> an C-4'</b>	3.98 s	56.07	3.875 s	55.71	3.816*	55.69
<b>OH an C-5</b>	12.39 s		12.41 s	-	n.a.	-

\* Signale nicht zugeordnet

n.d. = nicht detektiert

n.a. = nicht angegeben

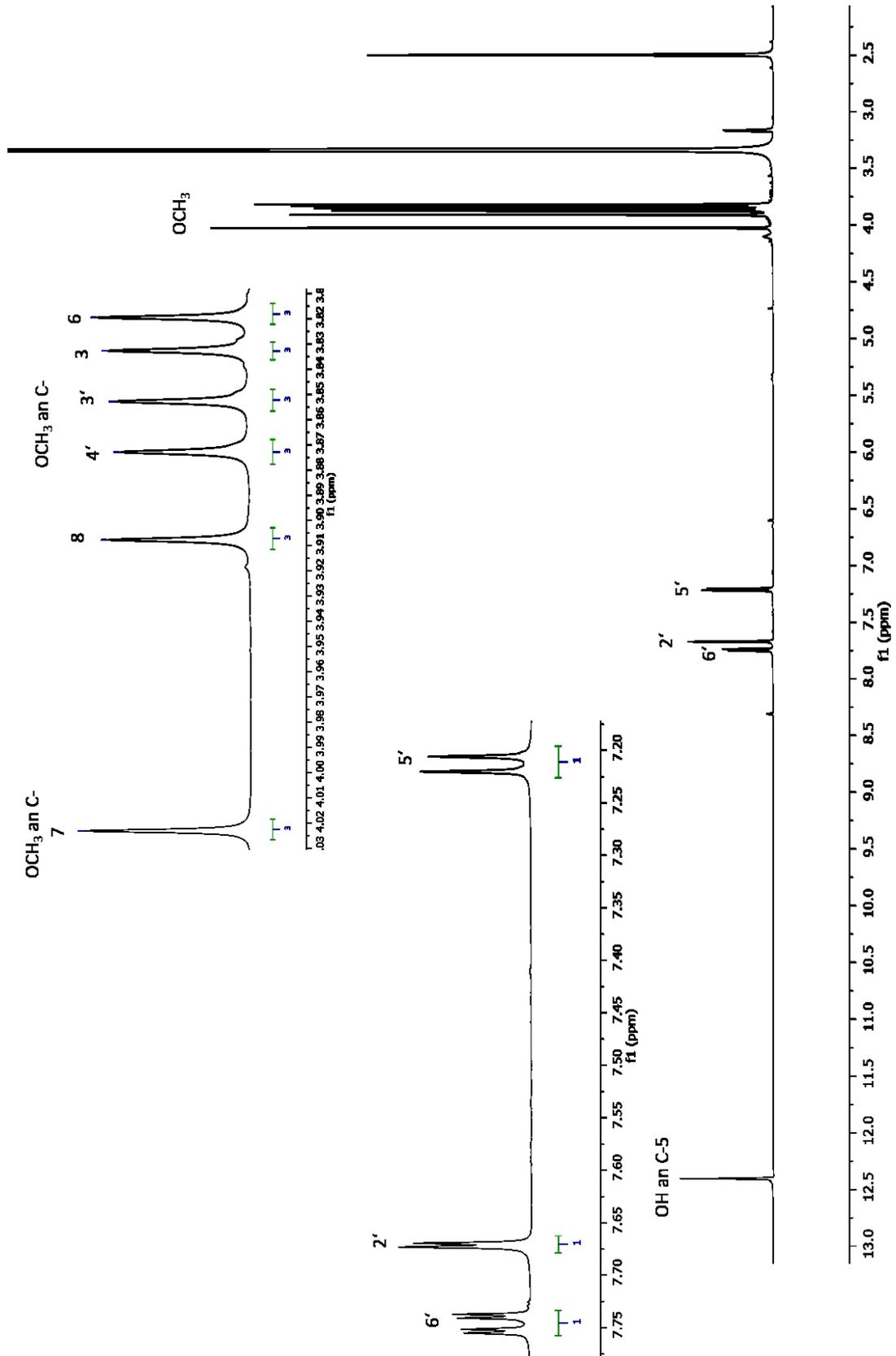


Abbildung 104:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **12** (600MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

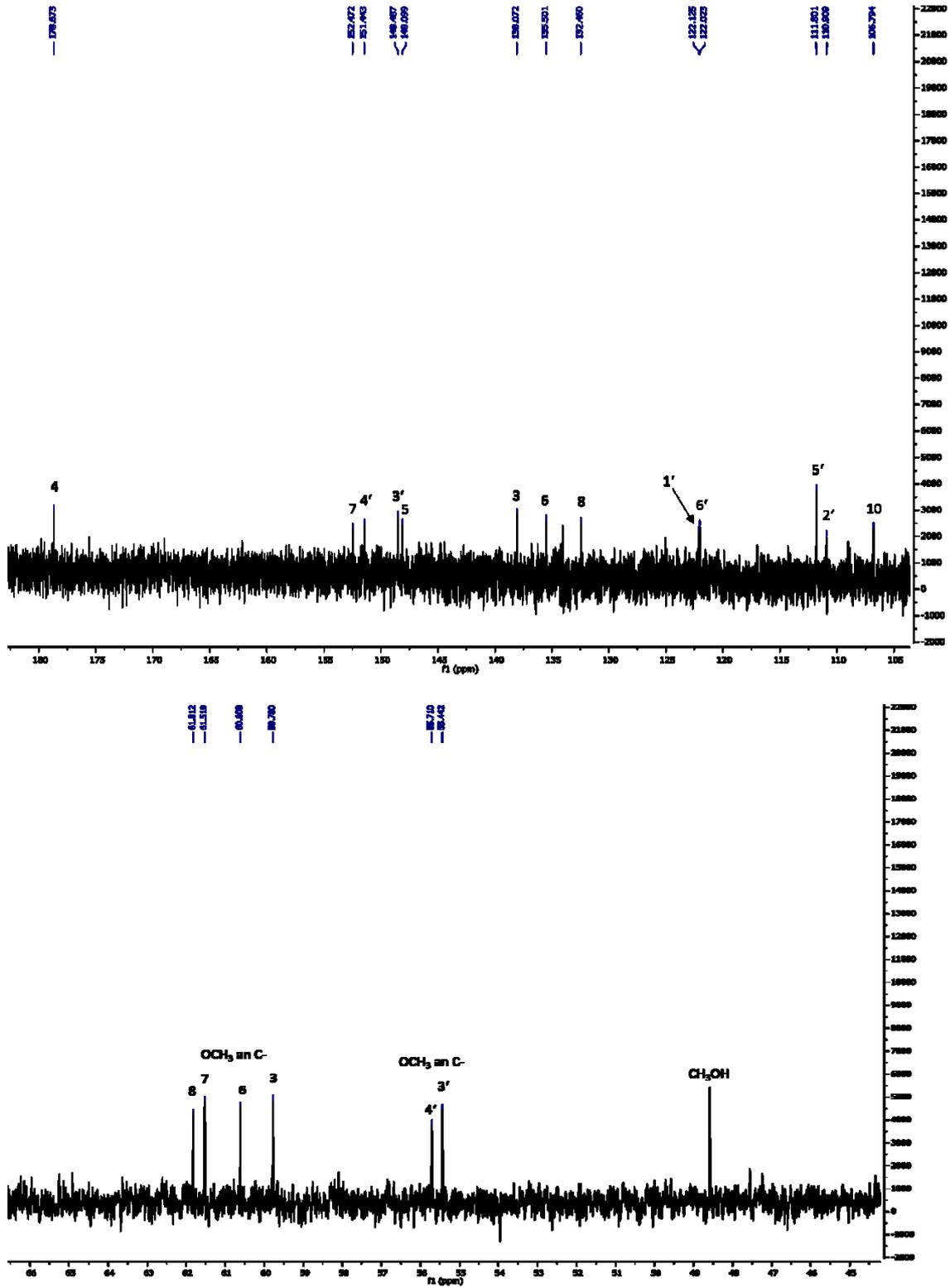


Abbildung 105:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 12 (150 MHz in DMSO- $d_6$ )

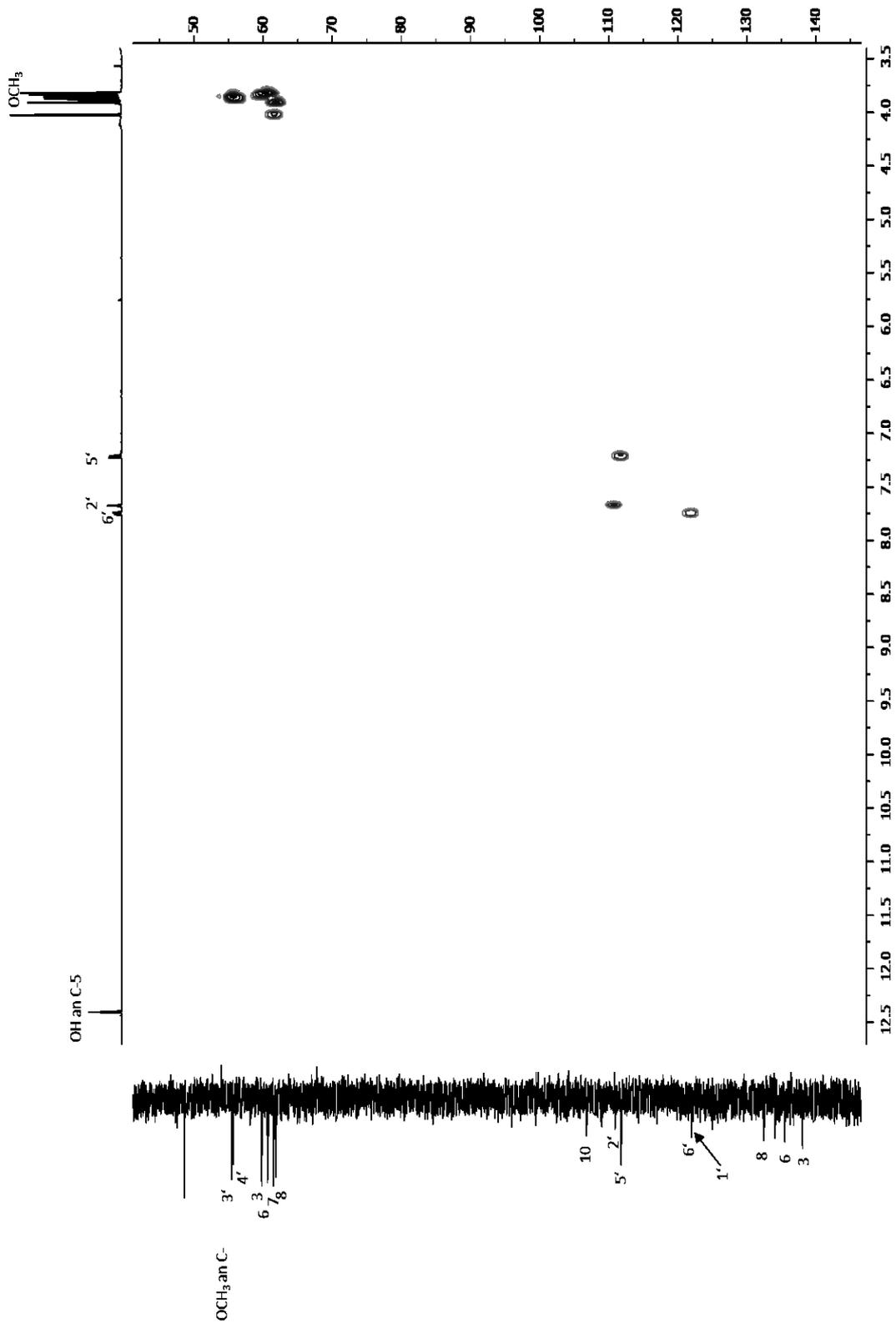


Abbildung 106: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 12 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

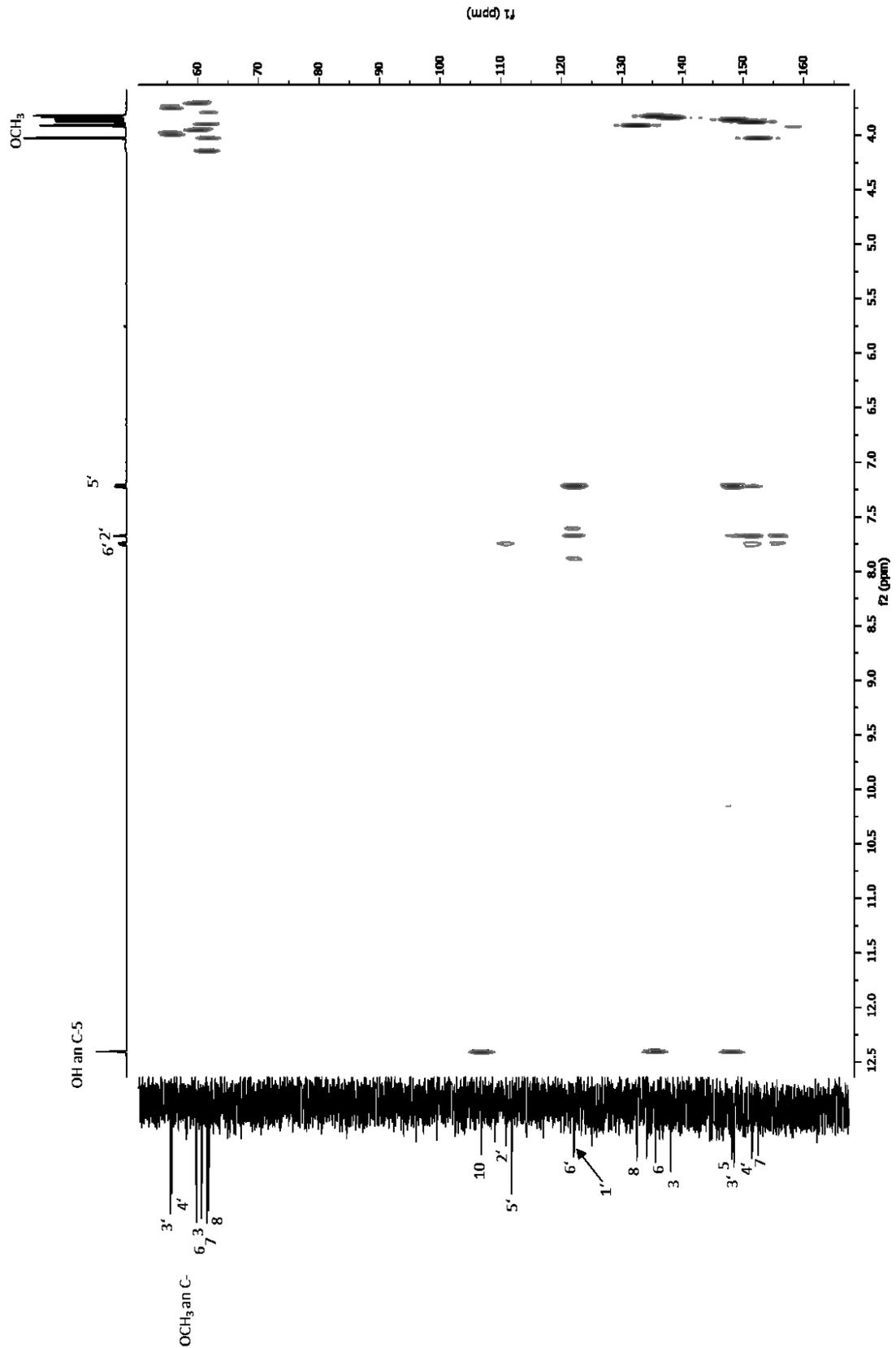


Abbildung 107: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 12 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

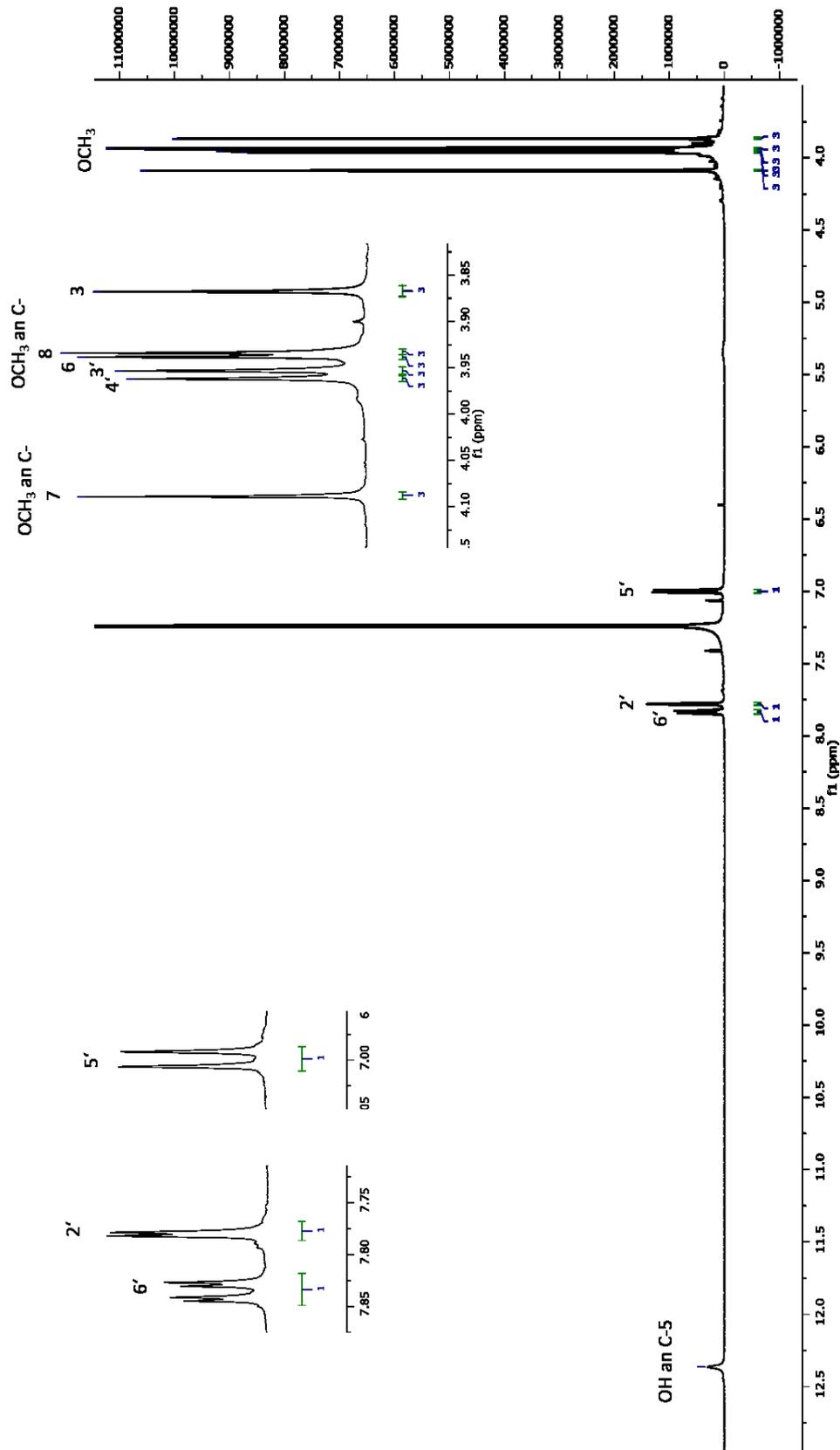


Abbildung 108:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von Verbindung 12 (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

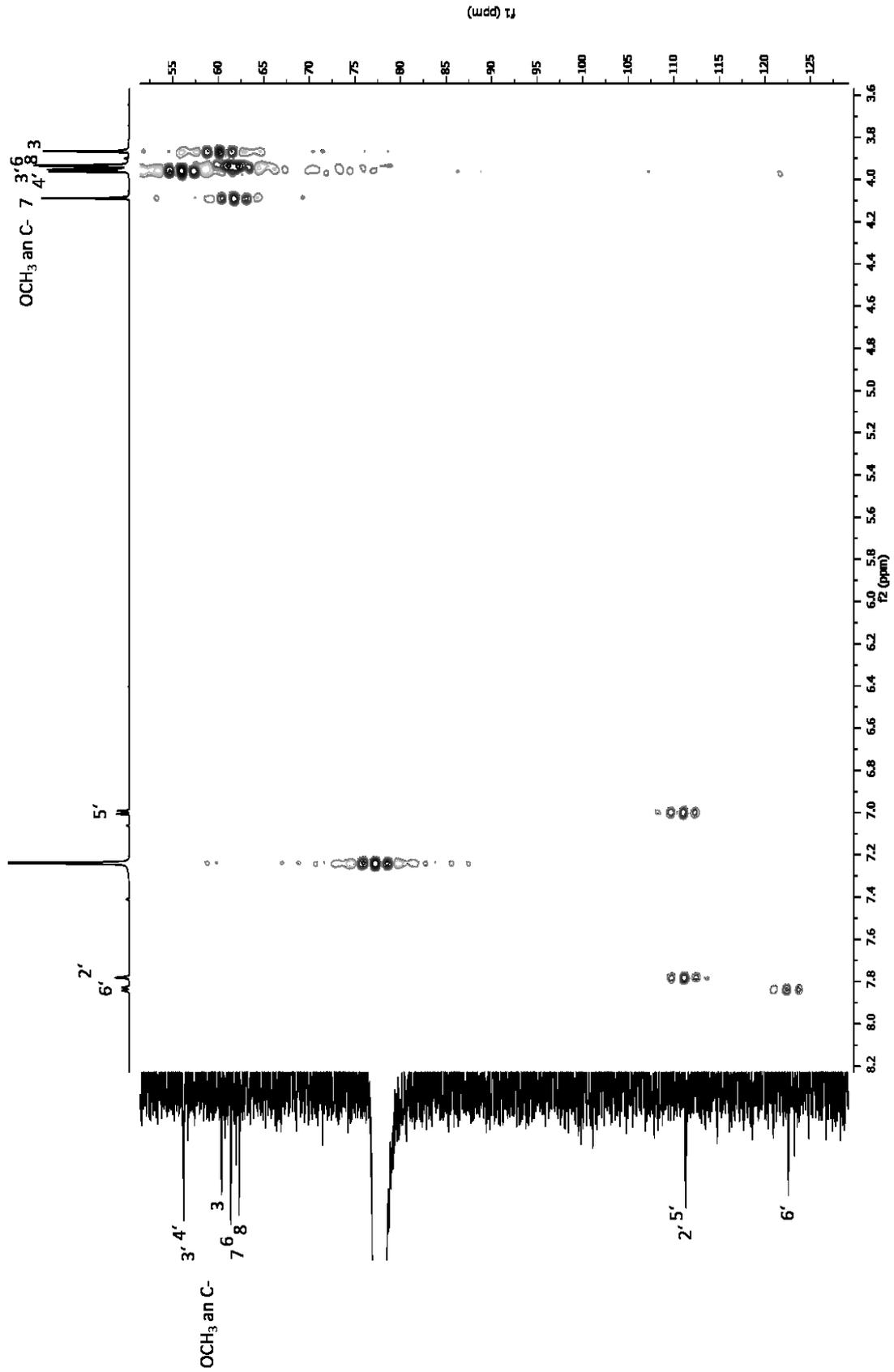


Abbildung 109: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 12 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

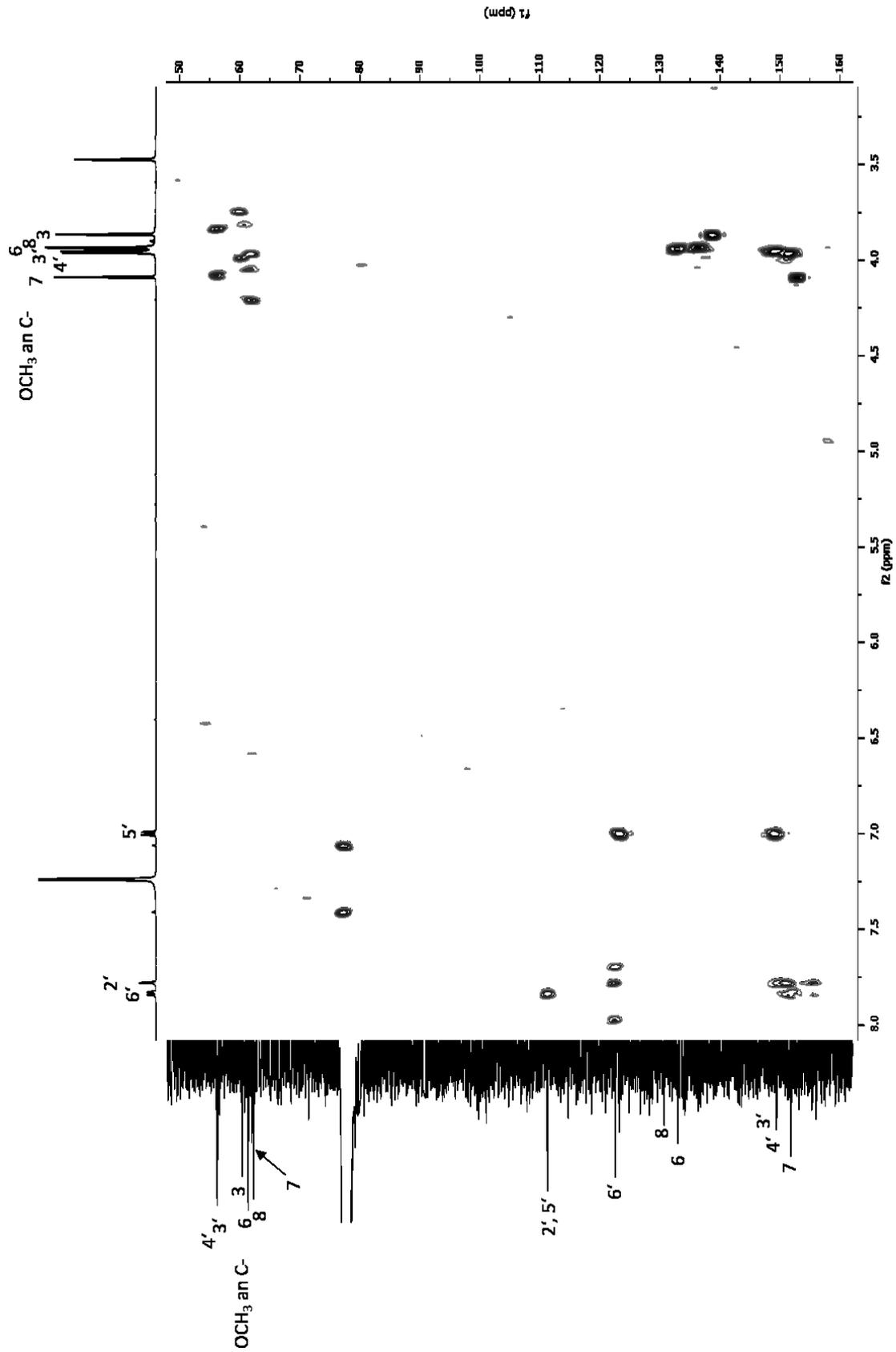


Abbildung 110: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 12 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

2.10.2 Daten von 13 (5-Hydroxy-3,3',4',7,8-pentamethoxyflavon)

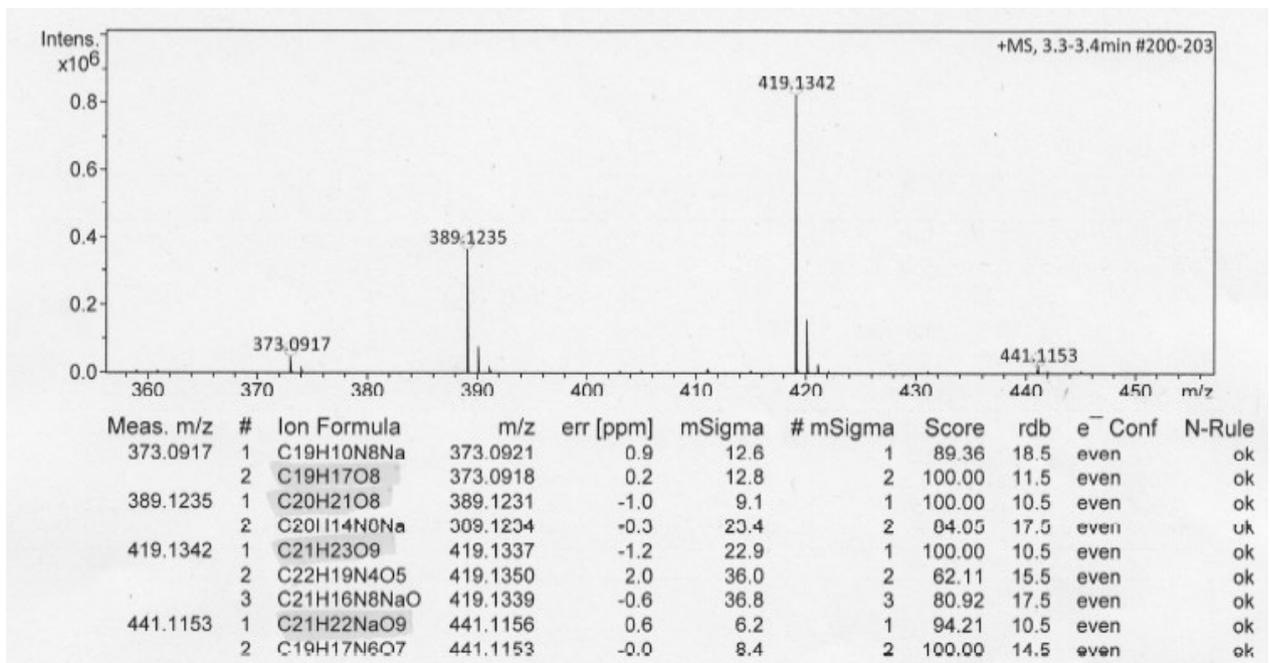
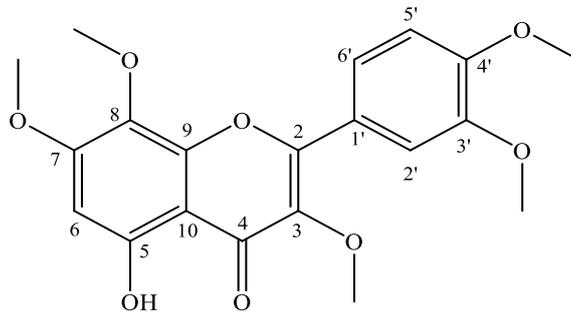


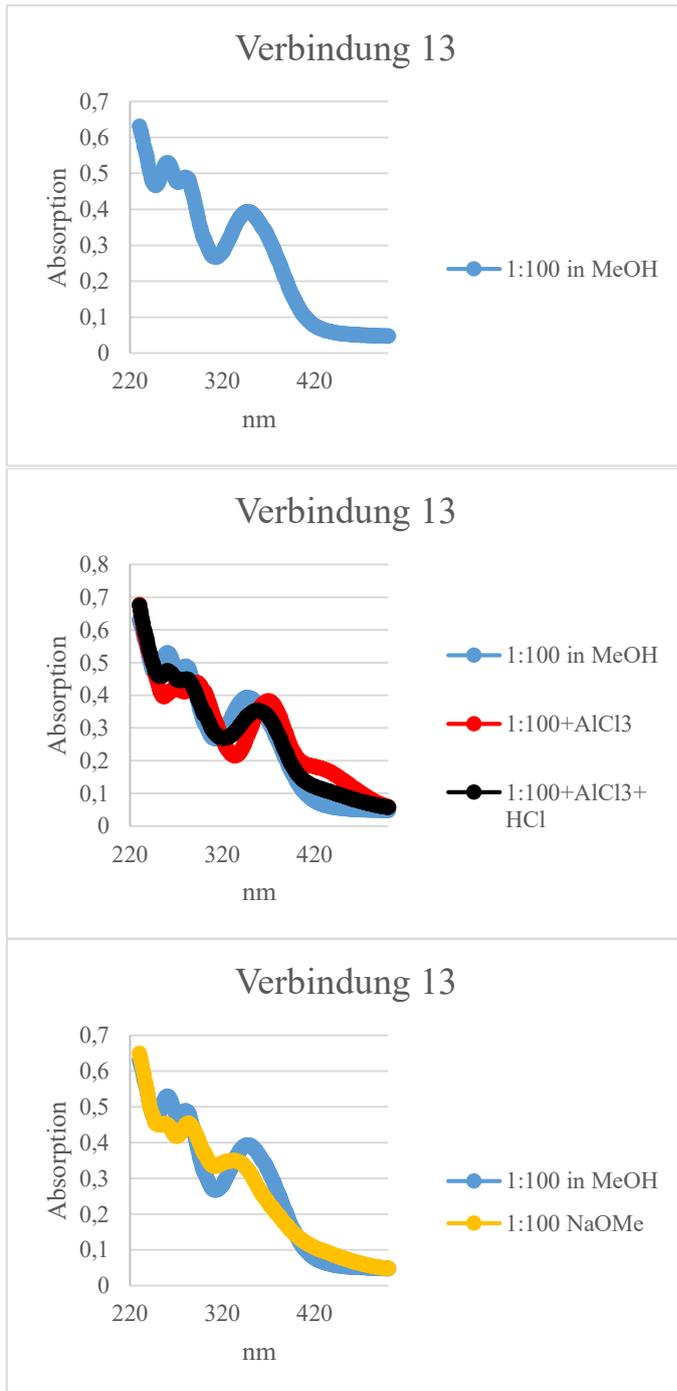
Abbildung 111: HRESIMS von Verbindung 13 (Nebenkomponente im Gemisch mit 12)

**Tabelle 16:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **13** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	13		Literatur nach [118]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
2	-	155.77	-	156.02
3	-	138.83	-	139.18
4	-	n.d.	-	179.42
5	-	157.50	-	157.79
6	6.42 s	95.27	6.43 s	95.83
7	-	158.37	-	158.80
8	-	128.84	-	129.20
9	-	n.d.	-	148.86
10	-	105.39	-	105.75
1'	-	122.84	-	123.53
2'	7.81 d (2.1)	111.13	7.82 d (2.0)	111.56
3'	-	148.82		149.22
4'	-	151.42		151.88
5'	7.02 (8.6)	111.13	7.03 d (8.5)	111.41
6'	7.86 dd (8.6, 2.1)	122.13	7.87 dd (8.5, 2.0)	122.73
OCH <sub>3</sub> an C-3	3.89 s	60.01	3.87 s	60.56
OCH <sub>3</sub> an C-7	3.95 s	56.75	3.93 s	56.79
OCH <sub>3</sub> an C-8	3.92 s	61.31	3.91 s	61.96
OCH <sub>3</sub> an C-3'	3.97 s	56.13	3.96 s	56.33
OCH <sub>3</sub> an C-4'	3.98 s	56.47	3.97 s	56.42
OH an C-5	12.47 s	-	12.47 s	-

n.d. = nicht detektiert

n.a. = nicht angegeben



**Abbildung 112:** UV-Spektren der Verbindung **13** in Methanol und unter Zusatz verschiedener Shiftreagenzien

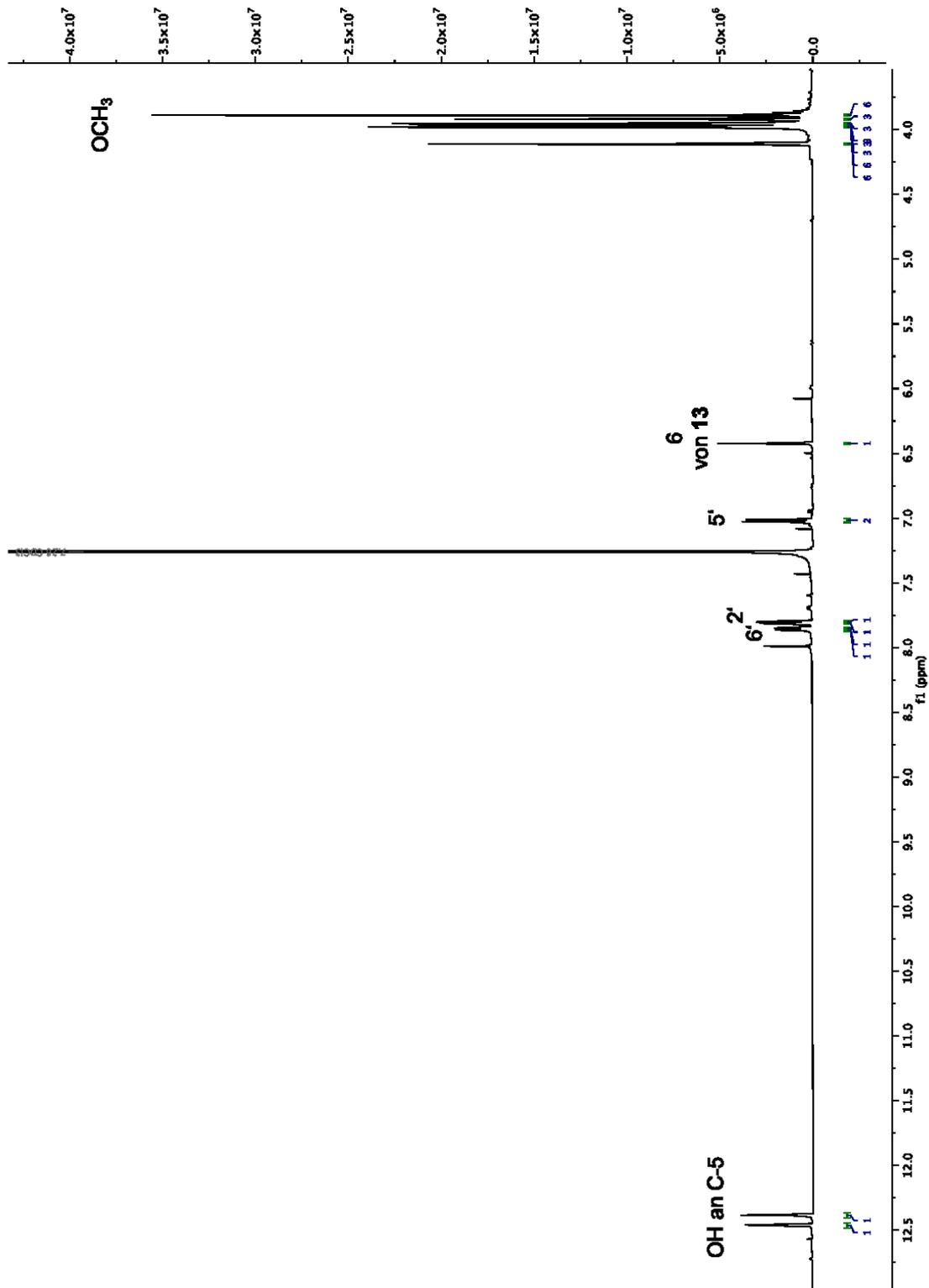


Abbildung 113:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum des Gemisches von 12 und 13 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

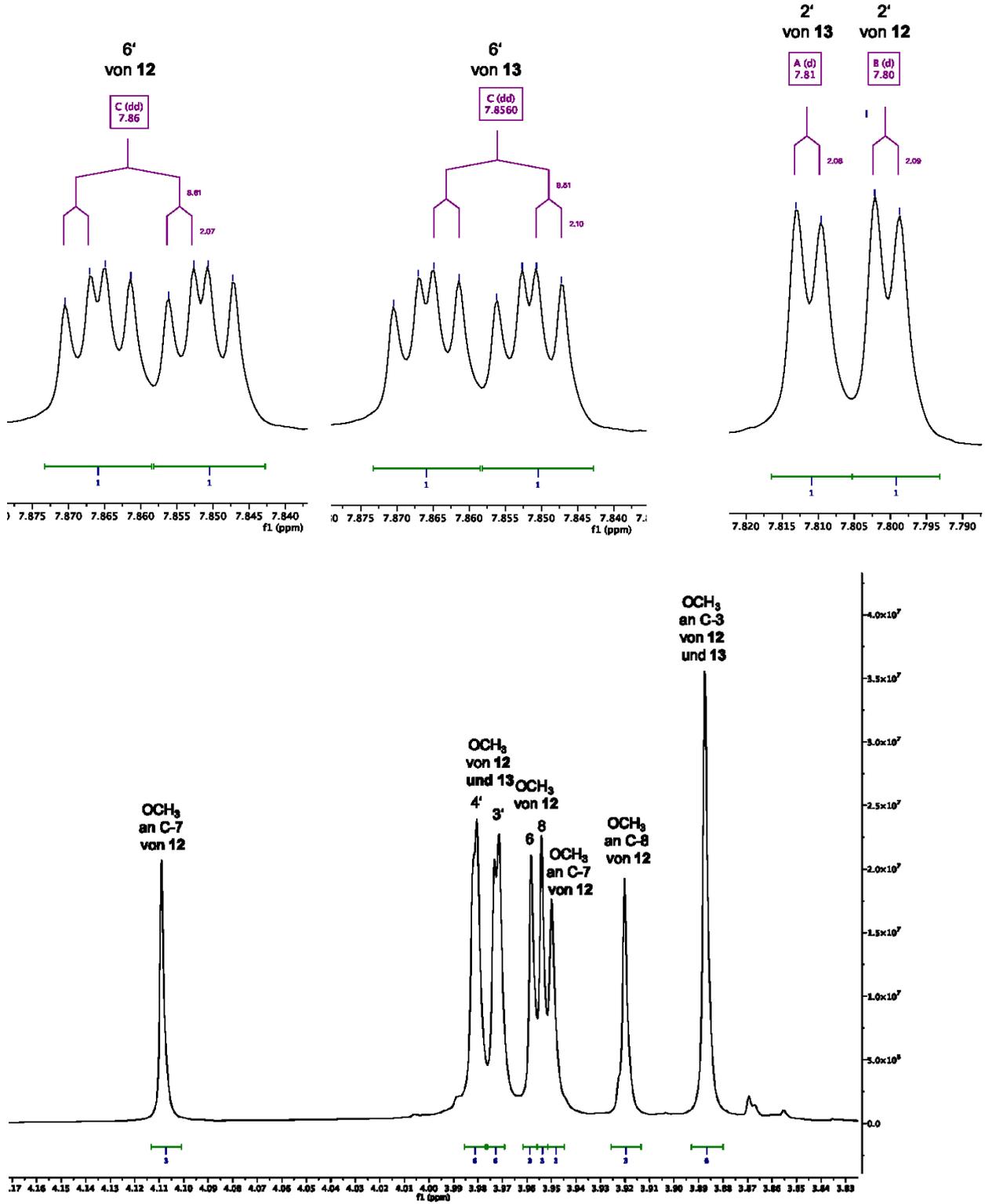


Abbildung 114: Ausschnitte aus dem  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum des Gemisches von 12 und 13 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

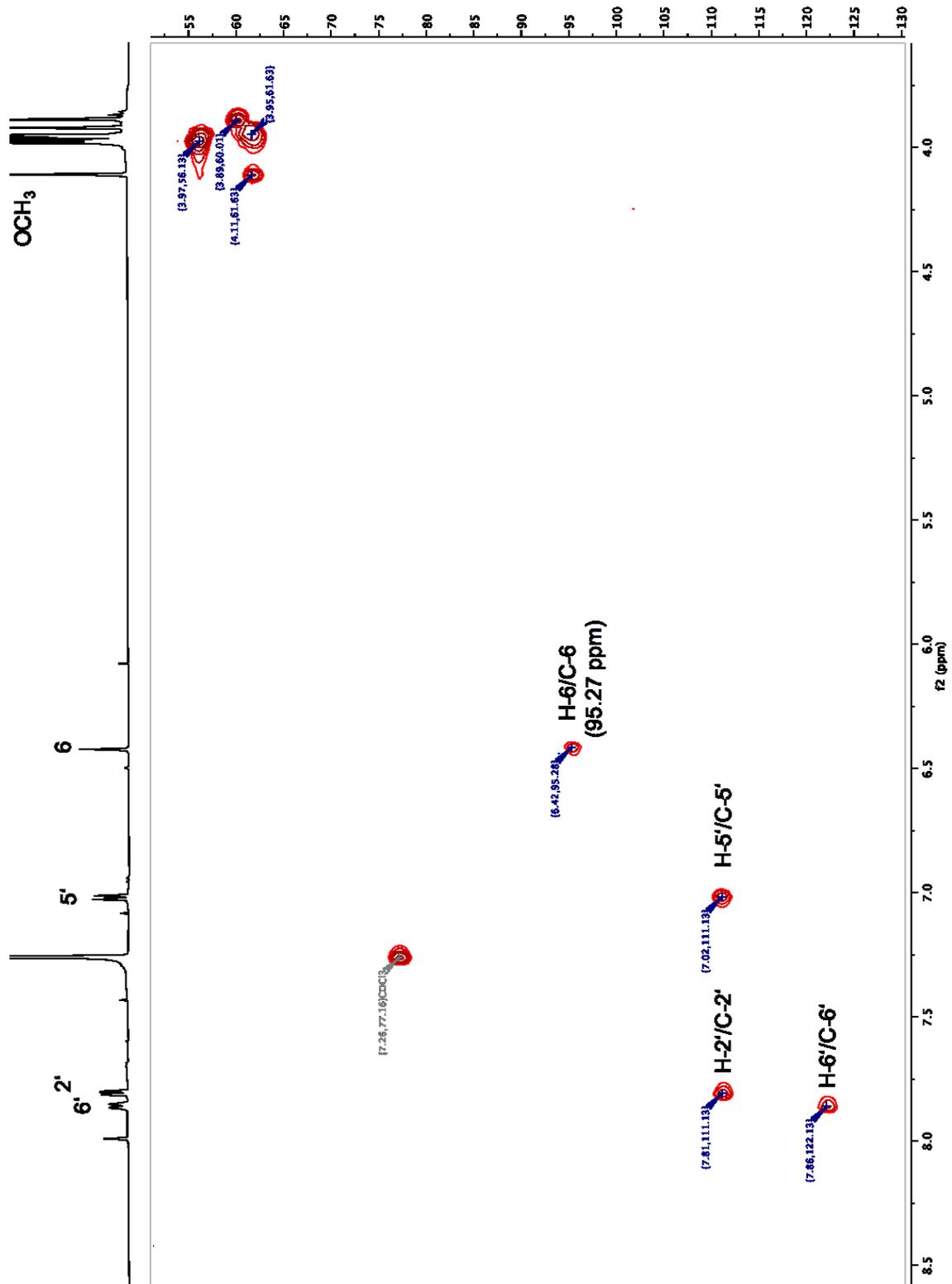


Abbildung 115: 2D-HSQC-Spektrum des Gemisches von **12** und **13** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

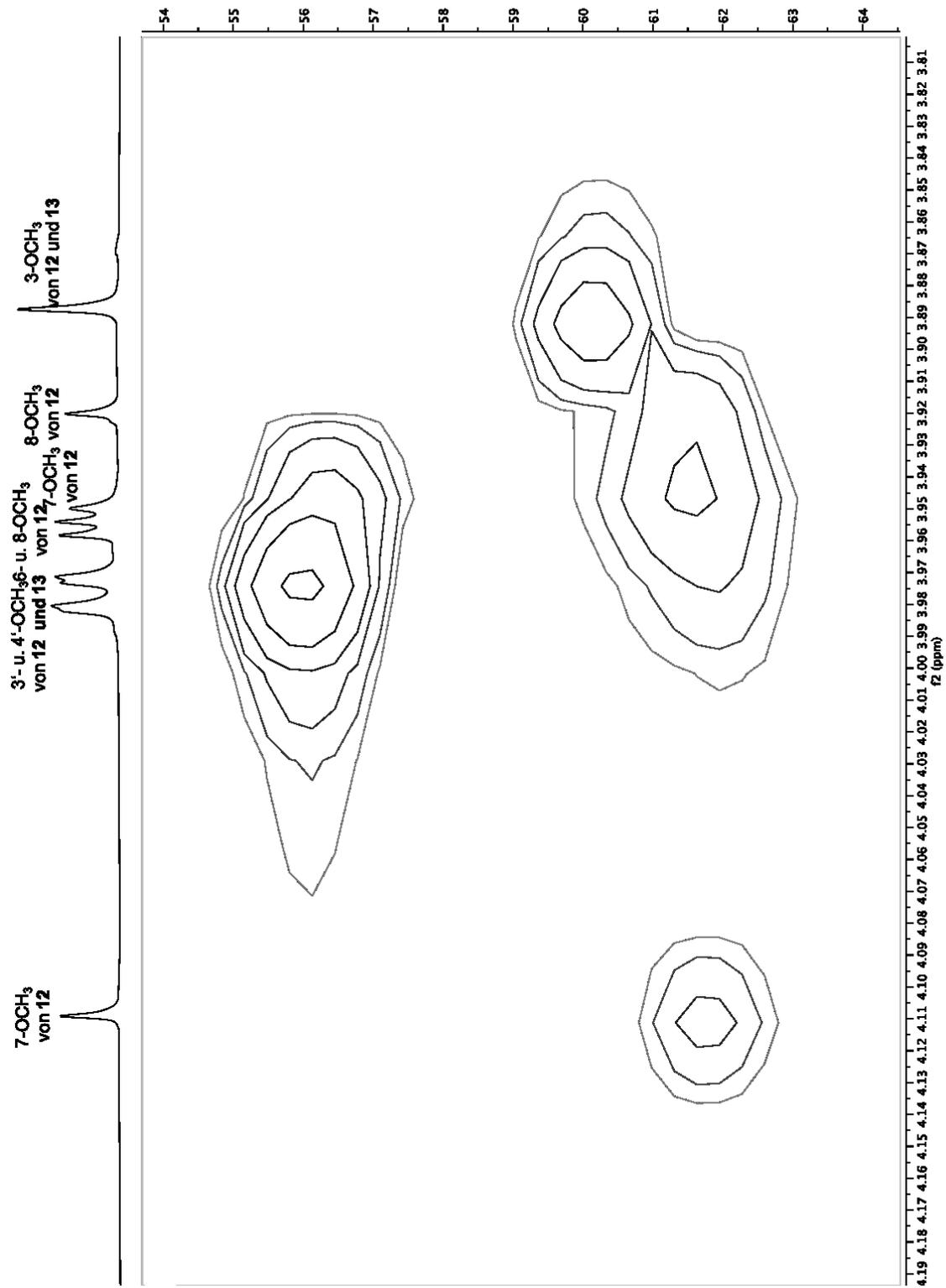


Abbildung 116: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum des Gemisches von 12 und 13 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

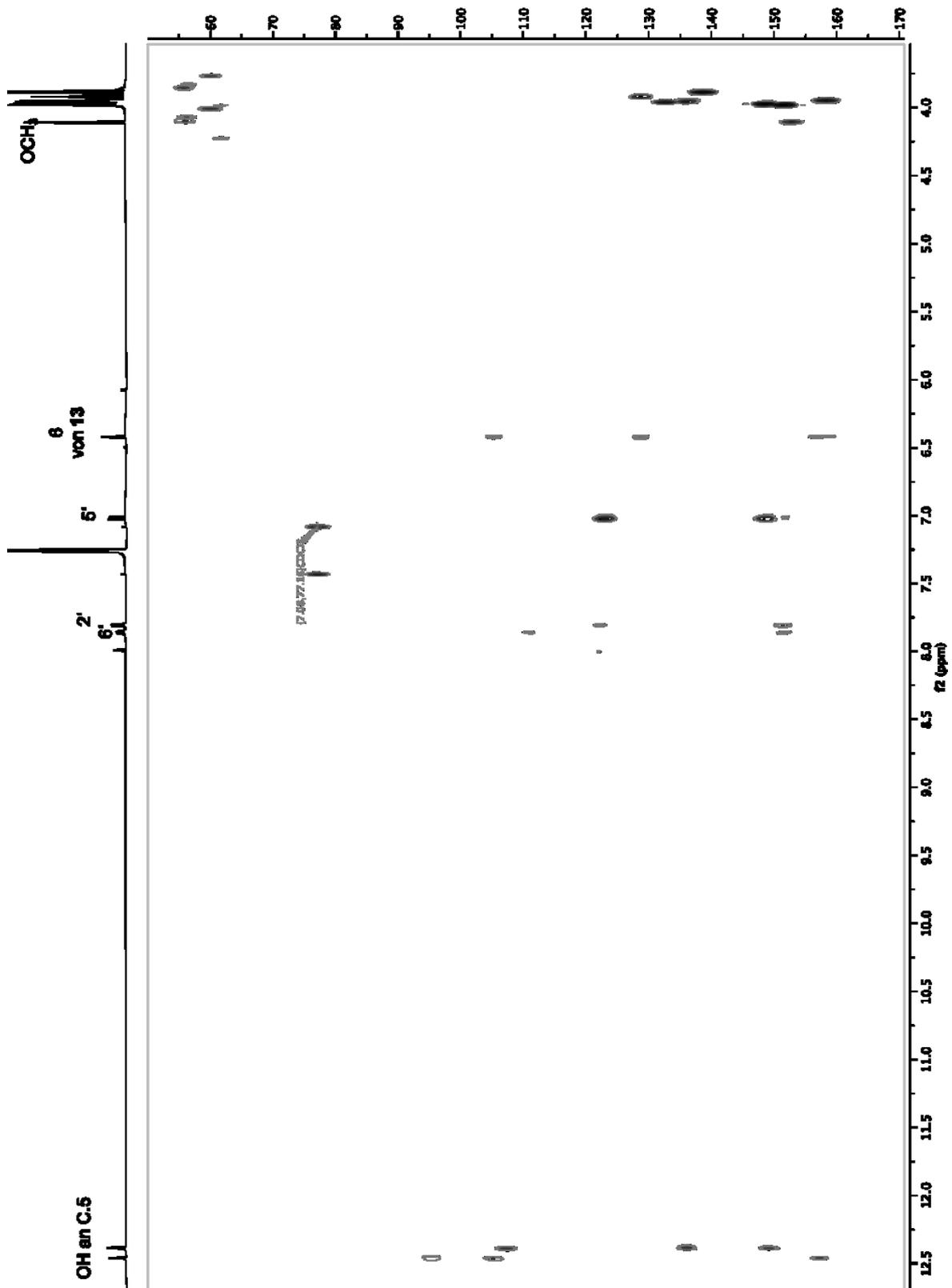


Abbildung 117: 2D-HMBC-Spektrum des Gemisches von **12** und **13** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

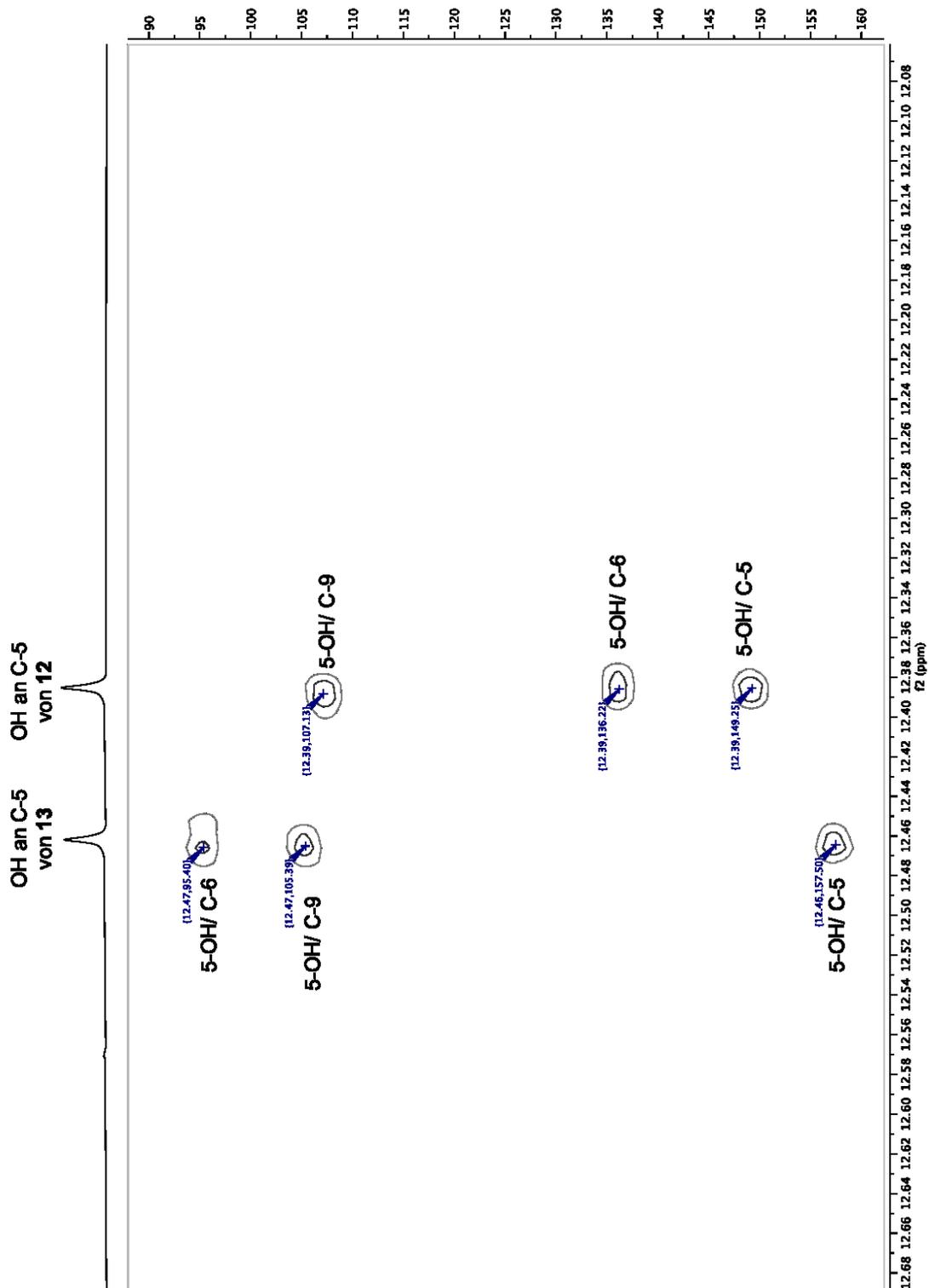


Abbildung 118: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum des Gemisches von 12 und 13 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

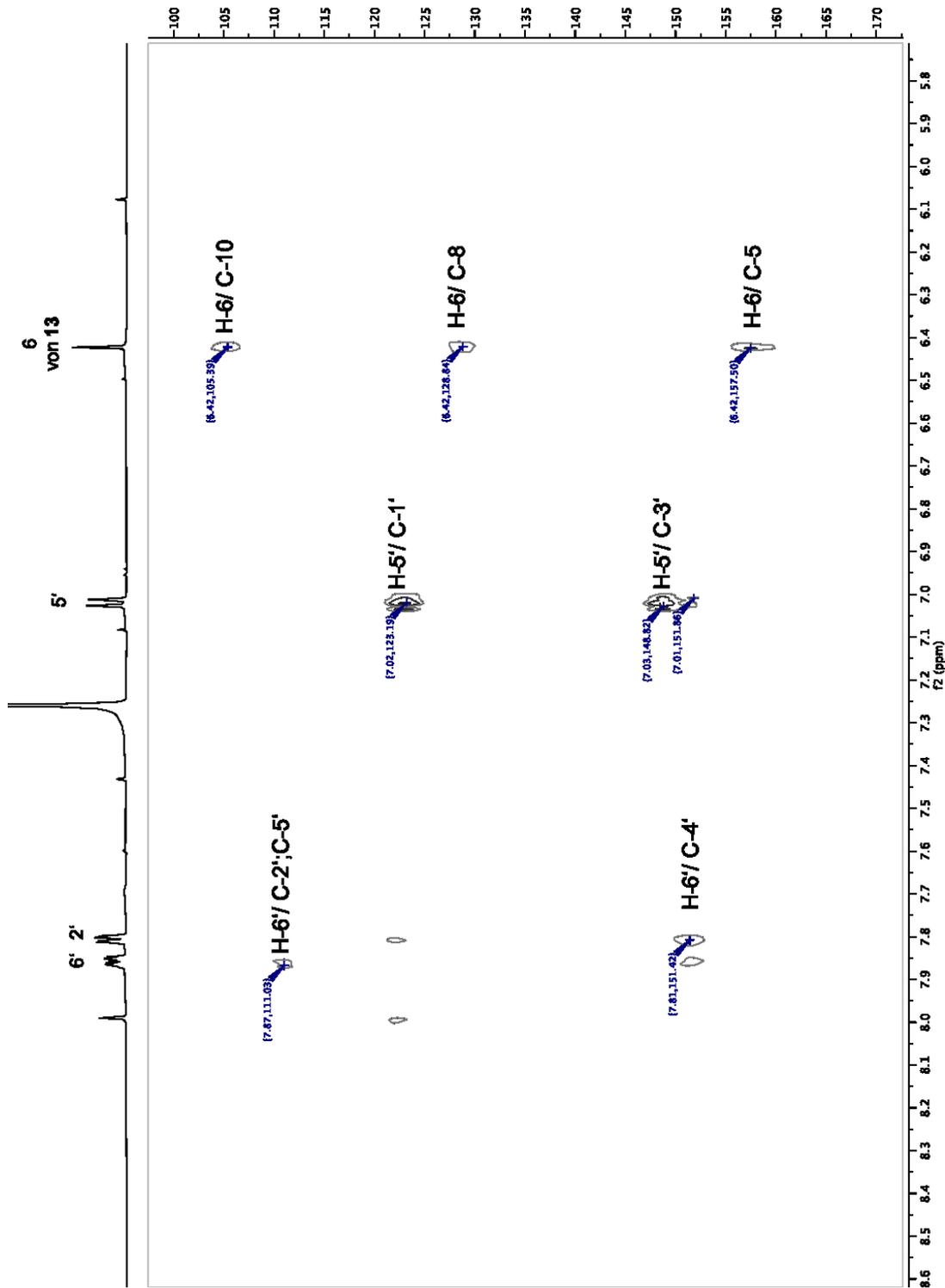


Abbildung 119: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum des Gemisches von 12 und 13 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

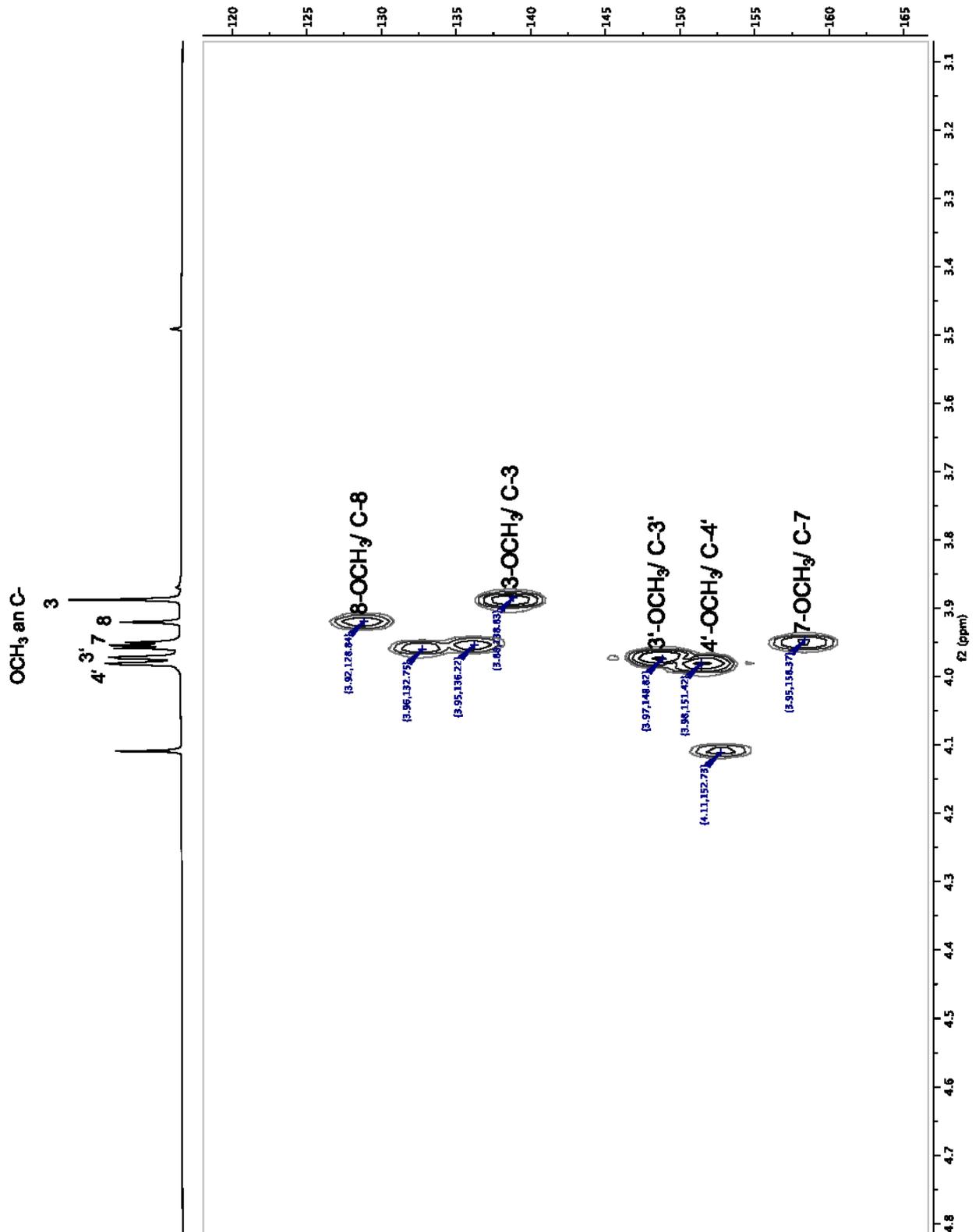


Abbildung 120: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum des Gemisches von 12 und 13 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

2.10.3 Daten von **14** (3,3',4',5,6,7,8-Heptamethoxyflavon)

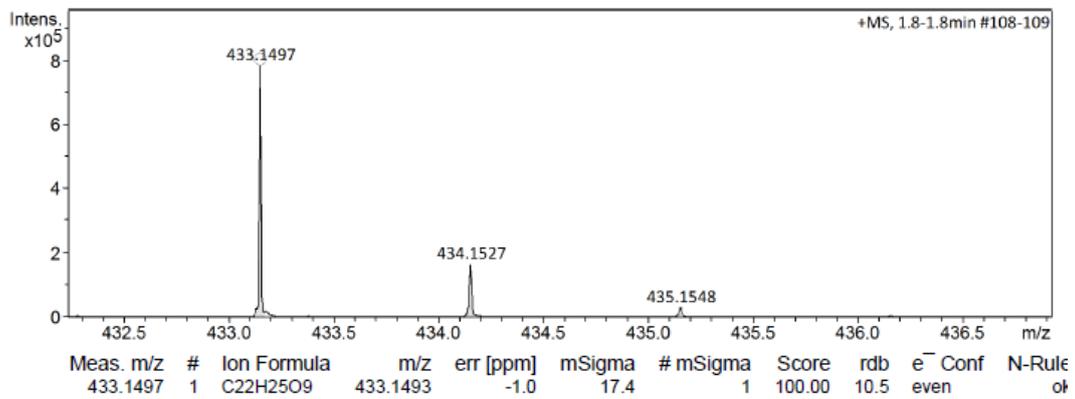
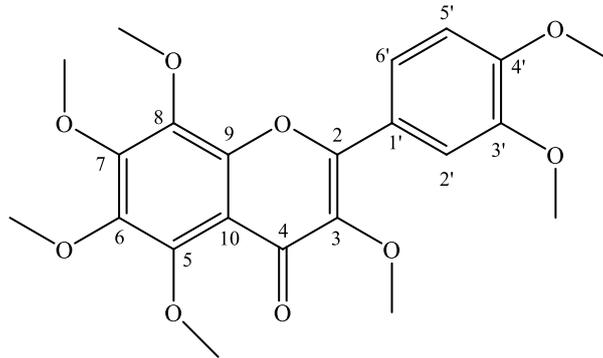


Abbildung 121: HRESIMS von Verbindung **14**

**Tabelle 17:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **14** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	14		Literatur nach[120]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
2	-	153.59	-	151.1
3	-	140.57	-	140.8
4	-	n.d.	-	173.9
5	-	151.42	-	143.9
6	-	143.61	-	137.8
7	-	137.53	-	151.3
8	-	147.95	-	137.8
9	-	n.d.	-	148.2
10	-	n.d.	-	115.1
1'	-	123.19	-	123.5
2'	7.81 (2.1)	111.14	7.81 d (2.0)	110.9
3'	-	148.38	-	148.8
4'	-	151.42	-	153.0
5'	7.01 (8.6)	110.97	7.01 d (8.0)	111.0
6'	7.84 dd (8.5, 2.1)	121.97	7.52 dd (8.0, 2.0)	121.9
3-OMe	3.89 s	59.85	3.90s*	59.9*
5-OMe	4.10 s	61.63	4.09 s*	61.7*
6-OMe	3.95 s	61.78	3.95 s*	61.8*
7-OMe	4.00 s	61.95	4.00 s*	61.9*
8-OMe	3.98 s	62.23	3.97 s*	62.3*
3'-OCH <sub>3</sub>	3.971 s	55.85	3.97 s*	56.1*
4'-OCH <sub>3</sub>	3.974 s	55.97	3.97 s*	56.0*

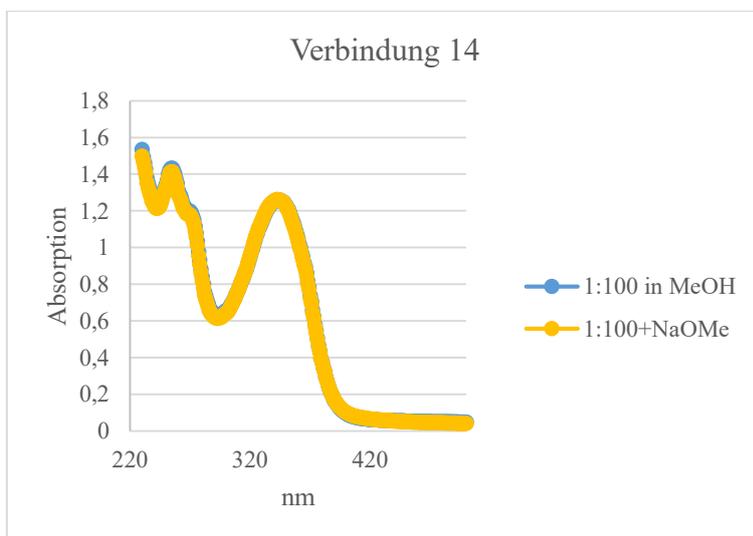
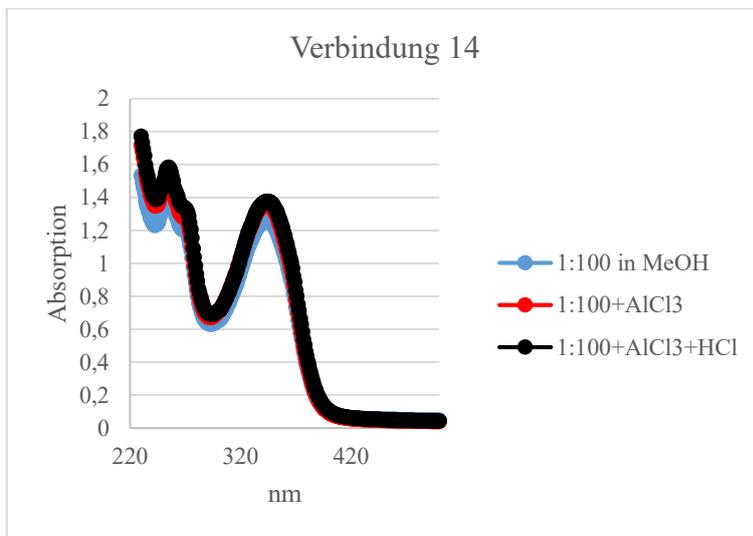
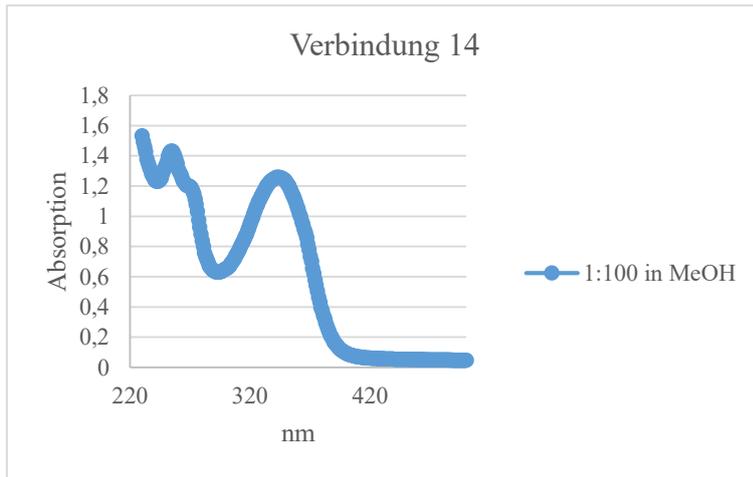


Abbildung 122: UV Spektren von Verbindung 14 mit verschiedenen Shift-Reagenzien

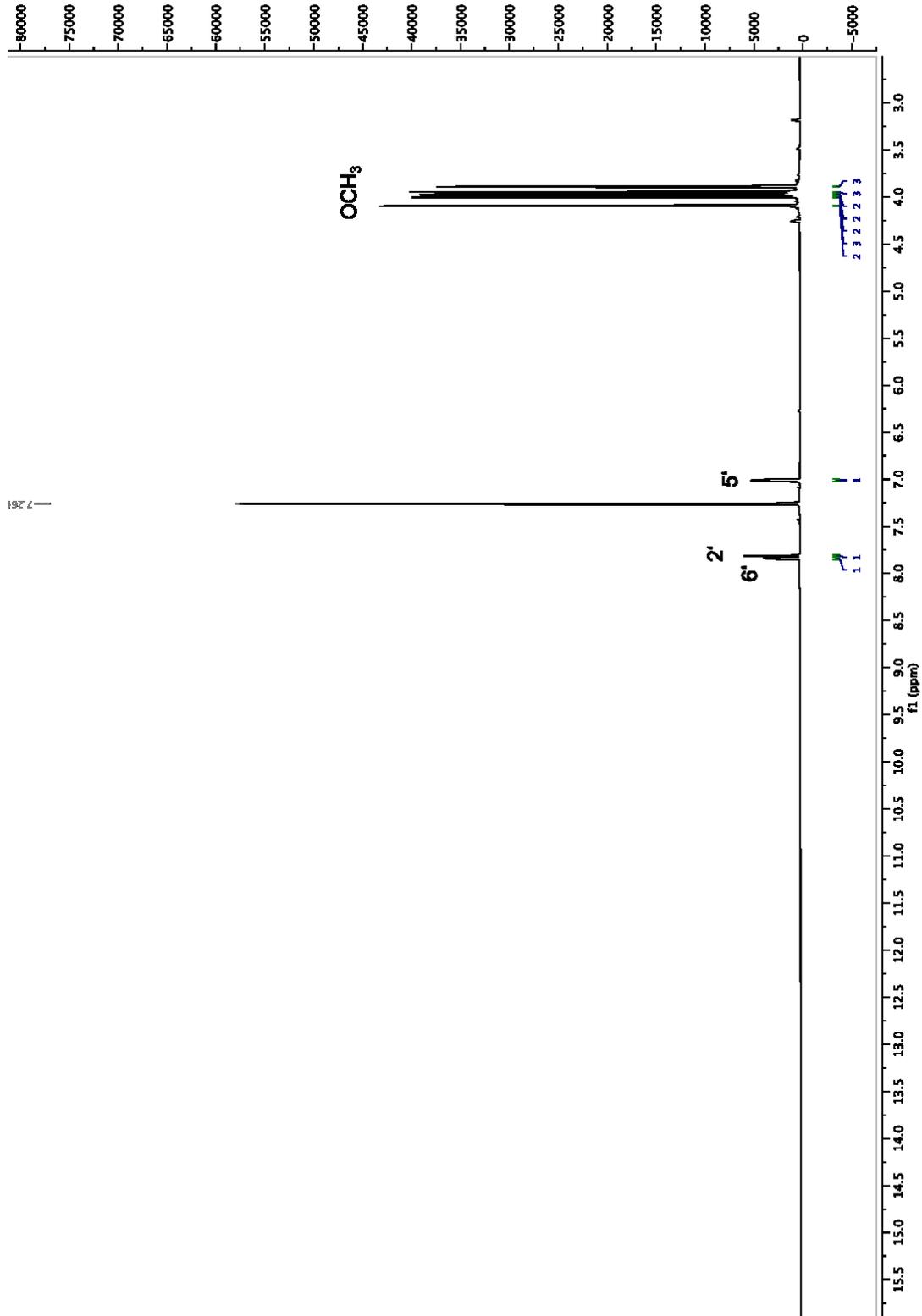


Abbildung 123:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **14** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

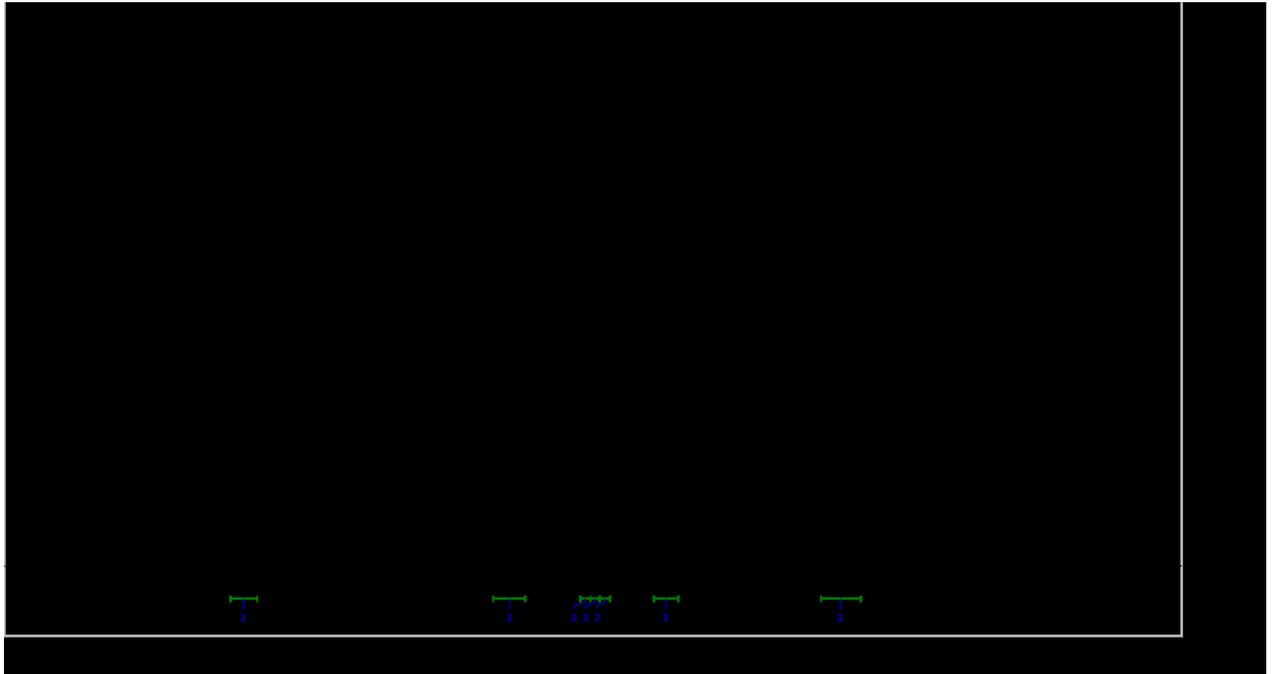
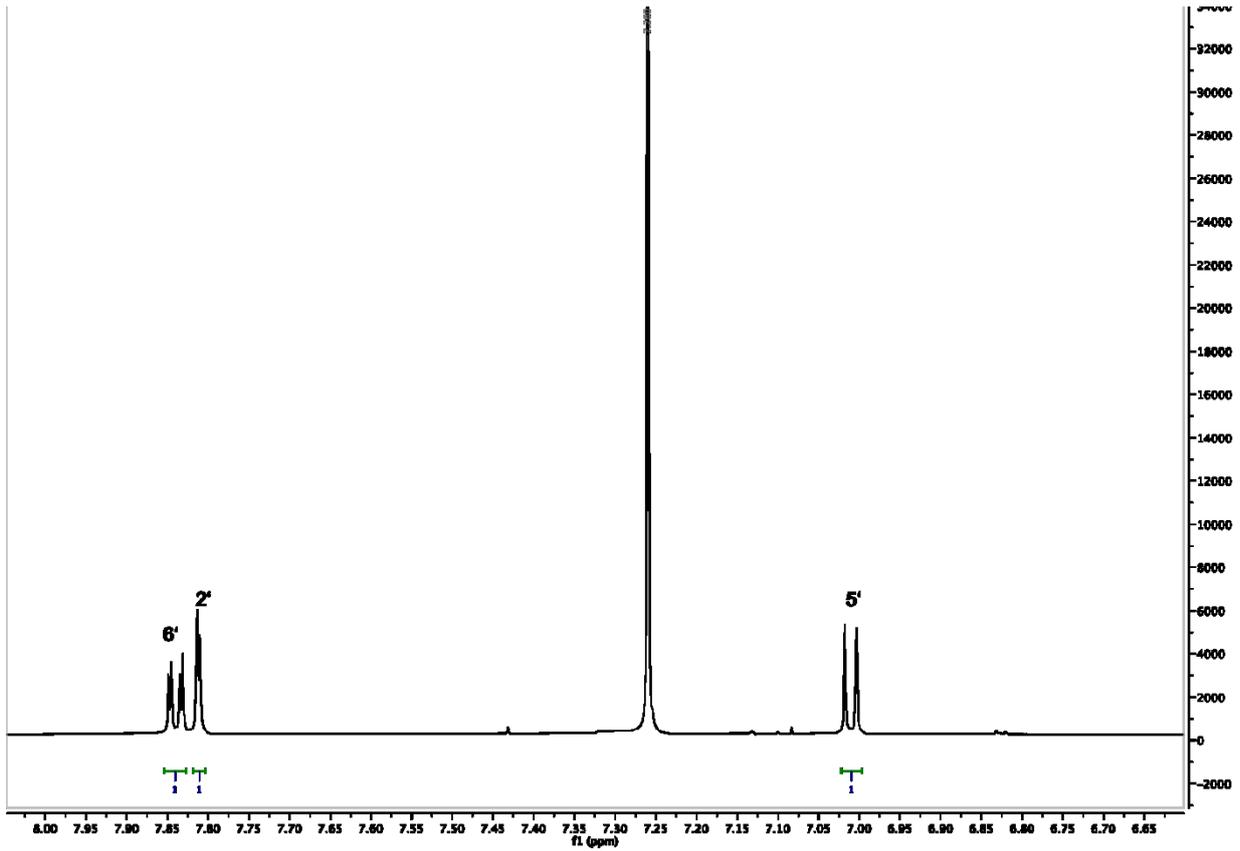


Abbildung 124: Ausschnitte aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 14 (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

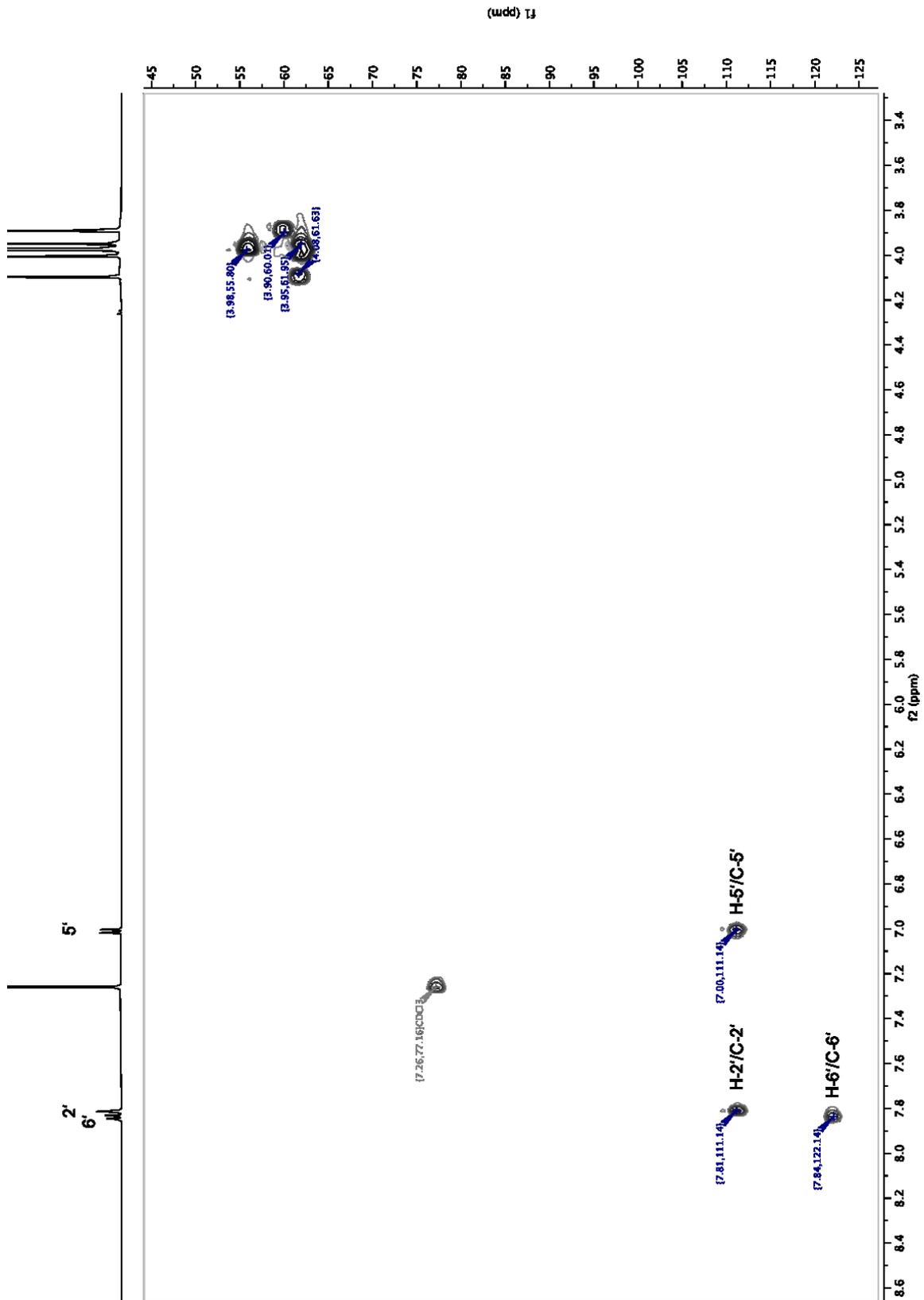


Abbildung 125: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 14 (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

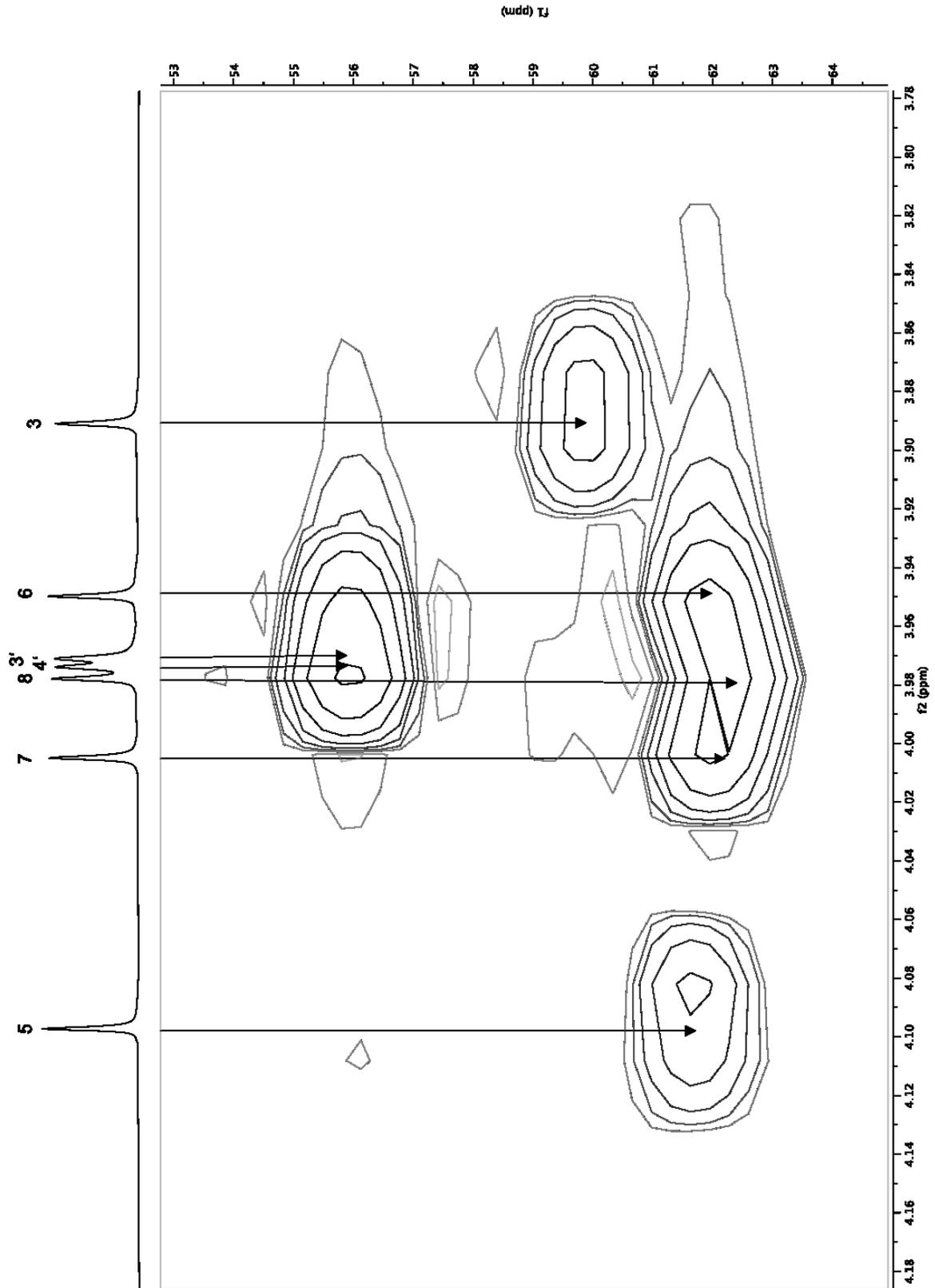


Abbildung 126: Ausschnitt aus dem 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

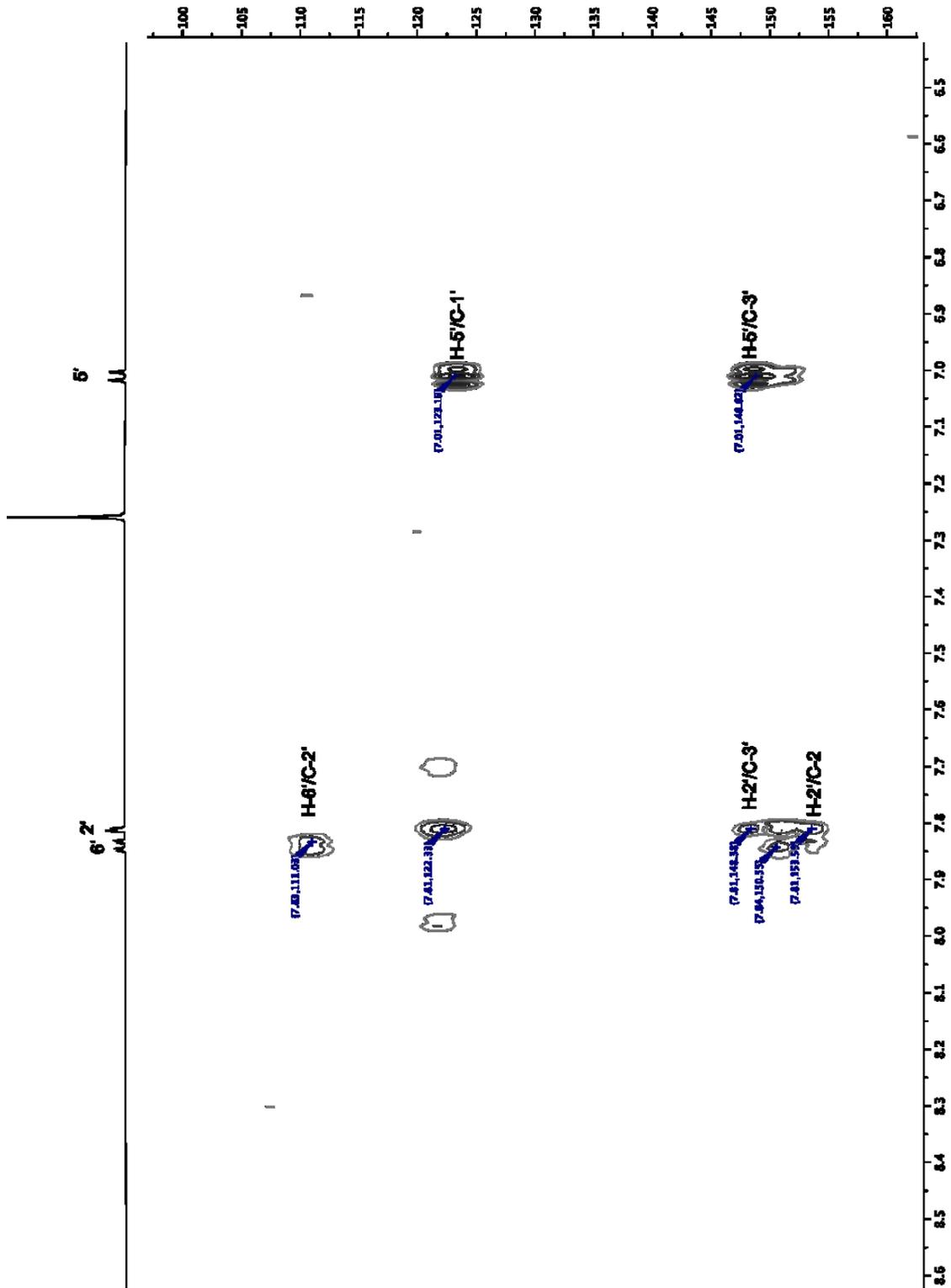


Abbildung 127: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

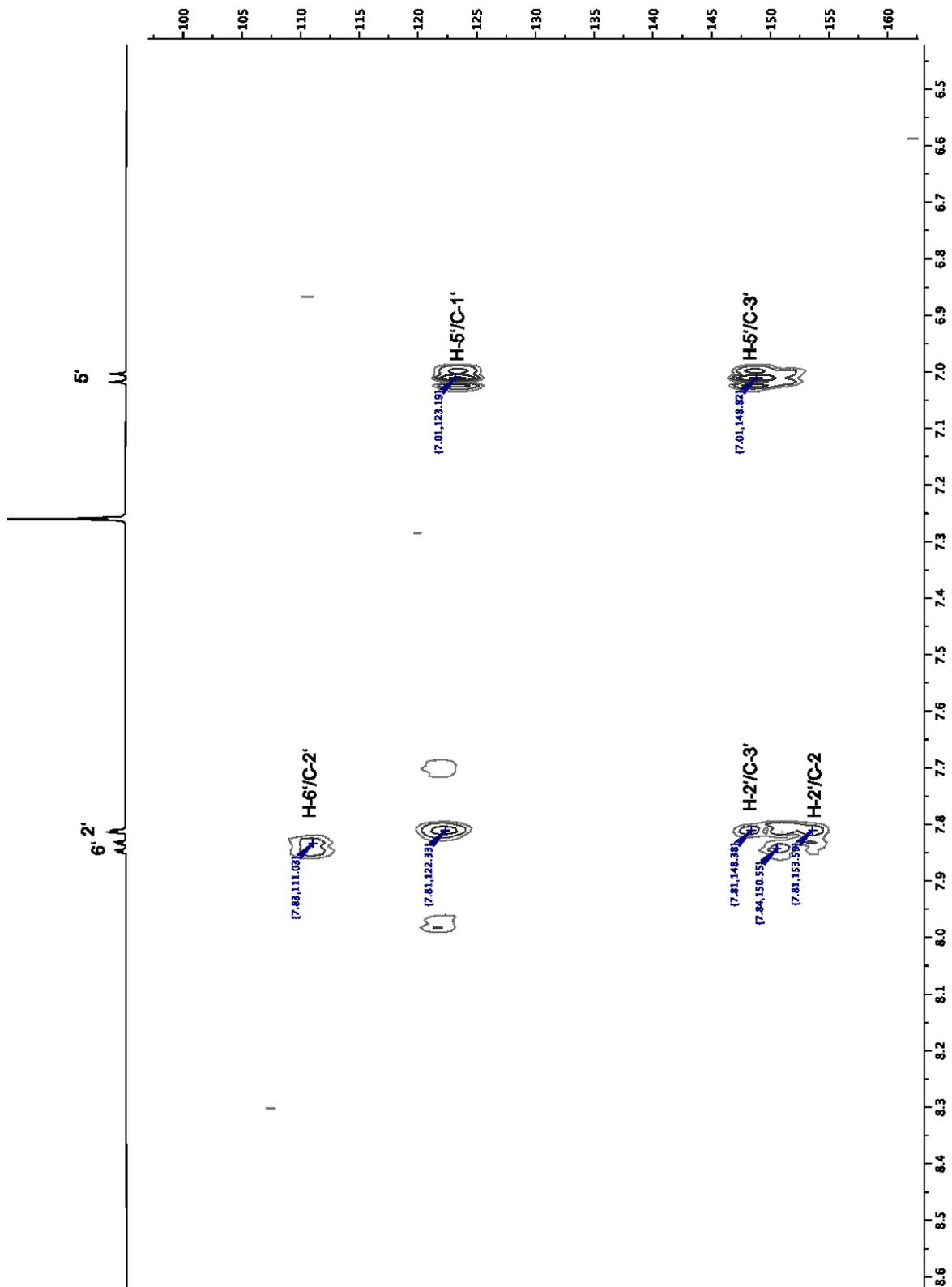


Abbildung 128: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

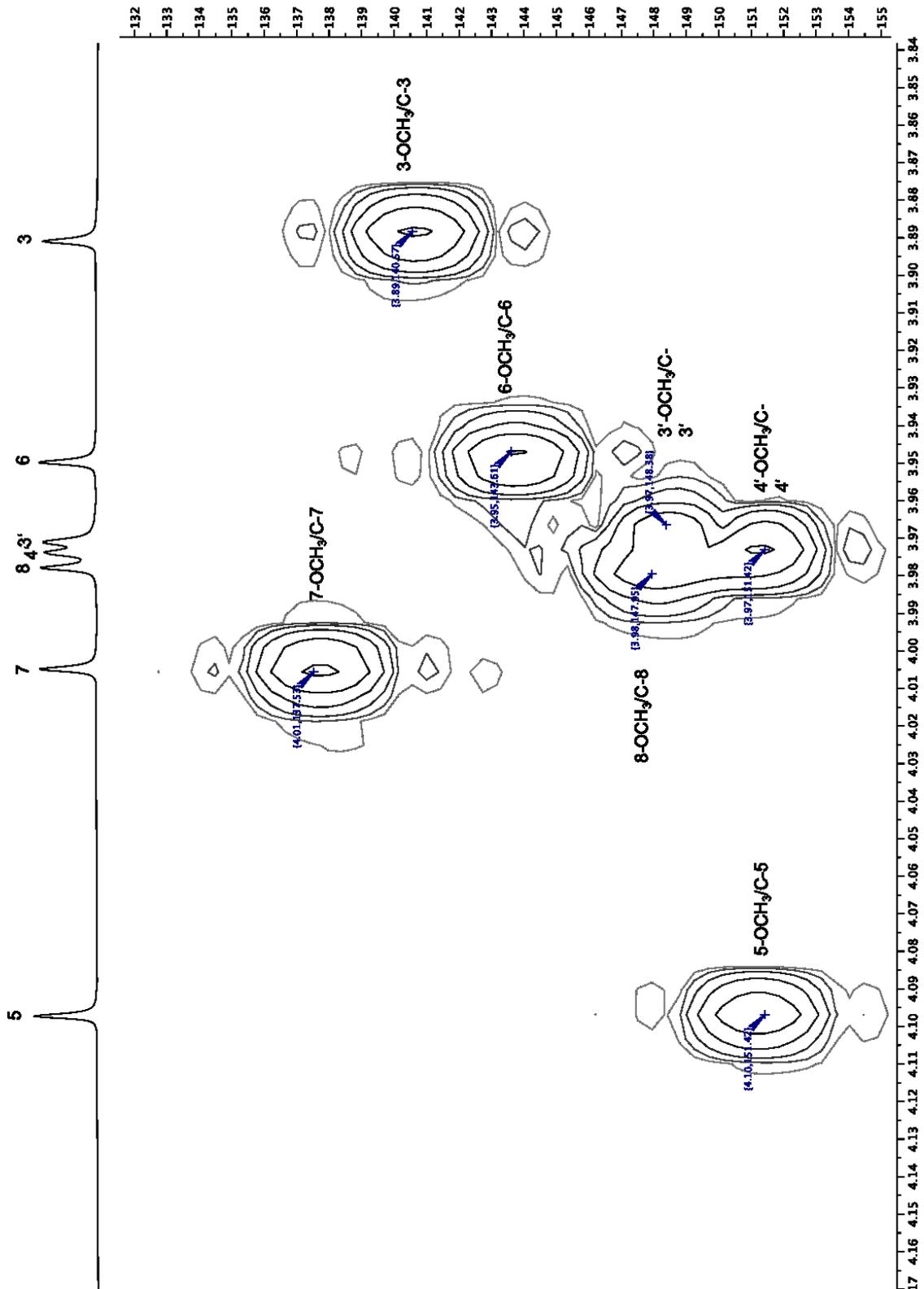


Abbildung 129: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 14 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

### 2.11 Verbindungen **15**, **16** und **17**

Die Verbindungen **15** und **16** wurden in den Fraktionen MB.D-VII-6-6 und MB.D-VII-9-4 (Gemisch von **15** und **16**) gefunden. Nach Aufreinigung im HPLC wurde Verbindung **15** rein in einer Ausbeute von 1,7 mg isoliert. Im Gegensatz dazu konnte **16** nicht rein gewonnen werden, es wurden 1,2 mg eines Gemisches mit **15** erhalten. Die hochauflösende Massenspektrometrie zeigte, dass beide Verbindungen die gleiche Masse besitzen;  $[M+H]^+ = 405.1187$  (s. Abbildung 130, Abbildung 136 und Abbildung 142), woraus sich die Summenformel  $C_{20}H_{20}O_9$  für beide Verbindungen ermitteln ließ. In den anschließend zunächst von **15** aufgenommenen NMR Spektren fanden sich die Signale für fünf Methoxygruppen und drei aromatische Protonen (s. Abbildung 132), die das Aufspaltungsmuster eines ABX-Systems am B-Ring zeigten. Die zugehörigen Kohlenstoffsignale ließen sich über das HSQC-Spektrum ermitteln (s. Abbildung 134 und Tabelle 18). Im Gegensatz zu Verbindung **13**, die als 3,3',4',7,8-Pentamethoxyflavon auch fünffach methyliert ist, fehlt im  $^1H$ -NMR-Spektrum von **15** das aromatische Proton an C-6, so dass diese Position bei **15** ebenfalls substituiert vorliegen muss. Im Vergleich zu den Verbindungen **12-14**, die alle eine Methoxygruppe an C-3' und C-4' besitzen, findet man für **15** ähnliche Protonen- und Kohlenstoffshifts, allerdings ist das Signal von H-2' geringfügig hochfeldverschoben. Der zugehörige Kohlenstoff findet sich tieffeldverschoben bei  $\delta = 114.76$  ppm. Das spricht dafür, dass **15**, im Gegensatz zu den zuvor isolierten Verbindungen eine freie phenolische OH-Gruppe am B-Ring besitzt. Neben dem Singulett bei  $\delta = 12.40$  ppm, das typisch für die freie, wasserstoffbrückengebundene OH-Gruppe an C-5 des A-Rings ist, findet sich ein weiteres Singulett bei  $\delta = 5.72$  ppm, das ebenfalls keine Korrelation mit einem Kohlenstoff im HSQC zeigt und somit dem OH-Proton der Hydroxylgruppe an C-3' zugeordnet werden kann. Über die Korrelationen der Protonensignale mit den Signalen der Kohlenstoffe im HSQC- und HMBC-Spektrum lassen sich alle Signale zuordnen. In Tabelle 18 sind die von Shi et al. (1995) veröffentlichten NMR-Daten von **15** zum Vergleich dargestellt. Die Daten stimmen sehr gut mit den hier ermittelten Werten überein. Verbindung **15** ist ein eher selten gefundenes Flavonoid, über dessen Vorkommen jedoch schon berichtet wurde. [122,123] In den Rutaceen ist es bisher nur aus *Glycosmis ovoidea* isoliert worden. [124] Für die Pflanzen der Gattung *Melicope* ist es der erste Bericht über das Vorkommen.

Verbindung **16** konnte leider nur im Gemisch mit **15** isoliert werden. Im  $^1H$ -NMR Spektrum des Gemisches (Abbildung 137) findet man zwei dicht nebeneinander liegende Dubletts für die Protonen an C-5' beider Verbindungen. Da der Shiftwert des H-5' von **15** bereits bekannt war, konnte das geringfügig ins tiefere Feld verschobene Signal als das H-5' von **16** erkannt werden.

Das zugehörige Kohlenstoffsignal findet sich um ca. 4 ppm verschoben bei  $\delta = 114.91$  ppm, wobei das C-2' in **16** jetzt bei einem Shiftwert von ca. 110 ppm gefunden wurde. (Tabelle 19) Damit war anzunehmen, dass sich **16** von **15** nur durch die Position der Methoxygruppe am B-Ring unterscheidet, die sich bei **16** am C-3' befindet. Es handelt sich somit um das 5,4'-Dihydroxy-3,3',6,7,8-pentamethoxyflavon, dessen NMR-Daten gut mit den von Shi et al. (1995) veröffentlichten Daten übereinstimmen. Im Gegensatz zu **15** wurde das 5-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,6,7,8-tetramethoxy-4*H*-1-benzopyran-4-one (**16**) bereits aus *Melicope triphylla* isoliert. [125] Bei der hier nachgewiesenen Substanz handelt es sich demnach um den zweiten Fund in dieser Gattung.

Verbindung **17** fiel in Fraktion MB-VI-10 in einer Ausbeute von 1,3 mg an. Aus dem, im hochauflösenden Massenspektrum (s. Abbildung 142), bei  $m/z = 375.1072$  gefundenen, Quasimolekülion errechnete sich die Summenformel  $C_{19}H_{18}O_8$ . In Verbindung mit den für Flavonole typischen UV-Spektren, konnte vermutet werden, dass es sich bei **17** um ein vierfach methoxyliertes Flavonol handeln muss. Diese Annahme wurde durch das in deuteriertem Chloroform aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (Abbildung 144) bestätigt, das die Singulets für vier Methoxygruppen bei  $\delta = 3.81, 3.82, 3.87$  und  $3.92$  ppm zeigte. Neben diesen 3-Protonen-Singulets traten drei weitere Signale für insgesamt vier Protonen als Multipllett bei  $\delta = 7.79$  ppm (2H), Dublett bei  $\delta = 7.00$  (1 H,  $J = 9.0$ ) und Singulett bei  $\delta = 6.42$  ppm (1 H) auf. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR (s. Abbildung 145) zeigte erwartungsgemäß die Signale für 19 Kohlenstoffatome, von denen die vier Signale bei  $\delta = 56.19, 56.52, 60.31$  und  $61.82$  ppm aufgrund der Lage im Spektrum und der Korrelation mit den oben beschriebenen 3-Protonen-Singulets im HSQC-Spektrum als Methoxykohlenstoffe erkannt wurden. Die übrigen drei Protonensignale koppeln mit den Kohlenstoffen bei  $\delta = 95.55, 110.61, 114.70$  und  $121.75$  ppm. Die beiden, am stärksten tieffeldverschobenen Signale, koppeln mit dem Multipllett für 2 Protonen bei  $\delta = 7.79$  ppm, was dafür spricht, dass es sich bei diesen Signalen in Verbindung mit dem Dublett bei  $7.00$  ppm und dem Kohlenstoff bei  $\delta = 110.61$  um die Resonanzen eines ABX-Systems handeln muss, das wie bei den Verbindungen zuvor im B-Ring lokalisiert sein musste. Das bei  $\delta = 6.42$  ppm im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum gefundene Signal gehörte demnach zu einem am A-Ring an C-6 oder C-8 gebundenen Wasserstoffatom. Die Position dieses A-Ring Protons und der drei aromatischen Methoxygruppen konnte aus den in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommenen Spektren leider nicht ermittelt werden, weil sich im HMBC-Spektrum keine Korrelation zwischen dem verbreiterten Singulett des Hydroxylprotons der OH-Gruppe an C-5 ( $\delta = 12.48$

ppm) mit dem C-6 nachweisen ließ (Abbildung 147). Auch die Substitution des B-Rings konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden. Vergleiche mit den Daten im B-Ring substituierter Quercetinderivate, zeigten jedoch, dass die Resonanzen von H-2' und H-6' in CDCl<sub>3</sub> immer dann nahe beieinander bzw. überlappend auftraten, wenn eine 3'-Hydroxy, 4' Methoxy-Substitution vorliegt. [126] Bei 3'-Methoxy-4'-Hydroxy-Derivaten waren das Dublett des H-2' und das Dublett vom Dublett des H-6' deutlich voneinander getrennt. [126] Da auch die Resonanz des zweiten Hydroxylprotons aufgrund des Austauschs mit dem Deuterium des protischen Chloroforms nicht im Spektrum auftrat, wurden weitere Spektren im DMSO-d<sub>6</sub> aufgenommen (s. Tabelle 21 und Abbildung 161, Abbildung 162, Abbildung 163, Abbildung 164). Im <sup>1</sup>H NMR waren die Signale der beiden OH-Protonen bei  $\delta = 12.48$  (OH an C-5) und 9.54 ppm (OH an C-3') als scharfe Singulets deutlich zu erkennen. Im in DMSO-d<sub>6</sub> aufgenommenen HMBC-Spektrum (Abbildung 147 und Abbildung 150), zeigte das Signal der Hydroxylgruppe an C-5 drei Korrelationen mit den Kohlenstoffen bei  $\delta = 95.6, 104.2$  und 156.4 ppm. Diese drei Signale waren der <sup>2</sup>J-Kopplung mit C-5 und den <sup>3</sup>J-Kopplungen mit C-6 und C-9 zuzuordnen. Das im hohen Feld bei  $\delta = 95.6$  ppm auftretende Signal zeigte eine Kopplung mit dem Proton bei  $\delta = 6.60$  ppm, welches demnach dem C-6 zuzuordnen war. Die beiden anderen Signale zweier quartärer Kohlenstoffe konnten im Vergleich mit den zuvor beschriebenen Flavonoiden C-10 und C-5 des A-Rings zugeordnet werden. Neben den Kreuzsignalen mit C-5 (156.4, <sup>2</sup>J) und C-10 (104.2, <sup>3</sup>J), zeigte das H-6 ( $\delta = 6.60$ ) zwei weitere Kopplungen mit den Kohlenstoffen bei  $\delta = 158.1$  und 128.3 ppm. Beide Signale besitzen Cross-Peaks zu den Methoxyprotonen bei  $\delta = 3.82$  ( $\delta_c = 60.9$ ) und 3.92 ( $\delta_c = 60.9$ ) ppm, so dass sie den Kohlenstoffen C-8 und C-7 zugeordnet werden konnten. Bei Verbindung **17** handelte es sich demnach um ein 3,7,8-Trimethoxyderivat des Quercetins, das eine vierte Methoxygruppe an C-3' oder C-4' tragen musste. Das Hydroxyproton bei  $\delta = 9.54$  ppm zeigte leider keine Korrelationen im HMBC, so dass auch mit diesem Spektrum die Substitution des B-Rings nicht eindeutig geklärt werden konnte. Eine Literaturrecherche ergab, dass Wollenweber et al. beide in Frage kommenden Verbindungen aus zwei Asteraceen-Arten isolieren konnten. [127] Ein Vergleich mit den dort veröffentlichten Daten ergab eindeutig, dass es sich bei **17** um das „3,7,8,4'-Tetramethoxyquercetin“ handeln musste. Auch in den Spektren von Wollenweber et al. (2008) traten die Protonensignale des H-2' und H-6' überlagert als ein Multiplett auf. [127] Ein Jahr später konnten Sarmento da Silva et al (2009) dieses Flavonoid aus Solanum-Arten isolieren. Die dort angegebenen in CDCl<sub>3</sub> aufgenommenen Daten stimmen ebenfalls mit den hier ermittelten Daten überein. [127]

Diese Verbindung, die interessante Aktivitäten gegen *Leishmania* Parasiten aufweist [128], und die bisher in der Gattung *Melicope* noch nicht gefunden wurde, ist auch unter dem Namen Gossypetin 3,7,8,4'- tetra-O-methylether bekannt.

2.11.1 Daten von **15** (5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon)

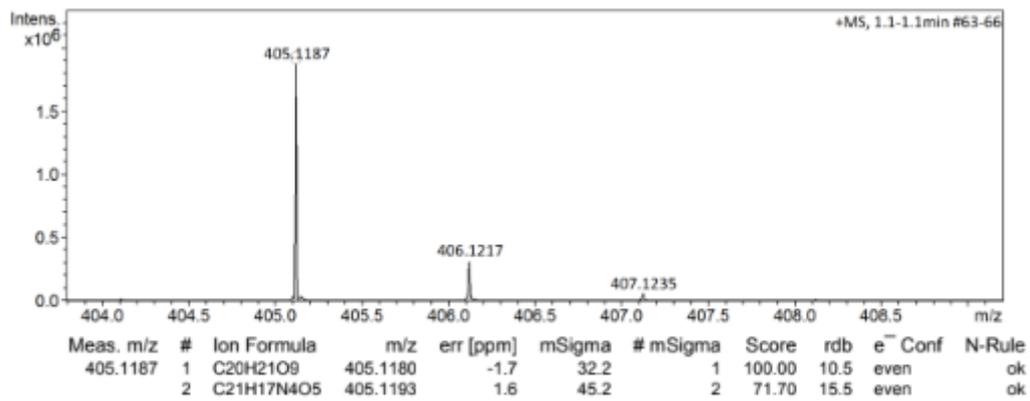
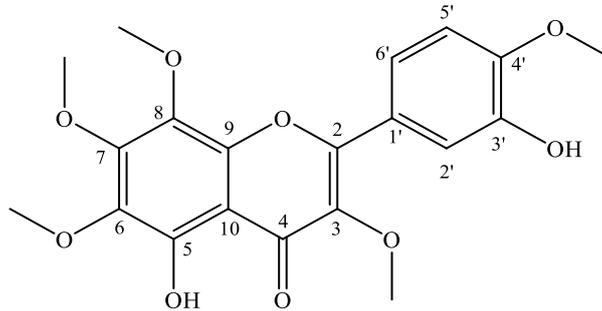


Abbildung 130: HRESIMS von Verbindung **15**

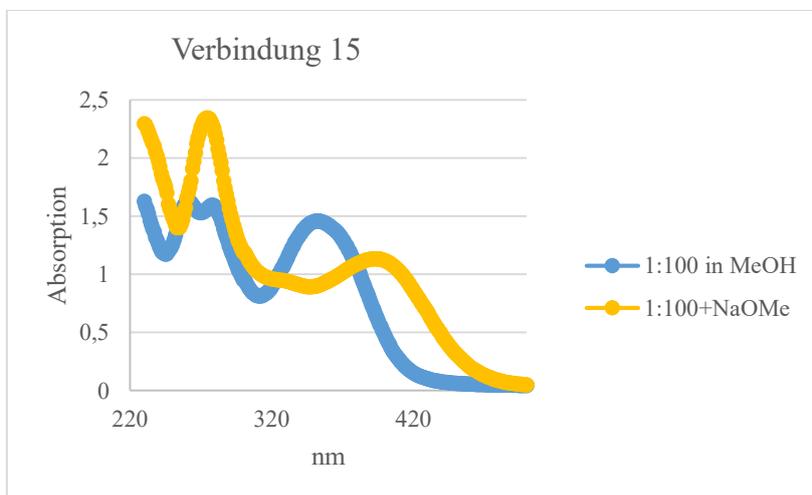
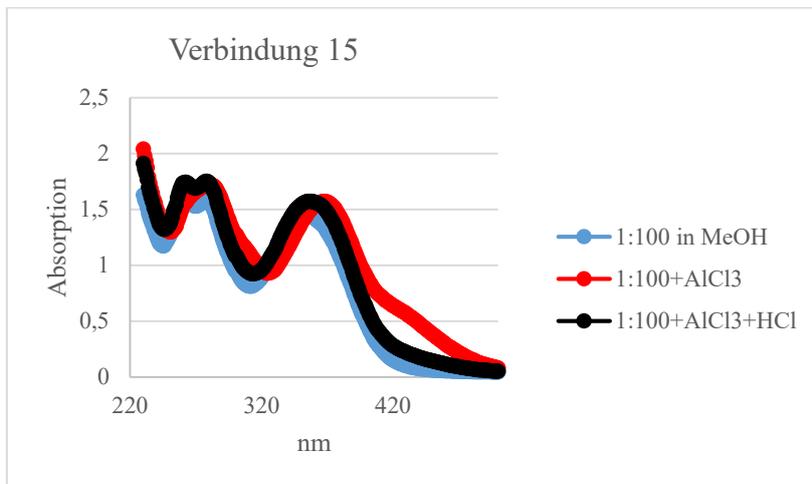
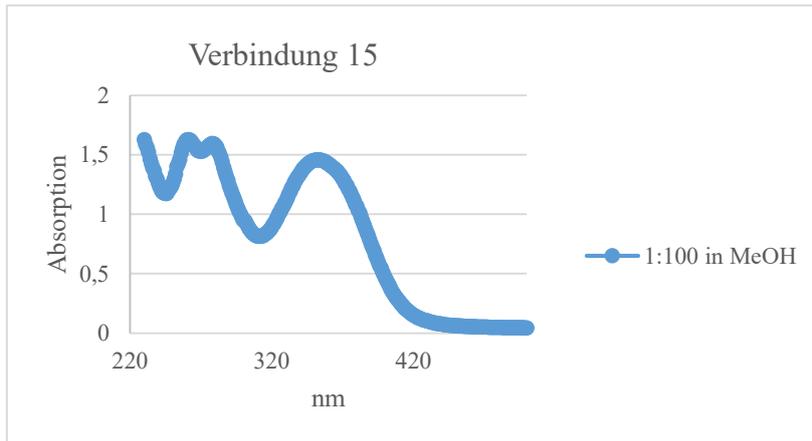


Abbildung 131: UV Spektren von Verbindung 15 mit verschiedenen Shift-Reagenzien

**Tabelle 18:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **15** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	15		Literaturwerte nach [129]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
2		155.96	-	155.8
3		139.14	-	138.9
4		179.53	-	179.4
5		149.05	-	149.1
6		136.39	-	136.2
7		153.09	-	152.9
8		133.23	-	132.9
9		145.11	-	144.9
10		107.74	-	107.5
1'		124.02	-	123.7
2'	7.78 d (br.)	114.76	7.77 d (2.2)	114.6
3'		145.85	-	145.6
4'		149.05	-	149.0
5'	6.99 d (8.4)	110.70	7.00 d (7.0)	110.5
6'	7.79 d (br.)	121.78	7.78 dd (7.0, 2.2)	121.6
3-OMe	3.88 s	60.28	3.88 s	60.1
6-OMe	3.947	62.26	3.95 s	62.1
7-OMe	4.10 s	61.84	4.11 s	61.7
8-OMe	3.954	61.28	3.96 s	61.2
3'-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-
4'-OCH <sub>3</sub>	4.00 s	56.24	4.00 s	56.1
OH an C-5	12.40 s	-	12.40 s	-
OH an C-3'	5.72 s	-	5.73 s	-

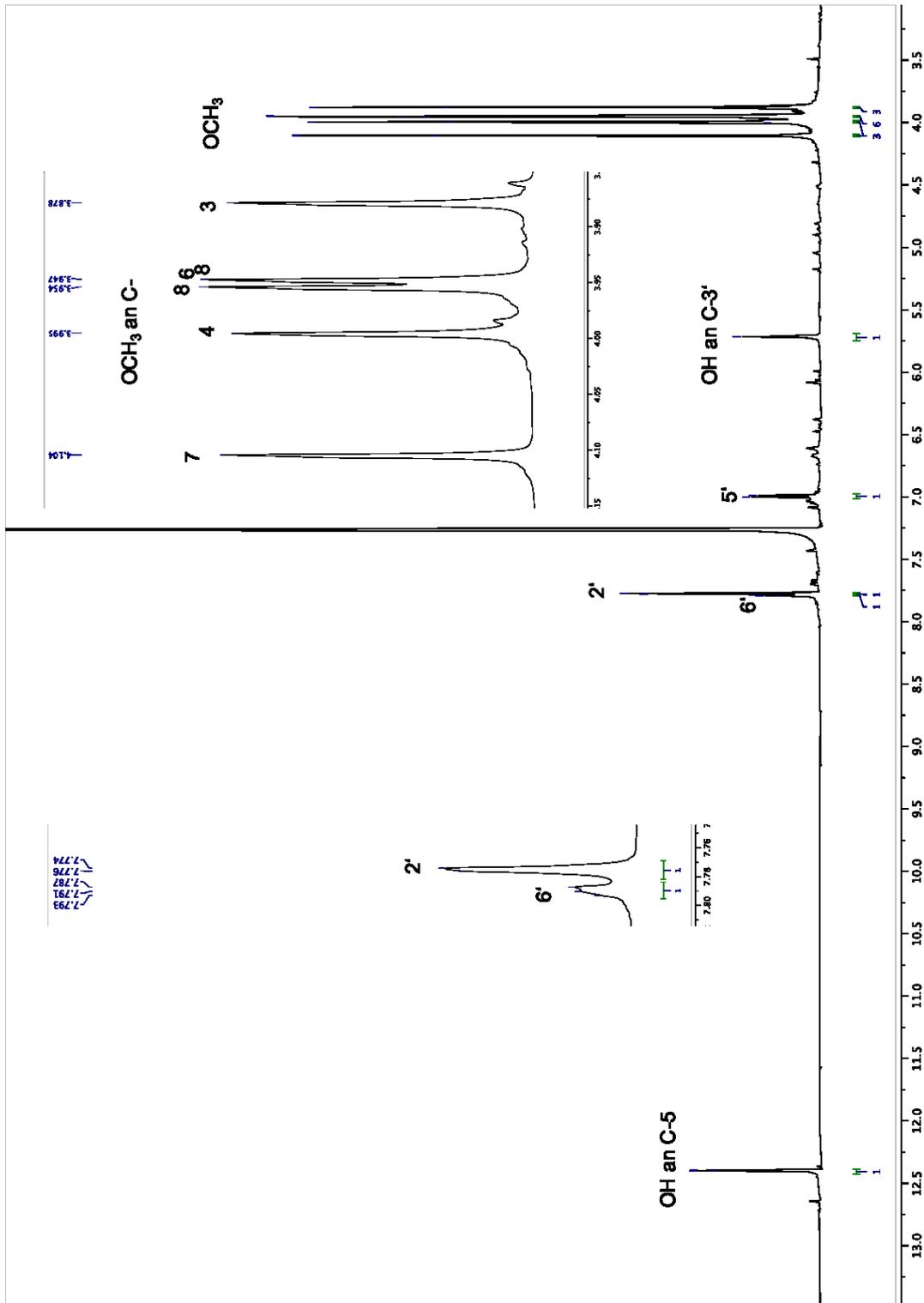


Abbildung 132:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **15** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

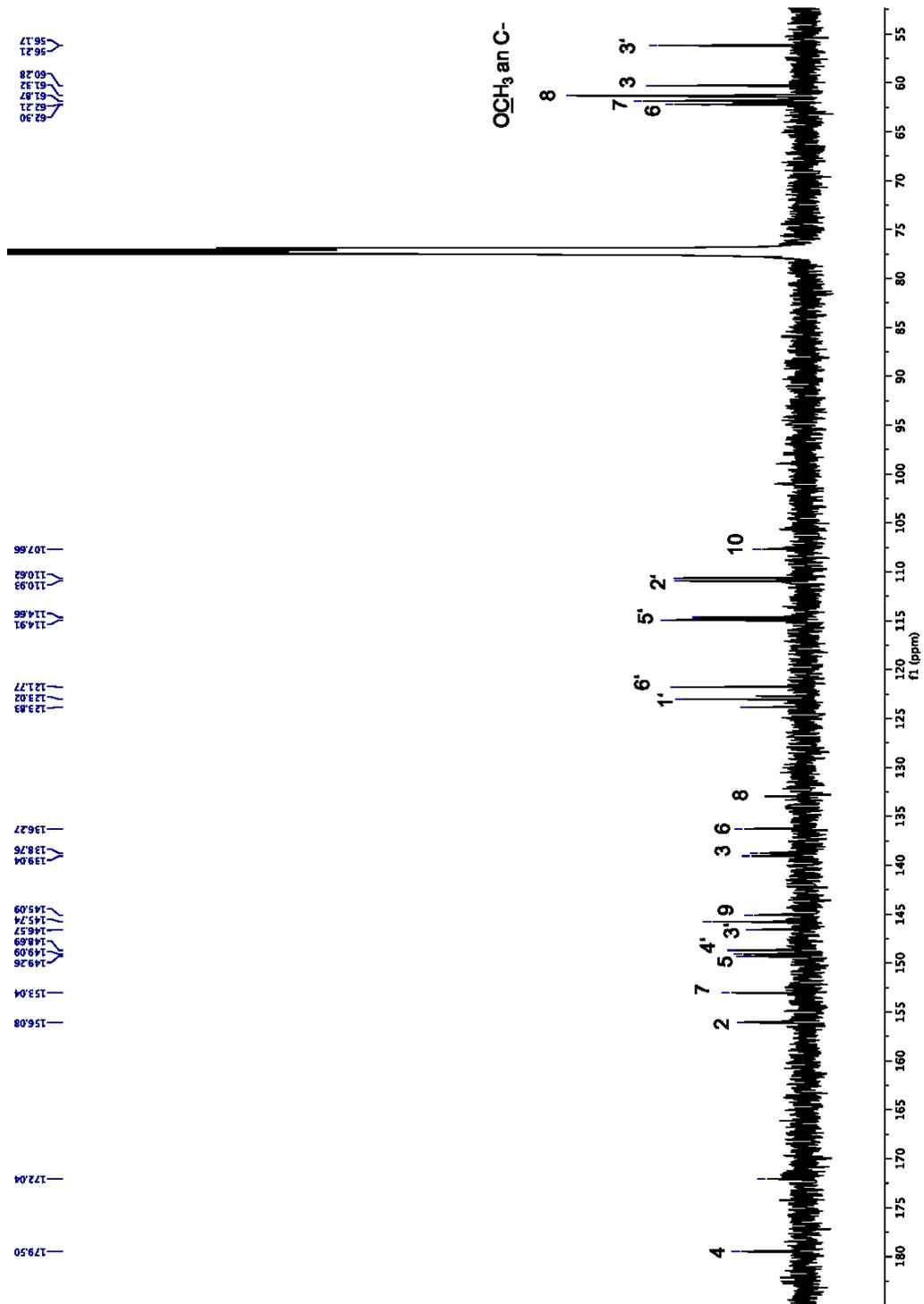


Abbildung 133:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **15** (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

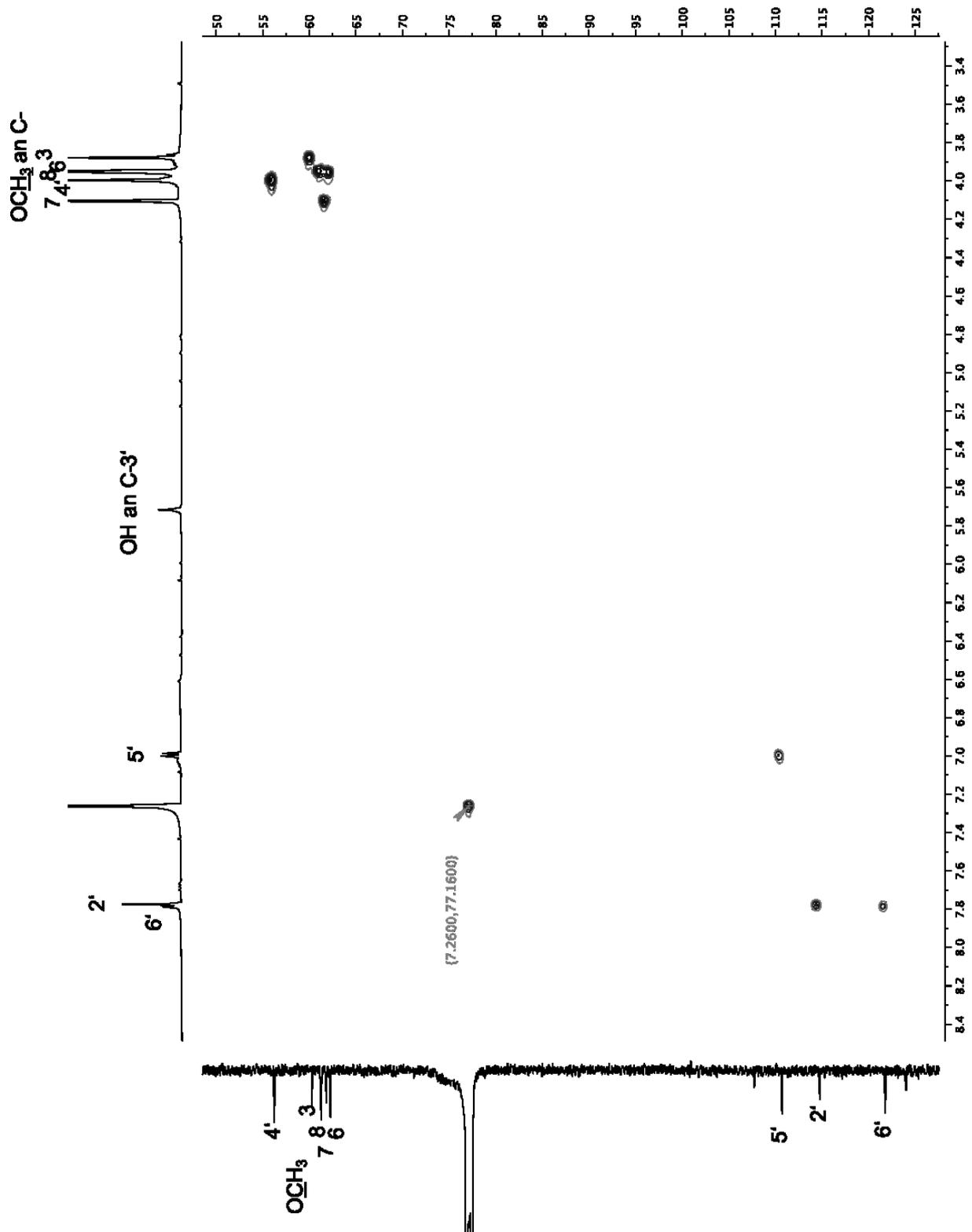


Abbildung 134: 2D-HSQC-Spektrum von **15** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

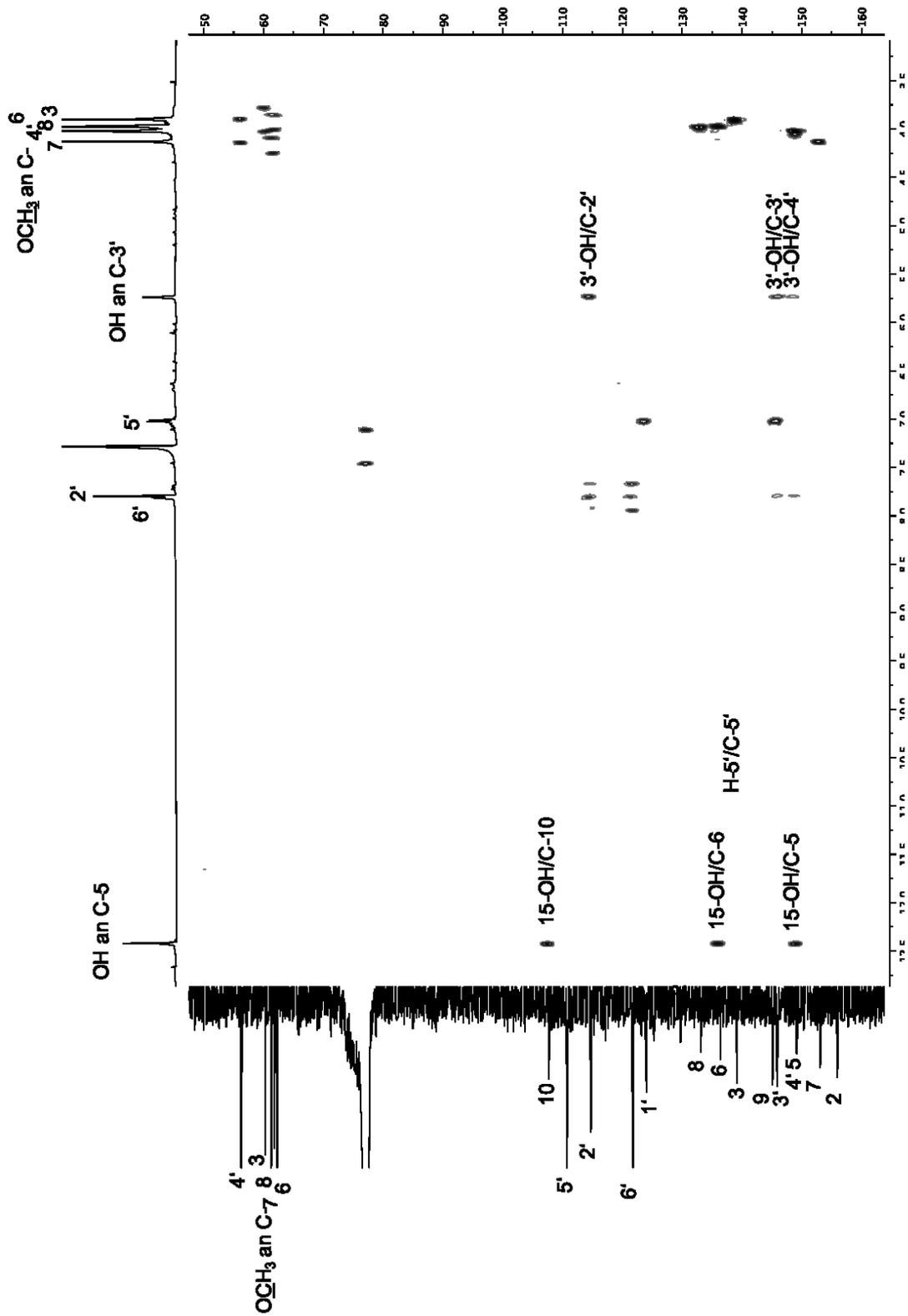


Abbildung 135: 2D-HMBC-Spektrum von **15** (600MHz in CDCl<sub>3</sub>)

2.11.2 Daten von **16** (5,4'-Dihydroxy-3,3',6,7,8-pentamethoxyflavon)

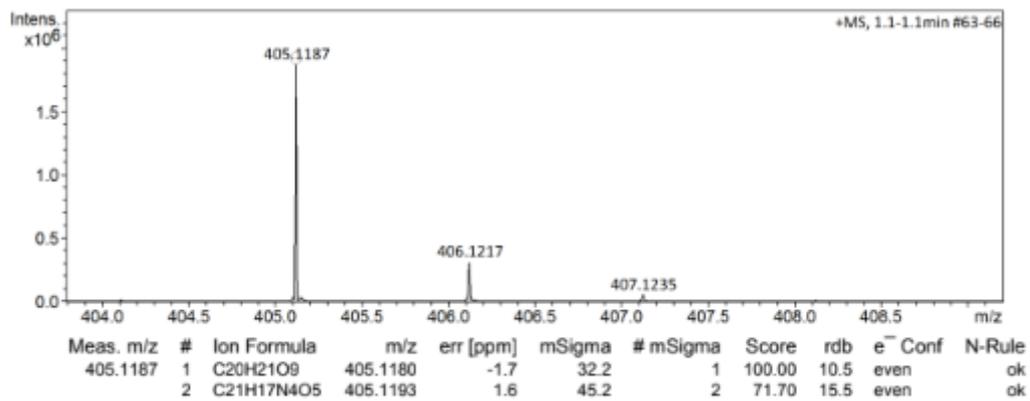
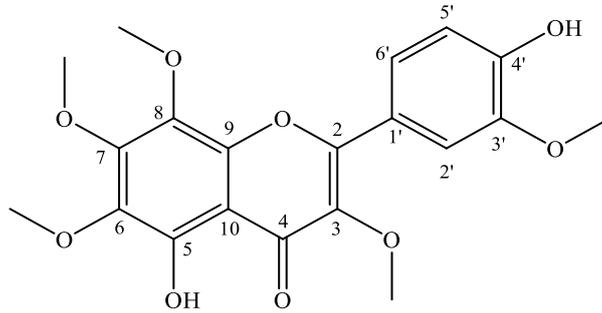


Abbildung 136: HRESIMS von Verbindung **16**

**Tabelle 19:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **16** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	16		Literaturwerte nach [129]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
2	-	156.08	-	155.9
3	-	138.76	-	138.6
4	-	179.40	-	179.3
5	-	149.30	-	149.2
6	-	136.27	-	136.2
7	-	153.04	-	152.9
8	-	132.95	-	132.8
9	-	145.00	-	144.9
10	-	107.60	-	107.5
1'	-	122.42	-	122.5
2'	7.77 s	110.93	7.80 s	110.8
3'	-	146.57	-	146.4
4'	-	148.26	-	148.6
5'	7.06 d (8.3)	114.91	7.07 d (7.5)	114.9
6'	7.79 m	122.78	7.78 dd (7.5, 1.5)	122.8
3-OMe	3.88 s	60.27	3.88 s	60.1
6-OMe	3.951 s	62.21	3.95 s	62.1
7-OMe	4.11 s	61.87	4.11 s	61.7
8-OMe	3.954 s	61.32	3.96 s	61.2
3'-OMe	3.988 s	56.17	3.98 s	56.0
4'-OMe	-	-	-	-
OH an C-5	12.40 s		12.39 s	-
OH an C-4'	n.d.		6.02 s	-

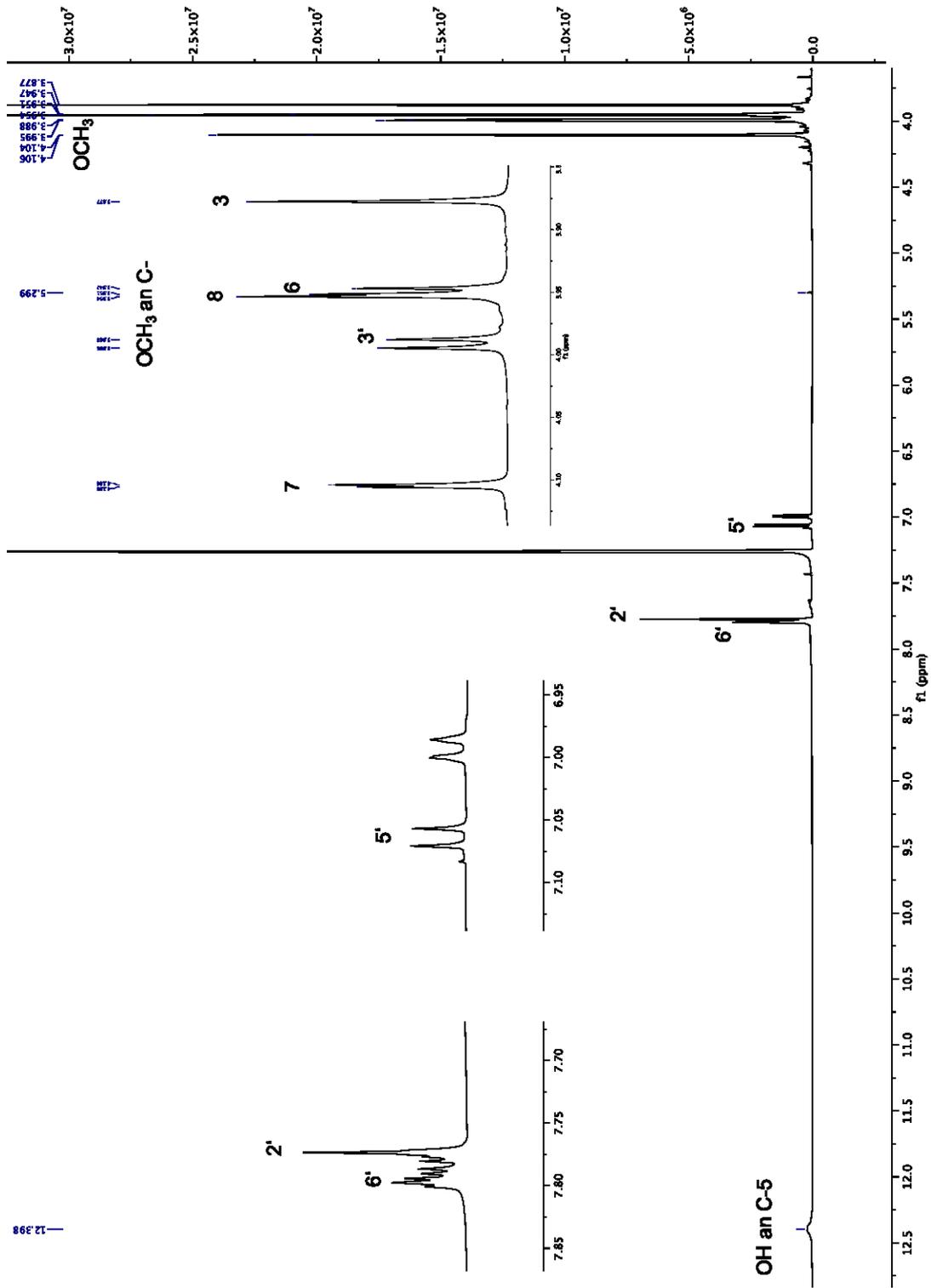


Abbildung 137:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum des Gemisches von 15 und 16 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ), Zuordnung für 16

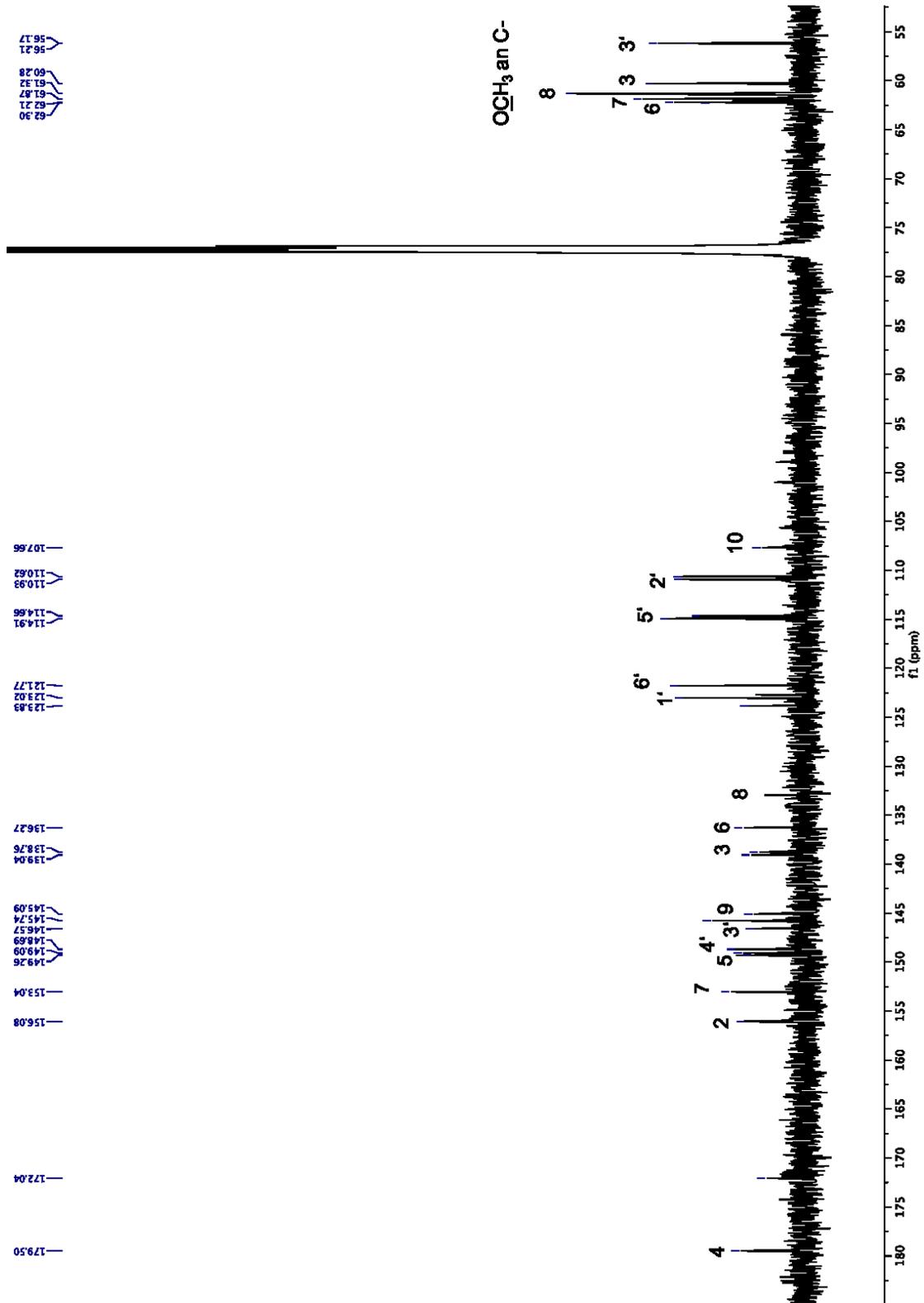


Abbildung 138:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum des Gemisches von **15** und **16** (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ); Zuordnung für **16**

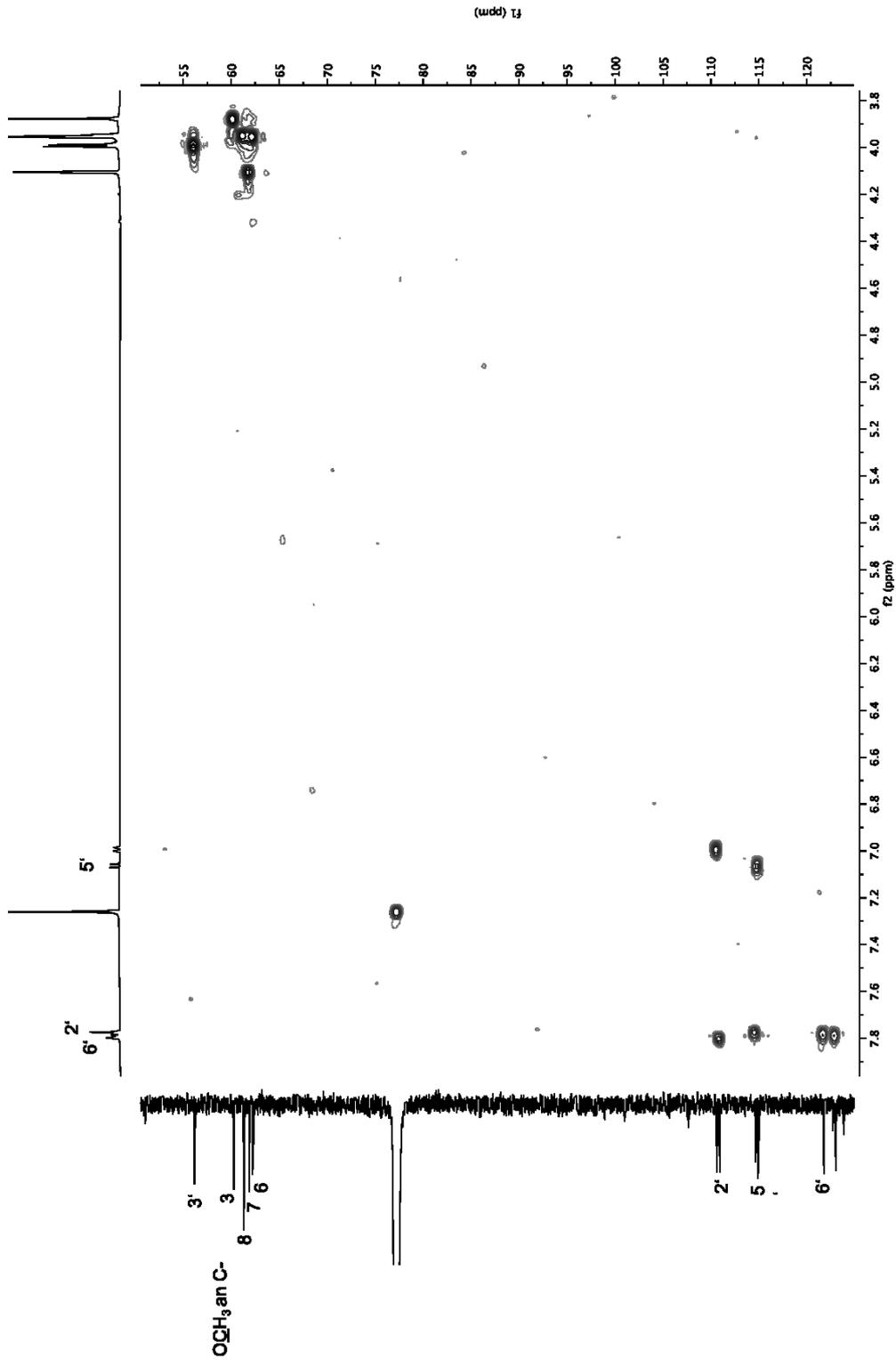


Abbildung 139: 2D-HSQC-Spektrum des Gemisches von 15 und 16 (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ ); Zuordnung für 16

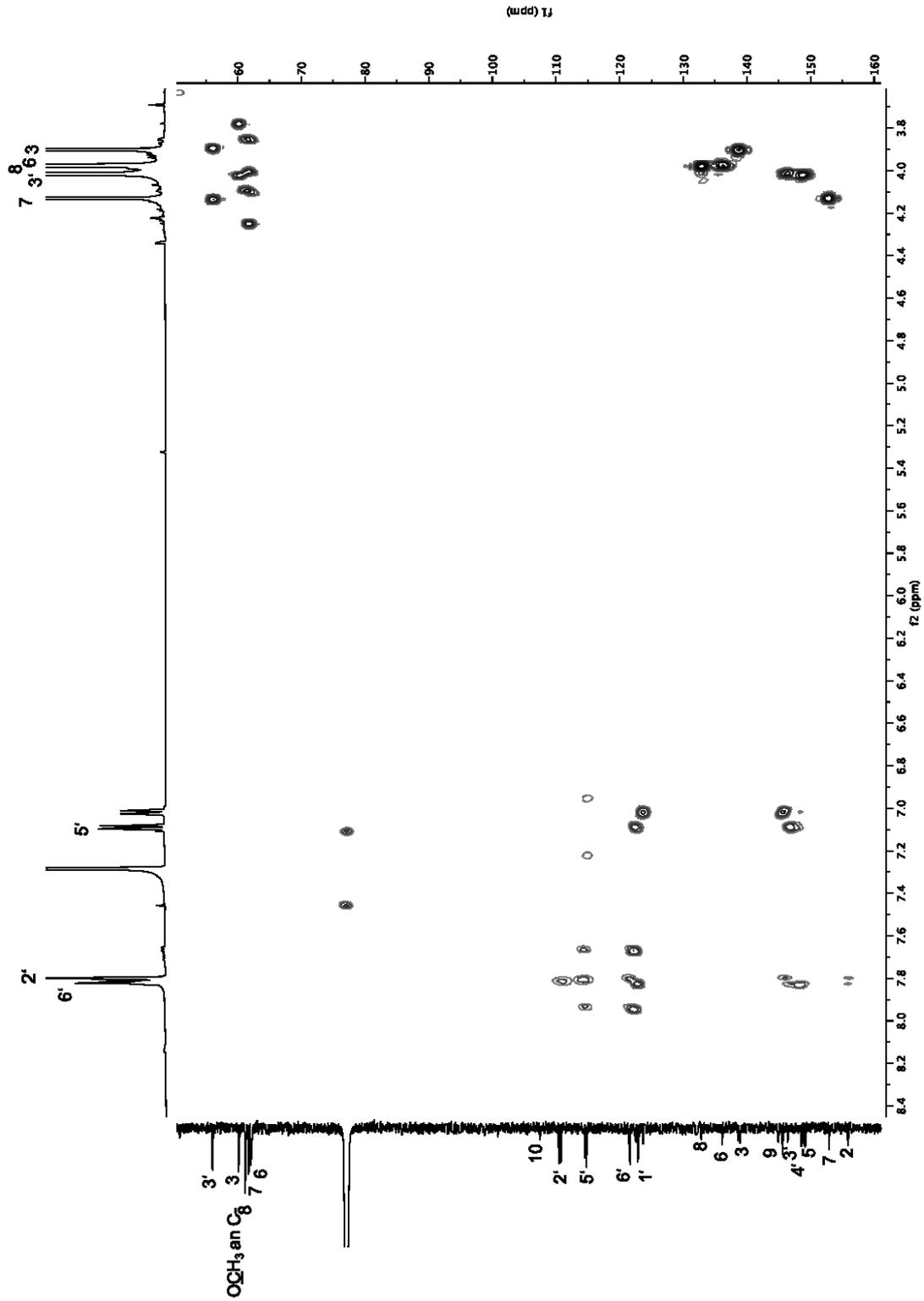


Abbildung 140: 2D-HMBC-Spektrum des Gemisches von **15** und **16** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ), Zuordnung für **16**

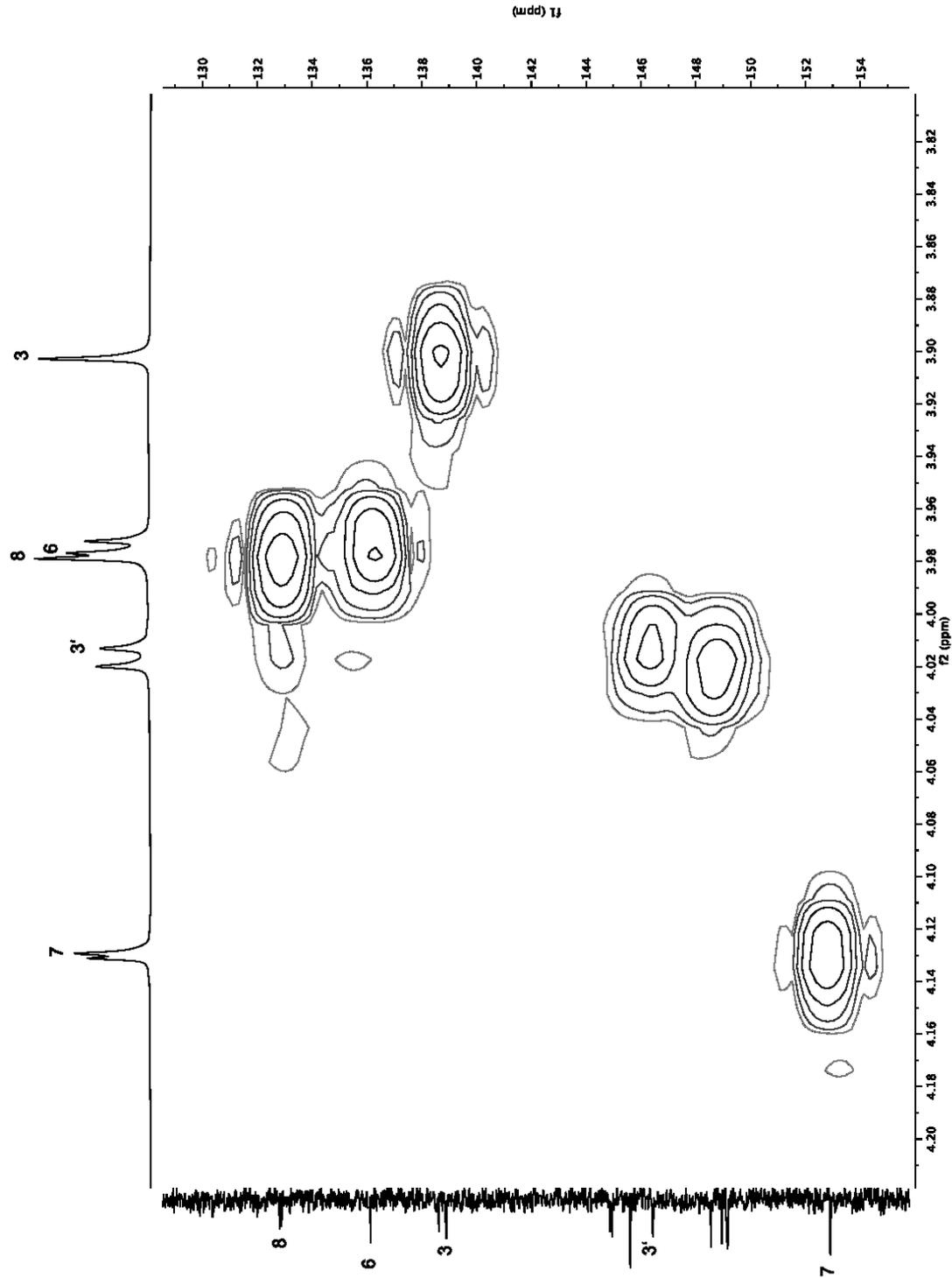


Abbildung 141: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum des Gemisches von **15** und **16** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>); Zuordnung für **16**

2.11.3 Daten von **17** (Gossypetin-3,7,8,4'-tetramethylether)

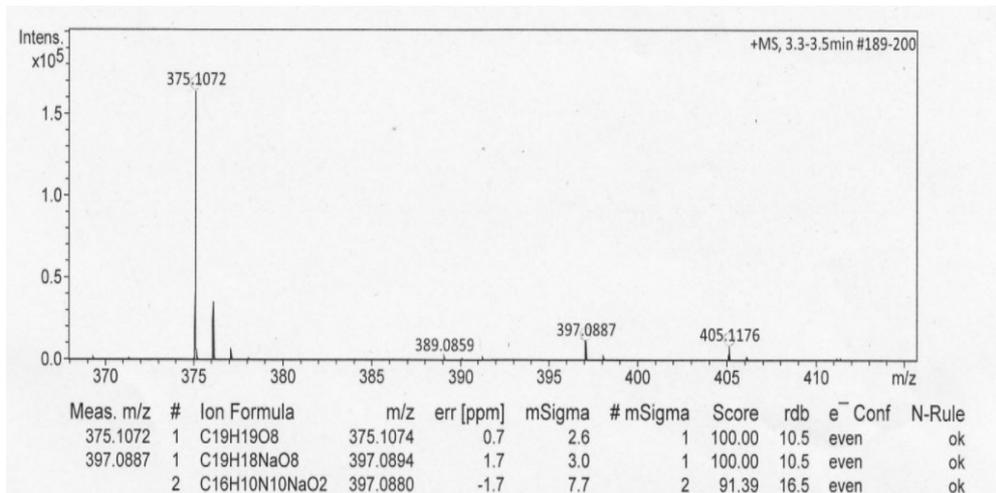
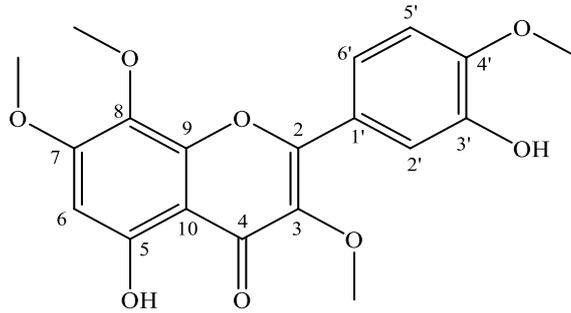


Abbildung 142: HRESIMS von Verbindung **17**

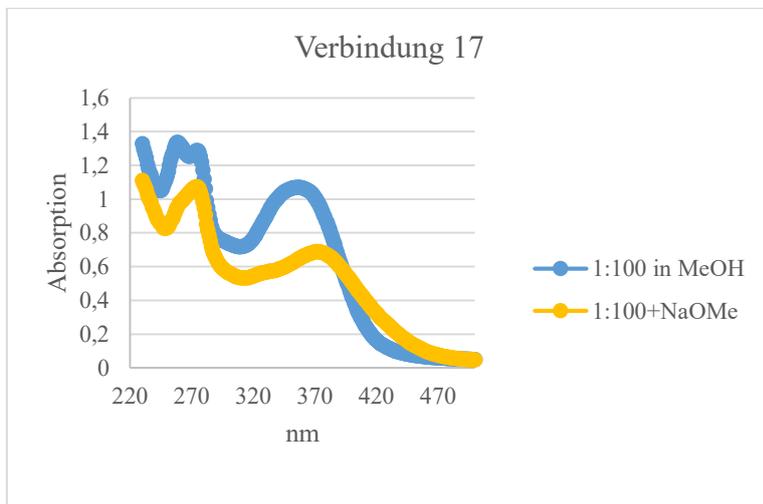
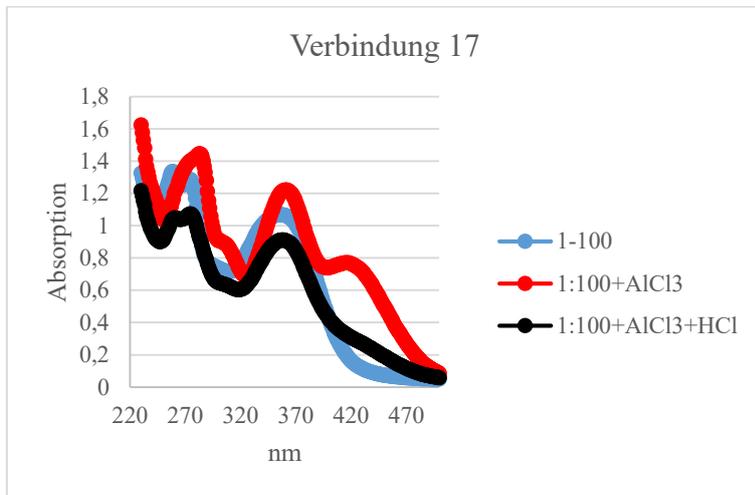
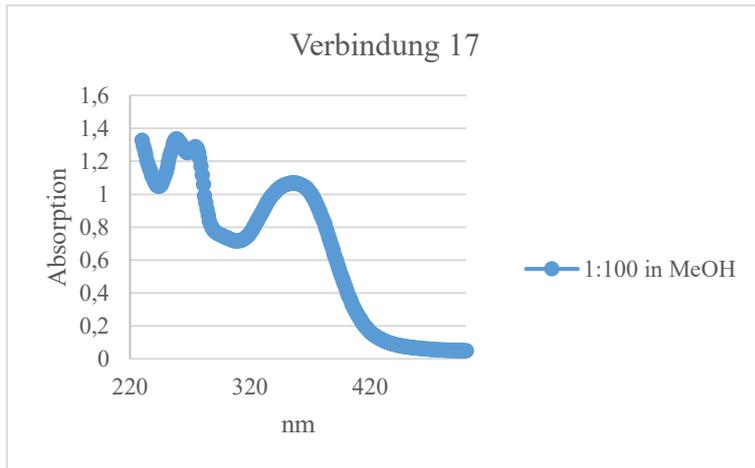


Abbildung 143: UV Spektren von Verbindung 17 mit verschiedenen Shift-Reagenzien

**Tabelle 20:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **17** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	17		Literaturwerte nach [118]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
2	-	155.80	-	155.86
3	-	139.05	-	139.05
4	-	179.24	-	179.25
5	-	157.50	-	157.49
6	6.42 s	95.55	6.41 s	95.60
7	-	158.52	-	158.56
8	-	129.01	-	129.07
9	-	123.92	-	148.65
10	-	105.61	-	105.53
1'	-	123.92	-	123.88
2'	7.79 m	114.70	7.78 sl	114.79
3'	-	145.69	-	145.78
4'	-	149.01	-	149.16
5'	7.00 d (9.0)	110.61	6.98 d (8.5)	110.69
6'	7.79 m	121.75	7.76 sl	121.73
3-OMe	3.88 s	60.31	3.87 s	60.31
7-OMe	3.94 s	56.52	3.94 s	56.54
8-OMe	3.92 s	61.82	3.91 s	61.82
4'-OMe	3.99 s	56.19	3.97 s	56.20
OH an C-5	12.48 s (br.)	-	12.47 s	
OH an C-3'	n.d.	-	-	

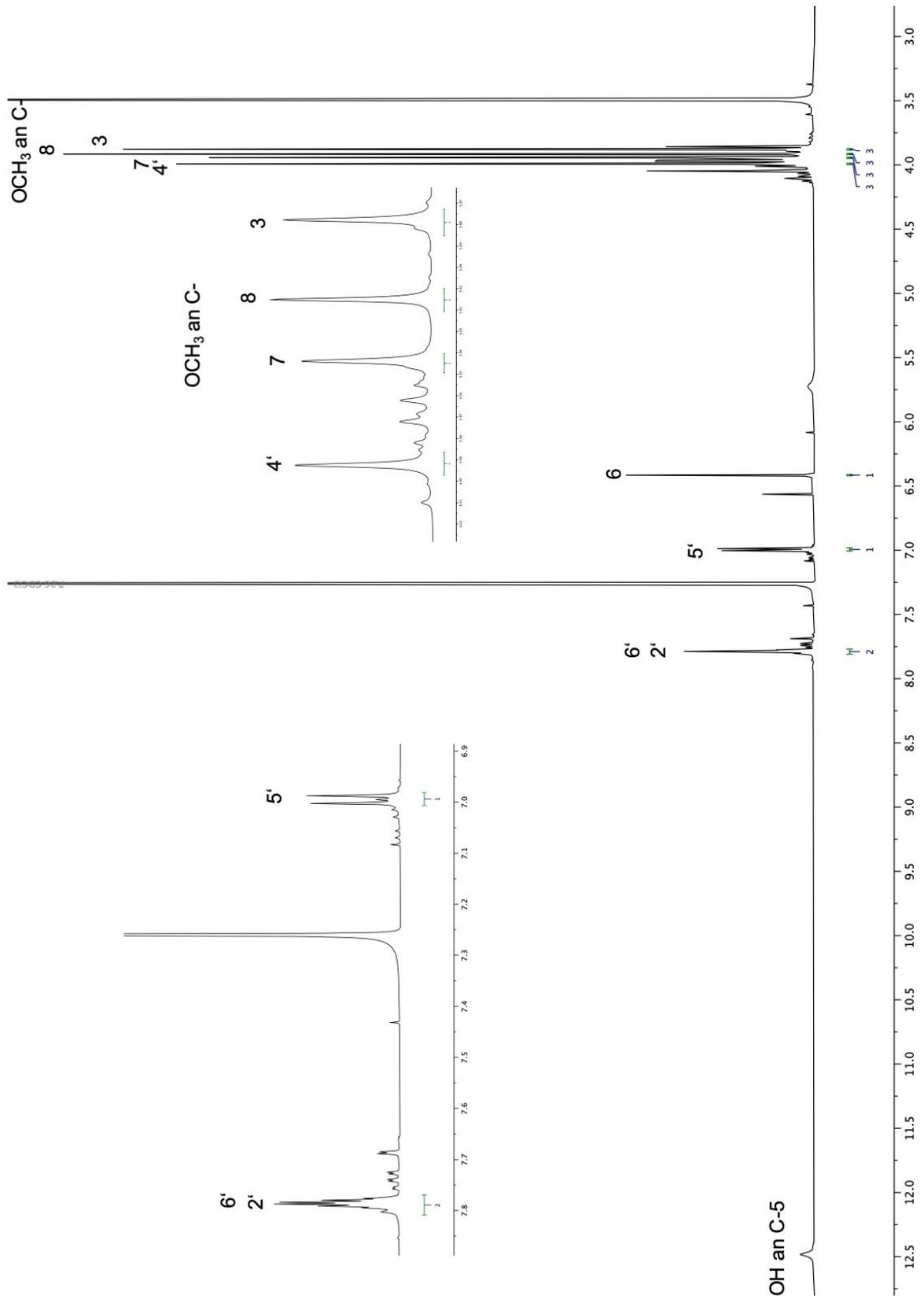


Abbildung 144:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **17** in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

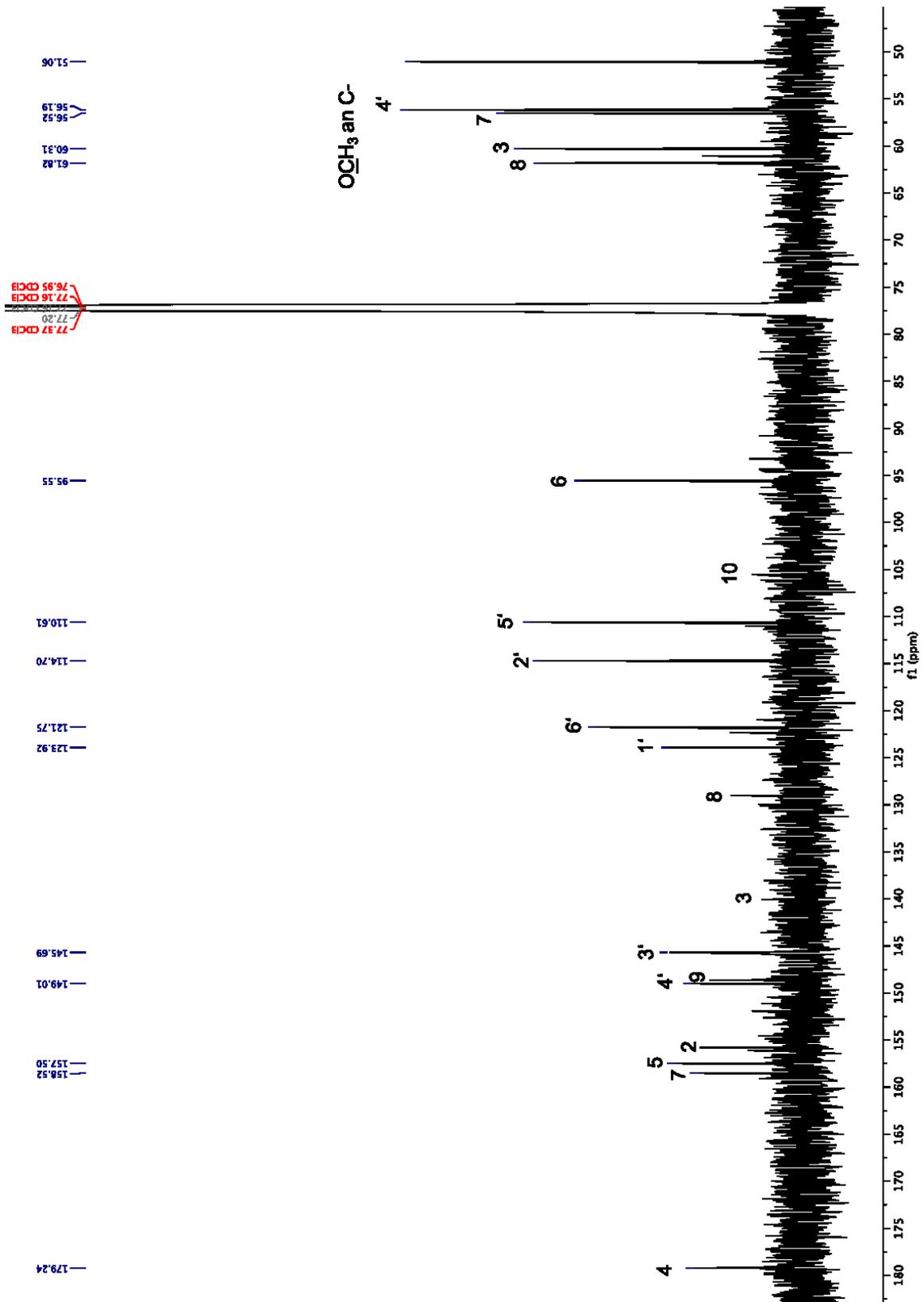


Abbildung 145:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 17 in  $\text{CDCl}_3$  (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

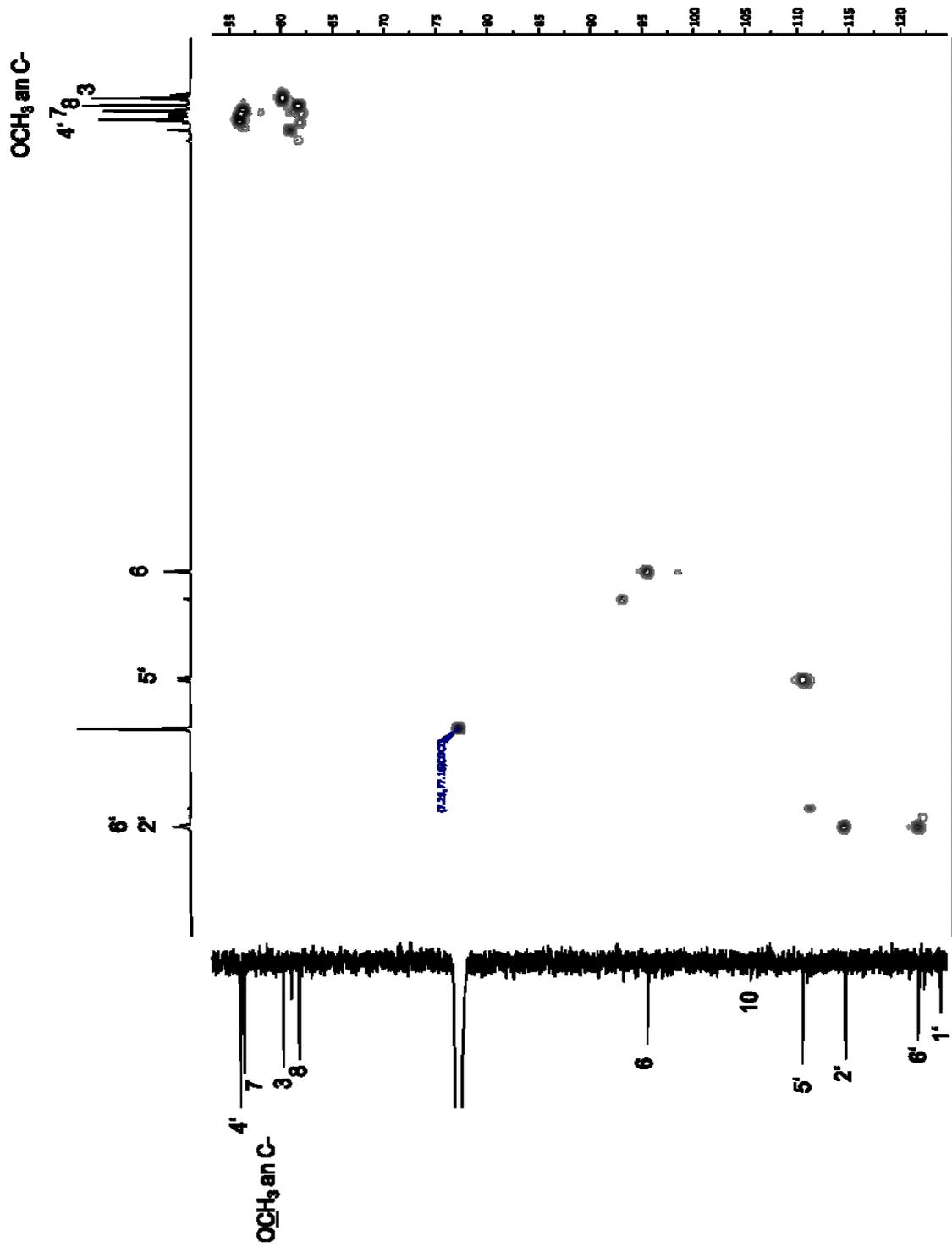


Abbildung 146: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 17 in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

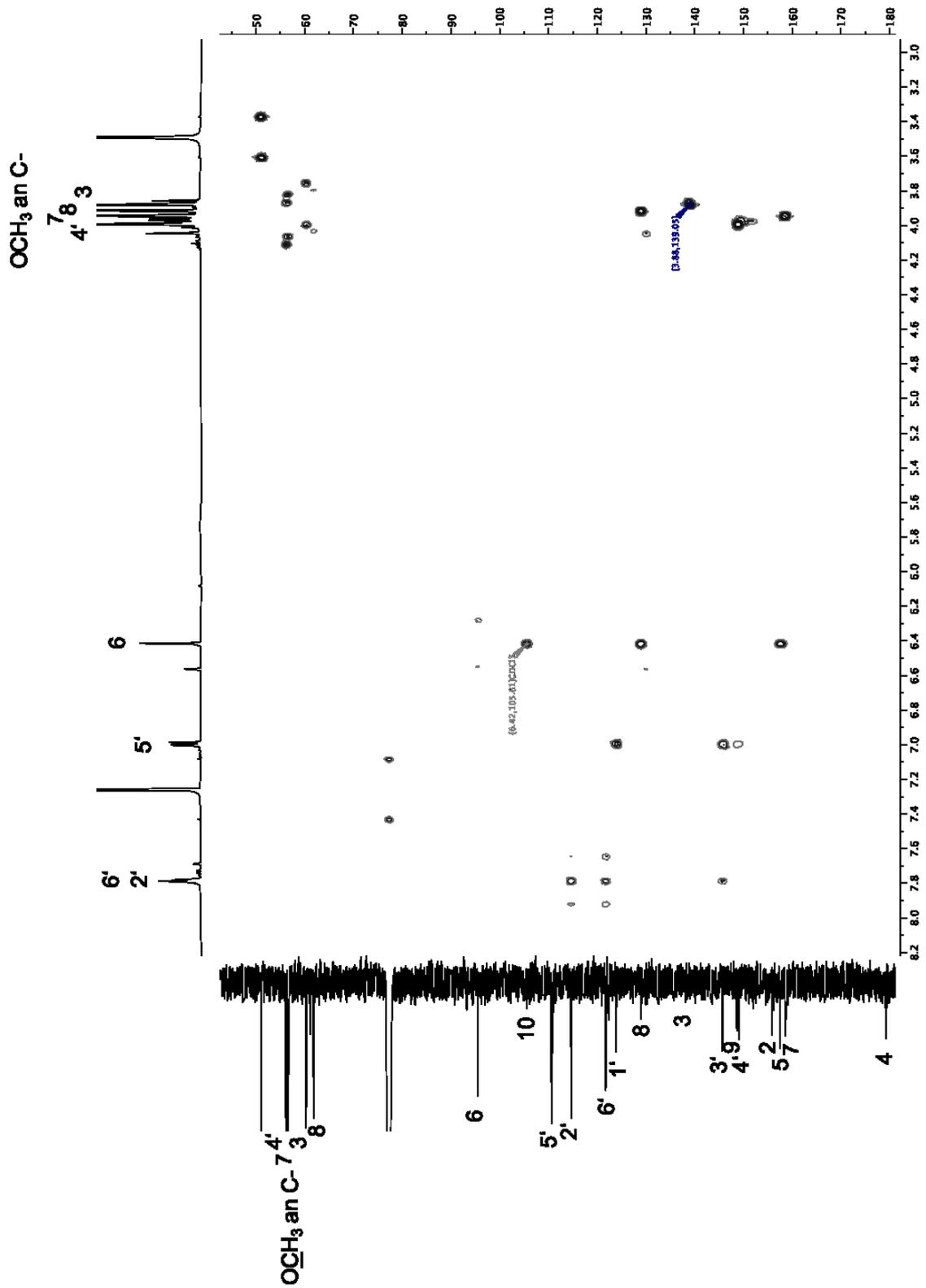


Abbildung 147: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 17 in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz)

Tabelle 21:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von **17** ( $\delta$  in ppm; 600/150 MHz in DMSO- $d_6$ )

Position	<b>17</b>		Literatur nach [127]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
<b>2</b>	-	154.8	-	155.5
<b>3</b>	-	137.9	-	138.0
<b>4</b>	-	n.d.	-	178.4
<b>5</b>	-	156.4	-	156.4
<b>6</b>	6.60 s	95.6	6.59 s	95.7
<b>7</b>	-	158.1	-	158.2
<b>8</b>	-	128.3	-	128.4
<b>9</b>	-	n.d.	-	147.8
<b>10</b>	-	104.2	-	104.5
<b>1'</b>	-	122.0	-	122.3
<b>2'</b>	7.60 m	114.6	7.60 m	114.9
<b>3'</b>	-	146.4	-	146.5
<b>4'</b>	-	150.3	-	150.4
<b>5'</b>	7.14 d (8.4)	111.7	7.15 d (8.4)	112.1
<b>6'</b>	7.61 m	120.1	7.60 m	120.4
<b>3-OMe</b>	3.81 s	59.4	3.81 s	59.7
<b>7-OMe</b>	3.92 s	56.4	3.92 s	56.5
<b>8-OMe</b>	3.82 s	60.9	3.83 s	61.1
<b>4'-OMe</b>	3.87 s	55.4	3.87 s	55.6
<b>OH an C-5</b>	12.48 s	-	12.47 s	-
<b>OH an C-3'</b>	9.54 s	-	9.53 s	-

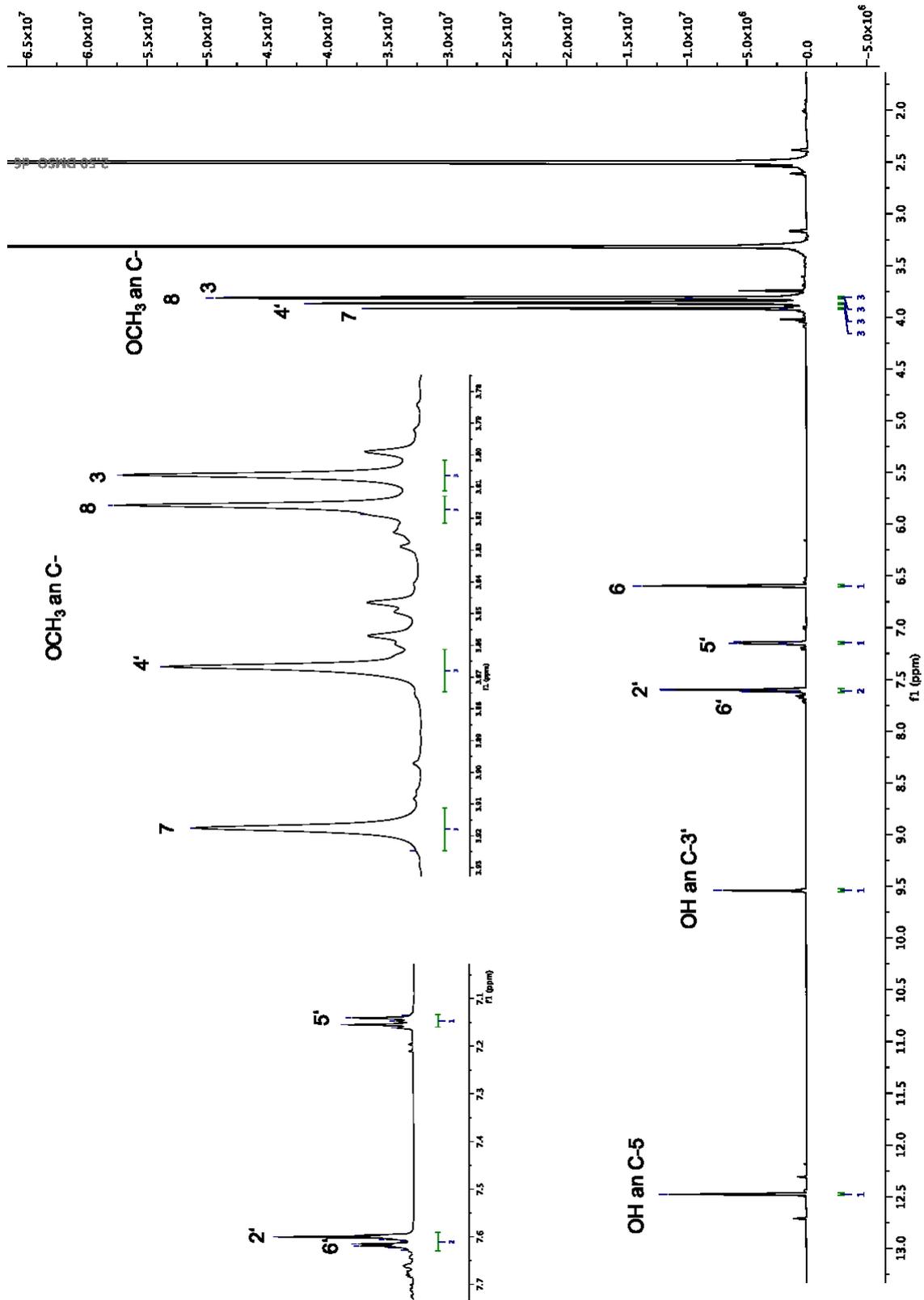


Abbildung 148:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 17 (600 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

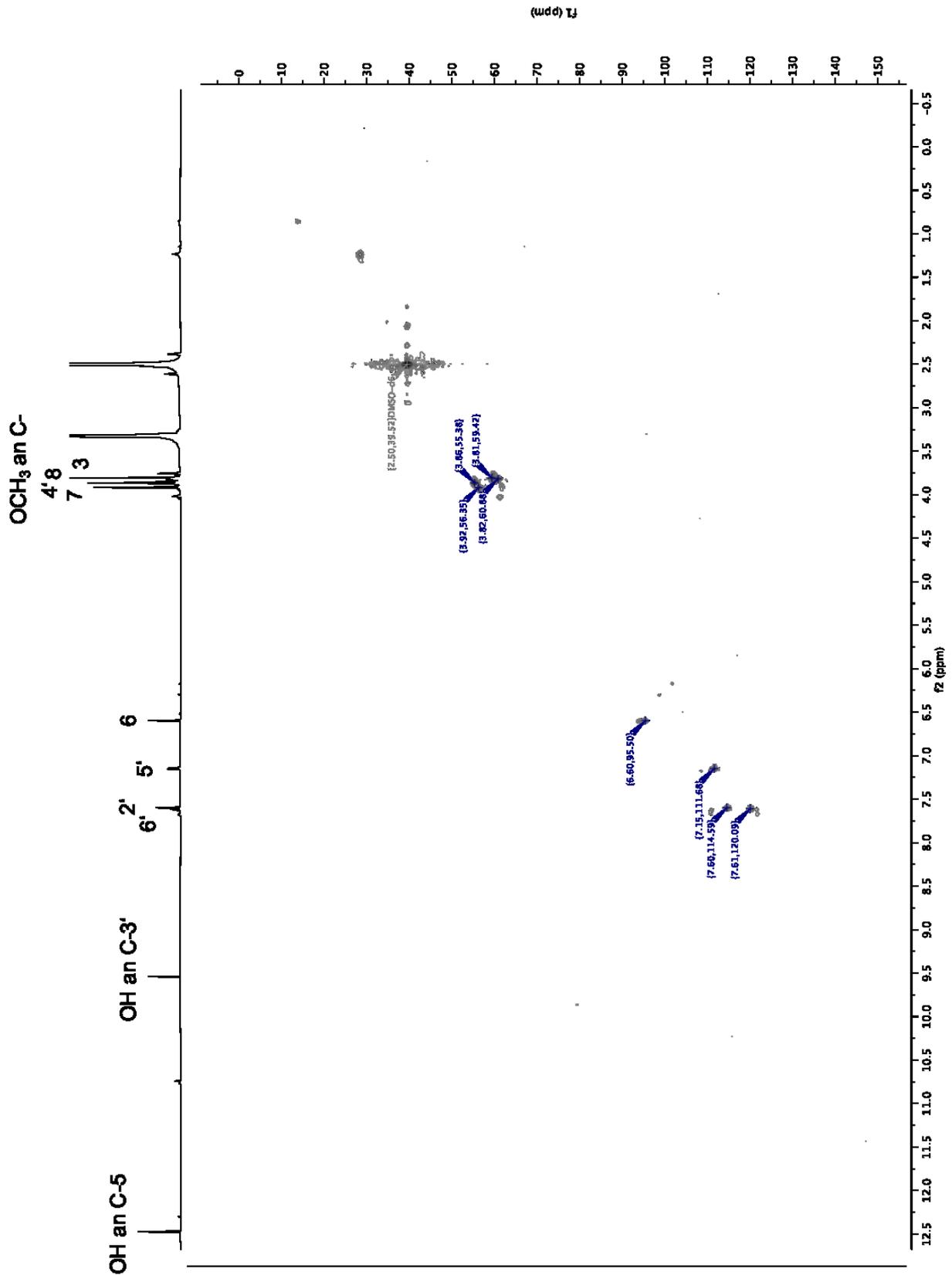


Abbildung 149: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 17 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

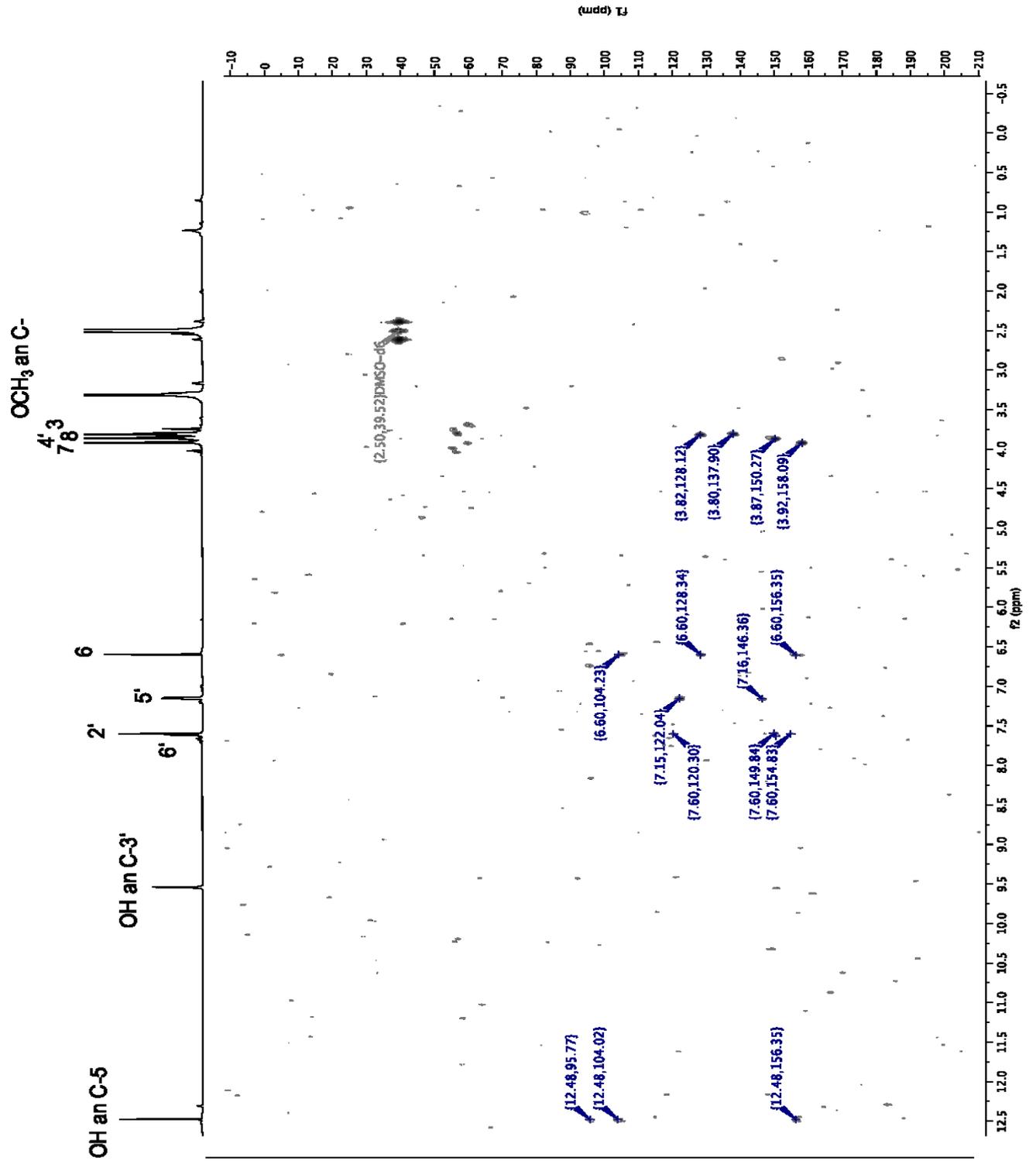


Abbildung 150: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 17 in DMSO-d<sub>6</sub> (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

## 2.12 Verbindung 18 und 19

Verbindung **18** konnte aus der Fraktion MB-D-VII-14 in einer Ausbeute von 1,45 mg isoliert werden. Das hochauflösende Massenspektrum (Abbildung 151) zeigte das protonierte Molekülion bei  $m/z = 331.0811$ , woraus sich die Summenformel  $C_{17}H_{14}O_7$  ableiten ließ. Bereits das deutete darauf hin, dass es sich bei **18** um ein zweifach methoxyliertes Flavonol handeln könnte. Aufgrund der Form und der Lage der langwelligen Bande I im UV-Spektrum (Abbildung 152) von **18** nach Zugabe von  $AlCl_3$  zur methanolischen Lösung, ließ sich zusätzlich ableiten, dass keine 6-O-Substitution im A-Ring und keine orthoständigen Hydroxygruppen im B-Ring vorhanden sein sollten.[130] Die endgültige Aufklärung der Struktur erfolgte mit der NMR-Spektroskopie (Tabelle 23, Abbildung 153 bis Abbildung 155). Das  $^1H$ -NMR Spektrum zeigt die Signale für 11 am Kohlenstoff gebundene Protonen sowie drei Hydroxylprotonen. Wie bereits angenommen sind zwei Methoxygruppen vorhanden, deren Singulets bei  $\delta = 3.80$  und  $3.86$  ppm auftreten. Die Shiftwerte der zugehörigen Kohlenstoffe bei  $\delta = 59.59$  und  $55.15$  wurden mit Hilfe der im HSQC-Spektrum (s. Abbildung 154) registrierten Kreuzsignale ermittelt. Wie bei den zuvor beschriebenen Flavonoiden, finden sich auch im Spektrum von **18** ein Dublett bei  $\delta = 7.64$  ppm ( $J = 2.2$  Hz), ein Dublett vom Dublett bei  $\delta = 7.58$  ppm ( $J = 2.2$  und  $8.4$  Hz) und ein weiteres Dublett bei  $\delta = 6.96$  ppm ( $J = 8.4$  Hz), was die 1,3,4-Trisubstitution des B-Rings belegt. Da Aufgrund des Verhaltens von **18** bei der UV-Analyse keine 3',4'-Dihydroxystruktur vorliegen kann, muss mindestens eine der beiden OH-Gruppen methyliert vorliegen. Dies wird durch die Korrelationen im ebenfalls aufgenommenen HMBC-Spektrum bestätigt (Abbildung 155). Neben den bei anderen Flavonoiden gefundenen  $^3J$ -Korrelationen zwischen den Protonen H-2' und H-6' und C-4', C-2 und der Korrelation von H-5' mit C-1' ist sind hier die  $^3J$ -Kopplungen des Hydroxylprotons bei  $\delta = 9.91$  ppm mit C-5' ( $\delta = 115.51$ ) und einem weiteren Kohlenstoff bei  $\delta = 147.12$ , der auch mit den drei äquivalenten Methylprotonen der Methoxygruppe bei  $\delta = 55.15$  ppm koppelt, strukturbeweisend. Der B-Ring ist demnach mit einer Hydroxylgruppe an C-4' und einer Methoxygruppe an C-3' substituiert. Der zweite Methylether ( $\delta_H 3.80$ ;  $\delta_C 59.59$  ppm) sollte sich aufgrund der Lage der Signale in den Spektren und der  $^3J$ -Korrelation mit C-3 ( $\delta_C 137.70$  ppm) am C-3 des Flavonols befinden. Das wird durch die beiden breiten Singulets  $\delta = 6.5$  und  $6.78$  ppm bestätigt, die mit den Kohlenstoffen C-6 ( $\delta_C 97.95$  ppm) bzw. C-8 ( $\delta_C 92.67$  ppm) korrelieren. Hinzu kommen die Signale der beiden noch nicht zugeordneten OH-Protonen bei  $\delta = 12.68$  und  $10.84$  ppm, die mit mit C-5, C-6 und C-10 (OH an C-5) bzw. C-6, C-7 und C-8 (OH an C-7) korrelieren. Das Signal des quartären C-9 konnte über seine Korrelation mit H-8 bei  $\delta = 156.27$  ppm im Spektrum gefunden werden. Da die Aufnahme eines  $^{13}C$ -NMR-

Spektrums aufgrund der Substanzmenge leider nicht möglich war, konnte das Signal des über Korrelationen nicht zugänglichen Carbonylkohlenstoffs des Cyclopyrenonrins (C-Ring, C-4) leider nicht detektiert werden.

Bei Verbindung **18** handelt es sich um das 3,3'-Dimethylquercetin, den Dimethylether des in vielen Pflanzen vorkommenden, ubiquitären Flavonols Quercetin. Auch diese Substanz, die erstmals bereits 1950 von Briggs et al. aus *Melicope ternata* isoliert werden konnte, wurde bisher in mehr als 300 Publikationen erwähnt. [47] Neuere NMR-Daten finden sich bei Wang et al. (2010), der sowohl die  $^1\text{H}$ - als auch die  $^{13}\text{C}$ -NMR Shiftwerte von Verbindung **18** veröffentlichte. [131] Ein Vergleich mit unseren Daten zeigt, dass diese weitgehend übereinstimmen, allerdings sind die Shiftwerte von C-2, C-3' und C-4' sowie die Kohlenstoffe C-6 und C-6 bei [131] vertauscht worden. Möglicherweise ist das darauf zurückzuführen, dass von den Autoren keine Korrelationsspektren aufgenommen wurden, sonst wäre das Vertauschen der mit den richtig zugeordneten Protonen H-6' und H-8' wohl kaum passiert. Wang et al. schreiben: „The structure was confirmed by comparison with literature data [21].“ Bei dieser Quelle handelt es sich um die Arbeit von Al-Dabbas et. (2006), der auch NMR-Daten von dieser Substanz veröffentlicht hat, die aber nicht in DMSO- $d_6$  sondern in Pyridin- $d_5$  aufgenommen wurden. [132] Bei etwas sorgfältigerem Studium der Literatur hätte auffallen können, dass bereits 1982 von Chiappini et al. NMR-Daten in DMSO- $d_6$  korrekt zugeordnet und veröffentlicht wurden. [133] Die dort angegebenen Daten sind ebenfalls in Tabelle 23 aufgeführt und befinden sich in guter Übereinstimmung mit den von uns ermittelten Werten.

1,3 mg von Verbindung **19** wurden aus der Fraktion MB.D-V-3 isoliert. Das im Massenspektrum von **19** (s. Abbildung 156) detektierte Molekülion bei  $m/z = 399.1141$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  führte zur Summenformel  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_7$ . Bei gleicher Anzahl von Sauerstoffen besitzt Verbindung **19** somit fünf Kohlenstoffe und sieben Protonen mehr als **18**. Die zunächst in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommenen NMR-Spektren (s. Abbildung 158 bis Abbildung 160) zeigen, dass es sich bei **19** ebenfalls um ein zweifach methoxyliertes Flavonol handelt, das im Gegensatz zu **18** einen Prenylrest besitzt, da die dafür typischen Signale für eine Methylen- ( $\delta_{\text{H}} 4.56$ ,  $\delta_{\text{C}} 65.49$ ), eine Methin- ( $\delta_{\text{H}} 5.47$ ,  $\delta_{\text{C}} 118.48$ ) und zwei Methylgruppen ( $\delta_{\text{H}} 1.75$  und  $1.80$ ,  $\delta_{\text{C}} 18.17$  und  $25.84$ ) sowie ein quartäres, olefinisches C-Atom ( $\delta_{\text{C}} 139.26$ ) im  $^1\text{H}$ -, HSQC und HMBC-Spektrum enthalten sind. Die  $^3\text{J}$ -Kopplung des zwischen den Methylprotonen bei  $\delta = 4.56$  ppm und dem aromatischen Kohlenstoff bei  $\delta = 164.63$  ppm beweist, dass das Proton der Hydroxylgruppe an C-7 durch den 3-Methylbut-2-en Substituenten ersetzt wurde. Wie bei **18** finden sich auch bei **19** die Signale für H-6 und H-8 bei  $\delta = 6.34$  ppm ( $\delta_{\text{C}} 98.28$ ) und  $\delta = 6.43$

ppm ( $\delta_C$  92.85) des A-Rings sowie die Signale für das von H-2', H-5' und H-6' geformte ABX-System bei  $\delta = 7.69$  ppm ( $\delta_C$  98.28), 7.03 ( $\delta_C$  114.45) und 7.65 ( $\delta_C$  122.42). Aufgrund der Korrelationen im HMBC Spektrum ist zu erkennen, dass die beiden Methylether wie bei **18** an C-3 und C-3' lokalisiert sind. Bei **19** handelt es sich daher um das 7-Isopentenyl-3,3'-dimethylquercetin, das 7-Prenylderivat von **18**. Diese Verbindung wurde erstmals von Fraser und Lewis in der Rutaceae *Euodia glabra* [134] gefunden und dann von Srivastava et al. (1982) synthetisch hergestellt. [135] Die hier ermittelten  $^1\text{H-NMR}$  Daten stimmen gut mit den von Fraser veröffentlichten Daten überein, allerdings gibt Fraser ein Multiplett für H-2' und H-6' bei 7.6 -7.7 ppm, was auf die schlechtere Auflösung des dort ausgewerteten 100 MHz Spektrum zurückgeführt werden könnte. Wie zuvor beschrieben, kann das Auftreten eines gemeinsamen Multipletts für diese zwei Protonen darauf hindeuten, dass es sich um einen 4'- und nicht um einen 3'-Methylether handeln könnte. [127] Da Srivastava zwei getrennte Signale in dem vom ihm aufgenommenen 80 MHz Spektren beschreibt, könnte angenommen werden, dass es sich bei der von Fraser und Lewis [134] beschriebenen Substanz um das 3'-Hydroxy-4'-methoxyderivat des Quercetins handeln könnte. Um diese Frage zu klären wurde die Literaturrecherche auf das 7-Isopentenyl-3,4'-dimethylquercetin erweitert. Zu dieser Substanz findet sich in den Chemical Abstracts [49] nur eine Literaturstelle von Wang et al. [131], die diese Verbindung aus *Melicope elleryana* isolieren konnten. Auch dort wurden nur Protonendaten (400 MHz) veröffentlicht, die Struktur wurde aber mit der Röntgenstrukturanalyse abgesichert. In der Publikation berichten Wang et al. auch über die Isolierung des 4'-Hydroxy-3'-methoxyderivates, allerdings ohne neue NMR Daten anzugeben. In Tabelle 25 sind im Vergleich zu den hier ermittelten Daten auch die von Fraser und Srivastava für das 4'-Hydroxy-3'-methoxy- und von Wang für das 3'-Hydroxy-4'-methoxyderivat gelistet. [134] Aufgrund der geringfügigen Unterschiede der chemischen Verschiebungen der B-Ring-Protonen kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, welches der isomeren Verbindungen vorliegt. In Tabelle 24 sind die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Shiftwerte in  $\text{CDCl}_3$  der B-Ring-Protonen und -Kohlenstoffe der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen 3'-Hydroxy-4'-Methoxy- und 4'-Hydroxy-3'-Methoxy-Flavonole **15-17** und **19** aufgelistet. Die Unterscheidung zwischen den beiden Substitutionstypen gelingt mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten in Verbindung mit den Korrelationen in den HSQC- und HMBC-Spektren ohne Probleme. Bei Vorliegen einer Hydroxylgruppe an C-4' und Methoxygruppe an C-3' finden sich die Signale der benachbarten Kohlenstoffe C-2' und C-5' bei ca. 110 (C-2') und 114 ppm (C-5'). Ist die Substitution anders herum (C-3'-OH, C-4'-OMe) dann wechseln diese Kohlenstoffe den Platz. Durch die Korrelation zu den zugehörigen Dubletts des ABX-Systems, H-2' bei ca. 7.7 ppm

mit kleiner Metakopplung zu H-6' (J= 2 Hz) und H-5' bei ca, 7.0 ppm mit großer Orthokopplung zu H-6' (J = 8 Hz), lässt sich die Zuordnung der Kohlenstoffsignale eindeutig durchführen.

**Tabelle 22:** Vergleich der Protonen- und Kohlenstoffshifts der hier isolierten Flavonoide mit 3',4'-monomethyliertem B-Ring.

	<sup>1</sup> H				<sup>13</sup> C			
	15 3'OH- 4'OMe	17 3'OH- 4'OMe	16 4'OH- 3'OMe	19 4'OH- 3'OMe	15 3'OH- 4'OMe	17 3'OH- 4'OMe	16 4'OH- 3'OMe	19 4'OH- 3'OMe
<b>1'</b>					124.02	123.88	122.42	n.d.
<b>2'</b>	7.78 d	7.79 m	7.77 s	7.69 d	114.76	114.79	110.93	111.03
<b>3'</b>		-	-	-	145.85	145.78	146.57	146.24
<b>4'</b>		-	-	-	149.05	149.16	148.26	148.43
<b>5'</b>	6.99 d	7.00 d	7.06 d	7.03 d	110.70	110.69	114.91	114.45
<b>6'</b>	7.79 d	7.79 m	7.79 m	7.65 dd	121.78	121.73	122.78	122.42

Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Verbindungen kann man nur bei dem von Fraser und Lewis [131] isolierten 7-Isopentenyl-3,4'-dimethylquercetin durch die Röntgenstrukturanalyse eindeutig sagen, dass es sich um diese Verbindung handelt. Für das aus *Melicope elleryana* ebenfalls isolierte 7-Isopentenyl-3,3'-dimethylquercetin geben Wang et al. keine Daten an und verweisen nur auf die Literatur. Die dort von Fraser veröffentlichten Daten lassen eine Entscheidung aber gar nicht zu, wie der Vergleich der in Tabelle 24 gelisteten NMR Daten von Fraser et al. (1973) mit denen von Wang et al. (2001) und den von uns ermittelten Daten zeigen. Die Shifts von H-2', H-5' und H-6' weichen maximal um 0.04 ppm voneinander ab. Es wäre daher wünschenswert gewesen, wenn Wang et al. [131] die Unterschiede zwischen den beiden aus *M. elleryana* isolierten Verbindungen deutlich gemacht hätten. So lässt sich nicht sagen, ob tatsächlich beide Derivate isoliert wurden. Möglicherweise ist das der Grund dafür, dass nur das 3'-Hydroxy-4'-Methoxy-Derivat als Inhaltsstoff von *M. elleryana* in die Chemical Abstracts aufgenommen wurde. Um die Daten von **18** und **19** zu vergleichen wurden auch von **19** Spektren im DMSO-d<sub>6</sub> aufgenommen. Bis auf die durch die Prenylierung der

Hydroxylgruppe an C-7 entstanden Unterschiede, stimmen die Spektren weitgehend überein (s. Abbildung 161, Abbildung 162, Abbildung 163 und Abbildung 164 und Tabelle 23)

Abschließend kann gesagt werden, dass hier erstmals eindeutige NMR- Daten für Verbindung **19** aufgenommen wurden. Sollte sich herausstellen, dass die von Fraser und Lewis [134] untersuchte *Euodia glabra* auch das 4'-Methoxyderivat enthält, dann würde es sich bei **19** sogar um einen neuen Naturstoff handeln.

2.12.1 Daten von **18** (Quercetin 3,3'-dimethylether)

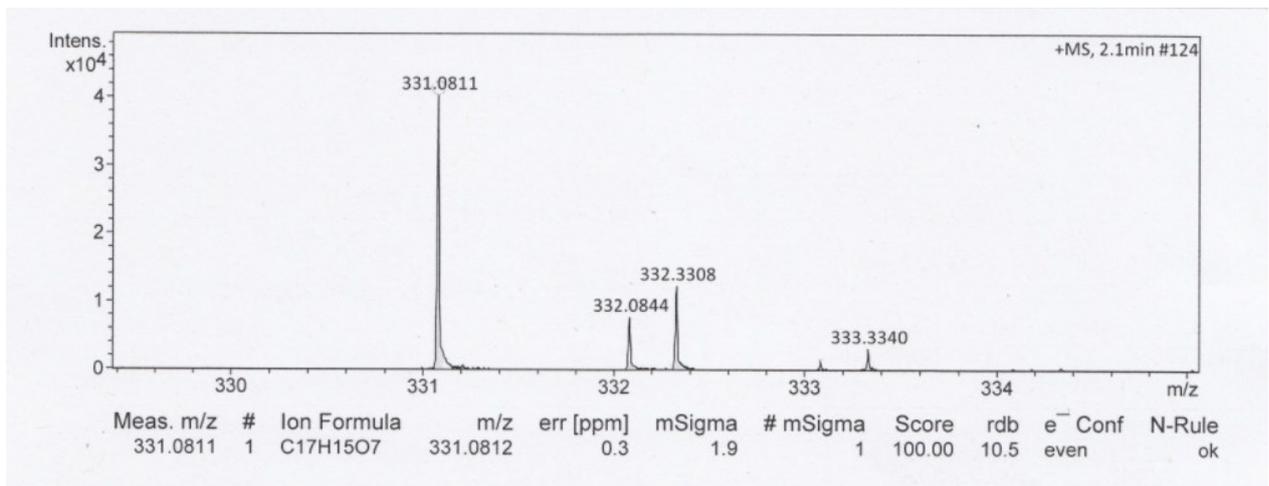
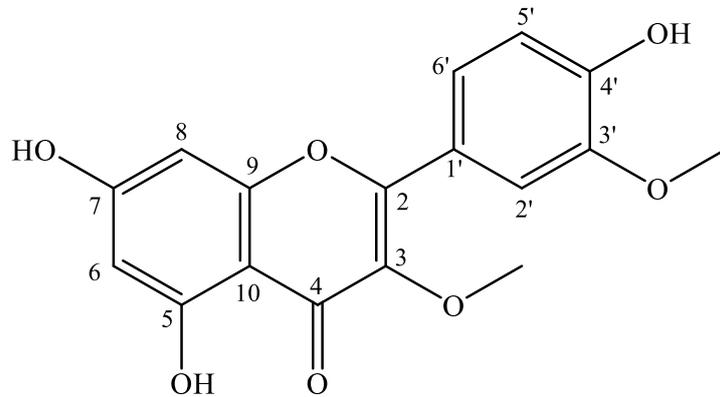


Abbildung 151: HRESIMS von Verbindung **18**

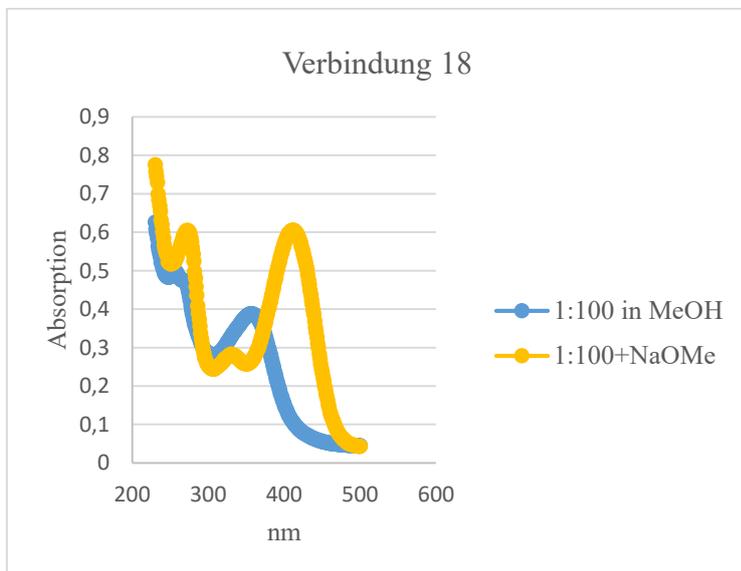
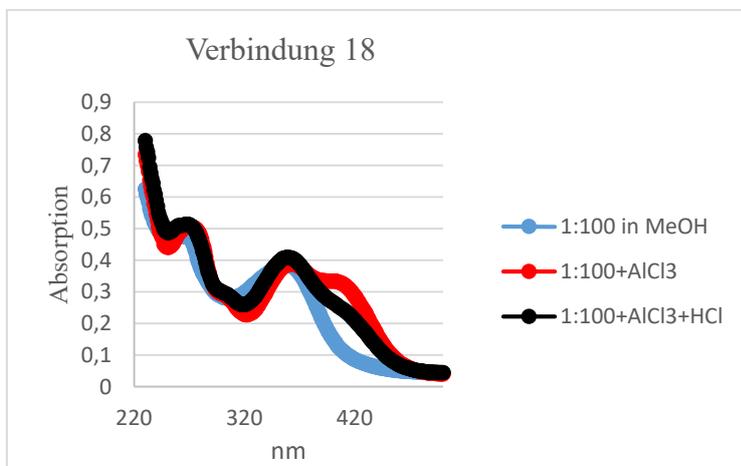
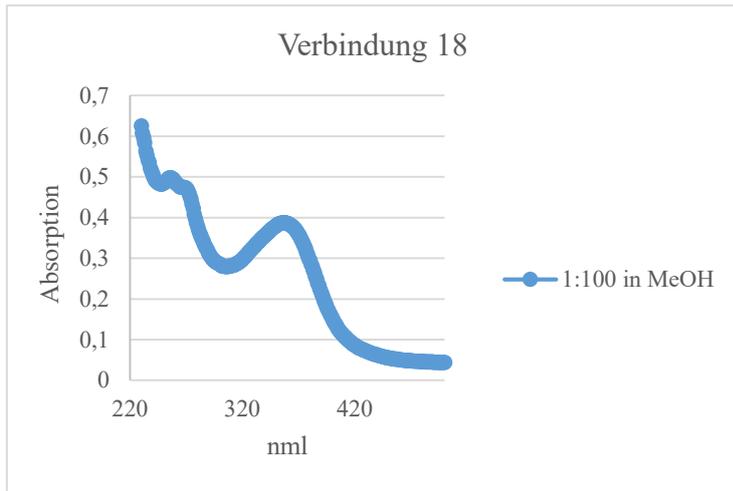


Abbildung 152: UV-Spektren von Verbindung 18 mit verschiedenen Shiftreagenzien

**Tabelle 23:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von **18** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in DMSO- $d_6$ )

Position	<b>18</b>		Literatur nach [131]		[133]
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
2	-	149.95		155.6	149.70
3	-	137.70		137.9	137.74
4	-	n.d.		178.1	177.89
5	-	161.24		161.4	161.28
6	6.20 d (2.1)	98.38	6.20 d (2.0)	94.0	98.55
7	-	164.00		164.3	164.09
8	6.48 d (2.1)	93.63	6.48 d (2.1)	98.8	93.79
9	-	156.27		156.5	156.35
10	-	104.19		104.4	104.25
1'	-	121.89		122.4	122.17
2'	7.64 d (2.2)	111.78	7.64 d (2.1)	112.3	129.55
3'	-	147.12		150.0	147.4
4'	-	155.38		147.6	155.42
5'	6.96 d (8.4)	115.51	6.97 d (8.4)	115.8	115.03
6'	7.58 dd (8.4; 2.2)	121.93	7.58 dd (8.4, 2.1)	121.0	120.91
3-OMe	3.80 s	59.59	3.80 s	59.9	59.63
3'-OMe	3.86 s	55.15	3.86 s	55.9	55.69
C-5-OH	12.68 s	-	12.68 s	-	-
C-7-OH	10.84 s	-	10.82	-	-
C-4'-OH	9.91 s	-	9.88 s	-	-

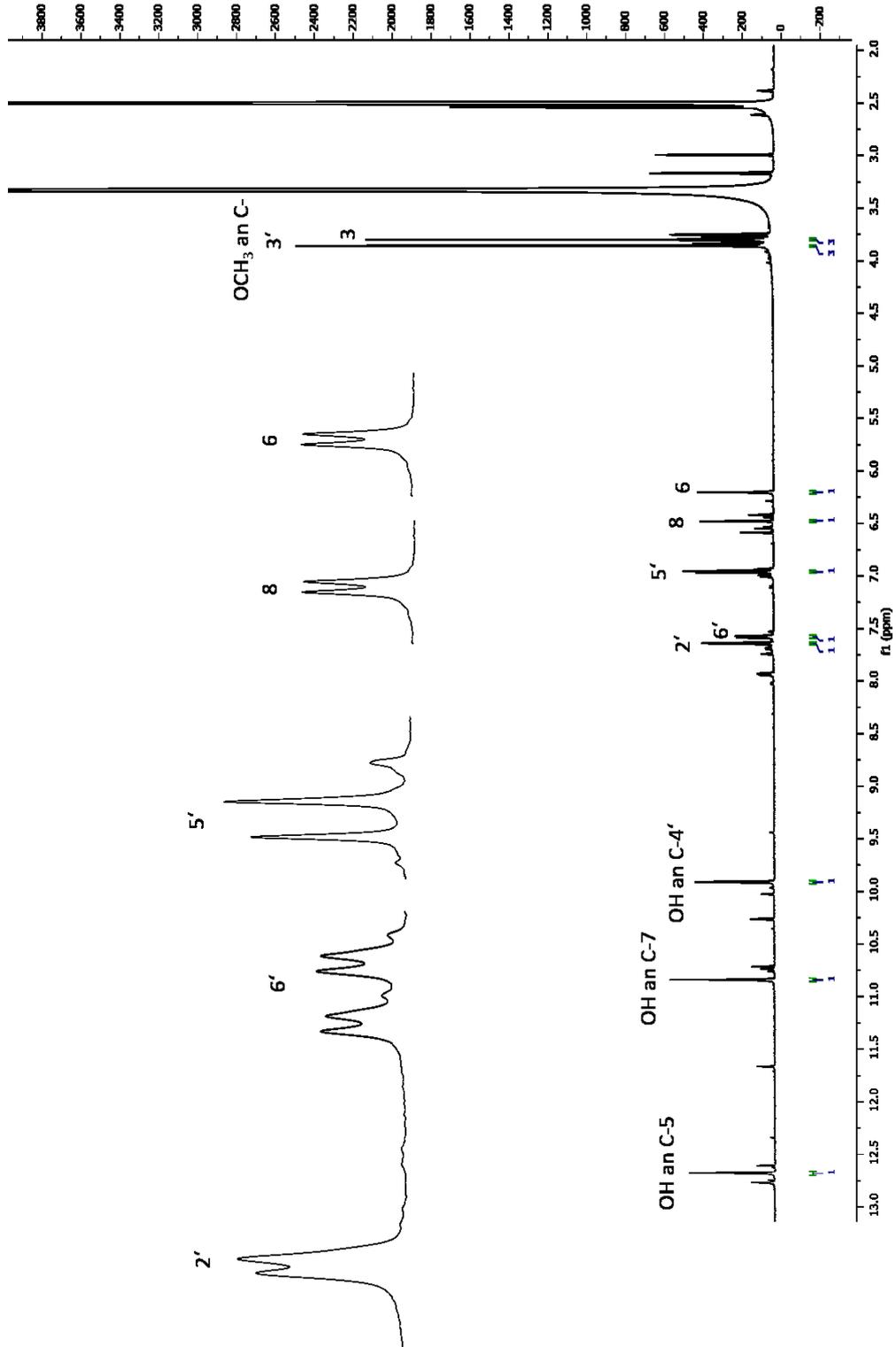


Abbildung 153:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **18** (600 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

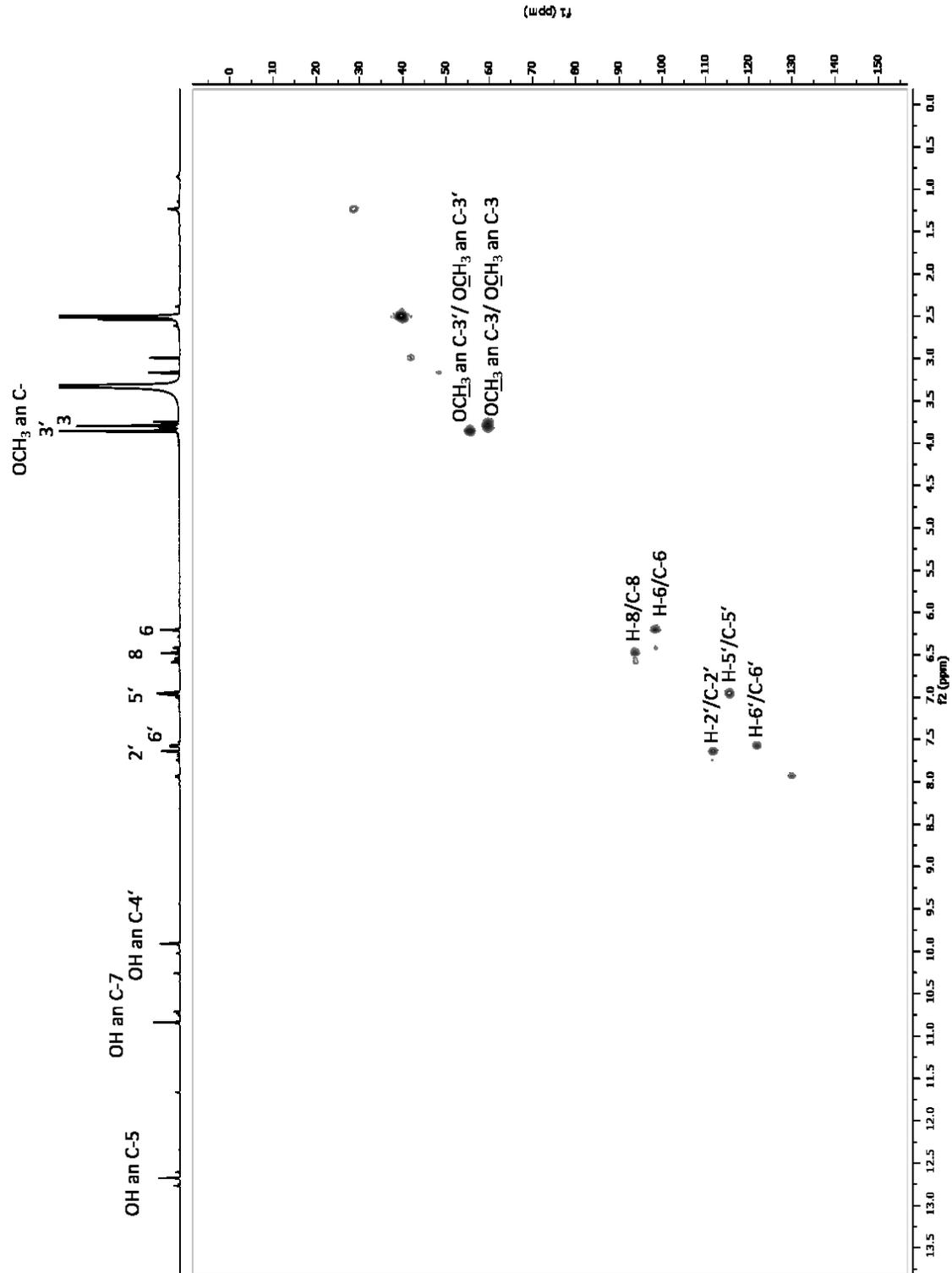


Abbildung 154: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 18 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

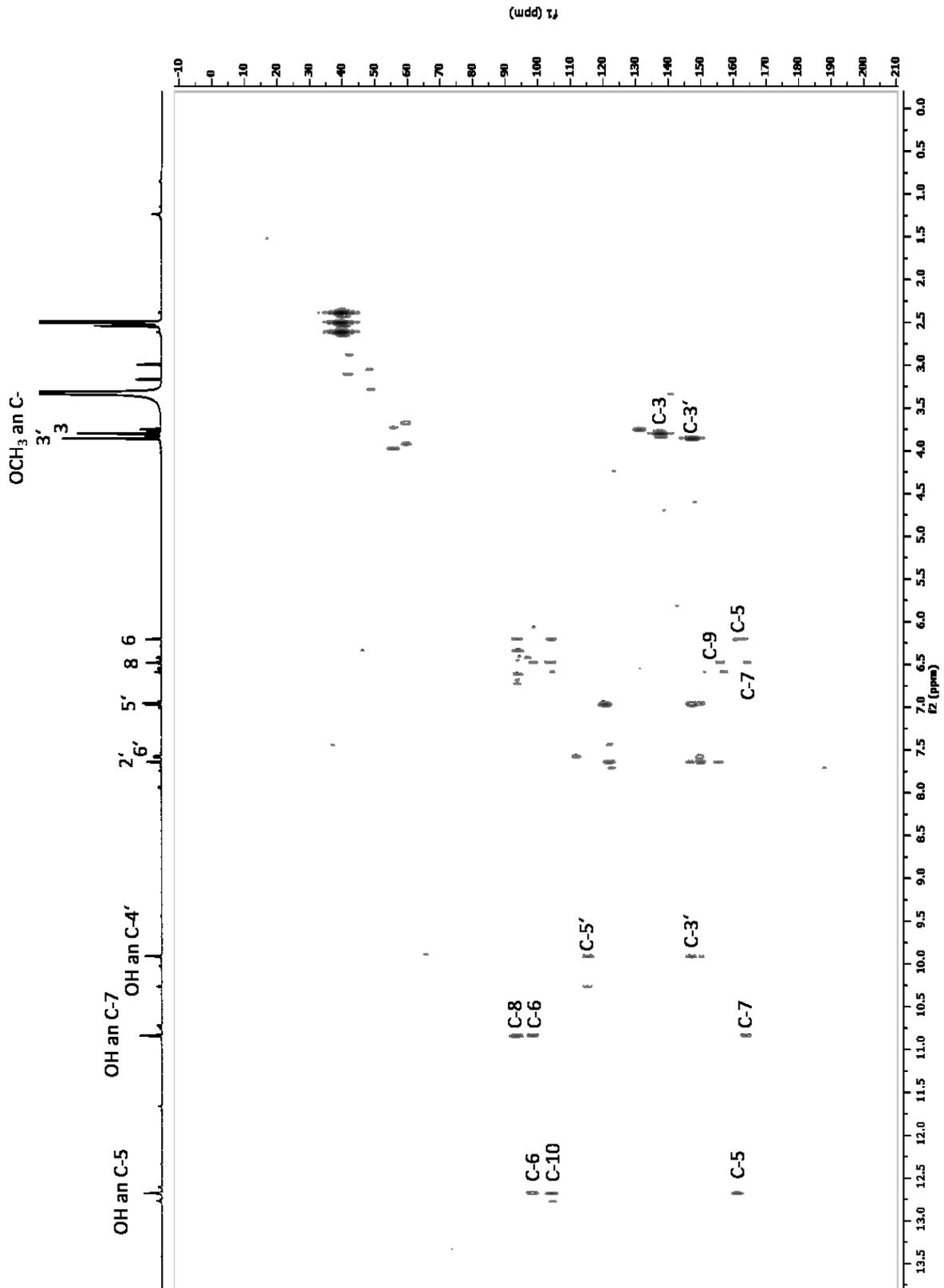


Abbildung 155: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 18 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

2.12.2 Daten von **19** (7-Isopentenyl-3,3'-dimethylquercetin)

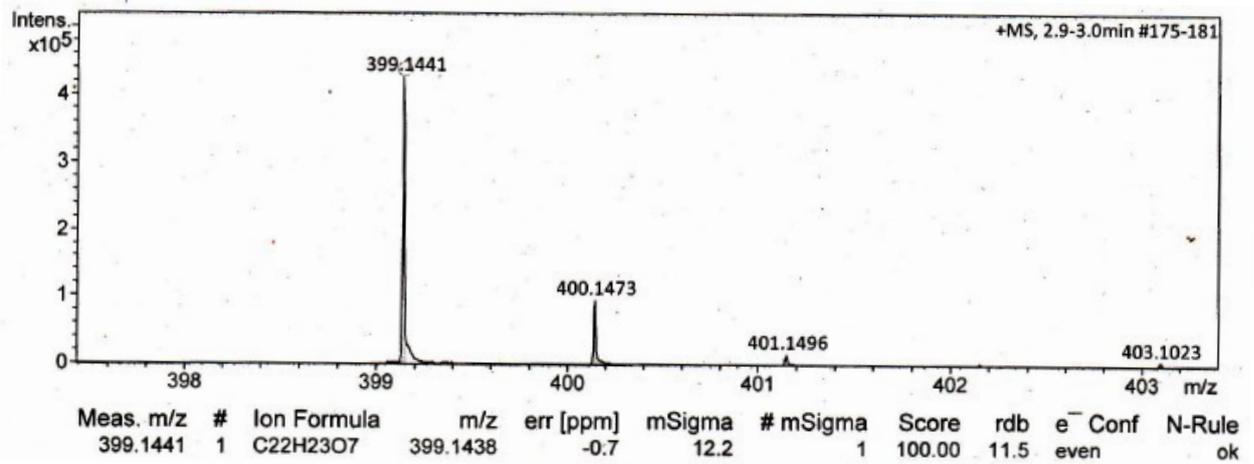
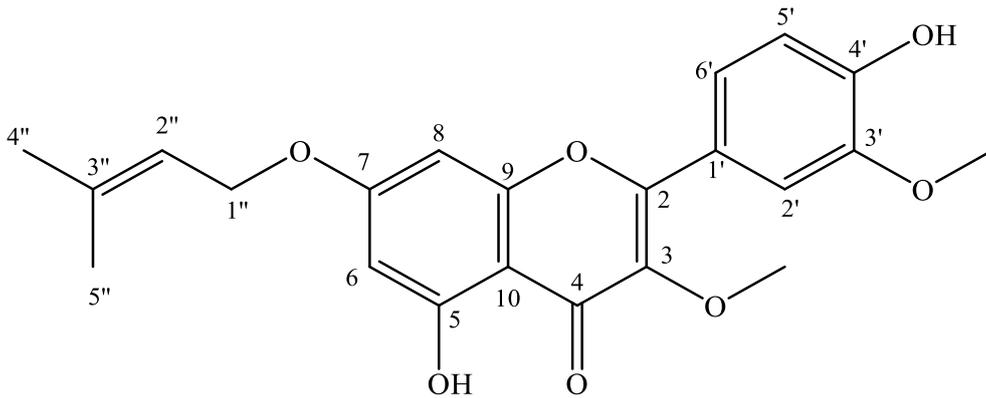


Abbildung 156: HRESIMS von Verbindung **19**

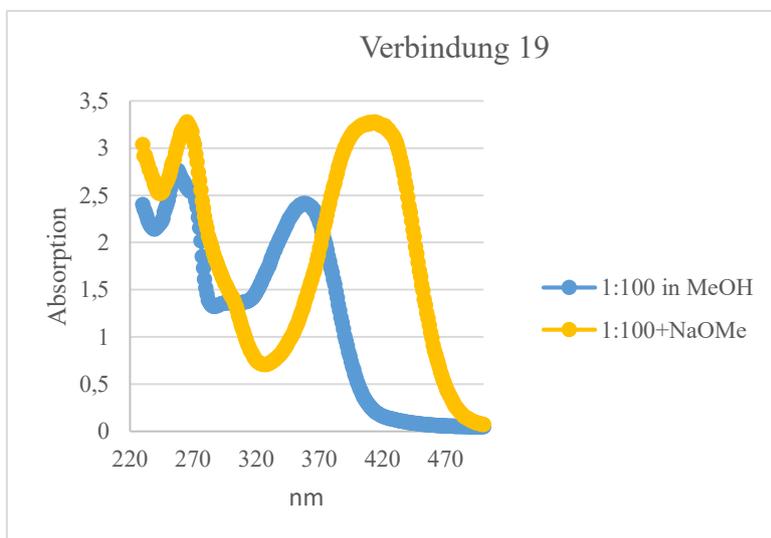
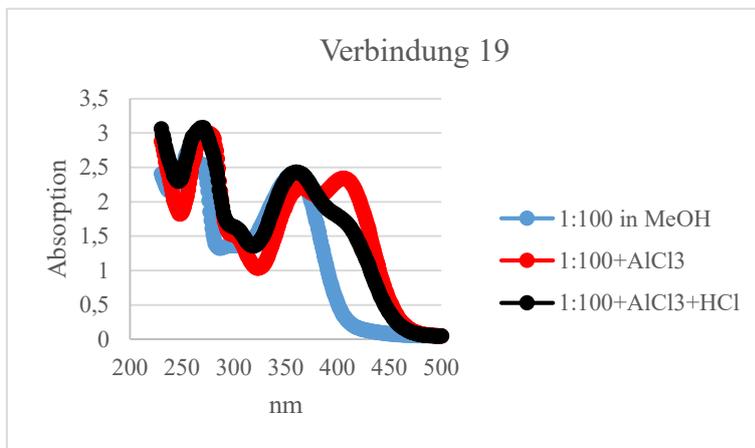
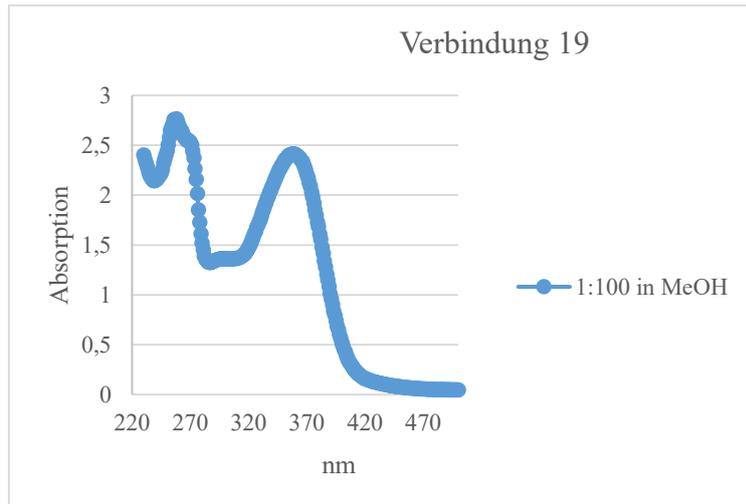


Abbildung 157: UV-Spektren von Verbindung 19 mit verschiedenen Shiftreagenzien

**Tabelle 24:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **19** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	19		Vergleich mit Literatur		
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (100 MHz) [134]	$^1\text{H}$ (80 MHz) [135]	$^1\text{H}$ (400 MHz) [131]
<b>2</b>	-	155.73	-	-	-
<b>3</b>	-	138.83	-	-	-
<b>4</b>	-	n.d.	-	-	-
<b>5</b>	-	161.73	-	-	-
<b>6</b>	6.34 d (2.1)	98.28	6.35 d (2)	6.30 s	6.35 d (2.2)
<b>7</b>	-	164.63	-	-	-
<b>8</b>	6.43 d (2.1)	92.85	6.44 d (2)	6.51 s	6.40 d (2.3)
<b>9</b>	-	156.57	-	-	-
<b>10</b>	-	105.59	-	-	-
<b>1'</b>	-	n.d.	-	-	-
<b>2'</b>	7.69 d (2.0)	111.03	7.6-7.7 m	7.55 dd	7.68 d (2.0)
<b>3'</b>	-	146.24	-	-	-
<b>4'</b>	-	148.43	-	-	-
<b>5'</b>	7.03 d (8.4)	114.45	7.04 d	6.82 d	7.0 d (9.0)
<b>6'</b>	7.65 dd (8.4; 2.0)	122.42	7.6-7.7 m	7.61 s (br.)	7.7 dd (9.0;2.0)
<b>1''</b>	4.56 d (6.7)	65.49	4.58 d (7.0)	4.60 d	4.60 d (6.5)
<b>2''</b>	5.47 ddt (6.7;5.3;1.4)	118.48	5.5 m	5.2 m	5.5 t (6.5)
<b>3''</b>	-	139.26	-	-	-
<b>4''</b>	1.80 s	25.84	1.82 s	1.65 s	1.80 s
<b>5''</b>	1.75 s	18.17	1.78 s	1.65 s	1.76 s
<b>3-OMe</b>	3.84 s	60.15	n.a.	3.80 s	3.85 s
<b>3'-OMe</b>	3.96 s	56.12	n.a.	3.91 s	4.00 s
<b>C-5-OH</b>	12.60 s	-	12.20 s	-	-
<b>C-4'-OH</b>	5.98 s	-	-	-	-

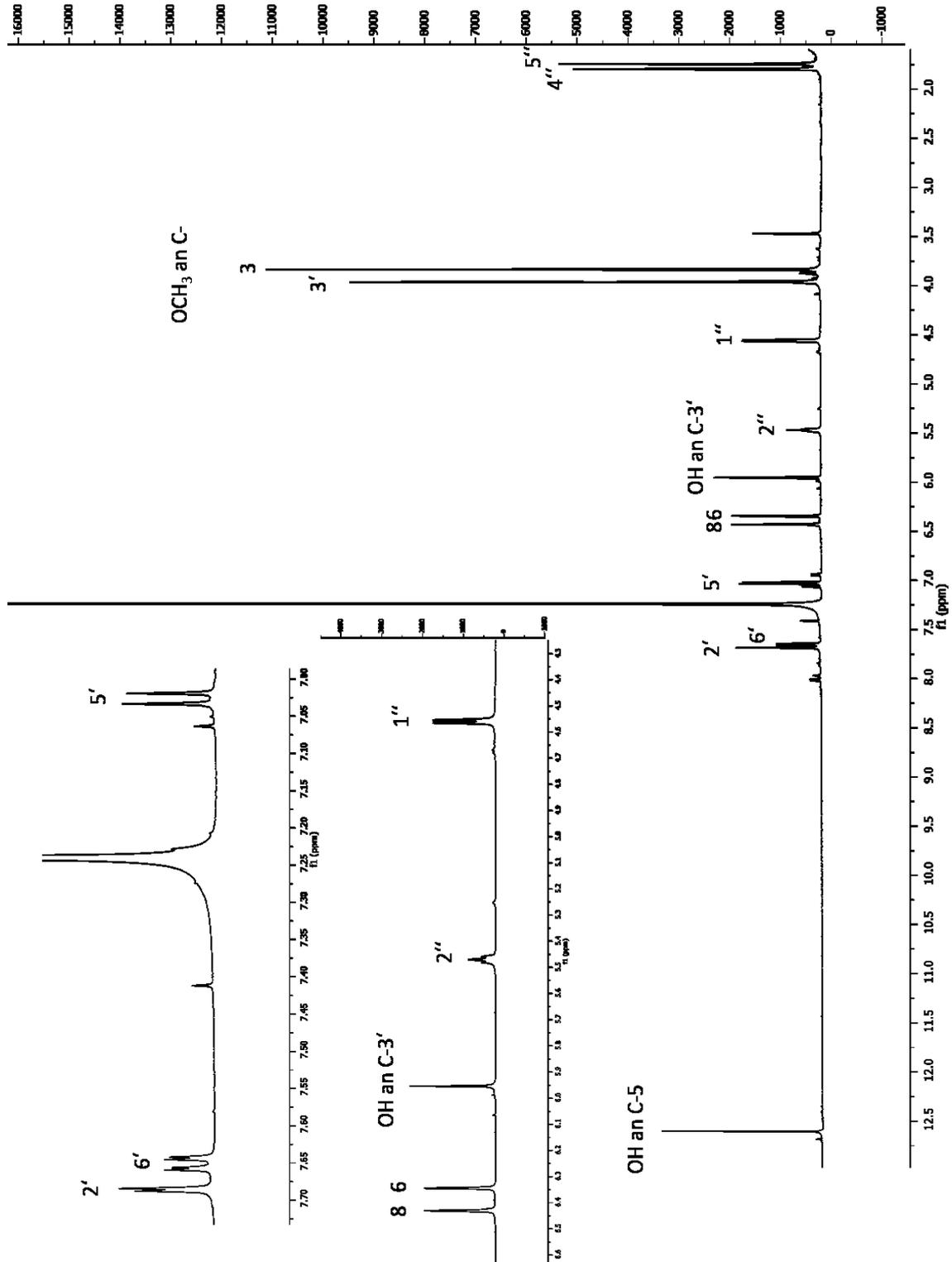


Abbildung 158:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **19** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

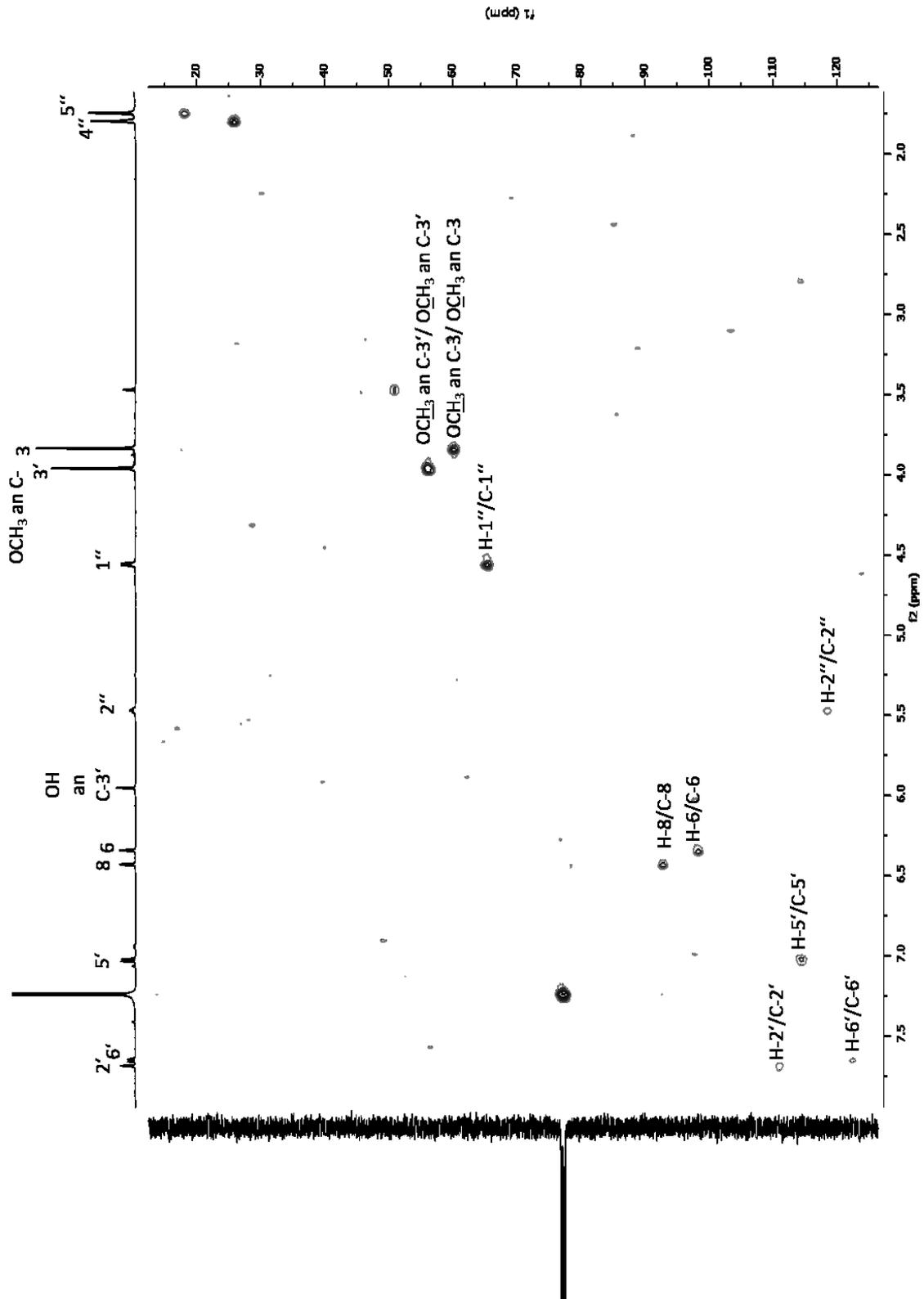


Abbildung 159: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 19 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

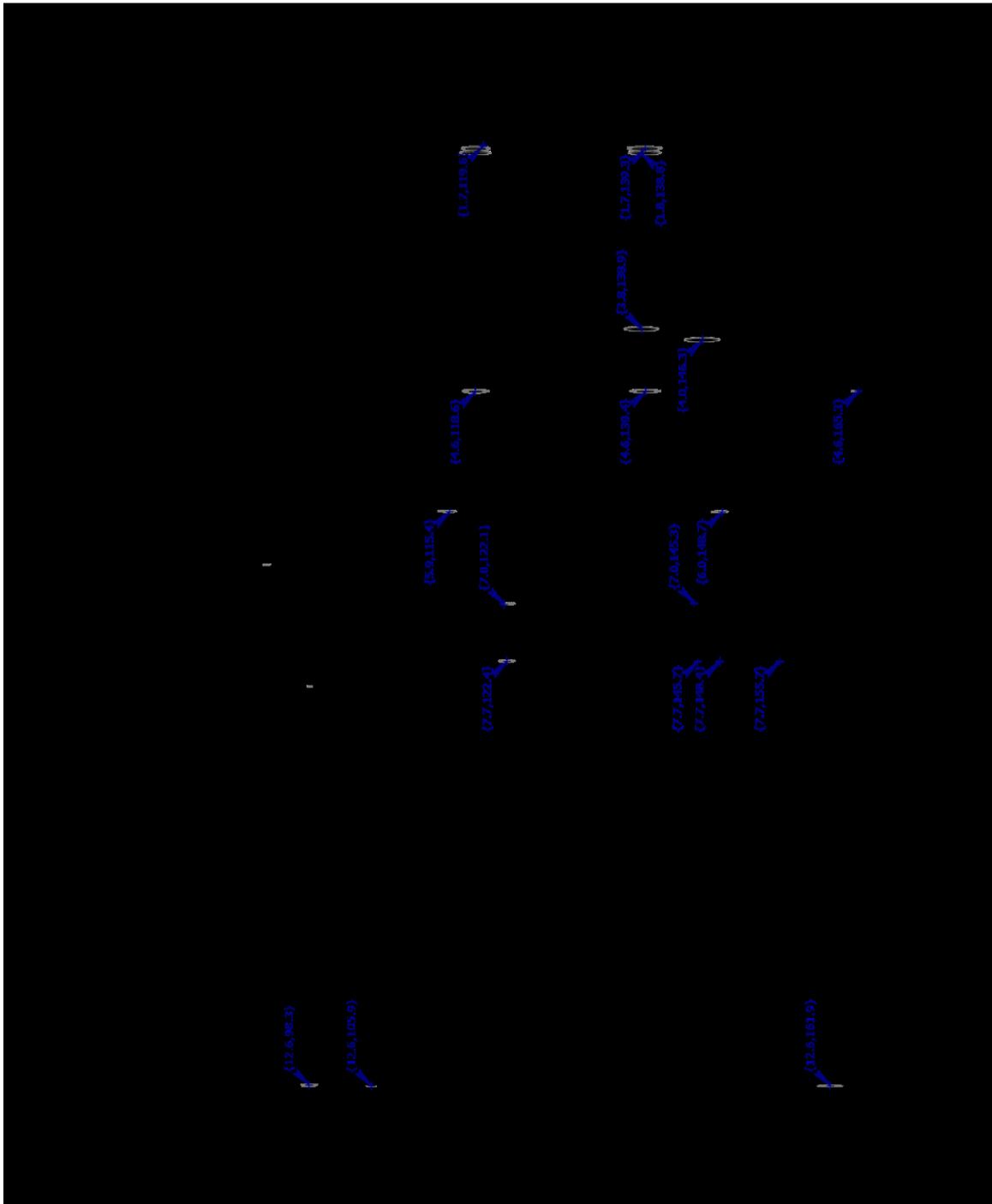


Abbildung 160: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 19 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

**Tabelle 25:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **19** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

Position	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>18</b>
2	-	150.12	-	149.95
3	-	137.87	-	137.70
4	-	n.d.	-	n.d.
5	-	n.d.	-	161.24
6	6.35 s (br.)	97.95	6.20 d (2.1)	98.38
7	-	164.21	-	164.00
8	6.78 s (br.)	92.67	6.48 d (2.1)	93.63
9	-	n.d.	-	156.27
10	-	n.d.	-	104.19
1'	-	120.52	-	121.89
2'	7.67 d (2.1)	112.04	7.64 d (2.2)	111.78
3'	-	147.60	-	147.12
4'	-	155.59	-	155.38
5'	6.97 d (8.7)	115.70	6.96 d (8.4)	115.51
6'	7.62 dd (8.7; 2.1)	122.33	7.58 dd (8.4; 2.2)	121.93
1''	4.64 d (6.8)	65.32		
2''	5.46 t (6.8)	118.98		
3''	-	138.23		-
4''	1.76 s	25.43		-
5''	1.73 s	18.07		-
3-OMe	3.81 s	59.71	3.80 s	59.59
3'-OMe	3.86 s	55.76	3.86 s	55.15
C-5-OH	12.66 s	-	12.68 s	-
C-4'-OH	8.41 s	-	9.91 s	-

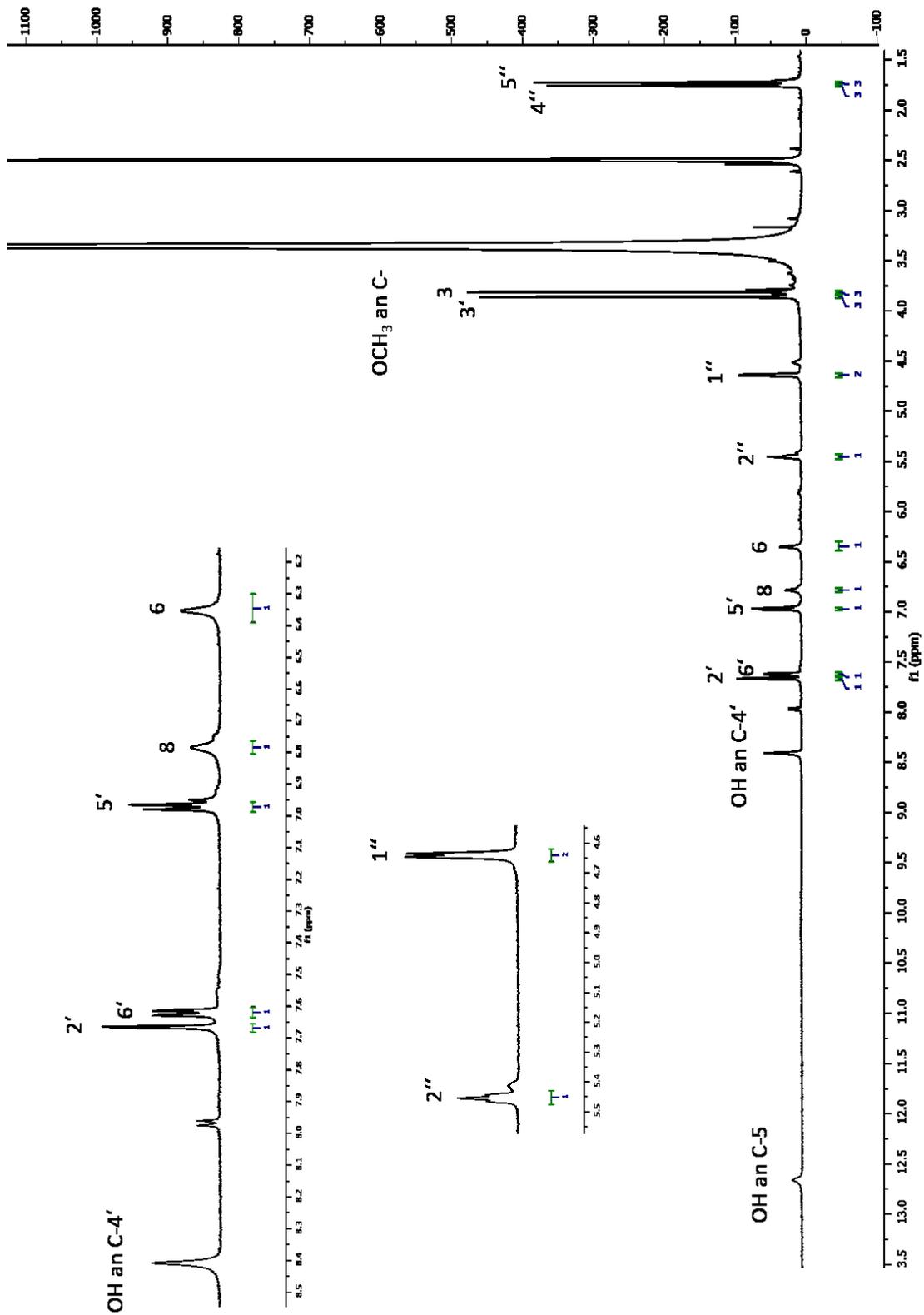


Abbildung 161:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **19** (600 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

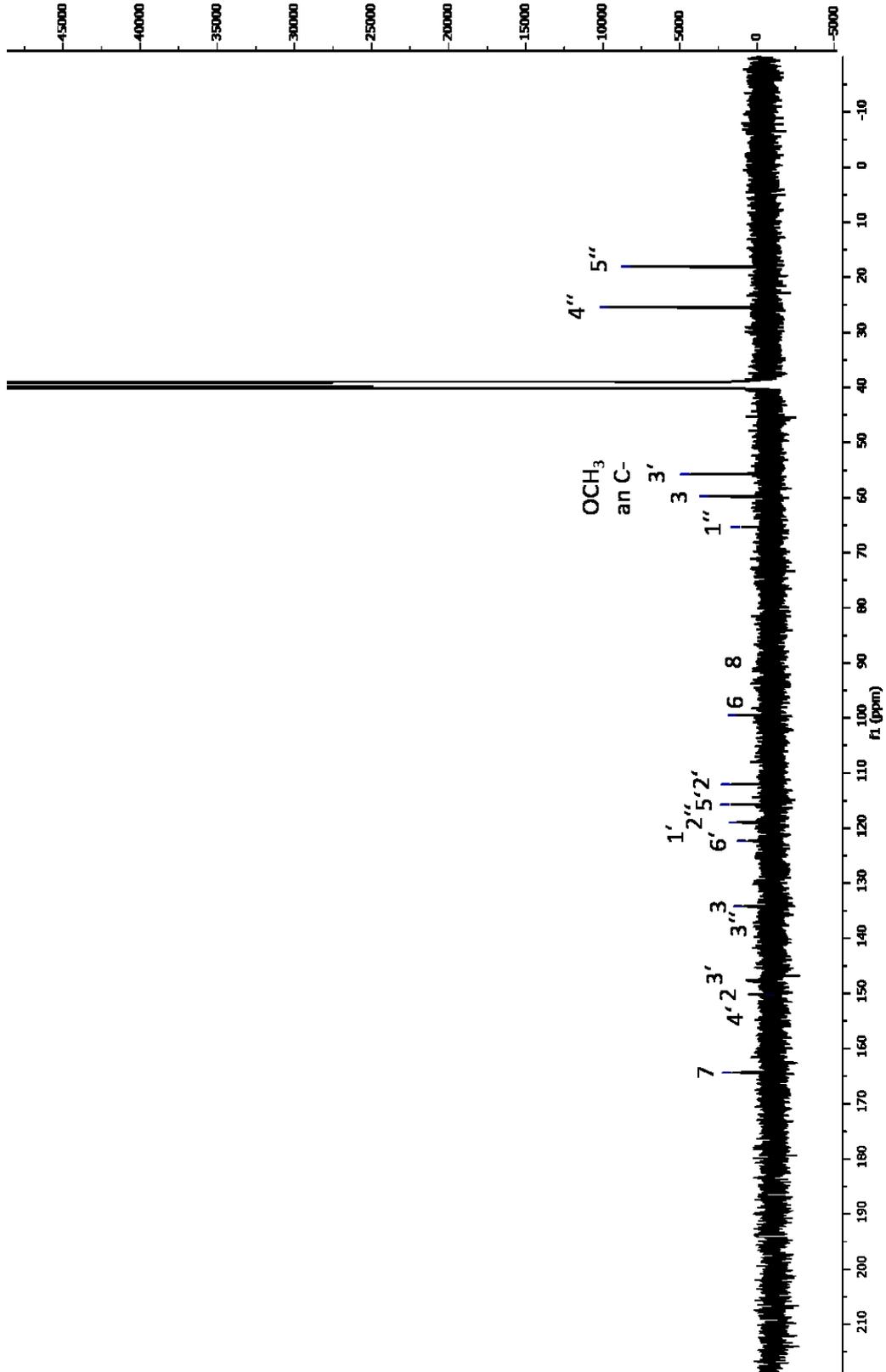


Abbildung 162:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von Verbindung 19 (150 MHz in DMSO- $d_6$ )

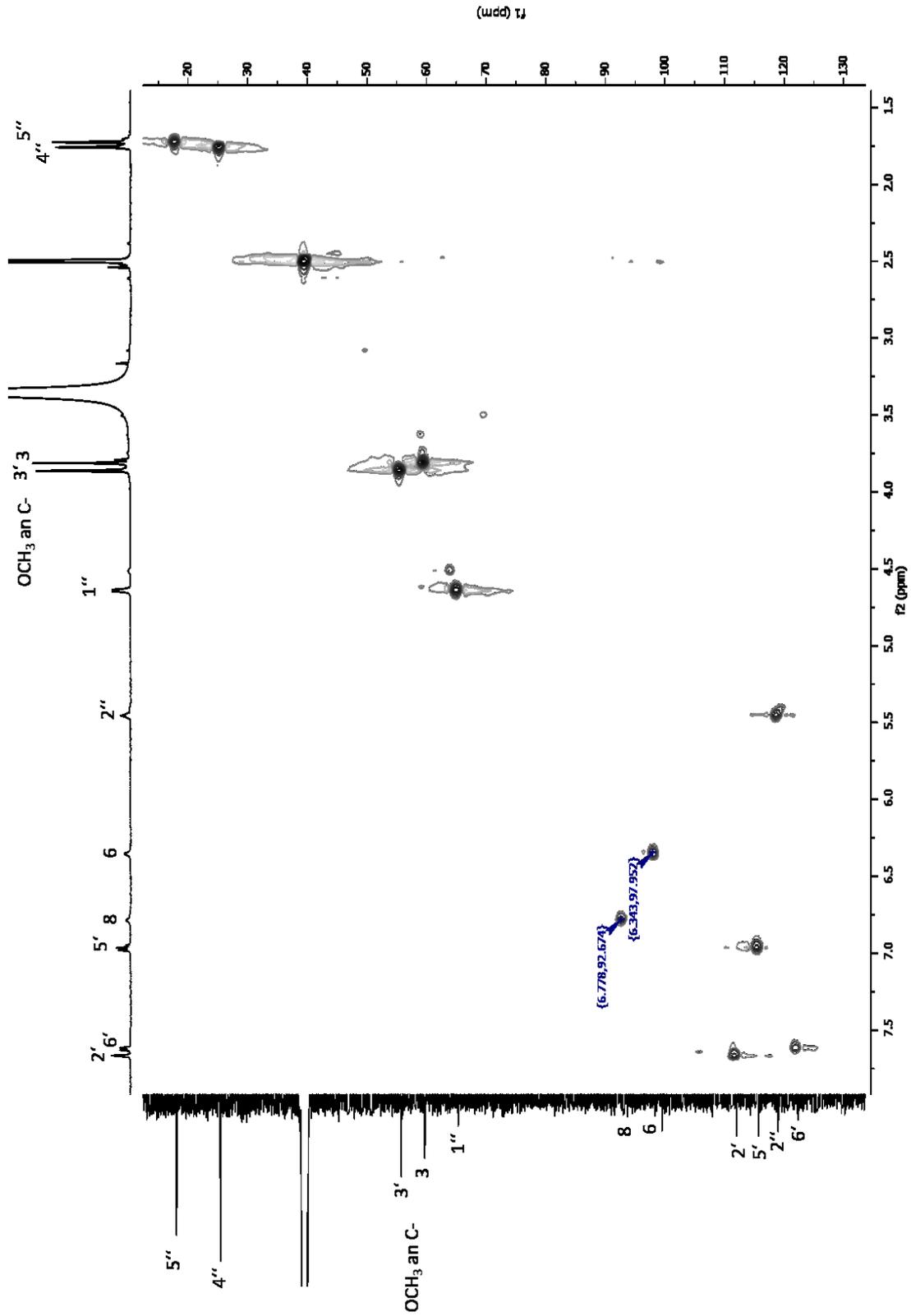
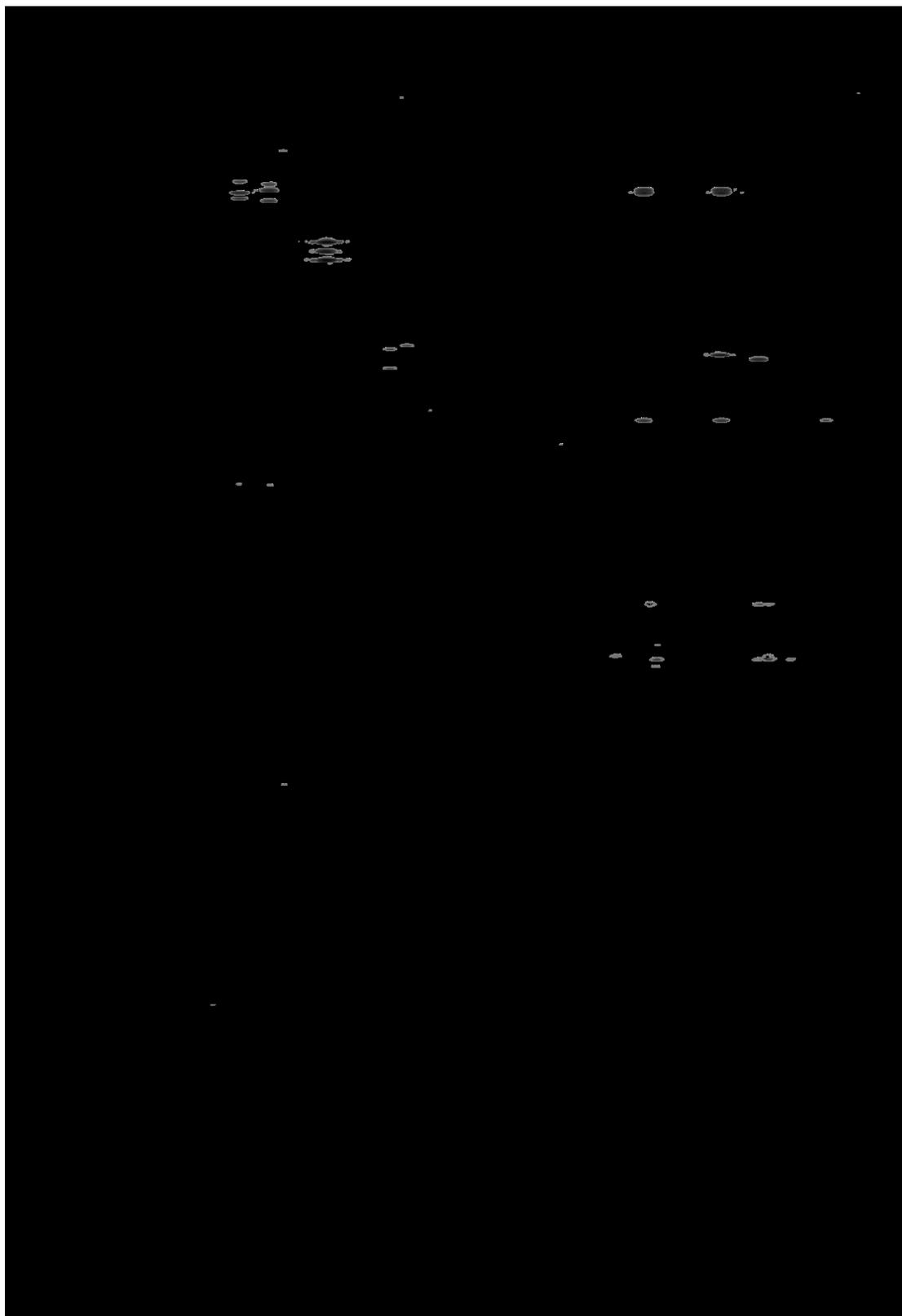


Abbildung 163: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 19 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)



**Abbildung 164:** 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung **19** (600MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

## 2.13 Verbindung 20 (Melisimplexin)

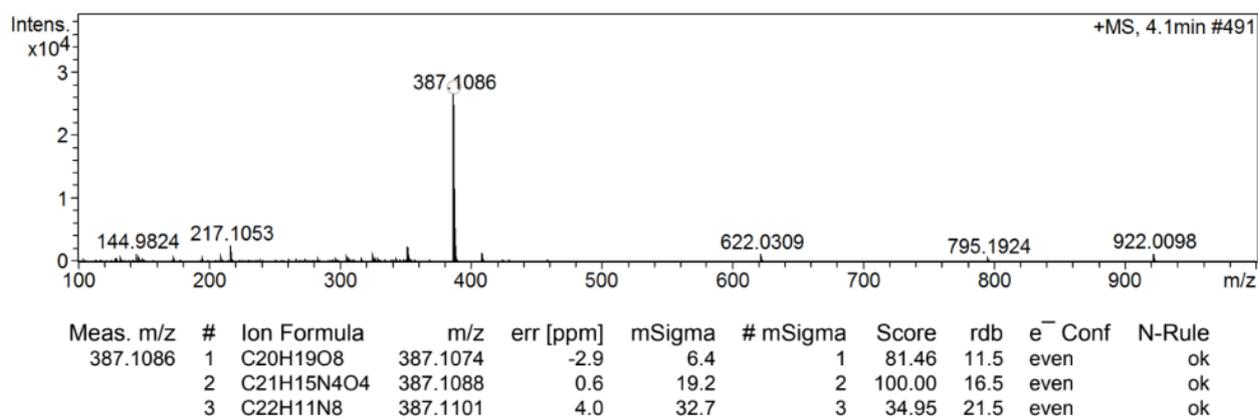
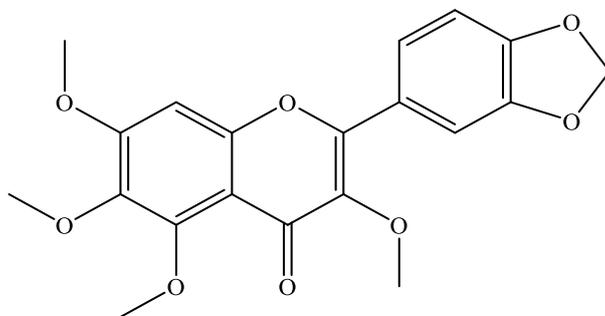


Abbildung 165: HRESIMS von Verbindung 20

Eine weitere Verbindung, bei der es sich aufgrund der chromatographischen Eigenschaften ebenfalls um ein Flavonoid handeln musste, konnte in einer Ausbeute von 1,5 mg aus der Fraktion MB-D-VIII-6 isoliert werden. Im hochauflösenden Massenspektrum (s. Abbildung 165) fand sich ein Molekülion bei  $m/z = 387.1070$   $[M+H]^+$ , woraus sich die Summenformel  $C_{20}H_{18}O_8$  für die unprotonierte Verbindung errechnen ließ. Verbindung 20 war damit um 30 Masseneinheiten leichter als Melibentin (11), woraus geschlossen werden konnte, dass sie vermutlich eine Methoxygruppe weniger besitzt.

Im anschließend aufgenommenen Protonenspektrum (s. Abbildung 167 und Tabelle 26) waren die Signale für insgesamt 18 Protonen zu erkennen. Wie bei 11 fand sich auch hier ein ABX-

System für die 3 Protonen des B-Rings bei  $\delta = 7.68$  (dd, H-6'), 7.60 (d, H-2') und 6.94 ppm (d, H-5') bei fast identischen Shiftwerten wie sie für Melibentin ermittelt worden waren. Dementsprechend wurde auch im Spektrum von **20** ein 2-Protonensingulett bei  $\delta = 6.06$  ppm gefunden, was die im Vergleich zu **11** identische Substitution des B-Rings mit einer 3',4'-Methylenedioxygruppe beweist. Wie bereits angenommen besitzt Verbindung **20** nur vier Methoxygruppen, deren Signale bei  $\delta = 4.01$ , 3.97, 3.92 und 3.87 ppm im Spektrum auftraten. Wie **11** besitzt auch Verbindung **20** keine freie OH-Gruppe an C-5, da kein OH-Signal im tiefen Feld registriert werden konnte. Ein zusätzliches Proton findet sich bei  $\delta = 6.75$  ppm als Singulett. Ein Vergleich mit den Shiftwerten der Methoxygruppen von **11** zeigt, dass im Spektrum von **12** ein Methoxysignal weniger auftritt. Es fehlt entweder die Methoxygruppe an C-6 oder C-8. Das Signal bei  $\delta = 6.75$  ppm ist daher entweder dem H-6 oder dem H-8 zuzuordnen.

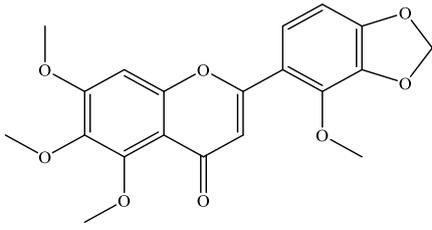
**Tabelle 26:**  $^1\text{H-NMR}$  Daten von Verbindung **20** ( $\delta$  ppm (J in Hz), 600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

	<b>20</b>	<b>Literaturwerte nach [102]</b>
<b>Position</b>	<b><math>^1\text{H}</math> (J in Hz)</b>	<b><math>^1\text{H}</math> (J in Hz)</b>
8	6.74 s	6.73
2'	7.60 d (1.65)	7.59
5'	6.94 d (8.25)	6.93
6'	7.68 dd (8.25, 1.65)	7.67
3-OMe	3.87 s	3.86
5-OMe	4.01 s	4.00
6-OMe	3.97 s	3.96
7-OMe	3.92 s	3.91
OCH <sub>2</sub> O	6.06 s	6.06

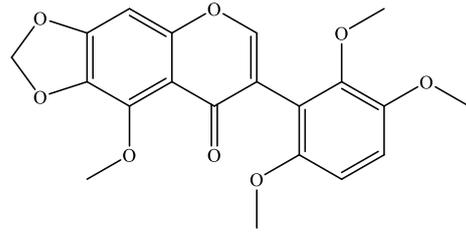
Eine Literaturrecherche in den Chemical Abstracts ergab, dass bisher sieben Flavonoide und Isoflavonoide mit der Summenformel  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_8$  in der Natur gefunden worden sind (s. Abbildung 166). [49] Fünf dieser Verbindungen besitzen eine Methylenedioxygruppe im Molekül, aber nur bei zwei dieser sieben Flavonoide können drei aromatische Protonen ein ABX-Spinsystem aufbauen. Für diese beiden, aus *Melicope triphylla* isolierten, Verbindungen mit den CAS-Nummern 569-18-6 (Meliternin) und 479-77-6 (Melisimplexin) wurden von Jong und Wu (1989) die  $^1\text{H-NMR}$  Daten in  $\text{CDCl}_3$  und Benzol- $d_6$  veröffentlicht. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um Desmethoxyderivate des Melibentins (**11**), denen entweder

die Methoxygruppe an C-6 (Meliternin) oder C-8 (Melisimplexin) fehlt. [102] Ein Vergleich der in der Zeitschrift *Phytochemistry* veröffentlichten Daten mit den hier von **20** ermittelten Shiftwerten zeigt, dass es sich bei **20** um das Melisimplexin mit einer 5,6,7-Trimethoxysubstitution am A-Ring handeln muss (s. Tabelle 26 ). Das freie Proton am Kohlenstoff C-6 des 5,7,8-trimethoxylierten Meliternins kommt wegen der Nachbarschaft der Methoxygruppen am C-5 und C-7 bei  $\delta = 6.41$  ppm etwas hochfeldverschoben zur Resonanz. Die Signale der Methoxygruppen an C-8 bei Meliternin und an C-6 bei Melisimplexin unterscheiden sich dagegen kaum. [102]

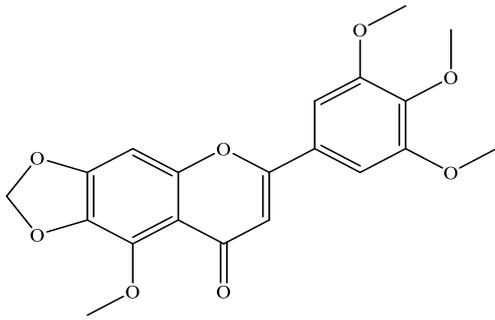
Melisimplexin wurde erstmals im Jahre 1950 aus *Melicope simplex* isoliert und identifiziert (Briggs et al, 1950). Daneben wurde dieses Flavonoid in fünf weiteren Species, *Melicope broadbentia*, *M. octandra*, *M. triphylla*, *M. ternata* und *M. subunifoliata* nachgewiesen [75,102,106,107,136]. Melisimplexin, das auch hinsichtlich seiner pharmakologisch-biologischen Eigenschaften getestet wurde [105,106], wurde hier erstmals aus *M. barbiger* isoliert, die damit die siebte Species ist, in der diese Verbindung gefunden wurde.



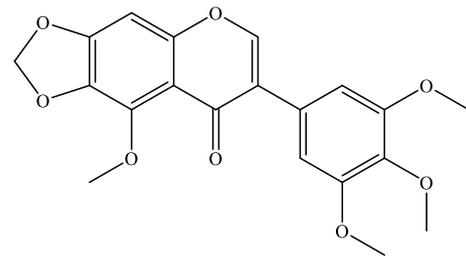
89029-10-7



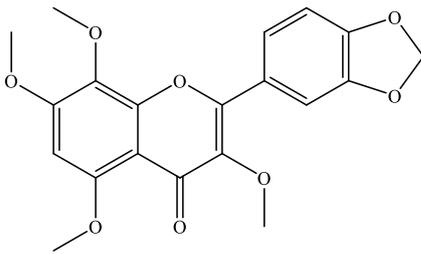
771531-46-5



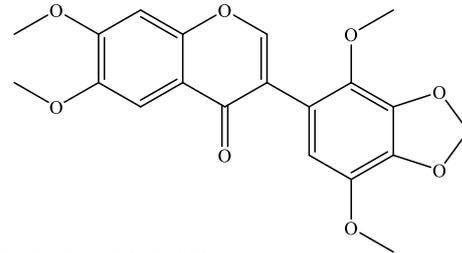
123185-74-1



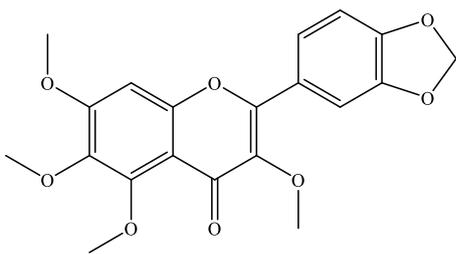
41743-73-1 (Irisflorentin)



569-18-6 (Meliternin)



943724-06-9 (Glaziovianin A)



479-77-6 (Melisimplexin)

Abbildung 166: Natürlich vorkommende Flavonoide mit der Summenformel  $C_{20}H_{18}O_8$

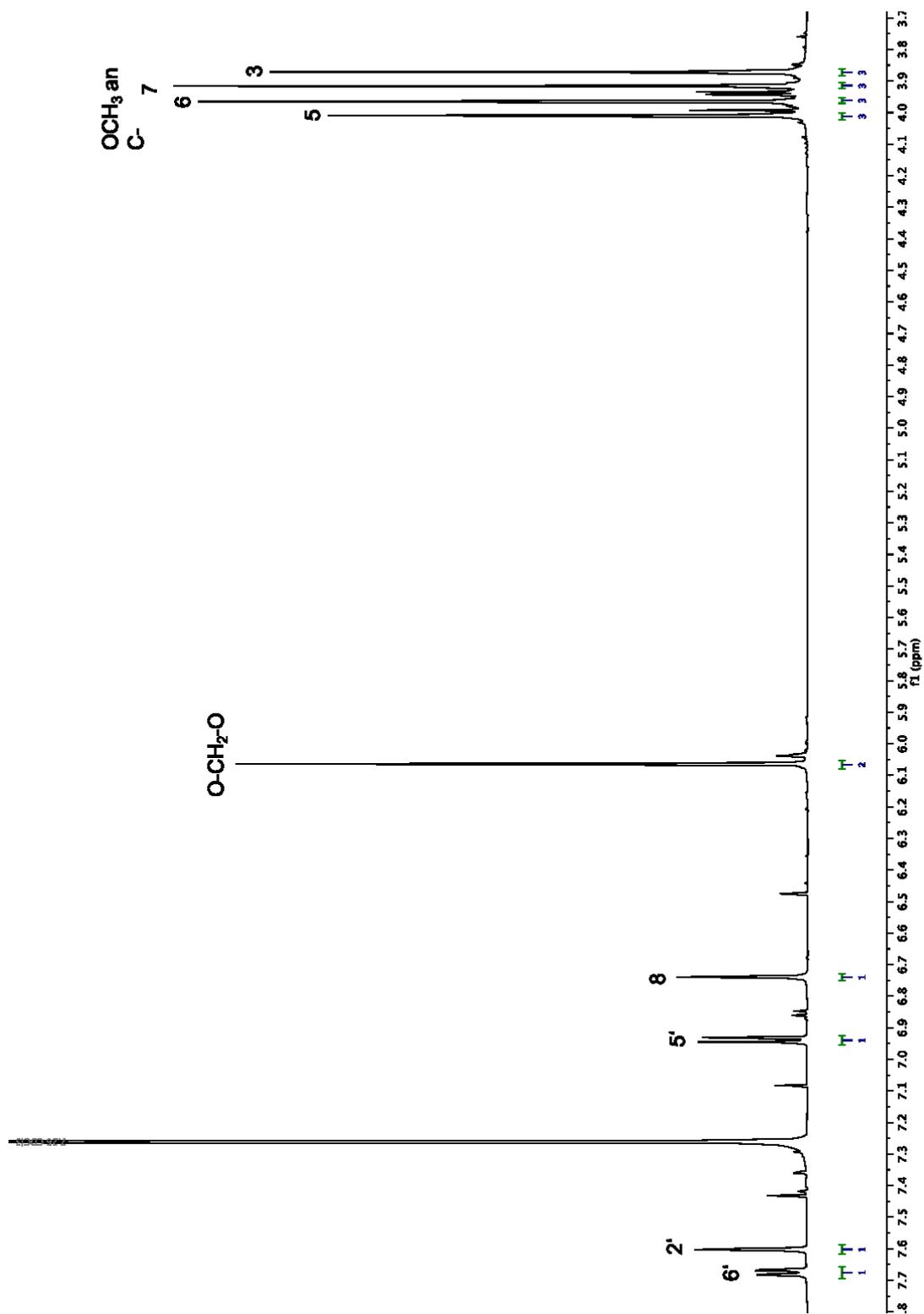
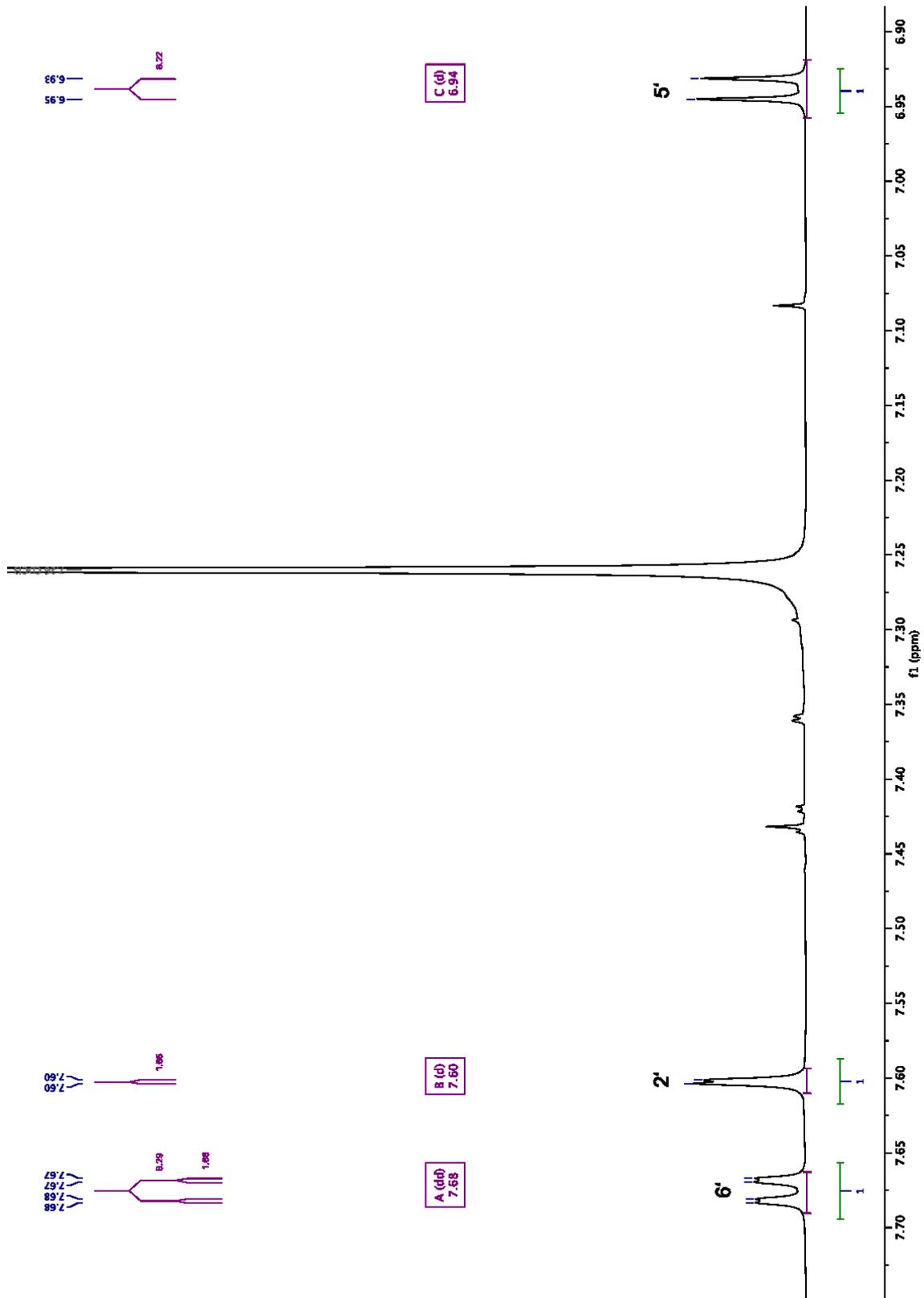


Abbildung 167:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **20** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



**Abbildung 168:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von Verbindung **20** (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

## 2.14 Verbindung **21** und **22**

Bei der Überprüfung des Methanolextraktes auf weitere hydrophilere Flavonoidglyka wurden die Verbindungen **21** und **22** als Gemisch aus der Subfraktion MB.M.IV in einer Ausbeute von 3,5 mg isoliert. Wie sich später bei der Auswertung der NMR-Spektren herausstellte, war Verbindung **21** als Hauptkomponente zu etwa 15 % mit Verbindung **22** verunreinigt. Im HRESIMS Massenspektrum fand sich nur ein Molekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z = 595.1448$  ( $C_{31}H_{23}N_4O_9$ ) woraus geschlossen werden konnte, dass es sich um zwei massengleiche, isomere Verbindungen handeln musste.

Die endgültige Aufklärung der Strukturen von **21** und **22** gelang mit Hilfe der NMR Spektroskopie (Abbildung 170, bis Abbildung 178 und Tabelle 27 für **21**). Im  $^1H$  NMR Spektrum von **21** fanden sich die Signale für 26 Protonen, die in einigen Fällen von den kleineren Signalen der Nebenkomponekte **22** flankiert wurden. In anderen Fällen überlagerten sich die Signale der Haupt- und Nebenkomponekte, was am etwas größeren Integral erkannt werden konnte, das sich aus der Addition der beiden Signale ergab. Aufgrund dieser Verhältnisse konnte ermittelt werden, dass **21** zu 15 % mit **22** verunreinigt vorlag. Zwei Protonensignale bei ca. 3.1 und 4.1 ppm wurden durch einen kleinen Rückstand von Methanol verursacht und nicht weiter beachtet. [137] Sieben der 26 Protonen besaßen keine Korrelation mit einem Kohlenstoff im HSQC-Spektrum (Abbildung 174), weshalb sie als Hydroxylprotonen erkannt wurden. Bei den Signalen bei  $\delta = 12.57, 10.85$  und  $10.16$  und  $10.01$  ppm handelt es sich um Singulets, was diese Hydroxylgruppen in Verbindung mit dem charakteristischen Shiftbereich als phenolische OH-Gruppen identifiziert. Die drei übrigen Hydroxysignale bei  $\delta = 5.45, 5.23$  und  $5.18$  ppm spalten jeweils zum Dublett auf, was sie als sekundäre aliphatische Alkohole ausweist. Die zugehörigen Methinprotonen finden sich in einem sehr engen Shiftbereich bei 3.26, 3.22 und 3.18 ppm als Multipllett für jeweils ein Proton. Aufgrund der Korrelationen dieser OH- und Methinprotonen mit den Kohlenstoffsignalen in den HSQC- und HMBC-Spektren (Abbildung 174 und Abbildung 175) wird deutlich, dass es sich um drei nebeneinanderliegende hydroxylierte Kohlenstoffe eines Zuckermoleküls handeln muss. Weitere Korrelationen zu einem direkt neben einem der Hydroxysignale liegenden Dublett bei  $\delta = 5.45$  ppm ( $\delta_C = 100.95$ ), bei dem es sich um das anomere Proton am C-1“ einer Glucose handelt, einem Multipllett für ein Proton bei  $\delta = 3.38$  ppm ( $\delta_C = 74.22$ , C-5“) und zwei Dubletts vom Dublett einer Methylengruppe bei  $\delta = 4.27$  und  $4.03$  ppm ( $\delta_C = 62.96$ , C-6“) komplettieren die Signale der an einem Flavonoid gebundenen Glucose. Über zwei der vier im Spektrum vorhandenen Hydroxylsignale bei  $\delta = 12.57$  (OH an C-5) und  $10.85$  ppm (OH an C-7), sowie deren  $^2J$  und  $^3J$ - Kopplungen im HMBC-Spektrum (Abbildung 175) lassen sich die

Kohlenstoffe C-5 ( $\delta_C = 161.15$ ), C-6 ( $\delta_C = 98.75$ ), C-7 ( $\delta_C = 164.15$ ), C-8 ( $\delta_C = 93.66$ ) und C-10 ( $\delta_C = 103.86$ ) eindeutig zuordnen. Die Protonen an C-6 ( $\delta_H = 6.15$ ) und C-8 ( $\delta_H = 6.38$ ) finden sich bei den typischen Shiftwerten für ein 5,7-dihydroxyliertes Flavonoid. Im Gegensatz zu vielen zuvor beschriebenen Verbindungen findet sich kein ABX-System für die drei Protonen des B-Rings. Stattdessen finden sich vier prominente Dubletts für je zwei Protonen, die aufgrund der Kopplungen als zwei AA'BB'- Spinsysteme erkannt werden konnten. Dabei gehören die Signale bei  $\delta = 7.99$  und  $6.86$  ppm zu einem 1,4-disubstituierten Aromaten, während die anderen zwei Dubletts je zwei äquivalente, aromatische Protonen eines zweiten para-substituierten Phenylrings repräsentieren. Beide Aromaten tragen eine Hydroxylgruppe, über deren Kopplungen im HMBC die benachbarten Kohlenstoffe zugeordnet werden können (s. Abbildung 173, Tabelle 27 und Tabelle 29). So zeigt das OH-Proton bei  $\delta = 10.16$  ppm eine  $^2J$ -Kopplung zum quartären Kohlenstoff bei  $\delta = 159.99$  ppm (C-4') und eine  $^3J$ -Kopplung zum Signal der beiden äquivalenten, direkt benachbarten Kohlenstoffen bei  $\delta = 115.08$  ppm (C-3', C-5'). Das zugehörige Dublett für zwei Protonen (H-3', H-5') findet sich bei  $\delta = 6.86$  ppm und koppelt mit dem am weitesten tieffeldverschobenen Dublett bei  $\delta = 7.99$  ppm (H-2', H-6'). Dieses Signal zeigt neben dem Crosspeak zu C-4' ein weiteres Kreuzsignal im HMBC zum quartären Kohlenstoff bei  $\delta = 156.43$  ppm, der aufgrund der charakteristischen Lage als C-2 eines Flavonols erkannt wurde. Die Zuordnung der Signale des anderen Aromaten lassen sich über das H-4'' bei  $\delta = 10.01$  ppm in gleicher Art zuordnen. Die Protonen H-2'' und H-6'', deren Dublett bei  $\delta = 7.37$  ppm registriert wurde, zeigen  $^3J$ -Kopplungen zum Kohlenstoff C-4'' ( $\delta_C = 159.79$ ) und zum sp<sup>2</sup>-hybridisierten Kohlenstoff C-7'' der Seitenkette bei  $\delta = 144.60$  ppm, dessen Proton ( $\delta_H = 7.34$  ppm) mit einer Kopplungskonstanten (J) von ca. 16 Hz mit einem zweiten Proton ( $\delta_H = 6.11$  ppm, H-8'') einer trans-konfigurierten Doppelbindung koppelt. Sowohl H-7'' als auch H-8'' zeigen Kopplungen im HMBC mit dem Carbonylkohlenstoff C-9'' ( $\delta_C = 166.16$  ppm), wodurch erkannt wurde, dass der zweite Phenylring zu einer trans-4-Hydroxymtsäure gehört. Aufgrund der Korrelation zwischen den beiden Protonen an H-6'' der Glucose und dem C-9'' der Zimtsäure konnte die Position des Esters am C-6'' der Glucose eindeutig nachgewiesen werden. Der Zucker wiederum ist am C-3-OH des Flavonols glykosidisch gebunden. Die zugehörige Korrelation zwischen dem anomeren Proton der Glucose ( $\delta_H = 5.45$  ppm) und dem C-3 ( $\delta_C = 133.05$  ppm) findet sich ebenfalls im HMBC Spektrum.

Bei Verbindung **20** handelte es sich somit um das an C-4 der Glucose mit der *trans*-p-Cumarsäure veresterte 3-O-Glykosid des Kämpferols, welches man auch als Astragalin-6''-*trans*-p-cumarat bezeichnen kann. Diese Verbindung ist auch unter dem Trivialnamen Tilirosid

bekannt. Die Verbindung wurde bereit 1959 von [138] aus *Tilia argentea* isoliert und identifiziert. Die Chemical Abstracts listet 929 Literaturstellen zum Stichwort trans-Tiliosid. [49] Über das Vorkommen in der Familie der Rutaceae und somit auch in der Gattung *Melicope* wurde bisher nicht berichtet.

Wie bereits eingangs erwähnt, war Verbindung **21** zu etwa 15 % mit einer sehr ähnlichen Verbindung verunreinigt. In Abbildung 170 ist das  $^1\text{H}$  NMR von **21** erneut abgebildet, beschriftet wurden dort jedoch die Signale der Nebenkompente **22**. Zielführend für die Aufklärung der Struktur, war das Dublett des H-7 $''''$  bei  $\delta = 6.67$  ppm, das mit einer um 3 Hz geringeren Kopplung zum H-8 $''''$  registriert wurde. H-8 $''''$  von **22** findet sich bei  $\delta = 5.46$  ppm, aber leider ist diese Signal mit den beiden Signalen von H-1 $''$  von **21** und **22** überlagert vorlag. Alle anderen Protonensignale waren nur geringfügig verschoben, wobei die Shiftwerte der Protonen des Cumaroylsubstituenten in **22** zu **21** am stärksten verschoben vorlagen. Es war klar zu erkennen, dass es sich auch in **22** um ein mit einer Glucose am C-3 verknüpftes Kämpferol handeln muss. Aufgrund der geringeren Kopplung zwischen den olefinischen Protonen H-7 $''''$  und H-8 $''''$  der Signale von **22**, war zu vermuten, dass es sich bei der in **22** am Zucker gebundenen Zimtsäure um die cis-Cumarsäure handeln könnte. Diese Substanz wurde von Timmers und Urban [139] zusammen mit Tiliosid (**21**) beschrieben. Die dort für cis-Tiliosid veröffentlichten Protonendaten für stimmen sehr gut mit den von uns gefundenen Werten überein (Abbildung 170 ). Wegen der Überlagerungen und des geringen Anteils von **22** am Gemisch der beiden Substanzen, wodurch nicht alle Kreuzsignale in den Korrelationsspektren vorhanden waren, konnten wir nicht alle Kohlenstoffsignale eindeutig zuordnen. Die von uns identifizierten Signale sind in Tabelle 29 aufgeführt und es besteht kein Zweifel daran, dass die restlichen Signale unter den Signalen von **21** versteckt sind. Bei Verbindung **22** handelt es sich somit um das Kämpferol 3-O-(6''-O-cis-p-coumaroyl)-O- $\beta$ -glucosid, das auch cis-Tiliosid bezeichnet wird. Diese Verbindung wurde 1995 erstmals von Budzianowski und Skrzypczak aus der weißen Taubnessel (*Lamium album*) isoliert. [140] Auch diese Substanz wurde bisher noch nicht in der Familie der Rutaceae und damit auch nicht in der Gattung *Melicope* gefunden.

2.14.1 Daten von **21** (trans-Tilirosid)

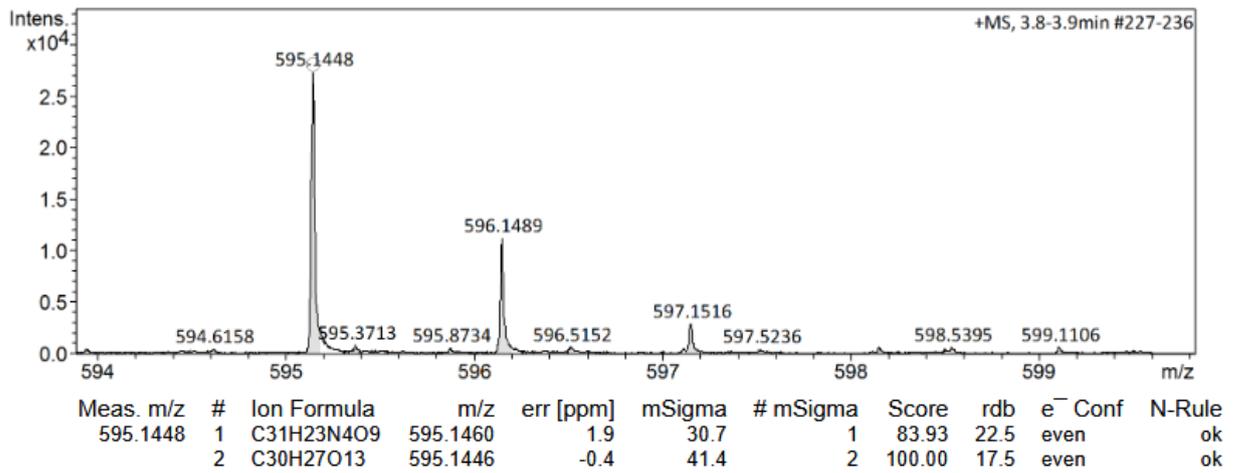
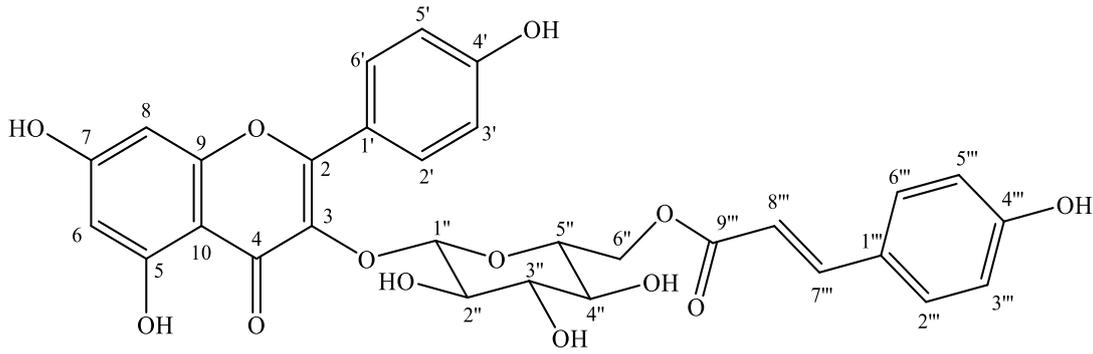


Abbildung 169: HRESIMS von Verbindung **21** und **22**

Tabelle 27: <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Daten von Verbindung **21** (δ in ppm, 600/150 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

Position	<b>21</b>		Literaturwerte nach [139]	
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	156.43	-	156.4
<b>3</b>	-	133.05	-	133.1
<b>4</b>	-	177.41	-	177.4
<b>5</b>	-	161.15	-	161.2
<b>6</b>	6.15 d (2.1)	98.75	6.15 d (2)	98.8
<b>7</b>	-	164.15	-	164.2
<b>8</b>	6.38 (2.1)	93.66	6.38 (2)	93.7
<b>9</b>	-	156.35	-	156.3
<b>10</b>	-	103.86	-	103.9
<b>1'</b>	-	120.75	-	120.8
<b>2'</b>	7.99 d (8.8)	130.9	7.98 dd (9, 1.5)	130.9
<b>3'</b>	6.86 d (8.8)	115.08	6.85 dd (9, 1.5)	115.1
<b>4'</b>	-	159.99	-	160.0
<b>5'</b>	6.86 d (8.8)	115.08	6.85 dd (9, 1.5)	115.1
<b>6'</b>	7.99 d (8.8)	130.82	7.98 dd (9, 1.5)	130.9
<b>1''</b>	5.45 d (7.5)	100.95	5.45 d (7.5)	101.0
<b>2''</b>	3.22 m	74.11	3.21 m	74.1
<b>3''</b>	3.26 m	76.21	3.24 m	76.2
<b>4''</b>	3.18 m	69.94	3.16 m	69.9
<b>5''</b>	3.38 m	74.22	3.37 m	74.2
<b>6''</b>	4.03 dd (11.9, 6.4) 4.27 dd (11.9, 2.2)	62.96	4.02 dd (12, 6.5) 4.26 dd (12, 1.5)	63.0
<b>1'''</b>	-	124.92	-	124.9
<b>2'''</b>	7.37 d (8.7)	130.15	7.37 d (8.5)	130.2
<b>3'''</b>	6.78 d (8.6)	115.74	6.78 d (8.5)	115.8
<b>4'''</b>	-	159.79	-	159.8
<b>5'''</b>	6.78 d (8.6)	115.74	6.78 d (8.5)	115.8
<b>6'''</b>	7.37 d (8.7)	130.15	7.37 d (8.5)	130.2
<b>7'''</b>	7.34 d (15.9)	144.60	7.34 d (16)	144.6
<b>8'''</b>	6.11 d (15.9)	113.63	6.12 d (16)	113.6
<b>9'''</b>	-	166.16	-	166.2
<b>5-OH</b>	12.57 s	-	12.58 s	-
<b>7-OH</b>	10.85 s	-	10.88 s	-
<b>4'-OH</b>	10.16 s	-	10.18 s	-
<b>2''-OH</b>	5.45 d (4.7)	-	5.48 d (4.5)	-
<b>3''-OH</b>	5.18 d (4.9)	-	5.19 d (5.5)	-
<b>4''-OH</b>	5.23 d (5.8)	-	5.24 d (4.5)	-
<b>4'''-OH</b>	10.01 s	-	10.05 s (br.)	-

**Tabelle 28:** 2D-HMBC-Korrelationen von Verbindung **21**

H	Korrelation mit
6	C-5, C-7, C-8, C-10,
8	C-6, C-7, C-9, C-10
2'	C-2, C-4', C-6'
3'	C-1', C-4', C-5',
5'	C-1', C-3', C-4'
6'	C-2, C-2', C-4'
1''	C-3, C-2''
2''	C-1'', C-3'', C-4''
3''	C-2'', C-4'', C-5''
4''	C-2'', C-3'', C-5'', C-6''
5''	C-1'', C-4'',
6''	C-5'', C-9'''
2'''	C-3''', C-4''', C-5''', C-6''', C-7'''
3'''	C-1''', C-4''', C-5'''
5'''	C-1''', C-3''', C-4''',
6'''	C-2''', C-3''', C-4''', C-5''', C-7'''
7'''	C-2''', C-6''', C-8''', C-9'''
8'''	C-1''', C-9'''
5-OH	C-5, C-6, C-10
7-OH	-
4'-OH	C-3', C-4'; C-5'
2''-OH	C-1'', C-2'', C-3''
3''-OH	C-2'', C-3'', C-4''
4''-OH	C-3'', C-4'', C-5''
4'''-OH	C-3''', C-4''', C-5'''

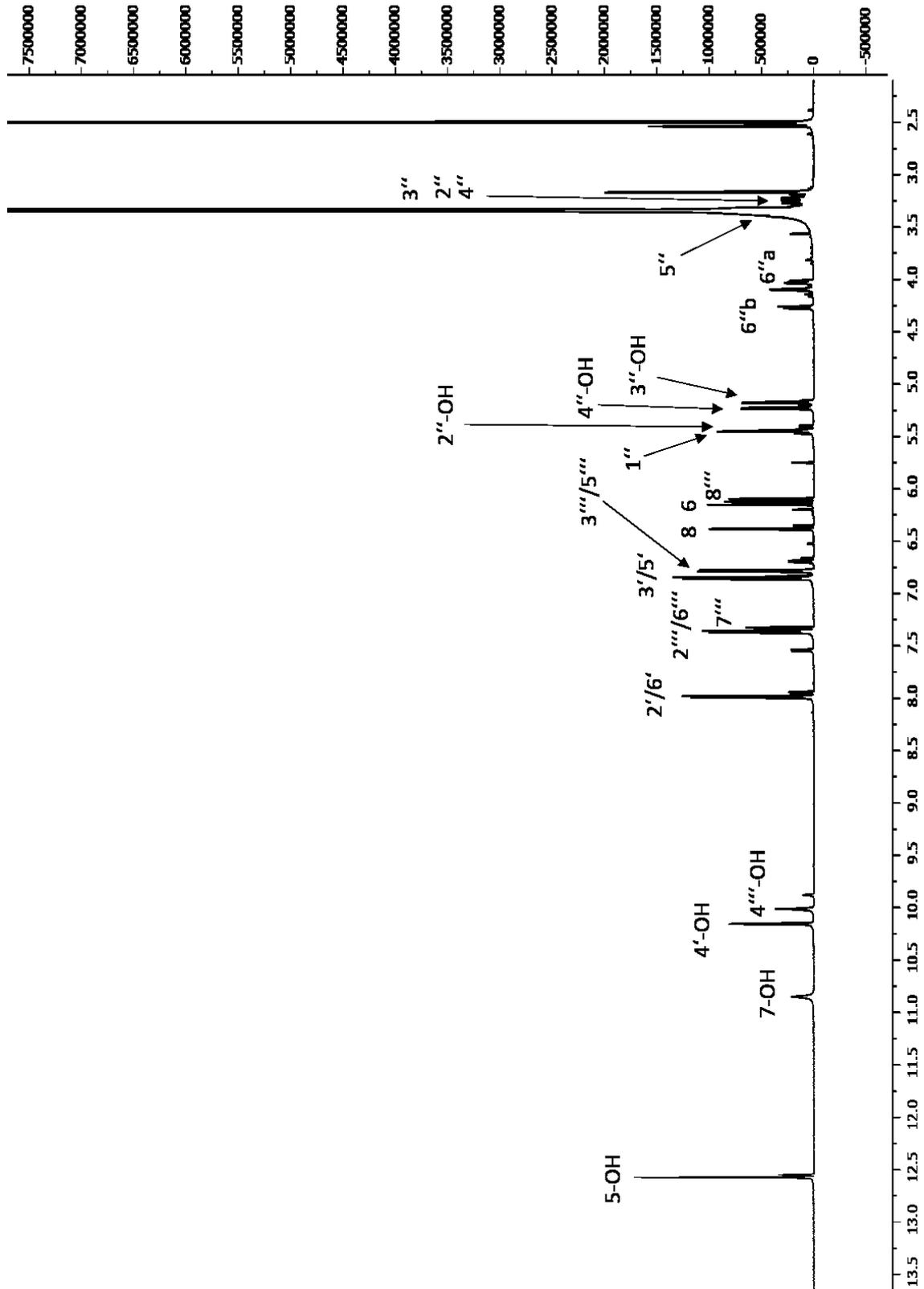
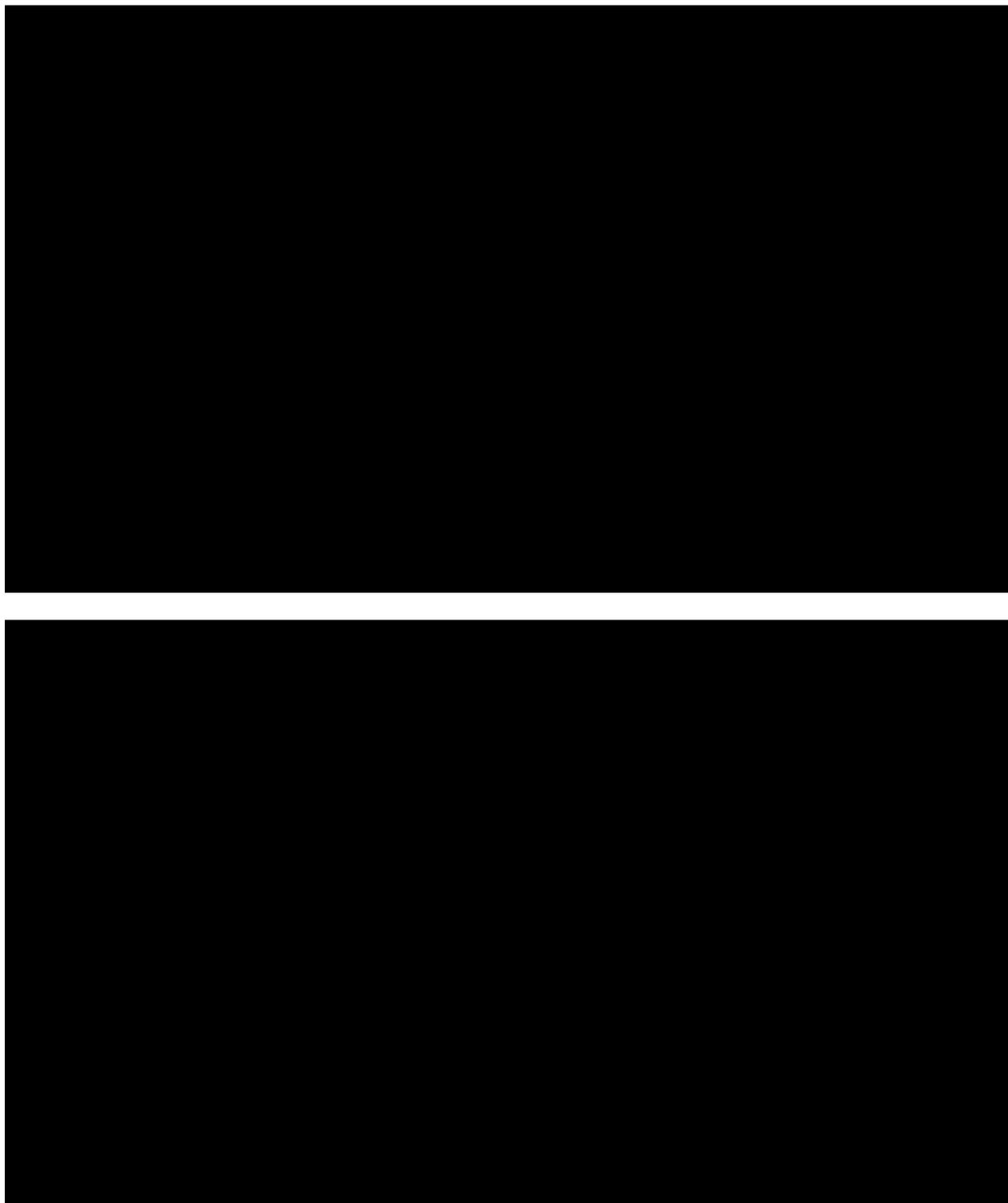


Abbildung 170:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 21 (600 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )



**Abbildung 171:** Ausschnitte aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **21** (600 MHz in DMSO- $d_6$ )

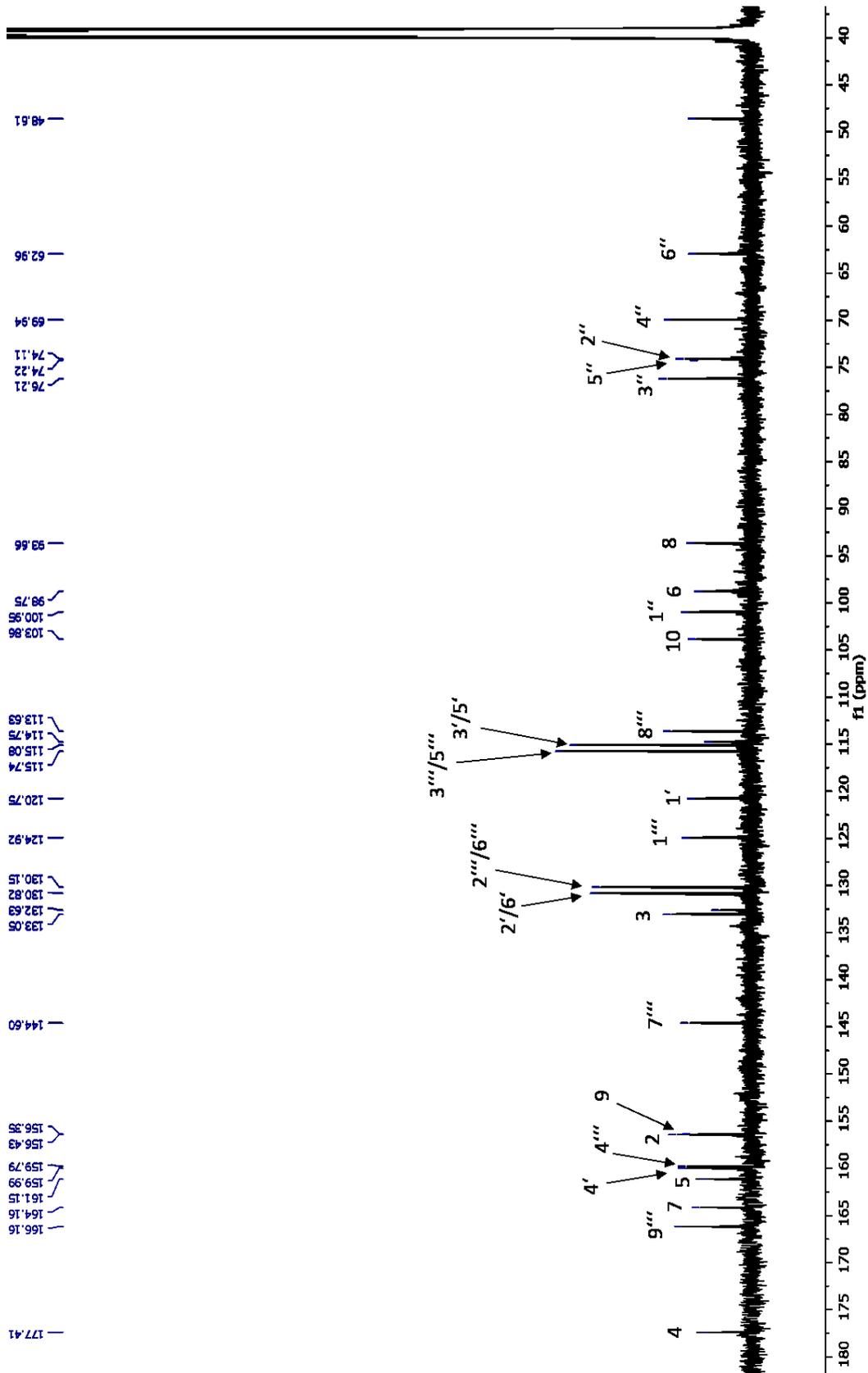


Abbildung 172:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 21 (150 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

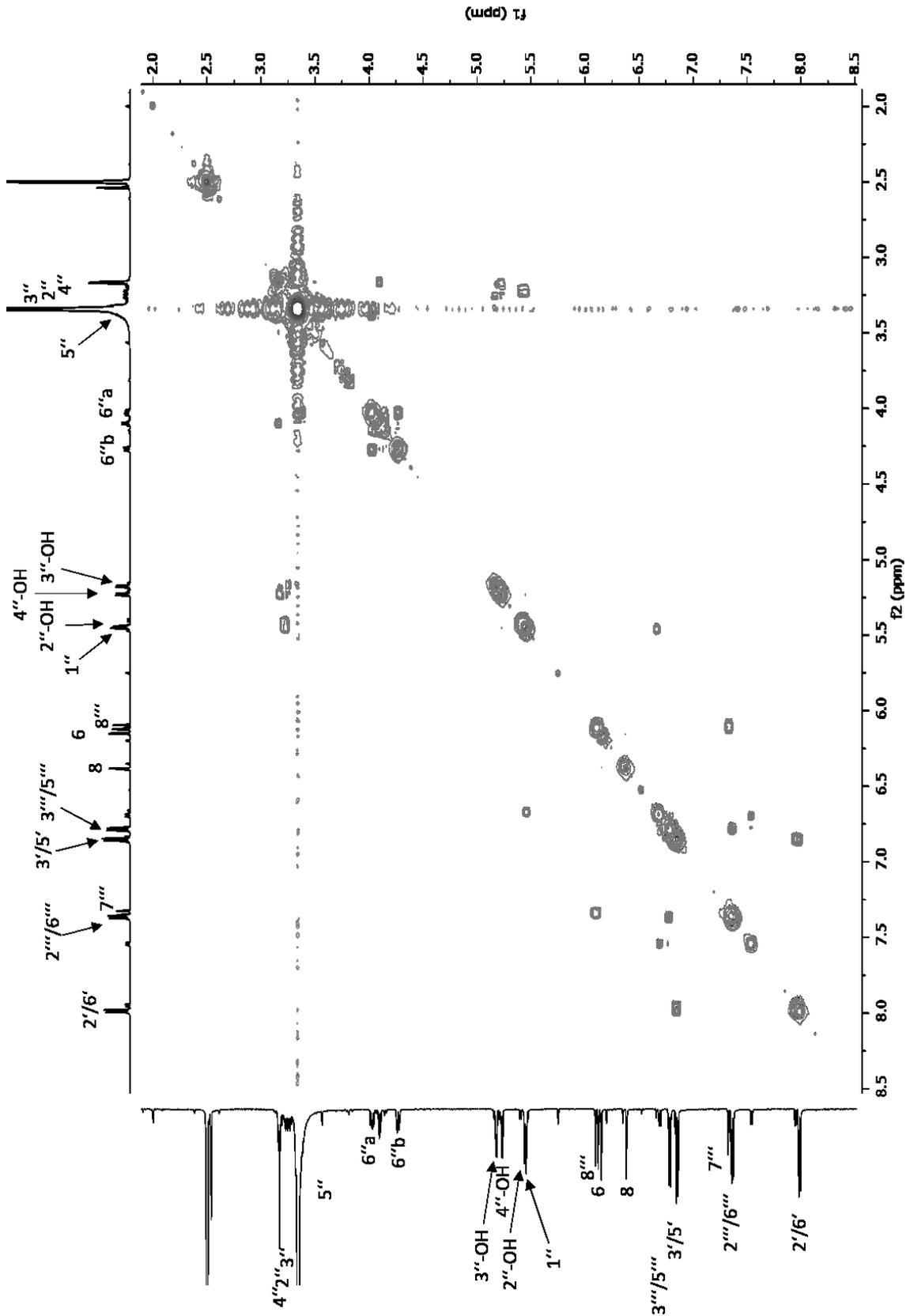


Abbildung 173: 2D-H,H-COSY-Spektrum von Verbindung **21** (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

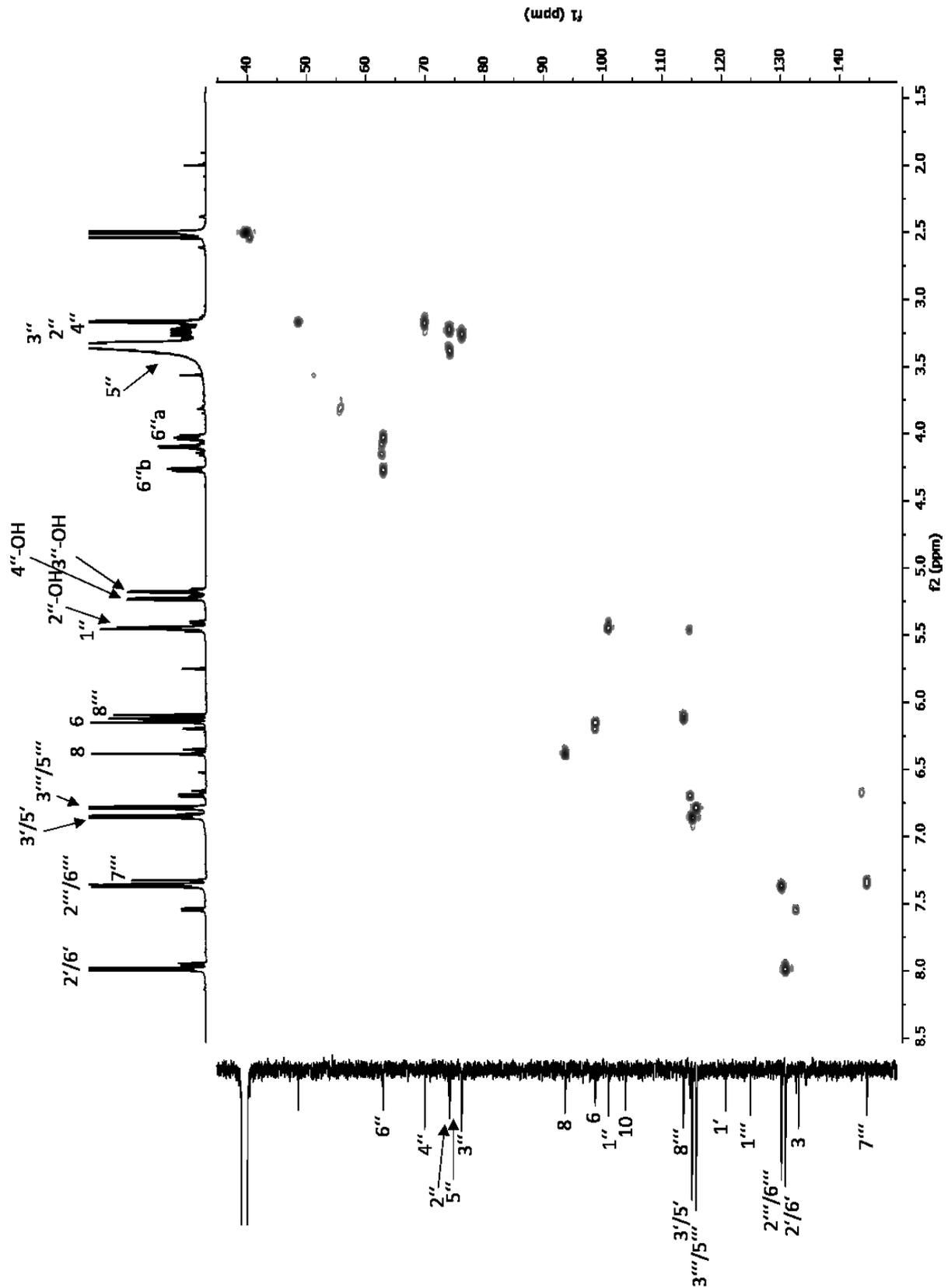


Abbildung 174: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 21 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

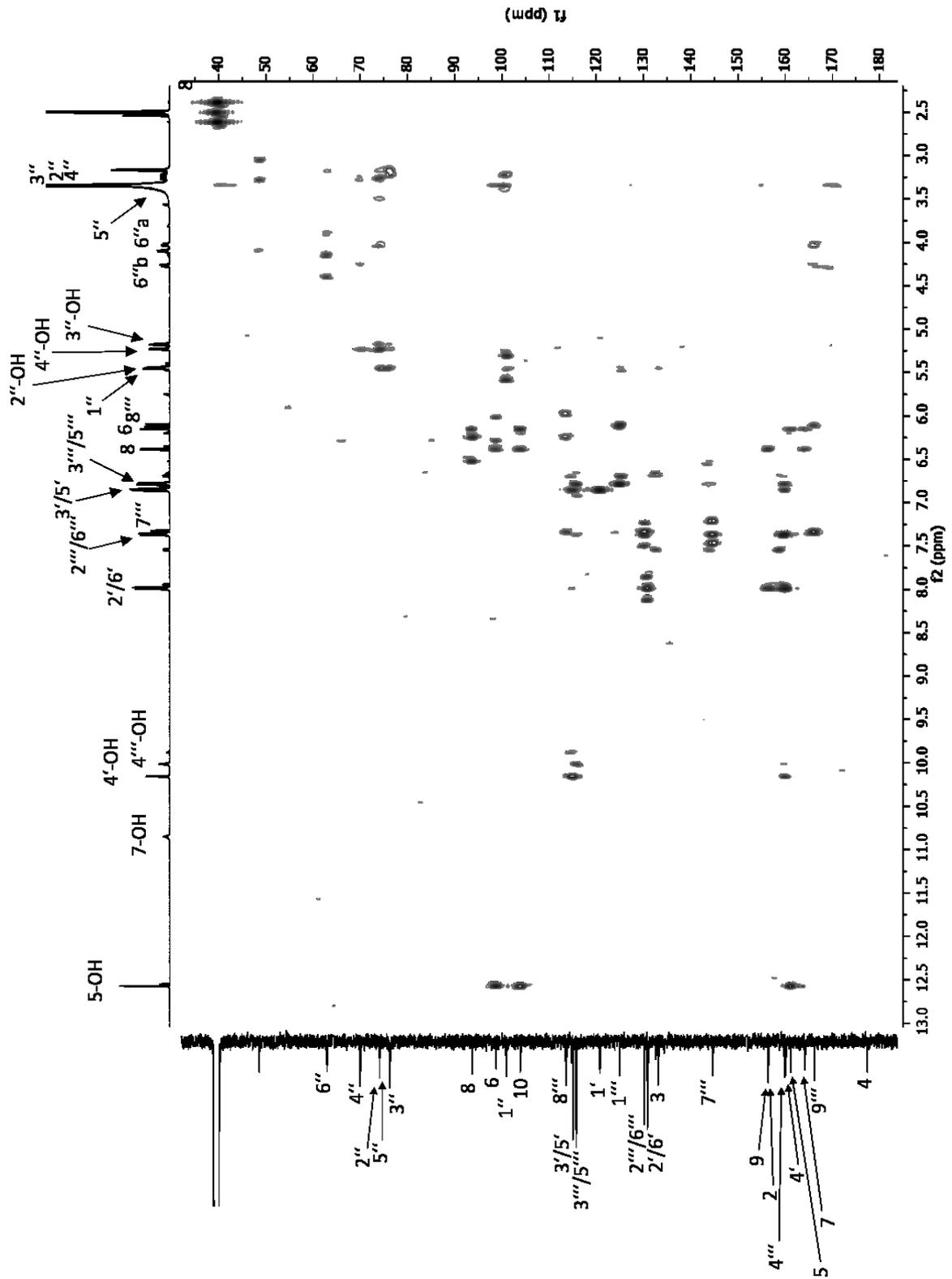


Abbildung 175: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 21 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

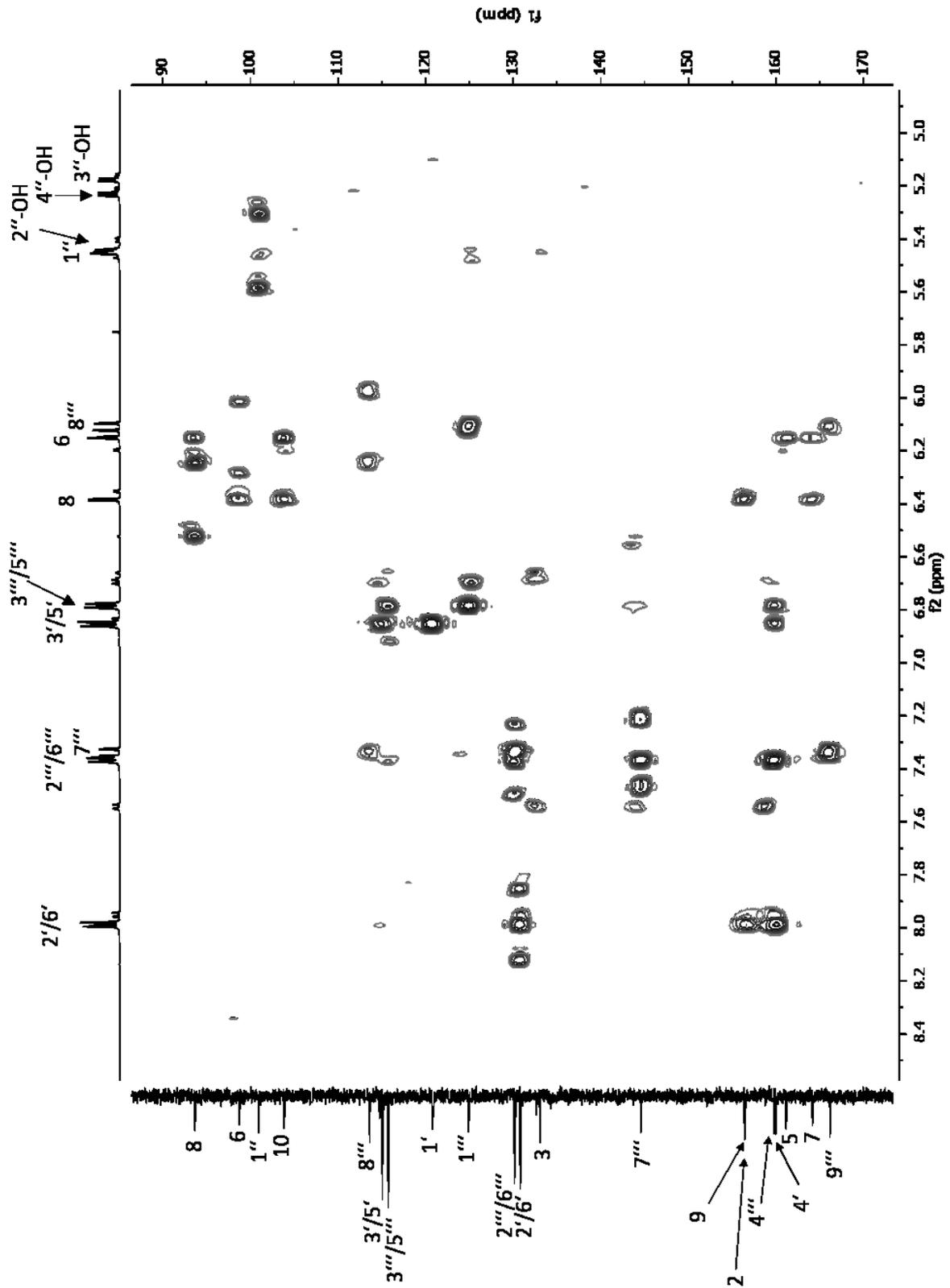


Abbildung 176: Ausschnitt aus dem 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 21 (600 MHz in DMSO- $d_6$ )

2.14.2 Daten von 22 (cis-Tilirosid)

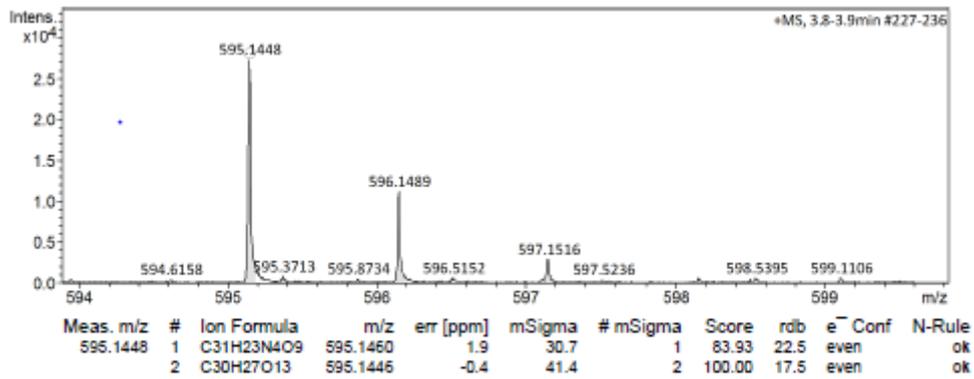
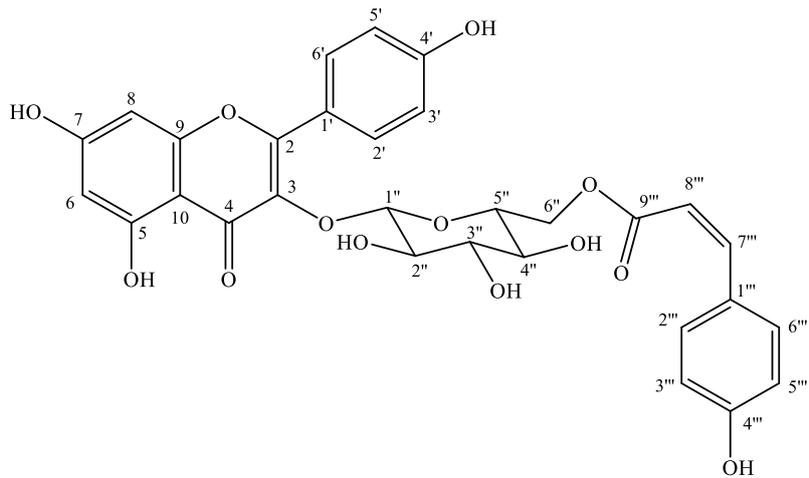


Abbildung 177: HRESIMS von Verbindung 21 und 22

**Tabelle 29:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **22** ( $\delta$  in ppm (J in Hz), 600/150 MHz in DMSO- $d_6$ )

Position	22		Literaturwerte nach [139]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
2	-	156.4	-	156.5
3	-	*	-	133.1
4	-	*	-	n.d.
5	-	160.8	-	161.1
6	6.20 d (2.1)	98.8	6.17 d (2)	98.5
7	-	*	-	164.3
8	6.35 d (2.1)	93.7	6.32 d (2)	93.5
9	-	*	-	156.4
10	-	*	-	103.7
1'	-	*	-	120.6
2'	7.95 d (8.9)	130.9	7.95 d (9)	130.6
3'	6.84 m <sup>#</sup>	*	6.84 d (9)	115.0
4'	-	159.85	-	159.7
5'	6.84 m	*	6.84 d (9)	115.0
6'	7.95 d (8.9)	130.9	7.95 d (9)	130.6
1''	5.40 d (7.6)	101.0	5.40 d (7.5)	101.5
2''	3.20 m	*	3.20 m	73.8
3''	3.24 m	*	3.24 m	75.9
4''	3.15 m	*	3.15 m	69.7
5''	3.37 m	*	3.37 m	74.2
6''	4.07 dd <sup>#</sup> 4.15 dd (11.9, 2.3)	62.7	4.07 dd (11.0, 6.0) 4.15 dd (11.0, 2.0)	63.0
1'''	-	125.2	-	125.4
2'''	7.54 d (8.7)	132.6	7.55 d (8.5)	132.4
3'''	6.69 d (8.7)	114.8	6.69 d (8.5)	114.6
4'''	-	158.8	-	158.8
5'''	6.69 d (8.7)	114.8	6.69 d (8.5)	114.6
6'''	7.54 d (8.7)	132.6	7.54 d (8.7)	132.4
7'''	6.67 d (13.1)	143.8	6.67 d (12.5)	143.5
8'''	5.46 d <sup>#</sup>	114.6	5.46 d (12.5)	114.3
9'''	-	165.3	-	165.6
5-OH	12.55 s	-	12.55	-
7-OH	-	-	n.d.	-
4'-OH	-	-	10.16 s (br.)	-
2''-OH	5.40 d (7.6)	-	5.45 d (4.5)	-
3''-OH	5.16 d (5.0)	-	5.17 d (5.0)	-
4''-OH	5.21 d (5.8)	-	5.22 d (5.5)	-
4'''-OH	9.88 s	-	-	-

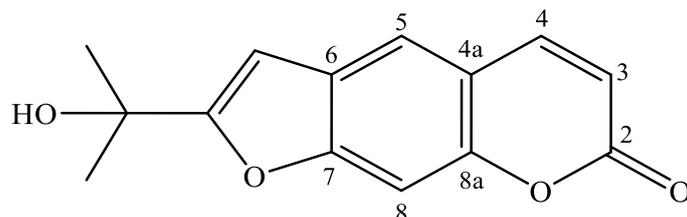
\* Die Signale konnten wegen der Überlagerung mit **21** und der geringen Menge nicht zweifelsfrei zugeordnet werden.

# Kopplungskonstanten konnten wegen Überlagerung nicht ermittelt werden

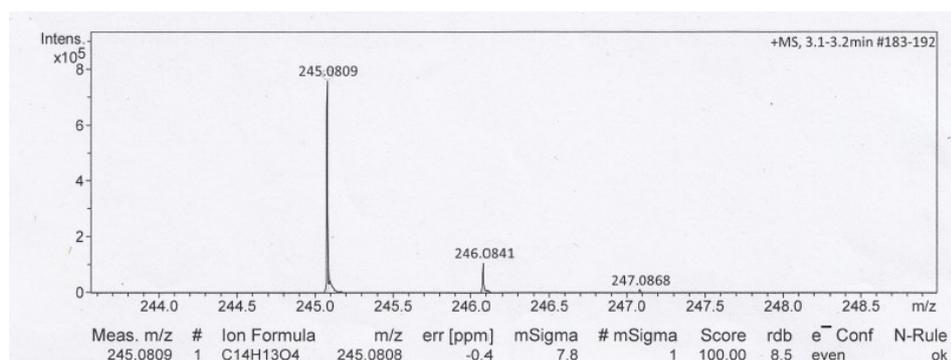


**Abbildung 178:** Ausschnitte aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **21** (600 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ ).  
Beschriftet wurden die Signale der Nebenkomponente **22**

## 2.15 Verbindung 23 (2',3' Dehydromarmesin)

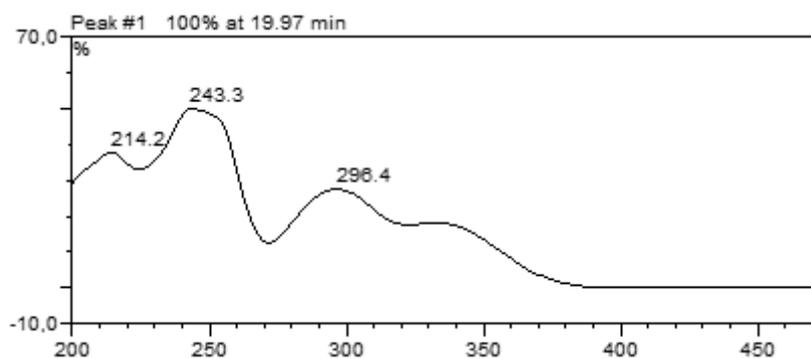


Verbindung **23** wurde als weiß-gelbliche, amorphe Substanz (Ausbeute 1,8 mg) aus der Fraktion MB.D-VIII-6 isoliert. Die hochauflösende Massenspektrometrie (HRESIMS) zeigte ein Quasimolekülion  $[M+H]^+$  bei 245.0809, woraus sich die Summenformel  $C_{14}H_{12}O_4$  für die unprotonierte Substanz ergibt. Die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente ergab die Zahl 8, sodass von 8 Doppelbindungen ausgegangen werden konnte.



**Abbildung 179:** HRESIMS von Verbindung **23**

Das bei der Aufnahme des HPLC-Chromatogramms mit Hilfe des Dioden-Array-Detektors erhaltene UV-Spektrum zeigte zwei UV-Maxima bei 243.3 nm sowie 296.4 nm (Abbildung 180), wodurch sich diese Verbindung deutlich von den zuvor beschriebenen Flavonoiden mit ihren charakteristischen UV-Spektren unterschied. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um eine weitere Substanzklasse handelt.



**Abbildung 180:** UV-Spektrum von Verbindung **23**

Im Dünnschichtchromatogramm (DC-Fließmittel DC-3) zeigte die Substanz einen die Fluoreszenz des in der Platte befindlichen Indikators bei 254 nm löschenden Substanzfleck bei einem  $R_f$  Wert von 0,41. Mit Naturstoffreagenz A färbte sich die Substanz gelblich. Besprühte man die Platte allerdings mit Anisaldehyd, so reagierte sie unter Violett färbung. (6.1.1)

Für die Strukturaufklärung von Verbindung **23** wurden 1D- und 2D-NMR Spektren in deuteriertem Chloroform aufgenommen. Das  $^1\text{H}$ -NMR (Abbildung 181) zeigte, zusätzlich zum Signal des Chloroforms bei  $\delta = 7.26$  ppm, vier scharfe Singulets, ein breites Singulett und zwei Dubletts für insgesamt 12 Protonen. Bis auf das Signal bei  $\delta = 1.67$  ppm, das aufgrund des Integrals als Singulett für sechs Protonen zweier äquivalenter Methylgruppen erkannt wurde, repräsentieren alle anderen Signale jeweils ein Proton, so dass fünf Methinkohlenstoffe im Molekül vorhanden sein sollten. Die Signale bei  $\delta = 6.35$  und  $7.76$  ppm zeigen eine Kopplungskonstante  $J = 9.5$  Hz, was in Kombination mit der Lage der Signale im Spektrum für die olefinischen Protonen einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylstruktur spricht. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR (Abbildung 182) konnten 13 Signale gefunden werden. Auch hier repräsentiert ein Signal die beiden äquivalenten Methylkohlenstoffe, was über das Kreuzsignal mit dem oben angesprochenen Protonensingulett im HSQC Spektrum (Abbildung 183) eindeutig nachgewiesen wurde. Somit entsprach die Anzahl der gefunden Kohlenstoffe und Protonen der Summenformel, die mit Hilfe des hochauflösenden Massenspektrums errechnet wurde (Abbildung 185). Neben den beiden Methylkohlenstoffen zeigten nur fünf weitere Kohlenstoffe eine direkte  $^1\text{J}$ -Kopplung zu den an ihnen gebundenen Protonen im HSQC-Spektrum, so dass es sich bei den restlichen 7 der 14 Kohlenstoffe um quartäre C-Atome handeln musste. Die anschließende Auswertung des HMBC-Spektrums, in dem auch die heteronuklearen Kopplungen über zwei ( $^2\text{J}$ ) und drei ( $^3\text{J}$ ) Bindungen registriert wurden, führte zur endgültigen Aufklärung der Struktur.

Wie bereits erwartet, zeigen die beiden olefinischen Protonen bei  $\delta = 6.35$  (H-3) und  $7.76$  ppm (H-4) Crosspeaks zu einem Carbonylkohlenstoff bei  $\delta = 161.33$  ppm (C-2), dessen Lage im Spektrum darauf hindeutet, dass es sich bei diesem Strukturelement von Verbindung **23** um ein 2-Pyrenon handelt. Bei Verbindung **23** könnte es sich demnach um ein Cumarin handeln. Dies wurde über die zusätzlichen HMBC Kopplungen des Protons H-4 mit dem Methinkohlenstoff C-5 ( $\delta_C = 119.69$  ppm) und dem quartären C-8a ( $\delta_C = 152.08$  ppm) bestätigt. Auch das H-3 zeigt neben der  $^2J$ -Kopplung mit C-2, eine weitere Kopplung zu einem quartären Kohlenstoff bei  $\delta_C = 115.69$  ppm, bei dem es sich um den zweiten Brückenkopf C-4a handelt. Dieser Kohlenstoff ist wiederum Kopplungspartner der Protonen bei  $\delta = 7.4$  ppm ( $^3J$ , H-8),  $\delta = 7.58$  ( $^2J$ , H-5) und  $7.76$  ( $^2J$ , H-4). Das Proton am C-5 besitzt insgesamt fünf Kopplungspartner, es finden sich Kreuzsignale zu den Signalen der Kohlenstoffe C-4a ( $\delta_C = 115.69$  ppm) und C-8a ( $\delta_C = 152.08$  ppm), sowie zu drei weiteren Kohlenstoffsignalen bei  $\delta_C = 102.21$ ,  $126.06$  und  $156.52$  ppm. Nur eines dieser drei Signale ( $\delta_C = 102.21$ ) zeigt eine Korrelation zu einem olefinischen oder aromatischen Proton ( $\delta_H = 6.61$  ppm), die beiden anderen Signale gehören zu quartären Kohlenstoffen. Da dieses Protonensignal seinerseits mit den beiden quartären Kohlenstoffen bei  $\delta_C = 126.06$  und  $156.52$  ppm koppelt, muss es sich um das Proton am zu C-6 benachbarten Kohlenstoff eines an C-6 und C-7 annelierten Pyran- oder Furanrings handeln. Der mit dem heterocyclischen Sauerstoff verbundene Kohlenstoff ist das C-7, dessen Signal sich bei einem entsprechend charakteristischen Shiftwert ( $\delta_C = 156.52$  ppm) findet. Bei den restlichen, bisher nicht zugeordneten drei Signalen des  $^{13}C$  NMR Spektrums, handelt es sich um das Signal der zwei äquivalenten Methylkohlenstoffe ( $\delta_C = 28.91$  ppm) und die Signale von zwei quartären C-Atomen von denen das eine  $sp^2$ -hybridisiert ( $\delta_C = 165.63$  ppm) und das andere ( $\delta_C = 69.52$  ppm) hydroxyliert vorliegen muss. Aufgrund der Shiftwerte und der Korrelationen im HMBC lässt sich folgern, dass es sich bei **23** um ein am C-2' substituiertes lineares Furanocumarin handelt, dessen C-Atome C-2' ( $\delta_C = 165.63$ ) und C-1' ( $102.21$ ) zusammen mit C-6 und C-7 den Furanring bilden. Das quartäre C-2' trägt einen Substituenten, bei dem es sich um eine 1-Hydroxy-1-Methyl-ethyl-Seitenkette handelt, die hier aufgrund des bei der Biosynthese vor Schließen des Furanrings am C-6 erfolgten Prenylierung als C-3', C-4' und C-5' bezeichnet werden. Die Protonen der beiden Methylgruppen (C-4' und C-5') zeigen Korrelationen mit C-3' ( $^2J$ ) und C-2' ( $^3J$ ) im HMBC-Spektrum, wodurch die Struktur bestätigt wird. Es handelt sich demnach bei **23** um das 2-(1-Hydroxy-1-methylethyl)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one, das auch als 2',3'-Dehydromarmesin, Nodachenetin 2'-(2-Hydroxyisopropyl)psoralen bezeichnet werden kann, wie eine Literaturrecherche ergab. [49] Die hier gefundenen NMR-Daten (Tabelle 30) stimmen sehr gut mit den von Quader et al.

(1992) für das in der Gattung *Phebalium* (Rutaceae) gefundene 2',3'-Dehydromarmesin veröffentlichten Daten überein. In unseren Spektren und in den Tabellen der Verbindungen **23** - **25** wurden die Substanzen anders beziffert, bedingt durch die biosynthetische Herkunft aus am C-6 prenylierten Cumarinen. Auch die wesentlich später von Luz et al. [141] publizierte <sup>13</sup>C NMR Daten sind weitgehend identisch, allerdings muss die von Luz et al. [141] getroffene Zuordnung der Shiftwerte für C-3'(C-1') ( $\delta_C = 99.7$ , C-3' bei Luz et al.) und C-8 ( $\delta_C = 100.0$ ) aufgrund der hier gefundenen Korrelationen im HMBC getauscht werden.

2',3'-Dehydromarmesin wurde auch in anderen Gattungen der Rutaceae gefunden. [142,143] Diese Verbindung wurde hier erstmals als Inhaltsstoff von *M. barbiger*a isoliert. Bereits 1974 haben Higa und Scheuer das 5-Methoxyderivat (siehe Verbindung **25**) dieser Verbindung aus *M. barbiger*a, damals noch *Pelea barbiger*a, isoliert. [5]

**Tabelle 30:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von **23** ( $\delta$  in ppm 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	<b>23</b>		Vergleich mit Literatur	
	$^1\text{H}$ (J in Hz) <b>23</b>	$^{13}\text{C}$ <b>23</b>	$^1\text{H}$ (J in Hz) <b>[91]</b>	$^{13}\text{C}$ <b>[141]</b>
2	-	161.33		161.1
3	6.35 d (9.5)	114.73	6.37 d (9.5)	114.5
4	7.76 d (9.5)	144.31	7.78 d (9.5)	144.1
4a	-	115.54	-	115.3
5	7.58 s	119.69	7.59 s	119.5
6	-	126.06	-	125.8
7	-	156.52	-	156.3
8	7.40 s	99.96	7.42 s	100.0
8a	-	152.08	-	151.9
1'	6.61 s	100.21	6.63 s	99.7
2'	-	165.63	-	165.4
3'	-	69.52	-	69.3
4'	1.67 s	28.91	1.69 s	28.7
5'	1.67 s	28.91	1.69 s	28.7
OH an C-3'	4.77 s	-	-	-

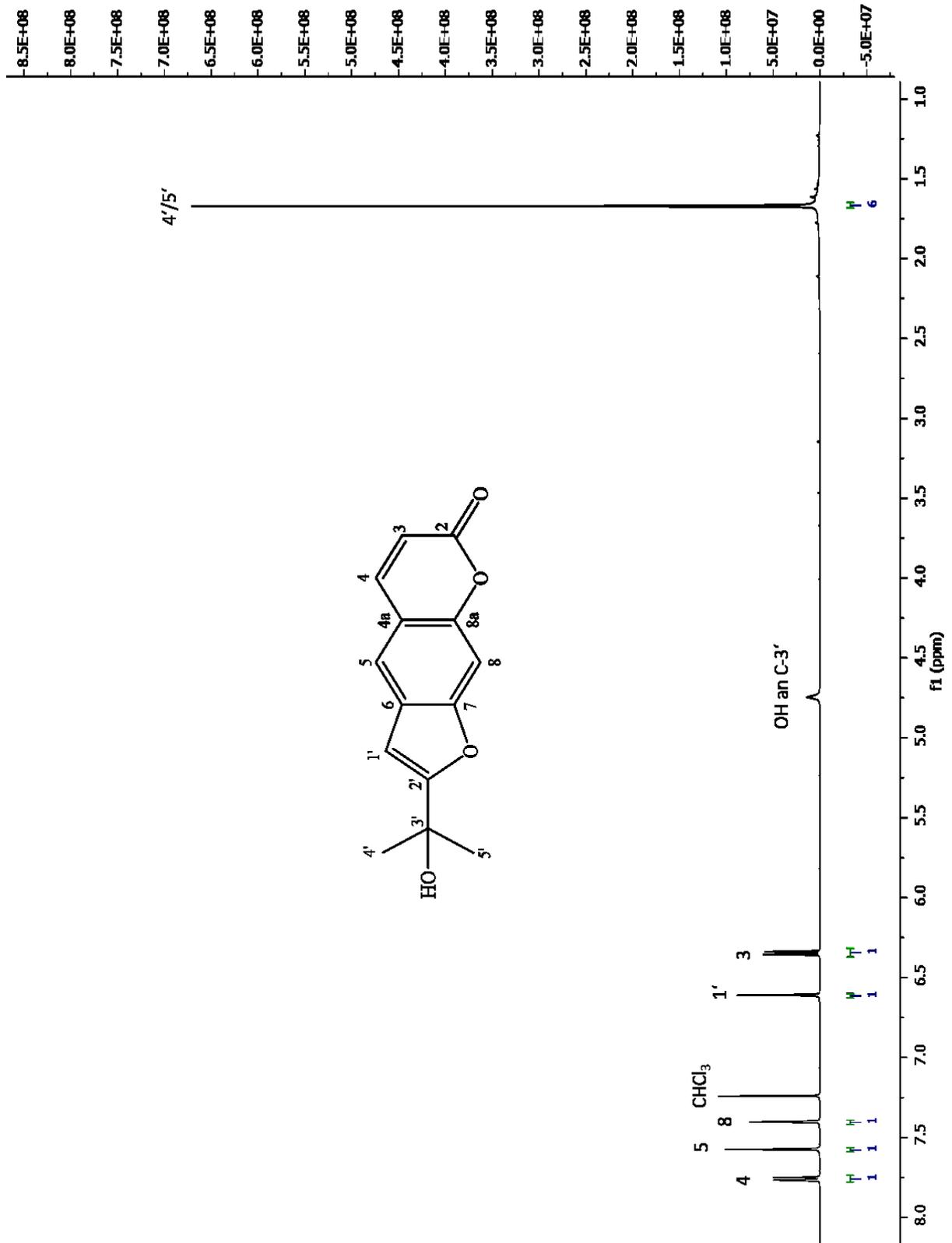


Abbildung 181: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Verbindung **23** (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

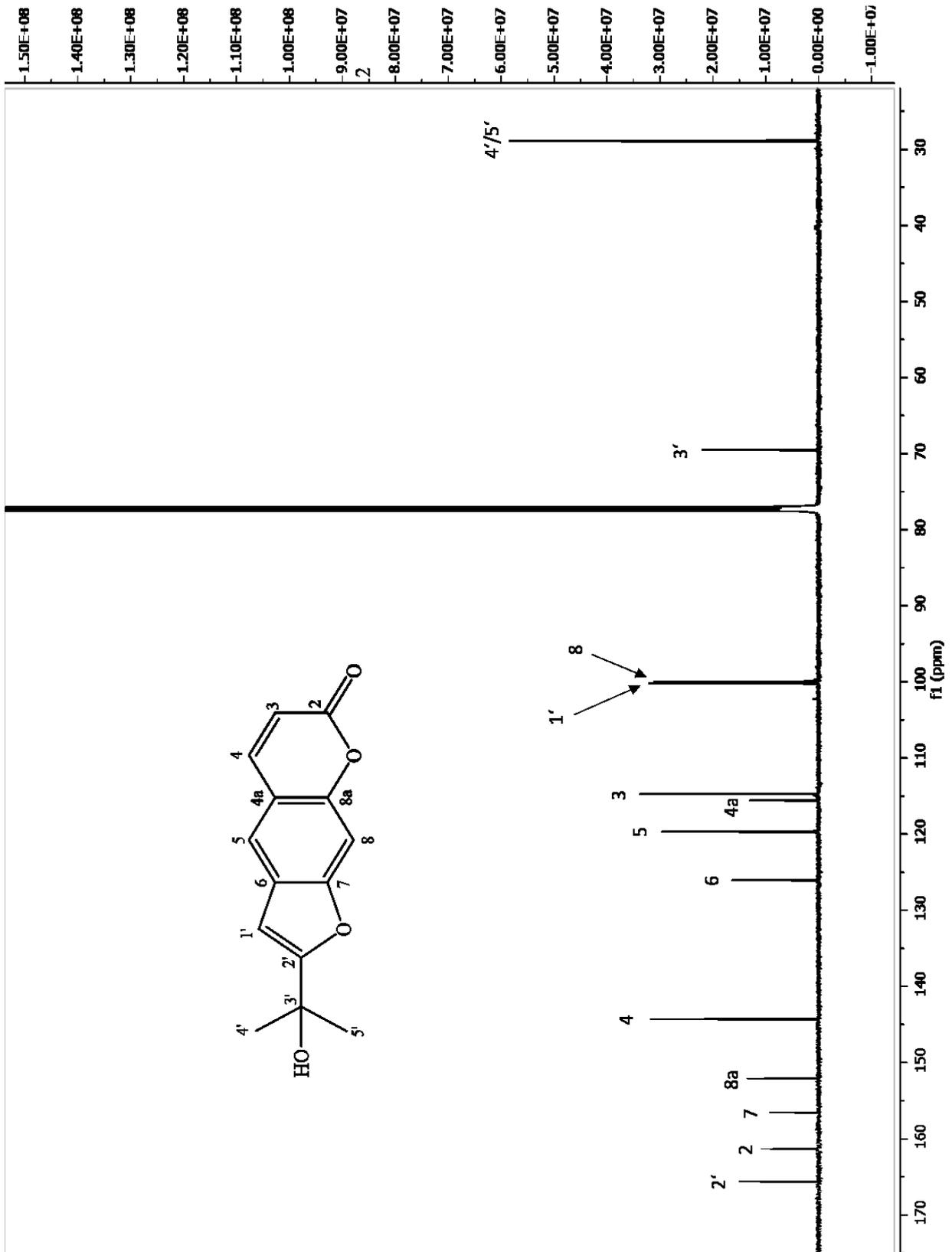


Abbildung 182: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Verbindung 23 (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

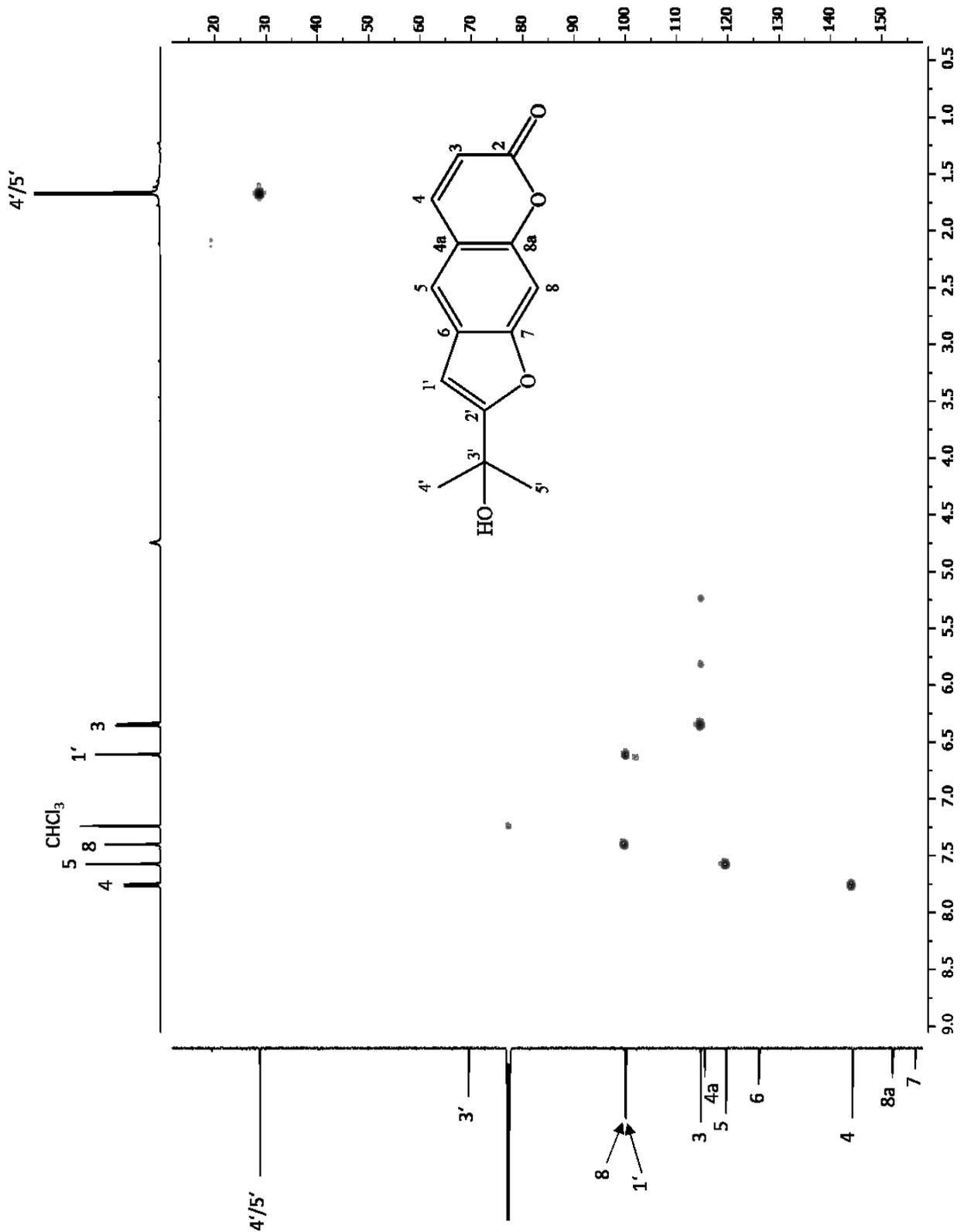


Abbildung 183: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 23 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

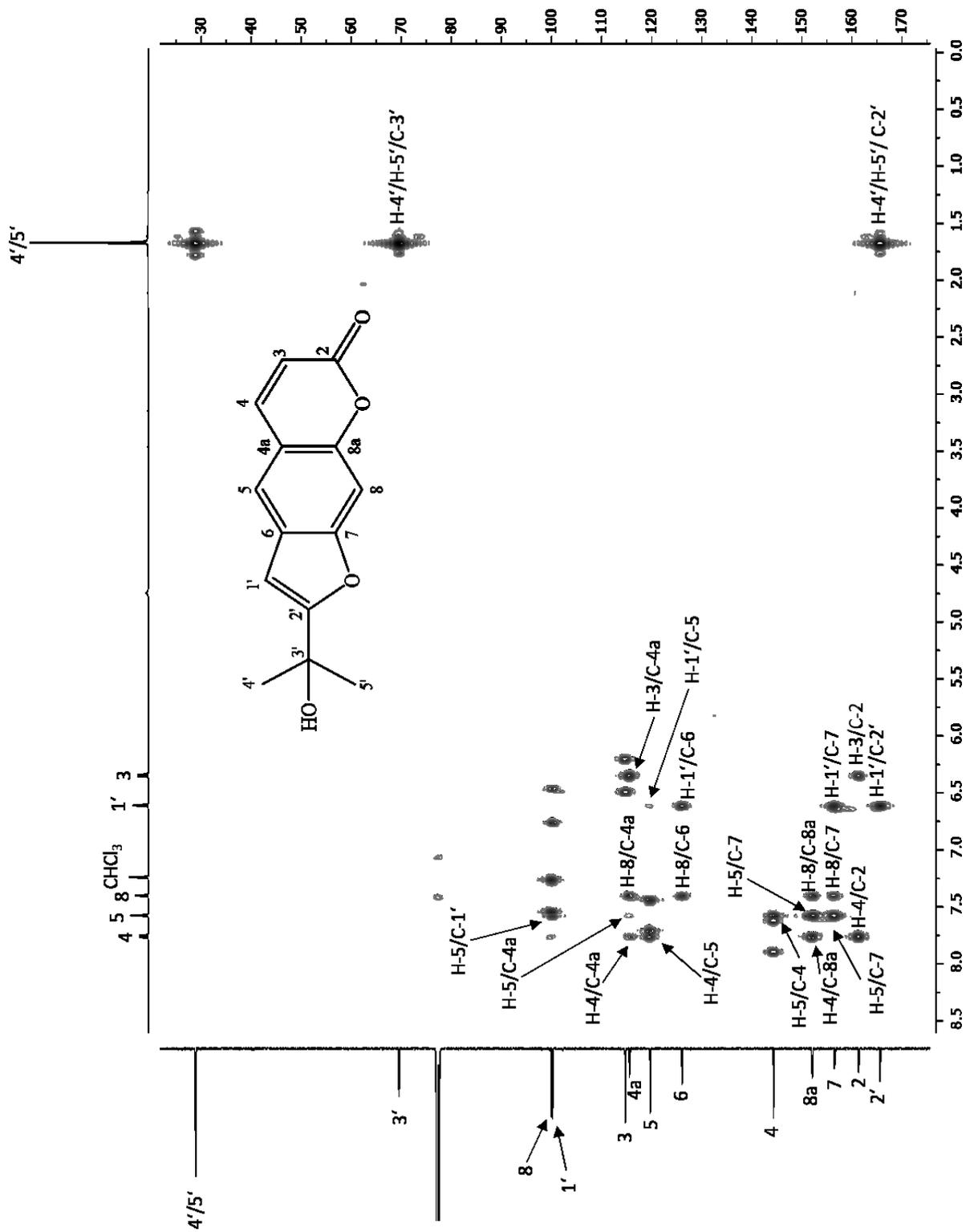
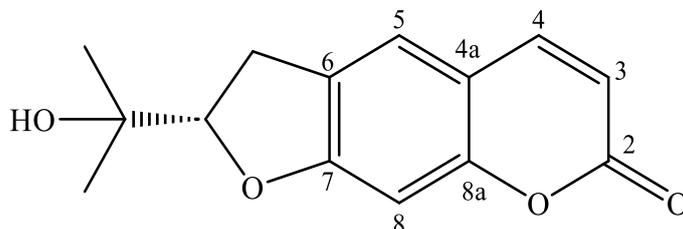


Abbildung 184: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 23 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

## 2.16 Verbindung 24 (Marmesin)



Verbindung **24** wurde als gelblich-weiße, amorphe Substanz aus der Fraktion MB.D-VIII-7- mittels semipräparativer HPLC isoliert. Bei der DC zeigte die Substanz einen  $R_f$ -Wert von 0,35 (DC-3) mit einer Fluoreszenzlöschung bei 254 nm. Nach Besprühen mit Naturstoff-Reagenz A färbt sich der Substanzfleck gelblich, mit Anisaldehyd violett (s. Kap. 6.1.1). Aufgrund der Ähnlichkeiten zu **23**, konnte bereits vermutet werden, dass es sich bei **24** ebenfalls um ein Cumarin mit ähnlicher Struktur handeln könnte.

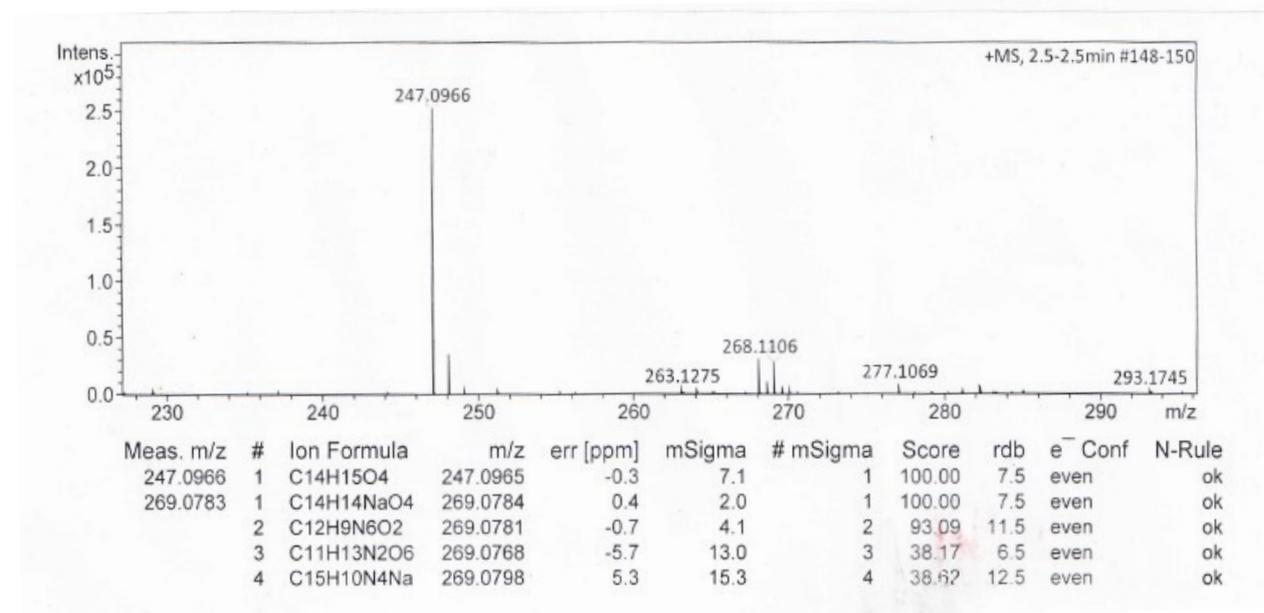


Abbildung 185: HRESIMS von Verbindung **24**

Bei der anschließend durchgeführten massenspektrometrischen Analyse fand sich ein Quasimolekülion mit der Masse  $m/z = 247.0966$   $[M+H]^+$ , woraus sich die Summenformel C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub> ermitteln ließ. Verbindung **24** war damit um zwei Masseneinheiten schwerer als 2',3'-Dehydromarmesin (**23**), so dass bereits jetzt zu vermuten war, dass es sich bei Verbindung **24**

um das 2,3-Dihydroderivat von **23** handeln könnte. In den zur weiteren Strukturaufklärung in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommenen ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren war schnell zu erkennen, dass es sich tatsächlich um das Marmesin oder sein Enantiomer Nodakenetin handeln musste. [144] Im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum (Abbildung 187) finden sich im Gegensatz zu **23** die Signale für 14 Kohlenstoffe, woraus folgt, dass die beiden Methylgruppen am C-3' nicht mehr chemisch äquivalent sind. Die Signale für C-4' und C-5' finden sich im Spektrum von **24** bei  $\delta = 26.0$  und  $24.3$  ppm. In Übereinstimmung damit sind auch die Protonensignale, die sich über die Crosspeaks im HSQC-Spektrum (Abbildung 189) leicht zuordnen lassen, bei unterschiedlichen Shiftwerten zu finden (Tabelle 31). Die beiden Singulets bei  $\delta = 1.37$  (H-4') und  $1.24$  ppm (H-5') zeigen im HMBC Kreuzsignale zum quartären C-3' ( $\delta_{\text{C}} = 71.83$ ;  $^2\text{J}$ ) und einem Methinkohlenstoff bei  $91.1$  ppm (C-2'), dessen korrespondierendes Protonensignal bei  $\delta = 4.74$  ppm als Dublett vom Dublett auftritt (s. Abbildung 190 und Tabelle 31). Dieses Proton zeigt zwei annähernd große Kopplungen zu zwei dicht nebeneinanderliegenden Protonensignalen bei  $\delta = 3.19$  und  $3.23$  (H-1'a und H-1'b, s. COSY-Spektrum, Abbildung 188), die am nächsten Kohlenstoff des Dihydrofuranrings (C-1';  $\delta_{\text{C}} = 29.65$ ) gebunden sind. Beide Protonensignale zeigen neben der jeweiligen vicinalen Kopplung zum H-2' und der geminalen Kopplung zueinander in Höhe von etwa  $16$  Hz noch eine weitere kleine Kopplung ( $J = 1.3$  bzw.  $1.4$  Hz), so dass die Signale zum Dublett vom Dublett vom Dublett aufspalten (s. Abbildung 186). Dem homonuklearen, zweidimensionalen COSY-Spektrum (Abbildung 188) lässt sich entnehmen, dass es sich dabei eine Kopplung zum aromatischen C-5 ( $\delta_{\text{C}} = 123.56$  ppm) handelt, das seinerseits als verbreitertes Triplett bei  $\delta = 7.22$  ppm auftritt. Ausgehend von diesem Proton lassen sich wie bei **23** die Kohlenstoffe C-4 ( $\delta_{\text{C}} = 143.82$ ), C-7 ( $\delta_{\text{C}} = 163.30$ ) und C-8a ( $\delta_{\text{C}} = 98.12$ ) über ihre  $^3\text{J}$ -Kopplungen im HMBC-Spektrum zuordnen. Über die Kopplungen im HSQC- und HMBC-Spektrum lassen sich auch alle anderen Protonen und Kohlenstoffsignale zuordnen (Tabelle 31). Dies gilt auch für die quartären Kohlenstoffe C-4a und C-8a, die beide  $^2\text{J}$ - bzw.  $^3\text{J}$ -Kopplungen mit den Protonen H-5 und H-8 zeigen. Da aber nur das Signal bei  $\delta = 112.96$  ppm mit dem Proton bei  $\delta = 6.22$  ppm (H-3) koppelt, konnte dies als das Signal von C-4a nachgewiesen werden. Kim et. al. [145] und später auch Karakaya et al. [146] veröffentlichten nahezu identische Werte. Auch die für das (R)-konfigurierte Nodaketin angegebenen NMR-Daten zeigen gute Übereinstimmung [146], so dass es sich bei **24** um eine dieser beiden Verbindungen handeln musste.

Zur Abklärung der Stereochemie am Chiralitätszentrum C-2' wurde eine 0,3-%ige Lösung in Methanol für Spektroskopiezwecke hergestellt und der optische Drehwert bestimmt. Der für **24**

gemessene Wert betrug  $[\alpha]_{25}^D c (0,03) = + 27^\circ$  und war damit mit dem für das S-(+)-Marmesin gefundenen Wert vergleichbar. [145]

Marmesin wurde wesentlich häufiger gefunden als das zuvor beschriebene achirale 2,3-Dehydromarmesin (**23**). Erstmals beschrieben wurde das Vorkommen dieser Verbindung von Chatterjee und Mitra (1949) in *Aegle marmelos*, der zur Familie der Rutaceae gehörenden Bengalischen Quitte. [147] Auch in der Gattung *Melicope* wurde die Verbindung in *M. glabra*, *M. lunu-ankenda*, *Melicope pteleifolia* und in einigen ebenfalls zur Gattung *Melicope* gerechneten *Euodia* species gefunden. [70,96,147–149] Über das Vorkommen dieser Verbindung in *Melicope barbiger*a wurde bereits 1974 von Higa und Scheuer berichtet. [5]

**Tabelle 31:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **24** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	<b>24</b>		Literaturwerte nach [145]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
<b>2</b>	-	161.58	-	161.4
<b>3</b>	6.22 d (9.4)	112.50	6.21 d (9.6)	112.2
<b>4</b>	7.59 d (9.4)	143.82	7.59 d (9.6)	143.7
<b>4a</b>	-	112.96	-	112.7
<b>5</b>	7.22 t (1.4)	123.56	7.22 t (1.2)	123.4
<b>6</b>	-	125.19	-	125.1
<b>7</b>	-	163.30	-	163.1
<b>8</b>	6.75 s	98.12	6.74 s	97.9
<b>8a</b>	-	155.85	-	155.7
<b>1'</b>	3.19 ddd (15.7; 9.2; 1.3) 3.23 ddd (15.8; 8.4; 1.4)	29.65	3.18 ddd (15.9; 9.3; 0.9) 3.25 ddd (15.9; 8.4; 1.5)	29.4
<b>2'</b>	4.74 dd (9.2; 8.4)	91.25	4.74 dd (9.3; 8.4)	91.1
<b>3'</b>	-	71.83	-	71.6
<b>4'</b>	1.37 s	26.27	1.39 s	26.0
<b>5'</b>	1.24 s	24.41	1.24 s	24.3

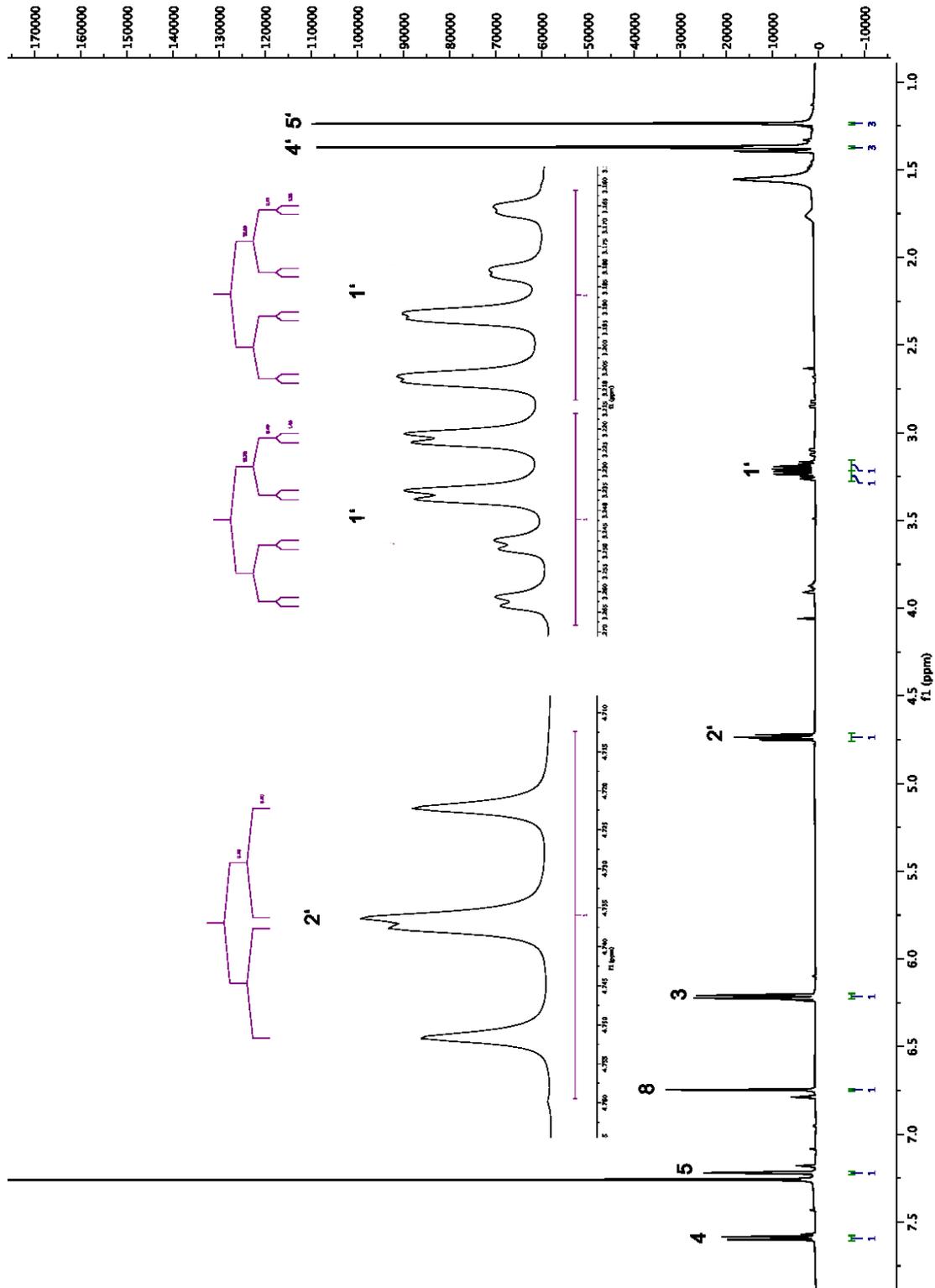


Abbildung 186:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **24** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

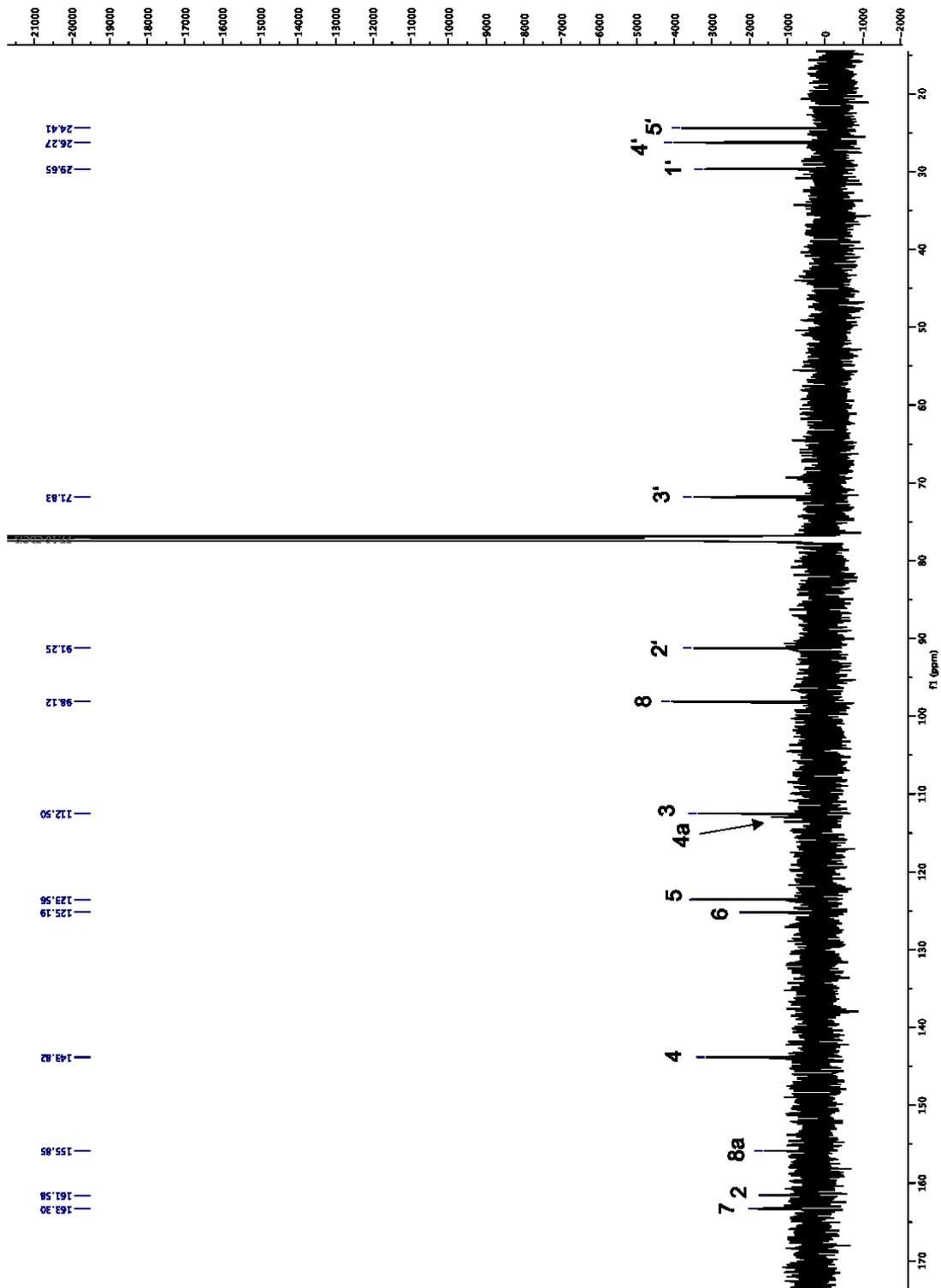


Abbildung 187:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **24** (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

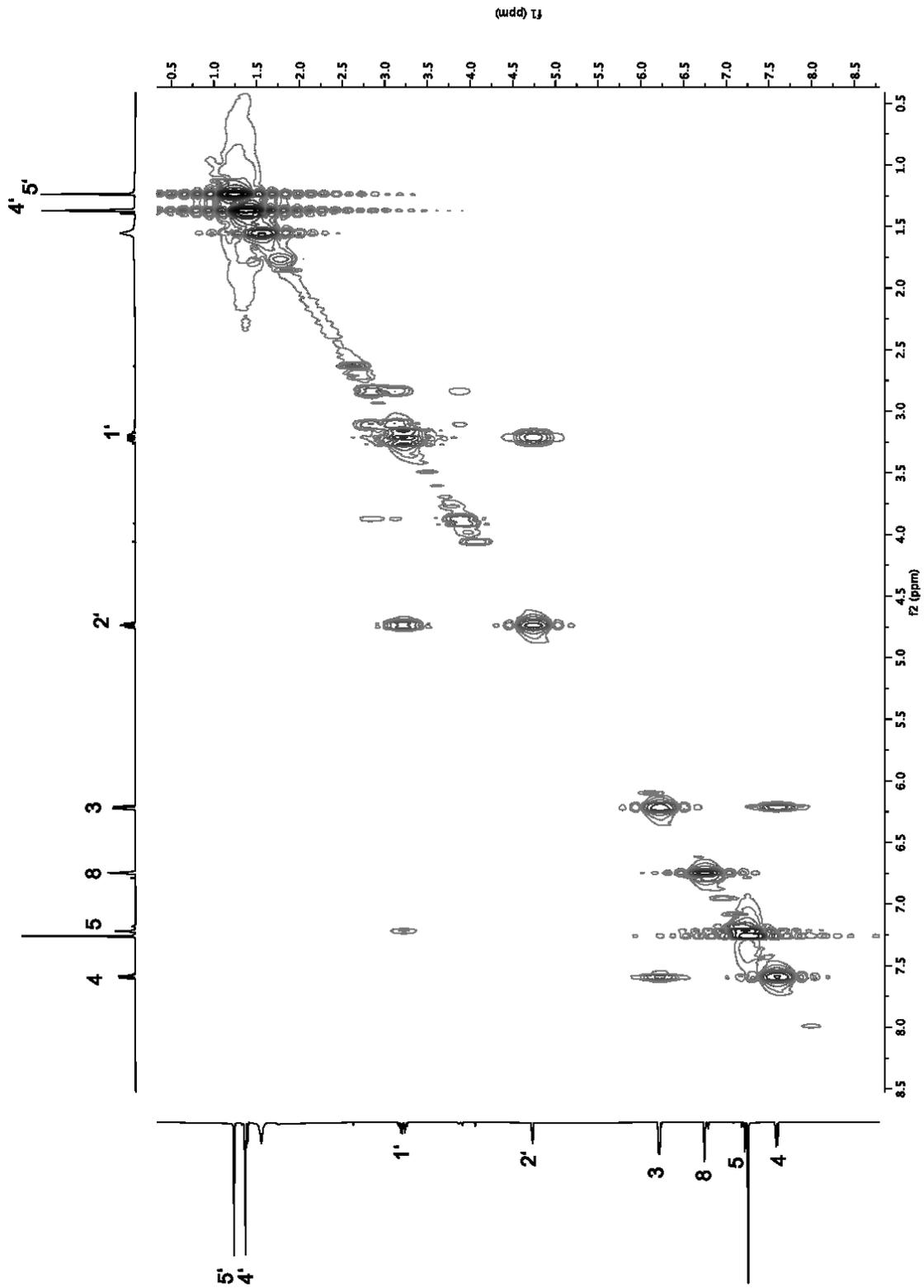


Abbildung 188: 2D-H,H-COSY-Spektrum von Verbindung 24 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

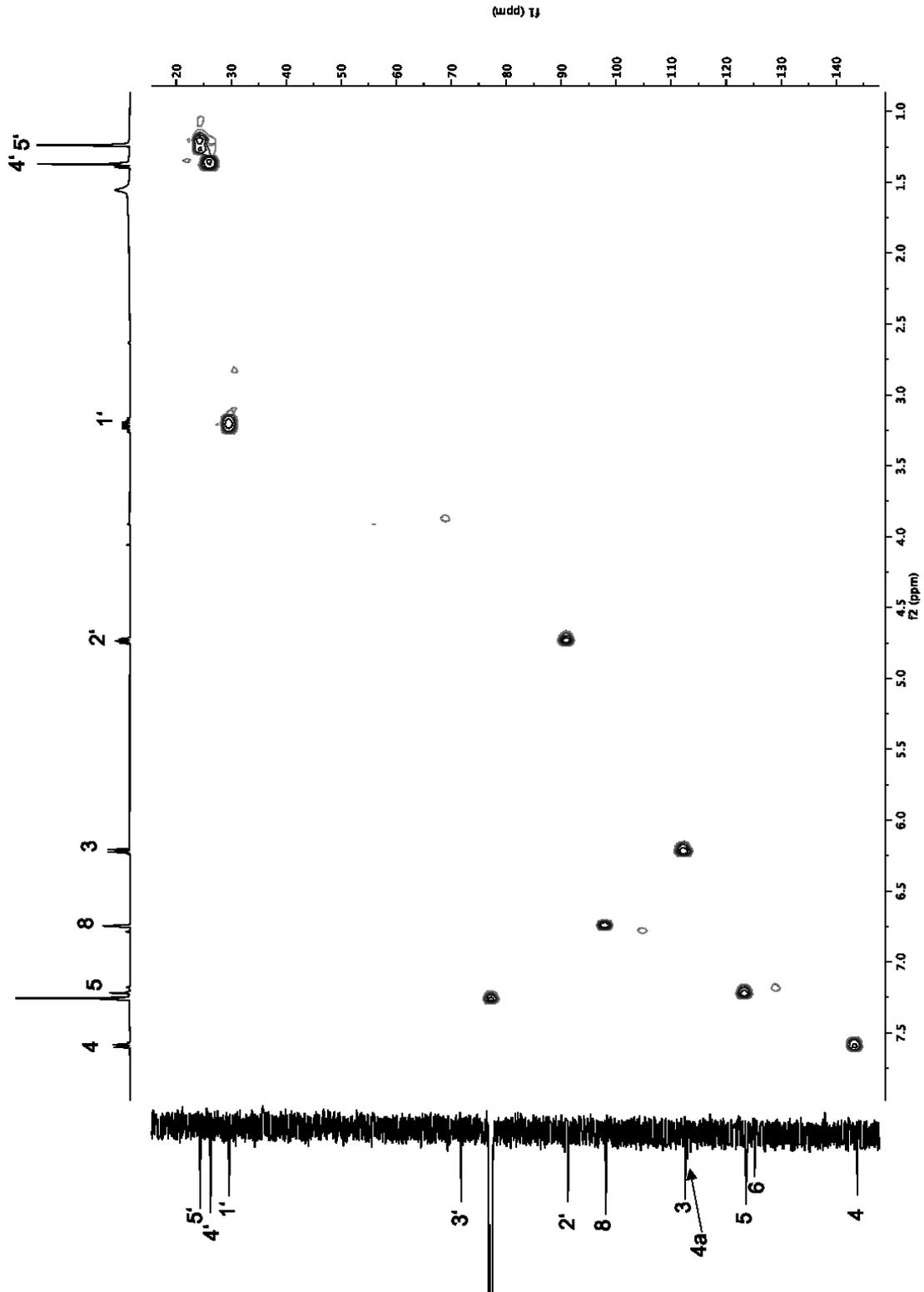


Abbildung 189: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 24 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

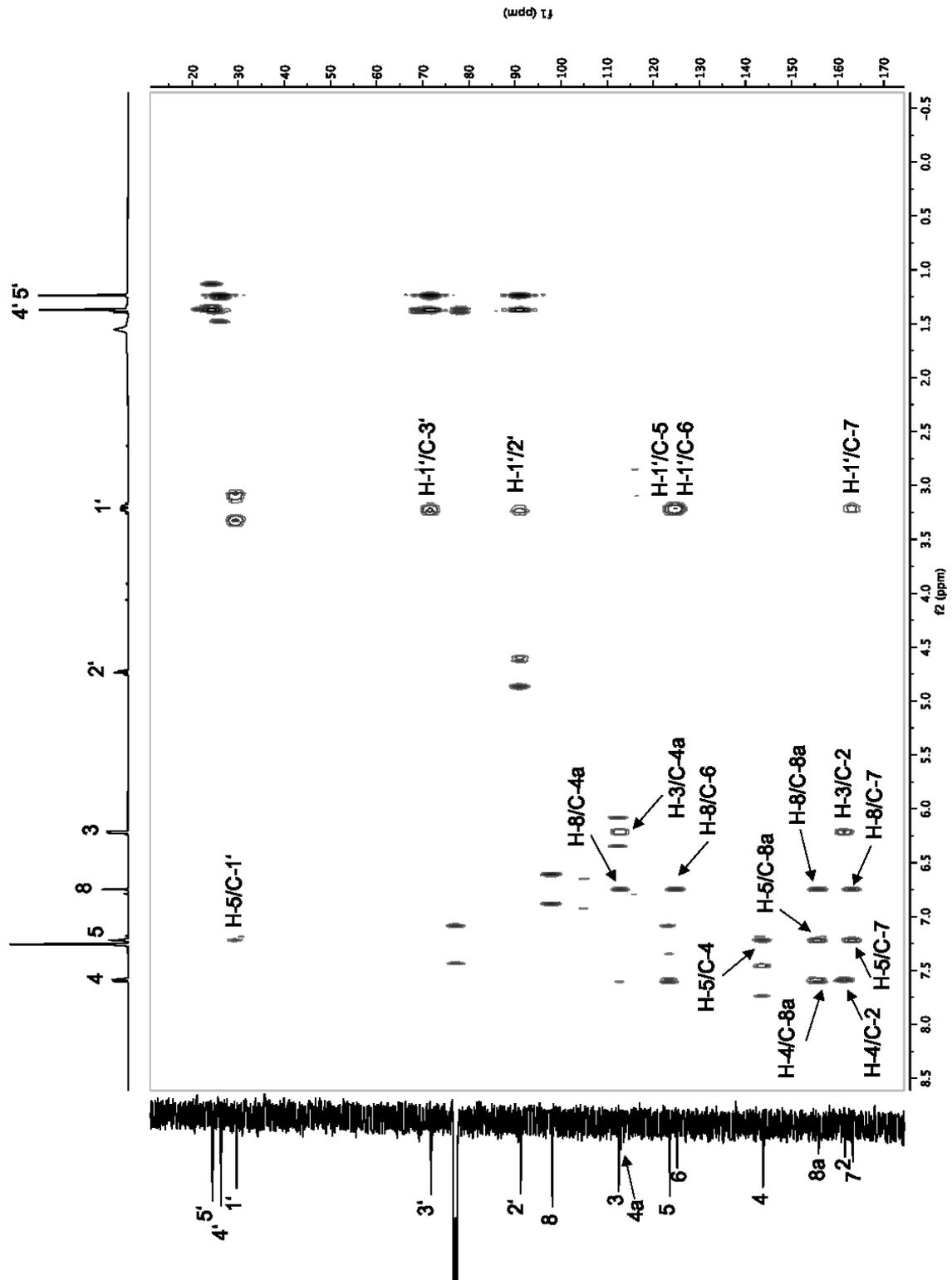
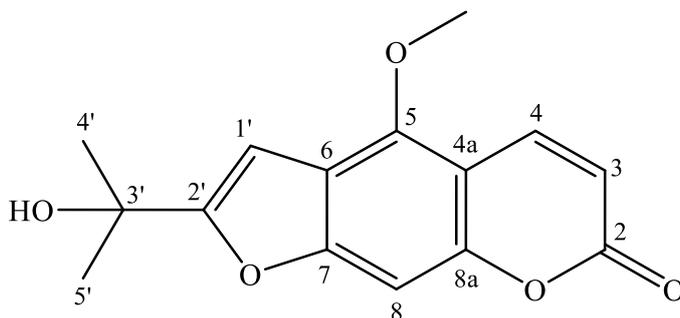


Abbildung 190: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 24 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

## 2.17 Verbindung 25 (5-Methoxy-2',3'-Dehydromarmesin)



Die Verbindung **25** wurde aus der Fraktion MB.D-VIII-6 als gelblich-amorphes Pulver in einer Ausbeute von 1,2 mg isoliert. Die hochauflösende Massenspektrometrie (HRESIMS) zeigte ein Quasimolekülion mit der Masse 275.0914  $[M+H]^+$ , woraus sich die Summenformel  $C_{15}H_{14}O_5$  errechnen ließ. Nach Berechnung der Doppelbindungsäquivalente konnte von acht Doppelbindungen ausgegangen werden.

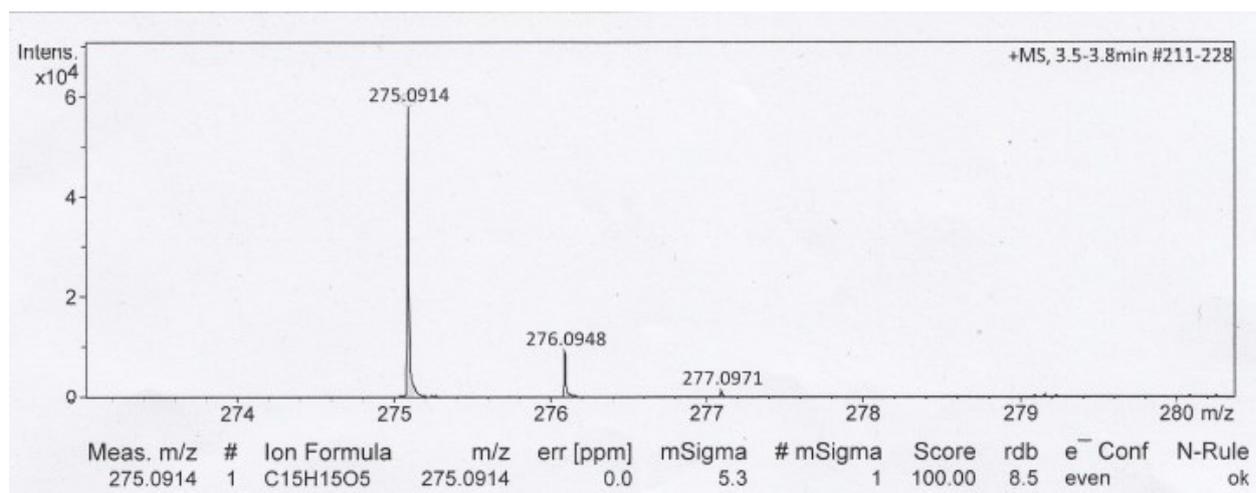


Abbildung 191: HRESIMS von Verbindung **25**

Im Dünnschichtchromatogramm konnte mit dem Fließmittel DC-3 die Substanz durch Löschung des Fluoreszenzindikators bei  $\lambda = 254$  nm detektiert werden. Besprühen mit Naturstoffreagenz A und Anisaldehyd auf getrennten DC-Platten führte zu einer Gelb- bzw. Violett-färbung (s. Kap. 6.1.1). Insgesamt zeigte das chromatographische Verhalten von Verbindung **24** große Ähnlichkeit mit den beiden zuvor beschriebenen Furanocumarinen. Ein Vergleich der Summenformeln von **23** und **24** ließ erkennen, dass **25** einen Kohlenstoff, zwei Protonen und einen Sauerstoff mehr besitzt als **23**, was auf eine Methoxylierung an einem der Wasserstoff tragenden Kohlenstoffe von **23** hindeutet.

Diese Annahme konnte durch die Auswertung der ebenfalls in deuteriertem Chloroform aufgenommenen 1D- und 2D-NMR Spektren von Verbindung **25** sehr schnell bestätigt werden. Das  $^1\text{H-NMR}$  (Abbildung 192) zeigte wie bei **23** die Dubletts für je ein Proton bei  $\delta = 6.25$  und  $8.12$  ppm, die den olefinischen Protonen am C-3 ( $\delta_{\text{C}} = 112.72$ ) und C-4 ( $\delta_{\text{C}} = 139.51$ ) zugeordnet werden können. Die Kopplungskonstante  $J$  liegt mit  $9.8$  Hz bei einem ähnlichen Wert wie bei **23**. Von den drei Singulett der Protonen an C-5, C-8 und C-1' im Tieffeldbereich des Spektrums von 1',2'-Dehydromarmesin (**22**) fehlt das Signal bei ca.  $7.5$  ppm, das dem H-5 in **22** zugeordnet wurde. Stattdessen findet man im Spektrum von **25** ein zusätzliches 3-Protonen Singulett bei  $\delta = 4.23$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 60.46$ ) im für aromatische Methoxygruppen typischen Shiftbereich (Tabelle 32). Das C-5, an dem der Methylether gebunden ist, findet sich über die  $^3\text{J}$ -Korrelation der Methoxyprotonen im HMBC-Spektrum (Abbildung 196) bei  $\delta_{\text{C}} = 149.56$  ppm. Die Position der Methoxygruppe an diesem Kohlenstoff wird durch eine zweite Korrelation zwischen dem olefinischen H-4 und dem C-5 zusätzlich bestätigt, da bei einer Methoxylierung an C-8 keine Korrelation zwischen diesen beiden Atomen möglich wäre. Das Proton an C-8 tritt als verbreitertes Singulett bei  $\delta = 7.08$  ppm auf. Im H,H-COSY Spektrum (Abbildung 194) lässt sich erkennen, dass dieses Proton eine Fernkopplung in Höhe von ca.  $1$  Hz zum Proton bei  $\delta = 6.80$  ppm zeigt, welches dem H-1' des Furanrings zuzuordnen ist. Von dort lassen sich die Kohlenstoffe C-2' ( $\delta_{\text{C}} = 163.32$  ppm), und C-3' ( $\delta_{\text{C}} = 69.50$  ppm) eindeutig zuordnen. Aufgrund der Korrelation des C-3' mit dem Singulett für sechs Protonen bei  $\delta = 1.67$  ppm lässt sich die Position der beiden äquivalenten Methylgruppen ( $\delta_{\text{C}} = 28.92$  ppm) wie bei **22** am C-3' zweifelsfrei bestimmen.

Über die restlichen in den Spektren gefundenen Signale (Abbildung 192, Abbildung 193, Abbildung 194, Abbildung 195, Abbildung 196 und Tabelle 32), lässt sich eindeutig erkennen, dass es sich bei **25** um das 5-Methoxyderivat von **23** handelt. Diese Substanz wurde erstmals von Higa und Scheuer (1974) aus *Pelea barbiger*, wie *Melicope barbiger* damals noch hieß, isoliert und identifiziert. [5] Damit konnte das Vorkommen dieses Furanocumarins in der hier untersuchten Pflanze bestätigt werden. Die damals von Higa und Scheuer (1974) ermittelten Protonendaten stimmen sehr gut mit den hier gefundenen Shiftwerten überein. Erstaunlich ist, dass schon 1974 die Fernkopplung zwischen H-8 und H-1' bei einer Messfrequenz von nur  $100$  MHz mit dem Varian HA-100 zu erkennen war. Während H-1' auch damals schon als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von  $1$  Hz beschrieben wurde, erkannte man das H-8 nicht als breites Singulett, sondern als Multipllett [5]. Die Shiftwerte der Kohlenstoffe wurden damals nicht publiziert und es gab auch keine zweidimensionalen Spektren. [5] Die Autoren die diese Verbindung erstmals als Naturstoff beschrieben haben, nannten die Verbindung einfach

Furocumarin, sie vergaben keinen Trivialnamen. Eine Literaturrecherche in den Chemical Abstracts ergab [49], dass diese Verbindung mit der chemischen Bezeichnung 2-(1-Hydroxy-1-methylethyl)-4-methoxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-one bisher nur in zwei weiteren Publikationen erwähnt wurde. 1989 isolierten Goh et al. diese Verbindung neben anderen Inhaltsstoffen, unter anderem auch Marmesin (**24**), aus den Rutaceen *Euodia pilulifera* und *E. latifolia*. Durch diese Untersuchungen wurde die Re-Klassifizierung von Hartley [150], der die meisten *Euodia* Species in die Gattung *Melicope* eingliedert hatte, zusätzlich bestätigt. Da Goh et al keine weiteren NMR Daten angegeben haben, werden die Kohlenstoffdaten hier erstmals veröffentlicht. [94] Darüber hinaus gibt es noch einen Bericht von Du et al. (2018), der diese Verbindung bei der Umwandlung von Pressrückständen aus Zuckerrohr in Brennstoffe durch Hydrothermale Karbonisierung, aber nur mittels GC/MS nachweisen konnte. [151]

Kürzlich veröffentlichten Xie et al. [152] den 3'-Methylether von Verbindung **24** als neuen Naturstoff aus *Evodia lepta* (Rutaceae). Die dort für dieses Derivat veröffentlichten <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten, die wie bei uns über das HMBC-Spektrum zweifelsfrei zugeordnet werden konnten, passen sehr gut zu den hier gefundenen Daten.

**Tabelle 32:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **25** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	25		Literaturwerte nach[5]
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz),
<b>2</b>	-	161.44	
<b>3</b>	6.25 dd (9.8)	112.65	6.27 d (10)
<b>4</b>	8.12 d (9.8; 0.6)	139.44	8.14 dd (10, 0.65)
<b>4a</b>	-	106.66	-
<b>5</b>		149.48	-
<b>6</b>	-	113.71	-
<b>7</b>	-	158.35	-
<b>8</b>	7.08 d (br.)	93.97	7.09 m
<b>8a</b>	-	152.66	-
<b>1'</b>	6.80 d (1.0)	98.72	6.84 d (1.0)
<b>2'</b>	-	163.32	-
<b>3'</b>	-	69.50	-
<b>4'</b>	1.67 s	28.92	1.72 s
<b>5'</b>	1.67 s	28.92	1.72 s
<b>OCH<sub>3</sub> an C-5</b>	4.23 s	60.30	4.27 s

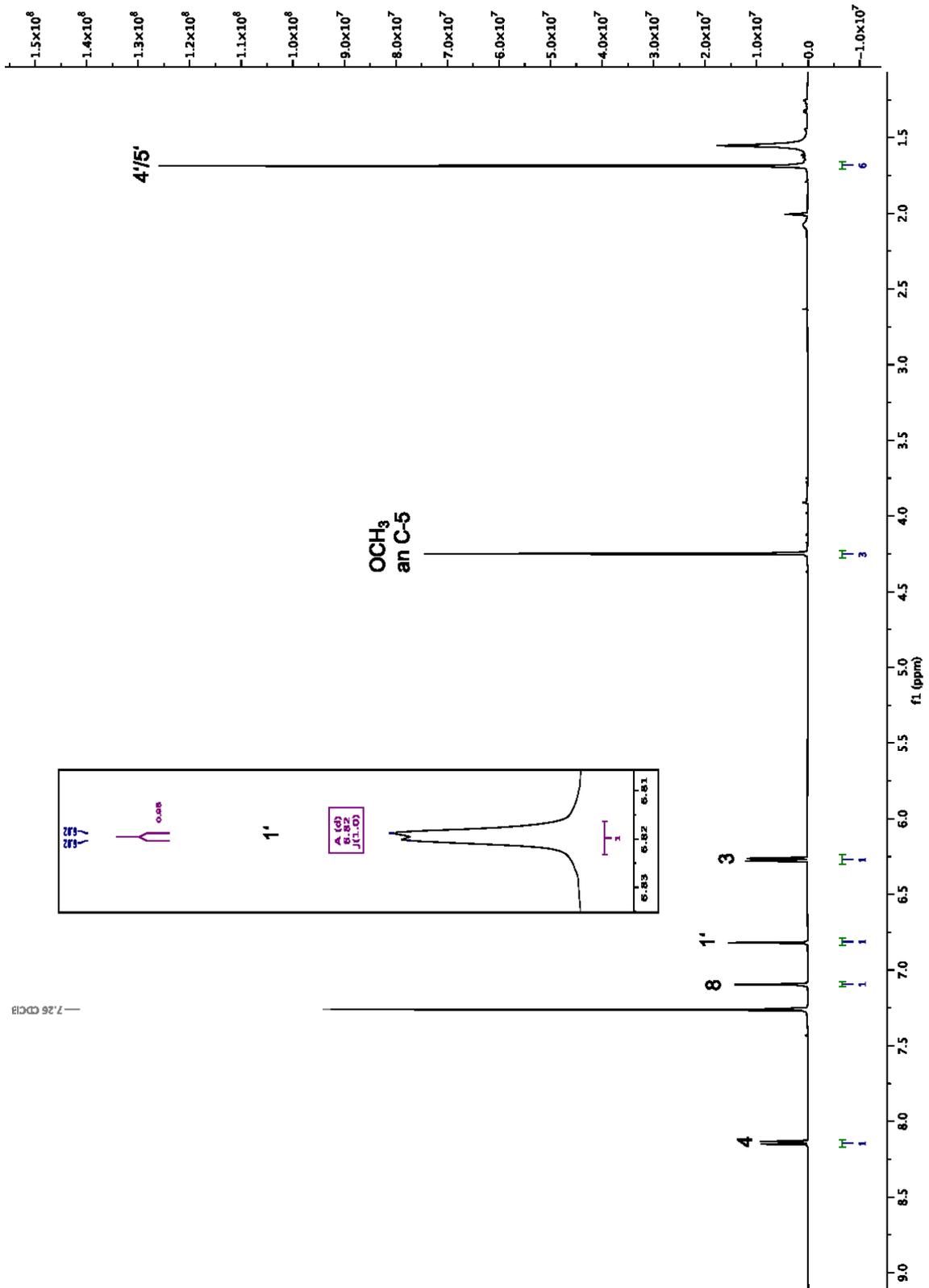


Abbildung 192: <sup>1</sup>H NMR-Spektrum von Verbindung 25 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

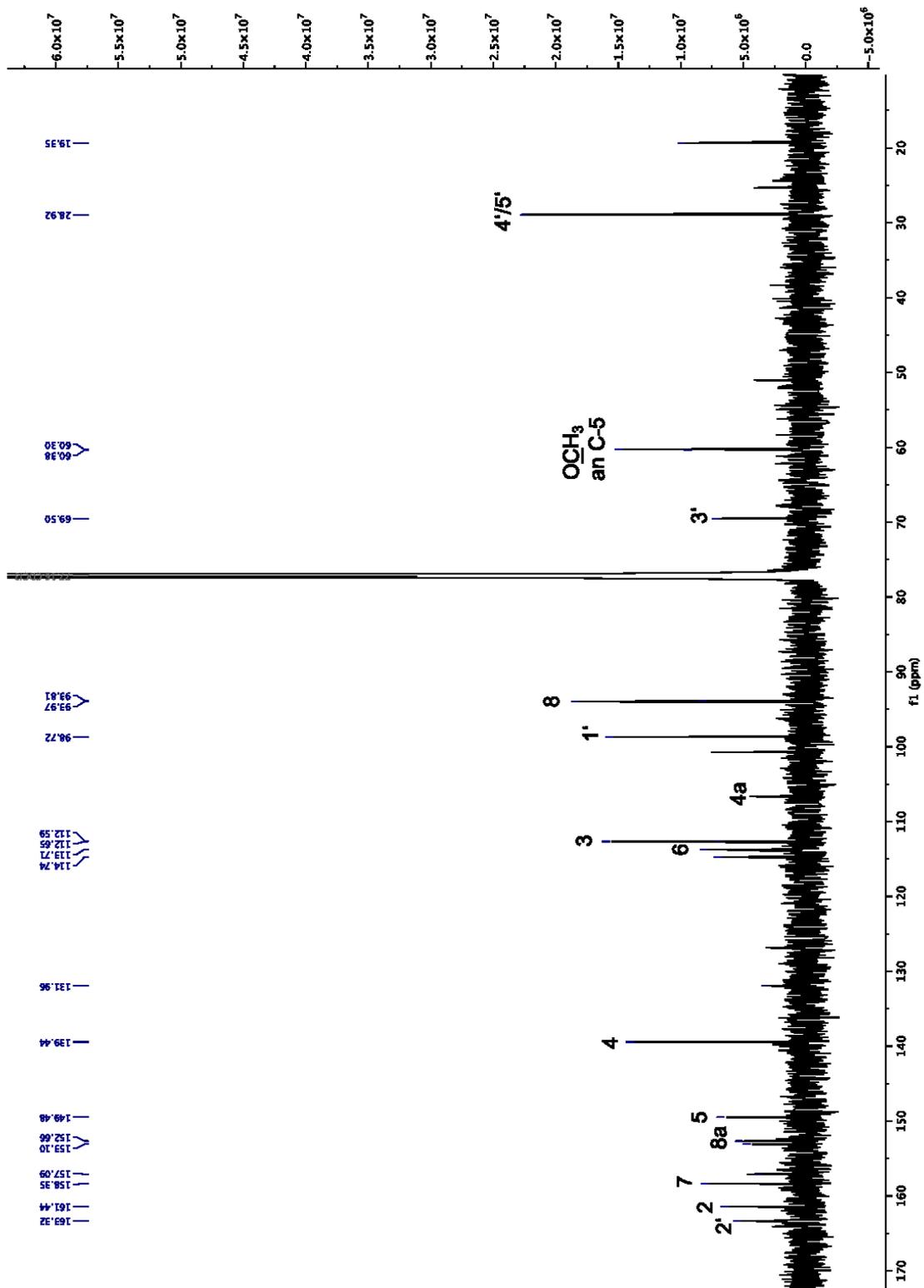


Abbildung 193: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Verbindung 25 (150 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

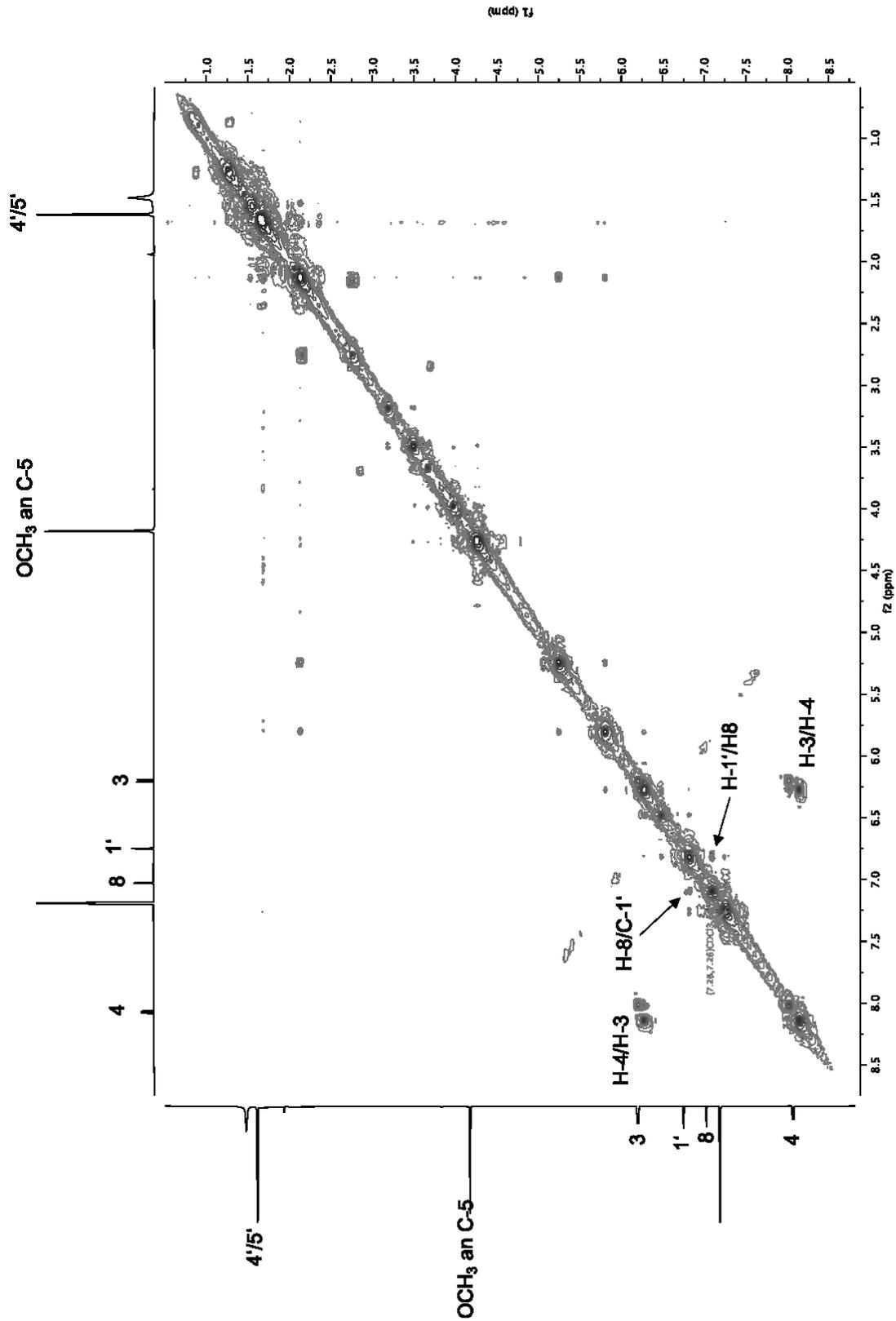


Abbildung 194: 2D-H,H-COSY-Spektrum von Verbindung 25 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

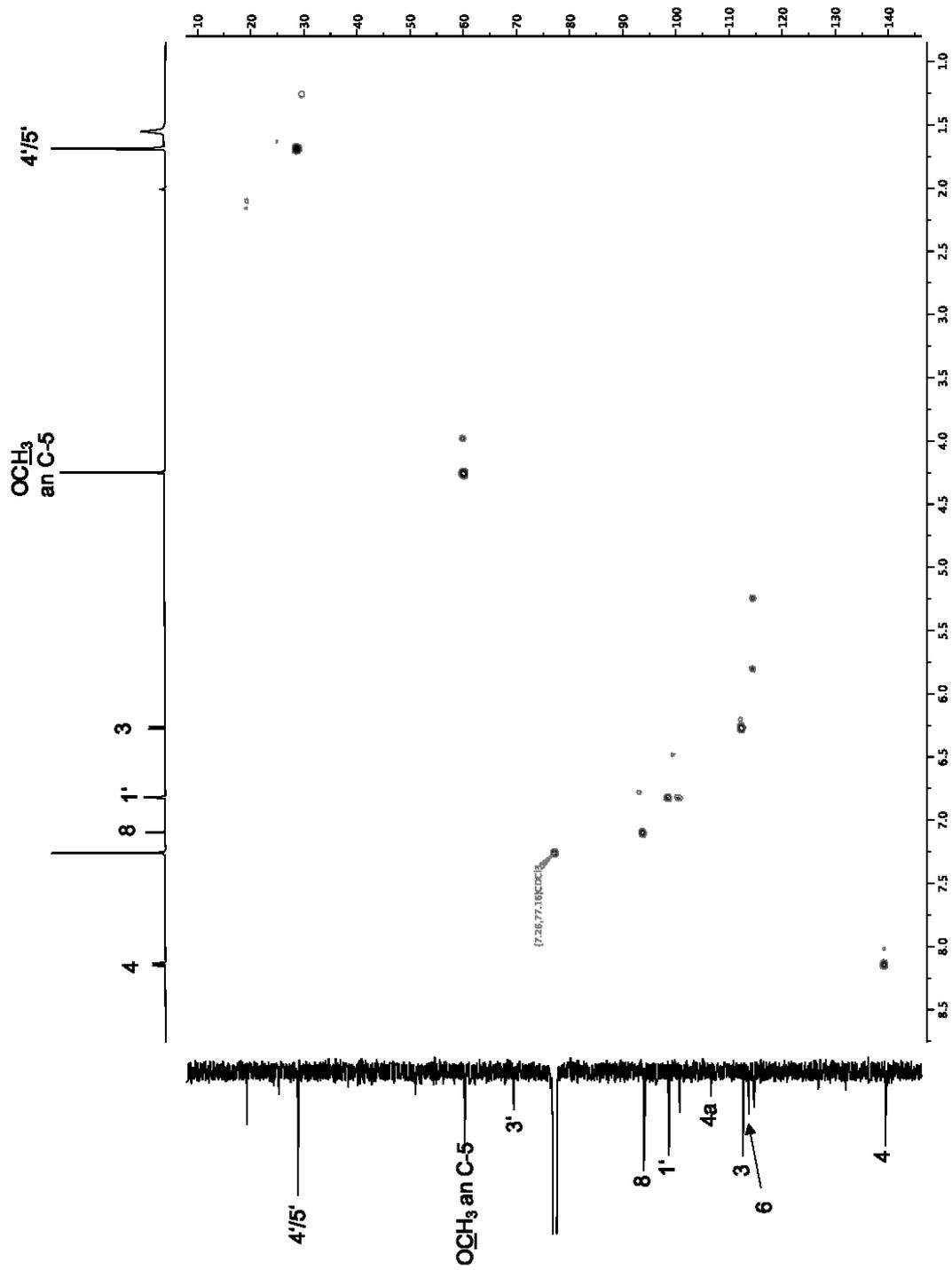


Abbildung 195: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 25 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

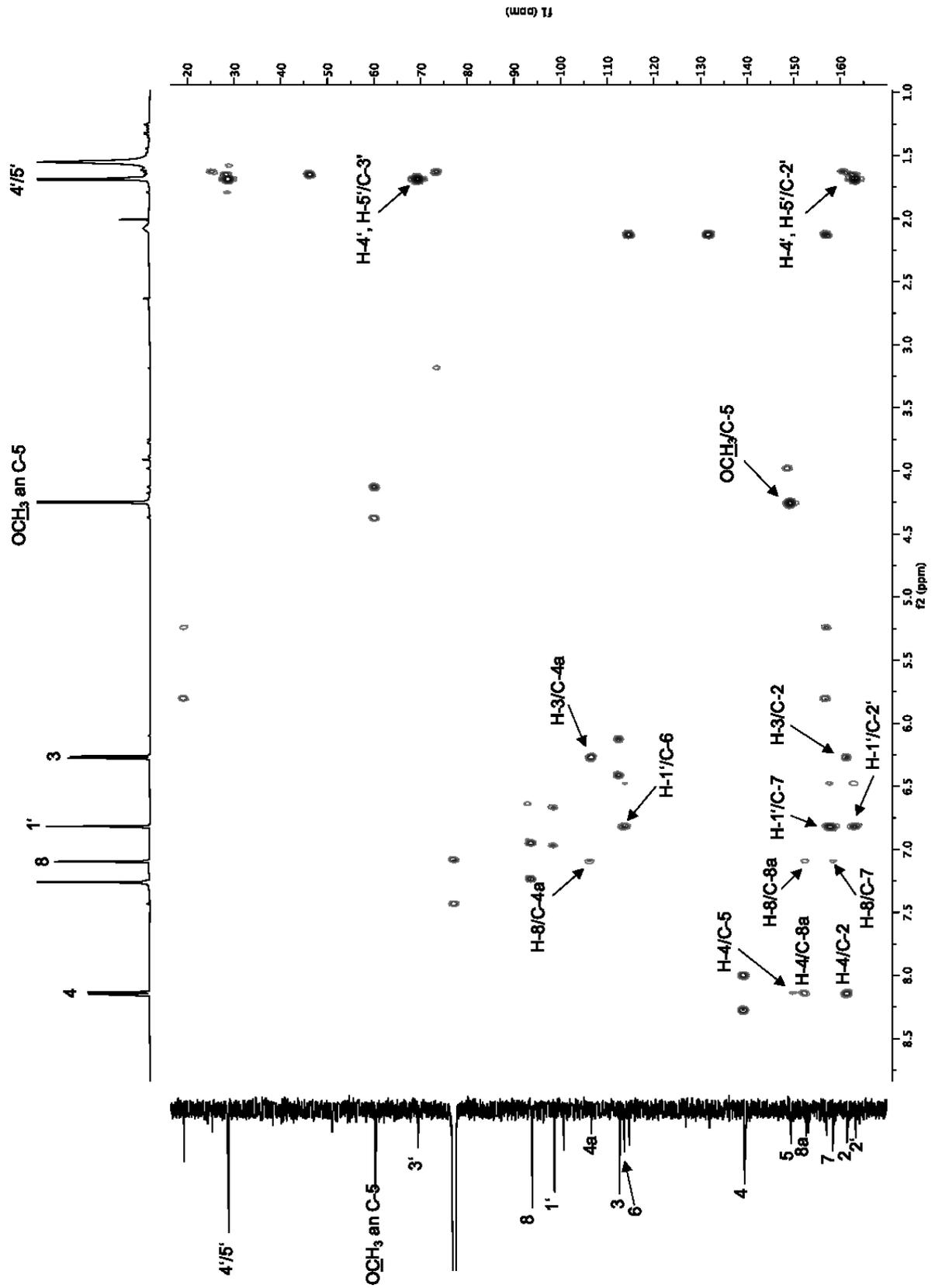
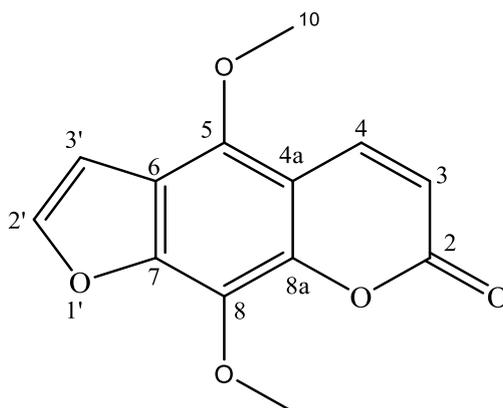


Abbildung 196: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 25 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

## 2.18 Verbindung 26 (Isopimpinellin)



Auch bei Verbindung **26**, die als weiß-gelbliche, amorphe Substanz in einer Ausbeute von 1,6 mg aus der Fraktion MB.D-VI-5-3 isoliert wurde, konnte bereits aufgrund des Verhaltens im DC und HPLC sowie der dabei erhaltenen UV-Daten (s. Kap. 6.1.1 und 6.9.) davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Furanocumarin handelt. Im DC (Fließmittel DC-3) wies die Substanz einen  $R_f$  Wert von 0,55 auf. Bei 254 nm zeigte der Substanzfleck mit dem  $R_f$  Wert von 0,55 eine Fluoreszenzlöschung. Mit Naturstoffreagenz A reagierte die Substanz unter Orangefärbung (s. Kap. 6.1.1).

Aus dem in der hochauflösenden Massenspektrometrie (Abbildung 197) gefundenen Quasimolekülion bei  $m/z=$  bei 247.0604  $[M+H]^+$  konnte die Summenformel  $C_{13}H_{10}O_5$  errechnet werden.

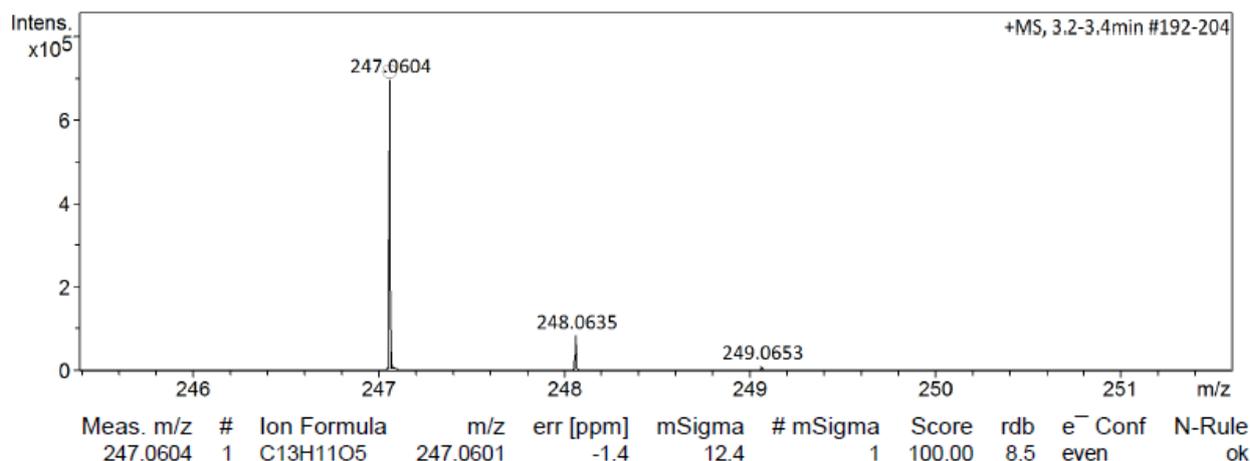


Abbildung 197: HRESIMS von Verbindung **26**

Vergleicht man die Summenformeln der bisher aus *Melicope barbiger*a isolierten Furanocumarine **23-25** mit Verbindung **26**, dann lässt sich folgern, dass **26** bei gleicher Anzahl von Sauerstoffen zwei Kohlenstoffe weniger als **25** besitzt. Gegenüber den am Phenylring

unsubstituierten Cumarinen **23** und **24** fehlt ein Kohlenstoff, es ist aber ein Sauerstoff mehr vorhanden. Daraus kann gefolgert werden, dass die bei **23-25** vorhandene hydroxylierte Isopropylgruppe am Furanring in **26** verkürzt vorliegt, oder ganz fehlt.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurde die Substanz in deuteriertem Chloroform gelöst und anschließend ein und zweidimensionale NMR Spektren aufgenommen. Das Protonenspektrum von **26** (Abbildung 203) zeigte sechs Signale für die erwarteten 10 Protonen. Zwei dicht nebeneinander auftretende Singulets für jeweils 3 Protonen bei  $\delta = 4.170$  und  $4.173$  ppm sprachen aufgrund der Lage im Spektrum für zwei aromatische Methoxygruppen. [153] Die zugehörigen Kohlenstoffe wurden mit Hilfe des HSQC-Spektrums (Abbildung 201) bei  $\delta = 61.89$  und  $61.01$  ppm gefunden. Bei den übrigen 4 Signalen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum handelte es sich um Dubletts, von denen jeweils zwei, aufgrund der Kopplungskonstanten und der Cross-Peaks im H,H-COSY-Spektrum (s. Abbildung 200), als zueinander benachbart erkannt wurden. Wie bei den Verbindungen **23-25** traten im gleichen Shiftbereich des Spektrums zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von  $J = 9.8$  Hz auf, die dem H-3 ( $\delta_{\text{H}} = 6.29$ ;  $\delta_{\text{C}} = 113.07$  ppm) und H-4 ( $\delta_{\text{H}} = 8.13$ ;  $\delta_{\text{C}} = 139.55$  ppm) des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten 2-Pyrenonringes der Cumarinstruktur zuzuordnen waren. Die beiden anderen Dubletts bei  $\delta_{\text{H}} = 7.00$  und  $7.63$  ppm mussten daher von einem in Verbindung **26** vorhandenen Furanring stammen, was gleichzeitig bewies, dass die bei **23-25** vorhandene Seitenkette am C-2' in Verbindung **26** fehlt. Da diese Substanz daher nicht mehr als prenyliertes Cumarin gesehen werden kann, ändert sich hier die Bezeichnung der Ringatome. Der Sauerstoff des Furanrings erhält die Nummer 1', wodurch die beiden Kohlenstoffe des Furanrings die Bezeichnung C-2' und C-3' erhalten. Aufgrund der Anzahl der Kohlenstoffatome, deren Signale sich nur über die zwei dimensional Spektren, leider im in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, eindeutig zuordnen ließen, und der Protonensignale war klar, dass es sich bei **26** um ein an C-5 und C-8 zweifach methoxyliertes einfaches, lineares Furanocumarin, das 5,8-Dimethoxypsoralen handeln musste. Zu dieser Verbindung, die auch Isopimpinellin genannt wird, fanden sich  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten bei Waight et al., allerdings haben die Autoren die Shiftwerte für die beiden Methoxygruppen nicht zugeordnet. [154] Bereits acht Jahre zuvor veröffentlichten Elgamal et al. (1979) nur  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten für das Isopimpinellin in  $\text{CDCl}_3$  und  $\text{DMSO-d}_6$ . [155] Aufgrund des von uns gemessenen, schlechten Kohlenstoffspektrums von **26** haben wir einen zweiten Satz Spektren in  $\text{DMSO-d}_6$  aufgenommen (Abbildung 198, Abbildung 199, Abbildung 201, Abbildung 202 und Tabelle 33). Durch den Vergleich der so ermittelten Shiftwerte mit den von Elgamal et al. (1979) veröffentlichten Daten, konnte eindeutig festgestellt werden, dass es sich bei **26** das Isopimpinellin handelt. [155] Die Protonendaten von **26** in  $\text{DMSO-d}_6$  wurden erstmals von

Ngwendson et al. veröffentlicht. [156] Die von dieser Arbeitsgruppe gemessenen Werte stimmen insgesamt gut mit unseren Daten überein, allerdings ist die Zuordnung der Methoxygruppen an C-5 und C-8 vertauscht worden. Betrachtet man unsere Spektren, so kann die Zuordnung von C-5 bzw. C-8 nur an der  $^3\text{J}$ -Korrelation des H-4 mit dem die Methoxygruppe tragenden C-5 festgemacht werden. Die zweite mögliche  $^3\text{J}$ -Korrelation zwischen H-3' und C-5 konnte im HMBC in beiden Lösungsmitteln nicht nachgewiesen werden (Abbildung 202). Aufgrund der Struktur des Isopimpinellins besitzt das C-8 keinen  $^3\text{J}$ -Korrelationspartner, so dass die Korrelation zwischen H-4 und C-5 eigentlich ausreichend sein sollte. Da es aber auch eine  $^4\text{J}$ -Kopplung zwischen H-4 und C-8 gibt, ist die Zuordnung von C-5 und C-8, sowie den an diesen Kohlenstoffen gebundenen Methoxygruppen nicht ohne weiteres möglich. Abhilfe schaffen, könnte ein NOESY-Spektrum, mit dessen Hilfe sich die Nachbarschaft der Methoxygruppe an C-5 mit H-4 bzw. H-3' nachweisen lassen sollte. Ein Vergleich der Kohlenstoffshifts des 5- bzw. 8-Methoxypsoralens, die von Waight et al. (1987) ebenfalls aus *Skimmia laureola* isoliert wurden, zeigt allerdings die richtige Zuordnung der aromatischen Kohlenstoffe C-5 und C-8 in **26**. [154] Während das C-5 im 5-Methoxypsoralen bei  $\delta = 149.6$  ppm zur Resonanz kommt, findet man den methoxylierten Kohlenstoff C-8 im 8-Methoxypsoralen bei  $\delta = 132.4$  ppm. Beide Kohlenstoffshifts liegen nur wenige ppm von den für die methoxylierten Kohlenstoffe in **26** gefundenen Werten entfernt. Da Waight et al. offenbar keine long-range Korrelationsspektren zur Verfügung hatten, haben sie die Methoxysignale bei  $\delta = 59.3$  und  $61.5$  ppm ebenfalls nicht zugeordnet.

Bei Kenntnis der Kohlenstoffshifts von C-5 und C-8 ist die Zuordnung aber über die  $^3\text{J}$ -Kopplungen zwischen den Methylprotonen und C-5 bzw. C-8 im HMBC eindeutig möglich (s. Tabelle 33 und Abbildung 202)

Isopimpinellin (**26**) ist ein sehr häufig gefundener Naturstoff, der auch in vielen Rutaceen und insbesondere auch in der Gattung *Melicope* schon gefunden wurde. [157–161] In *Melicope barbiger*a wurde diese Verbindung bisher noch nicht nachgewiesen.

**Tabelle 33:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Verbindung **26** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	<b>26</b>		Literaturwerte nach [154]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
<b>2</b>	-	160.45	-	160.7
<b>3</b>	6.29 d (9.8)	113.07	6.2d d (9.5)	112.9

**Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen**

---

<b>4</b>	8.13 d (9.8)	139.55	8.08 d (9.5)	139.3
<b>4a</b>	-	107.66	-	107.1
<b>5</b>	-	144.22		144.4
<b>6</b>	-	114.80	-	114.9
<b>7</b>	-	149.89	-	149.9
<b>8</b>	-	128.41		128.3
<b>8a</b>	-	143.61	-	143.7
<b>2'</b>	7.63 d (2.3)	145.29	7.59 d (2.2)	146.0
<b>3'</b>	7.00 d (2.4)	105.24	6.96 d (2.2)	105.1
<b>OCH<sub>3</sub> an C- 5</b>	4.17 s	61.01	4.10 s	59.3
<b>OCH<sub>3</sub> an C- 8</b>	4.17 s	61.89	4.14 s	61.5

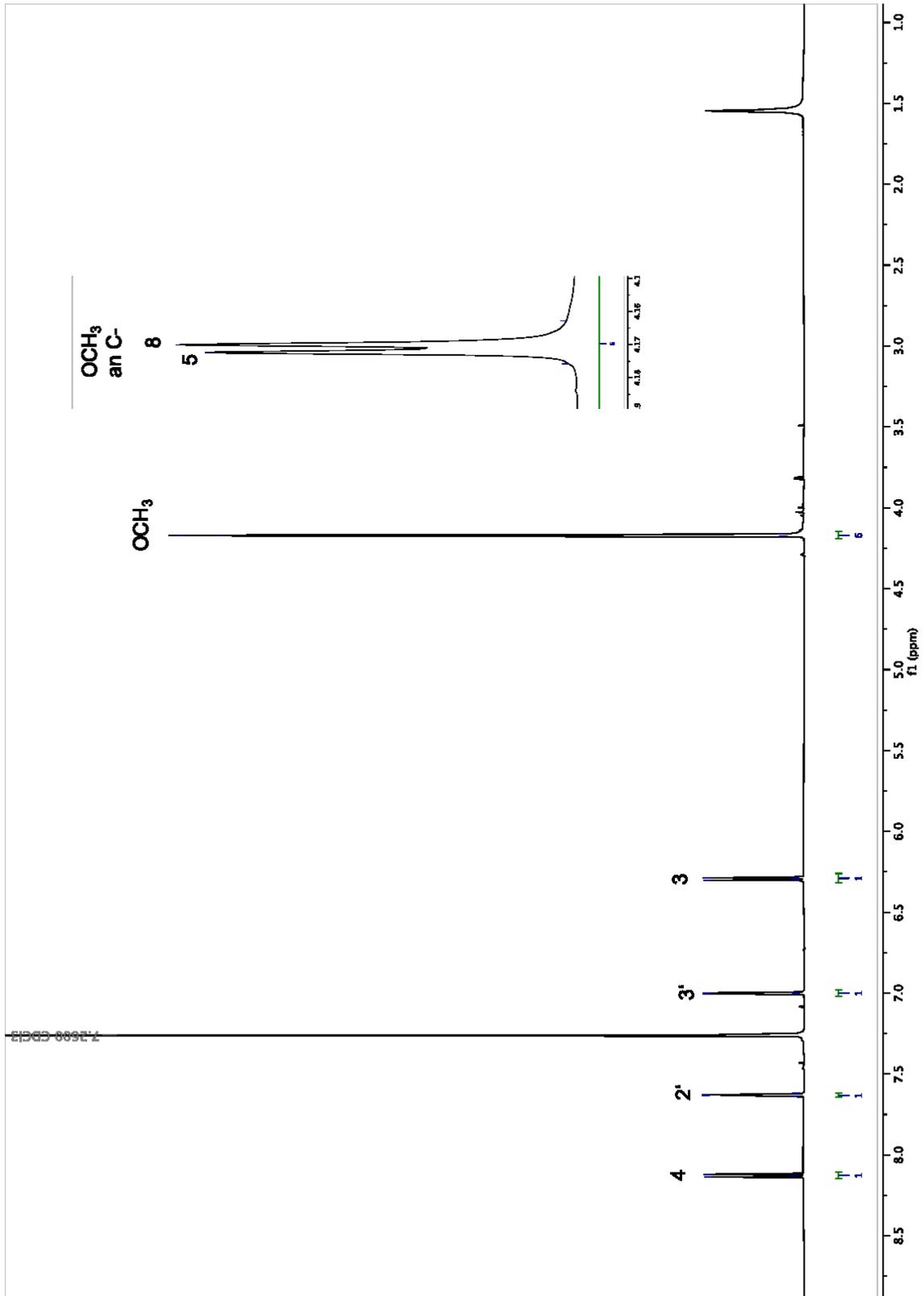


Abbildung 198:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **26** (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

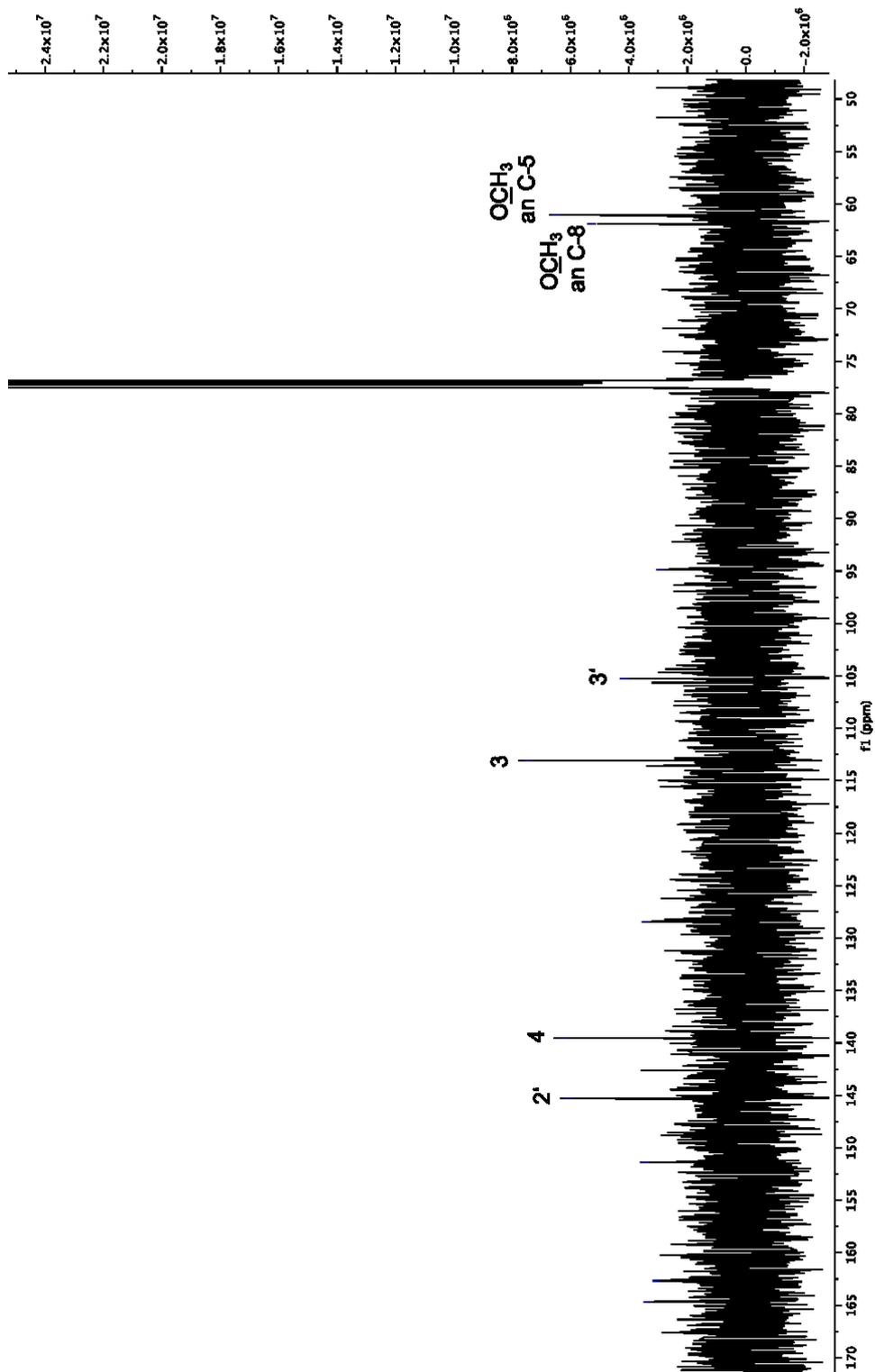


Abbildung 199:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **26** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

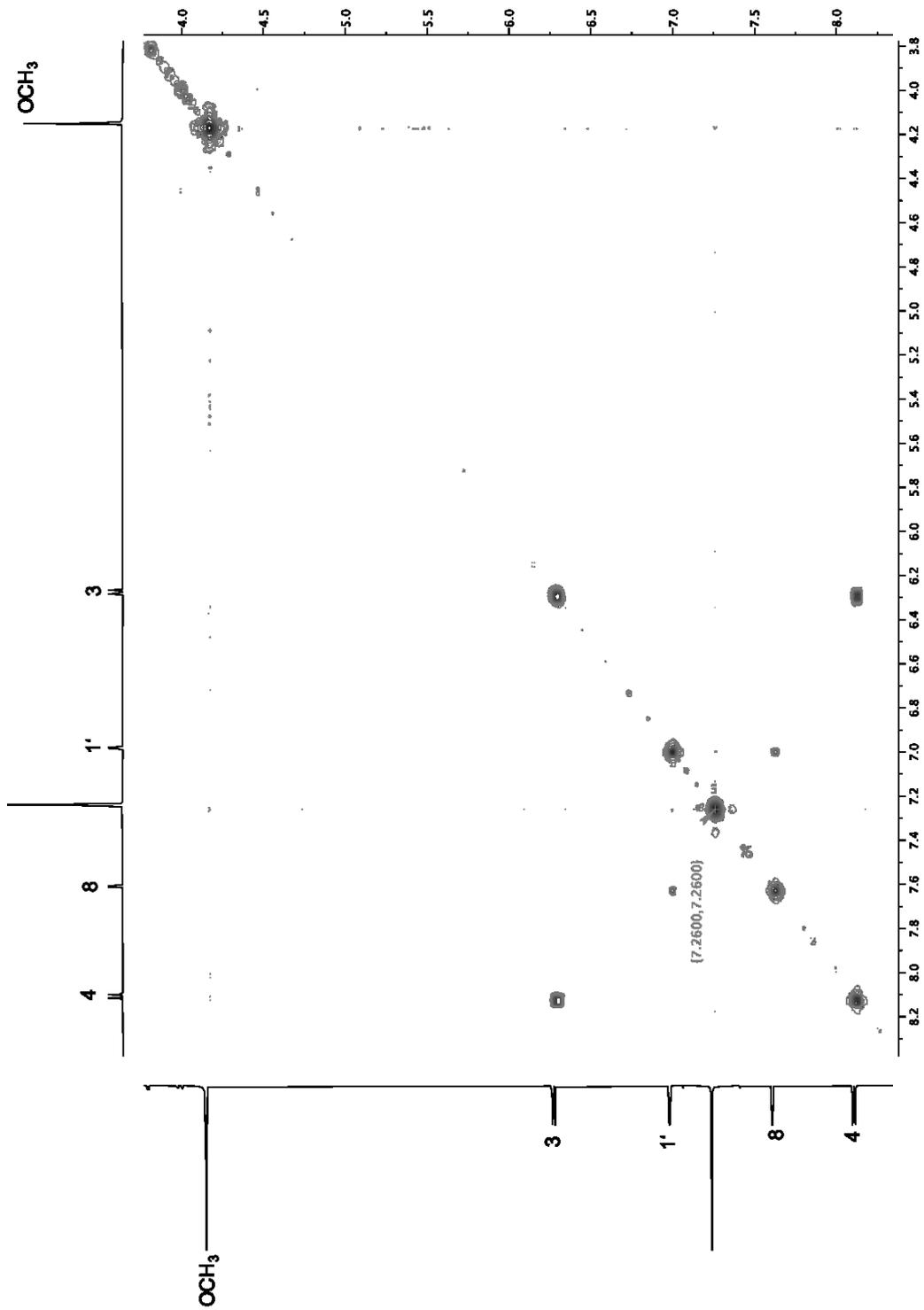


Abbildung 200: 2D-H,H-COSY-Spektrum von Verbindung 26 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

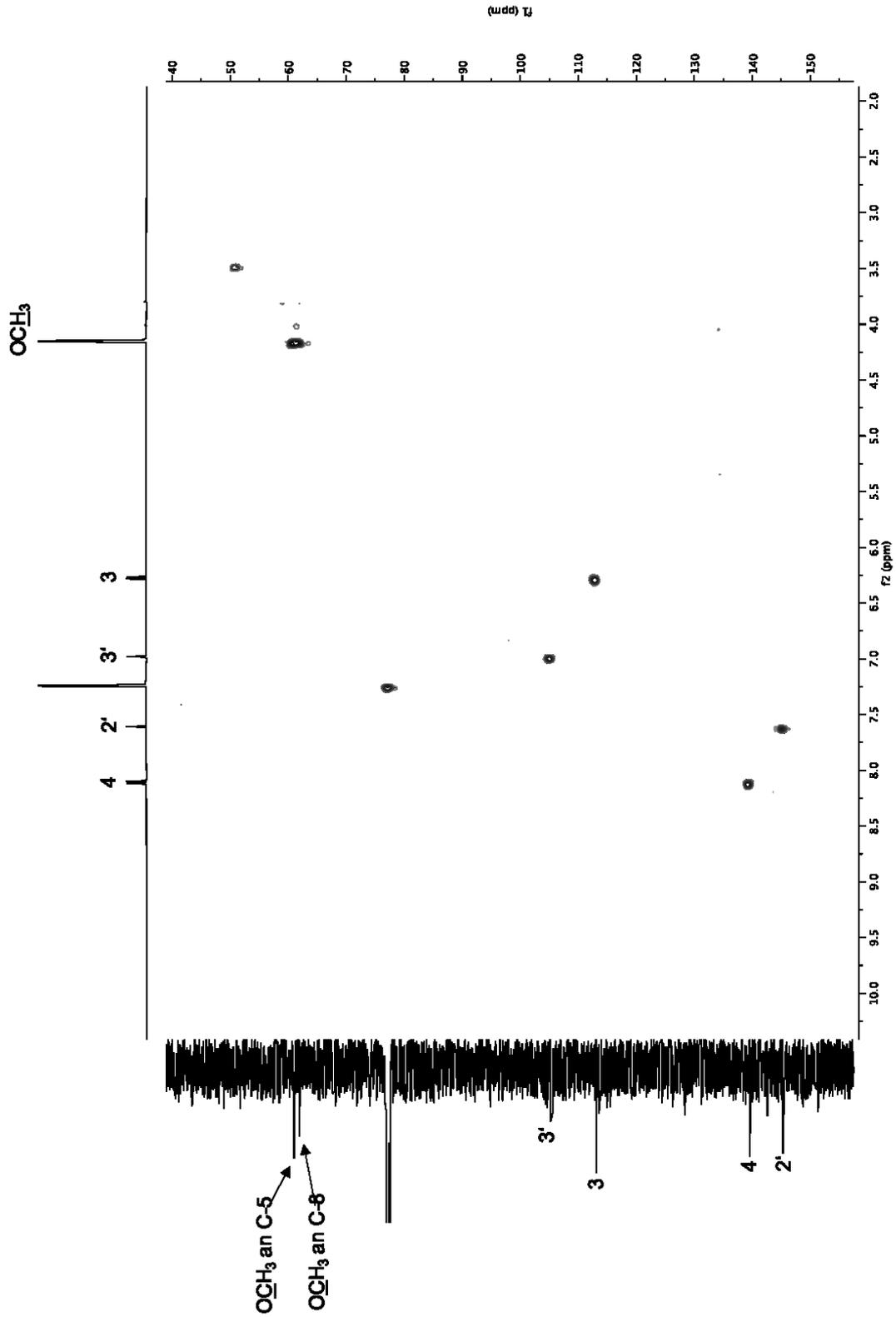


Abbildung 201: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 26 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

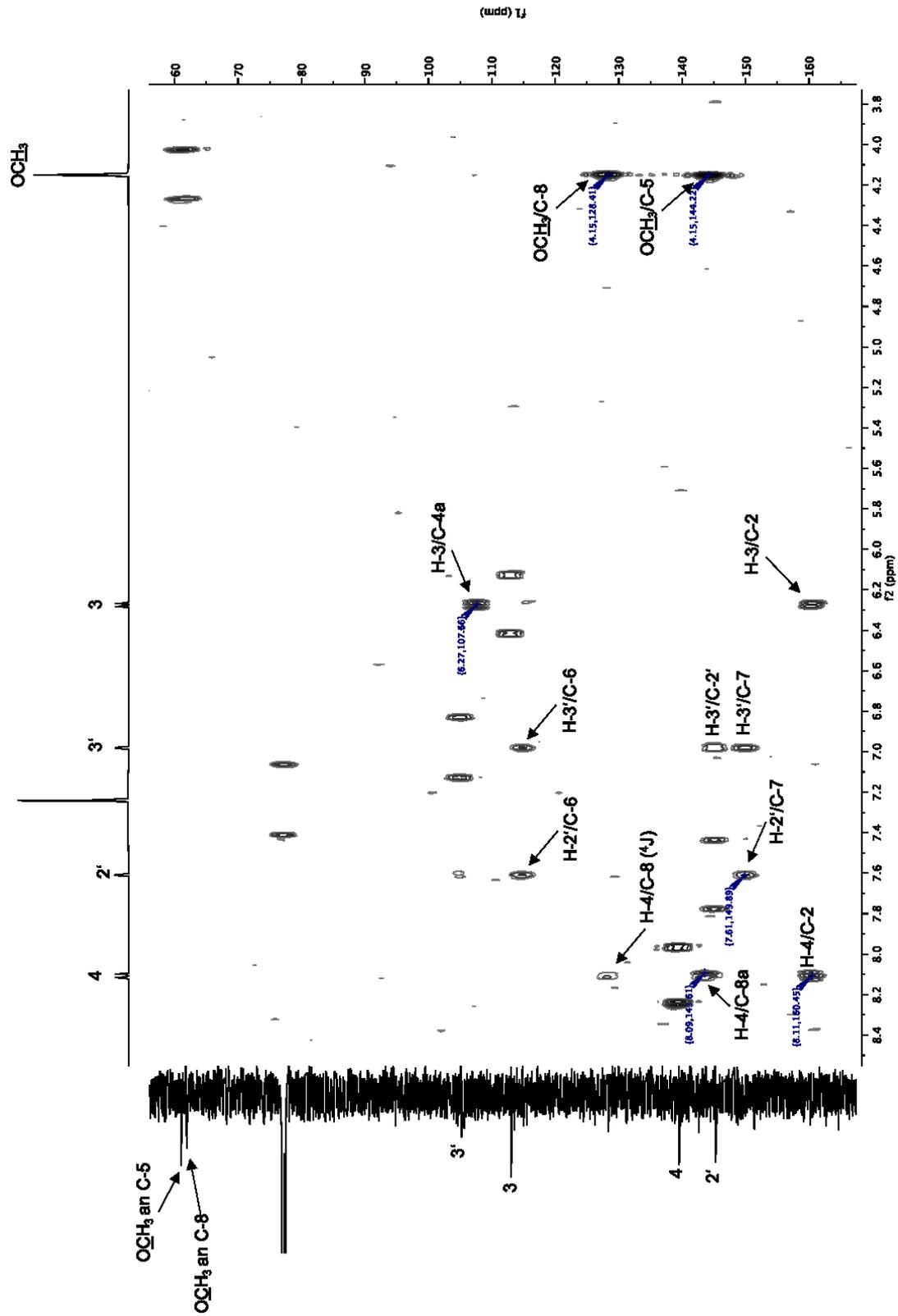


Abbildung 202: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 26 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

**Tabelle 34:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von **26** ( $\delta$  in ppm , 600/150 MHz in DMSO- $d_6$ )

Position	26		Vergleich mit Literatur	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz) [162]	$^{13}\text{C}$ [155]
<b>2</b>	-	159.58	-	159.4
<b>3</b>	6.35 d (9.8)	112.56	6.36 d (9.8)	112.3
<b>4</b>	8.19 d (9.8)	139.75	8.15 d (9.8)	139.5
<b>4a</b>	-	106.82	-	106.7
<b>5</b>	-	144.32	-	144.2
<b>6</b>	-	114.40	-	114.3
<b>7</b>	-	149.41	-	149.2
<b>8</b>	-	127.19	-	127.1
<b>8a</b>	-	143.09	-	142.9
<b>2'</b>	8.09 d (2.3)	146.35	8.07 d (2.3)	146.1
<b>3'</b>	7.39 d (2.3)	105.70	7.37 d (2.2)	105.5
<b>OCH<sub>3</sub> an C-5</b>	4.17 s	60.81	4.01 s	60.6.
<b>OCH<sub>3</sub> an C-8</b>	4.03 s	61.28	4.18 s	61.1

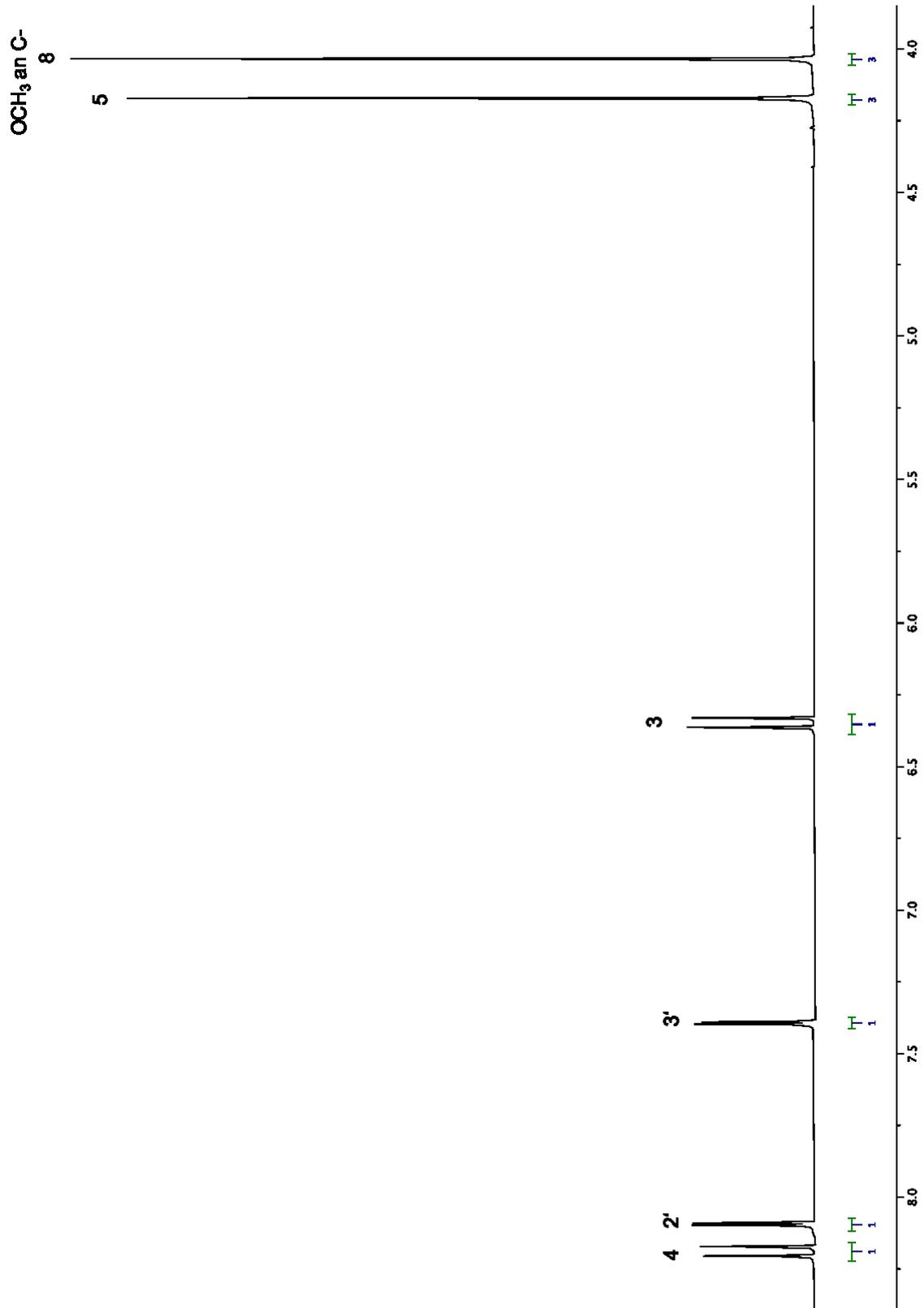


Abbildung 203:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **26** (600 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

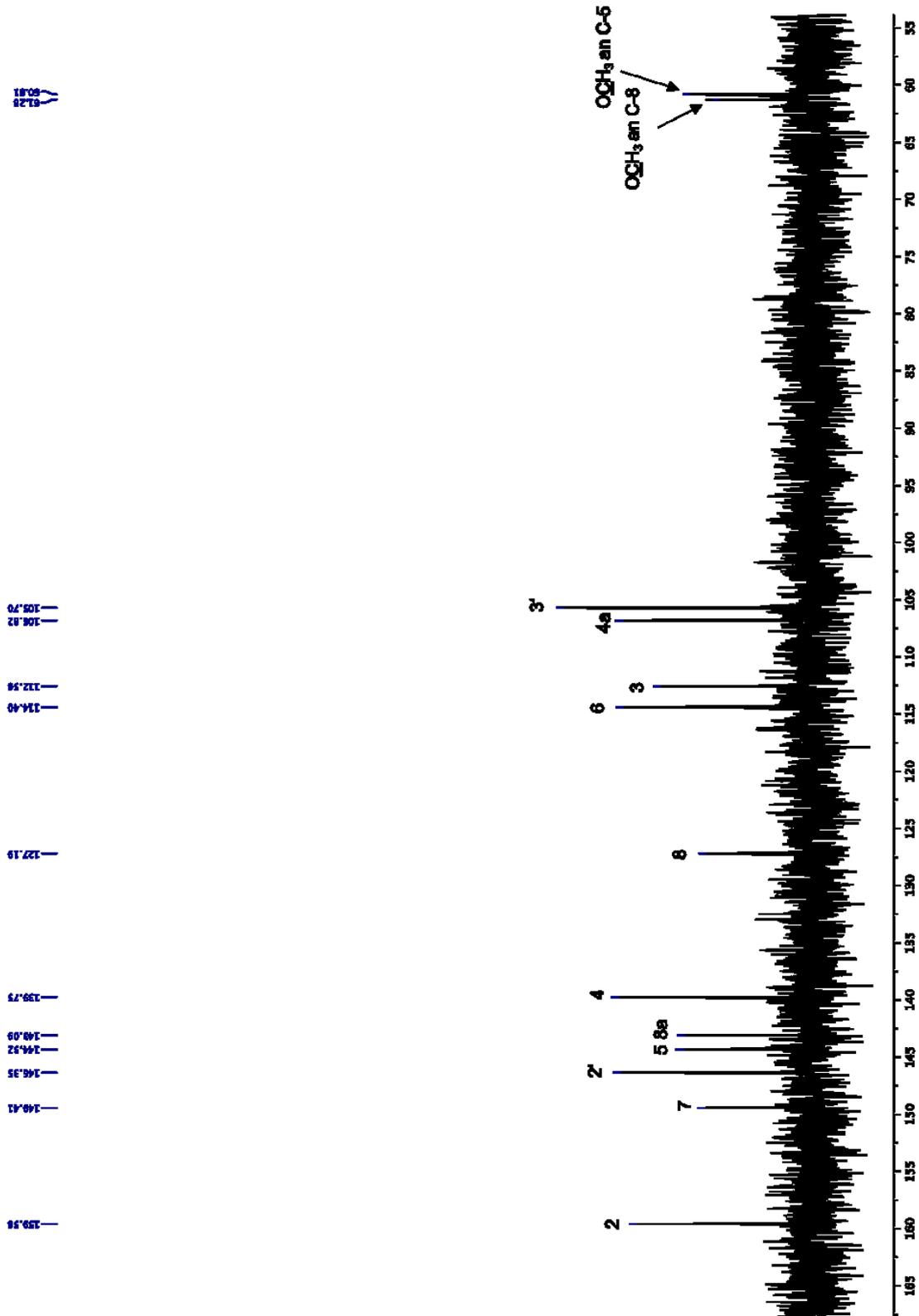


Abbildung 204:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 26 (150 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

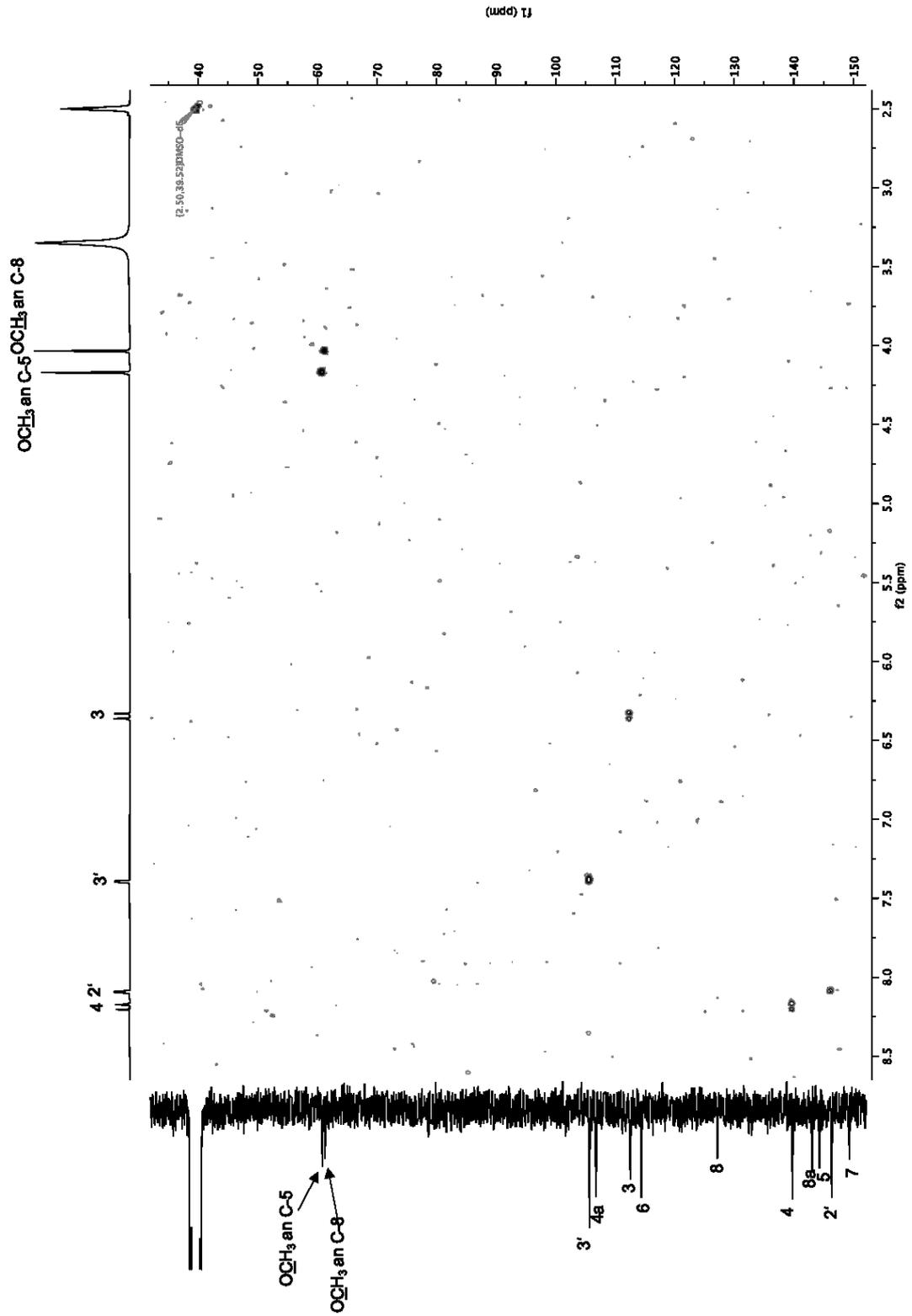


Abbildung 205: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 26 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

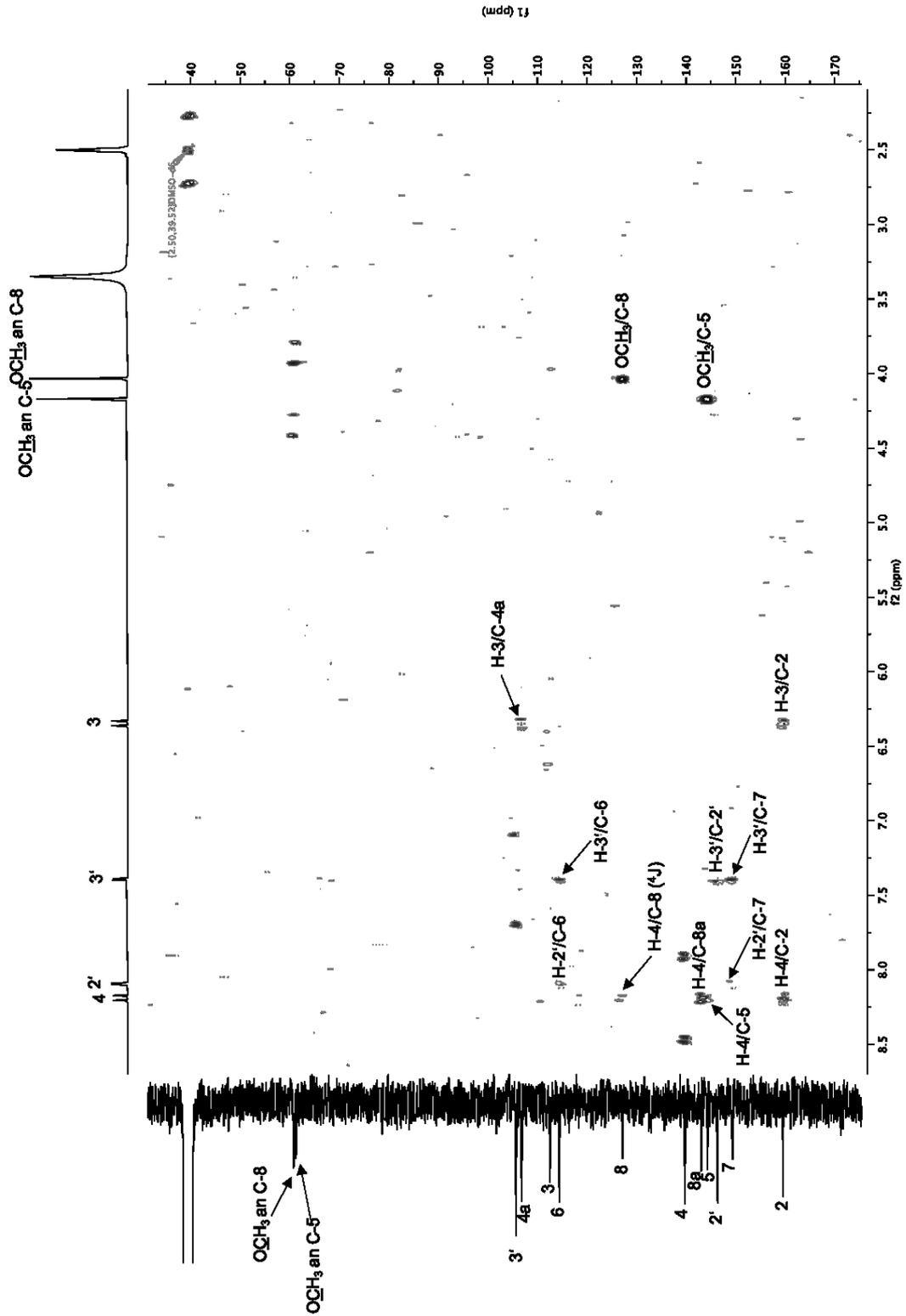
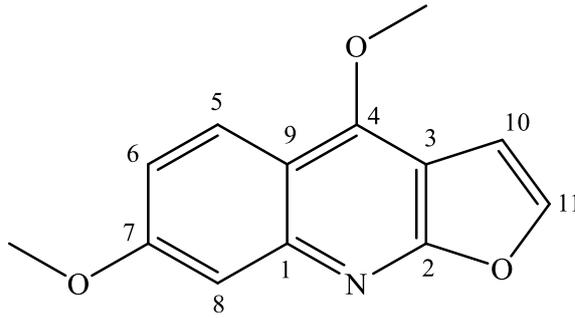


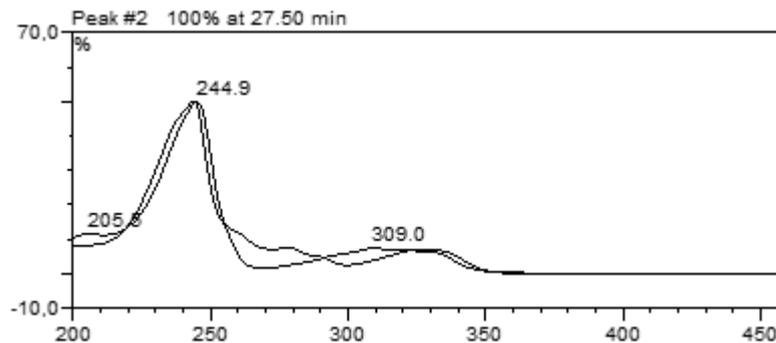
Abbildung 206: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 26 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

## 2.19 Verbindung 27 (Evolitrin)



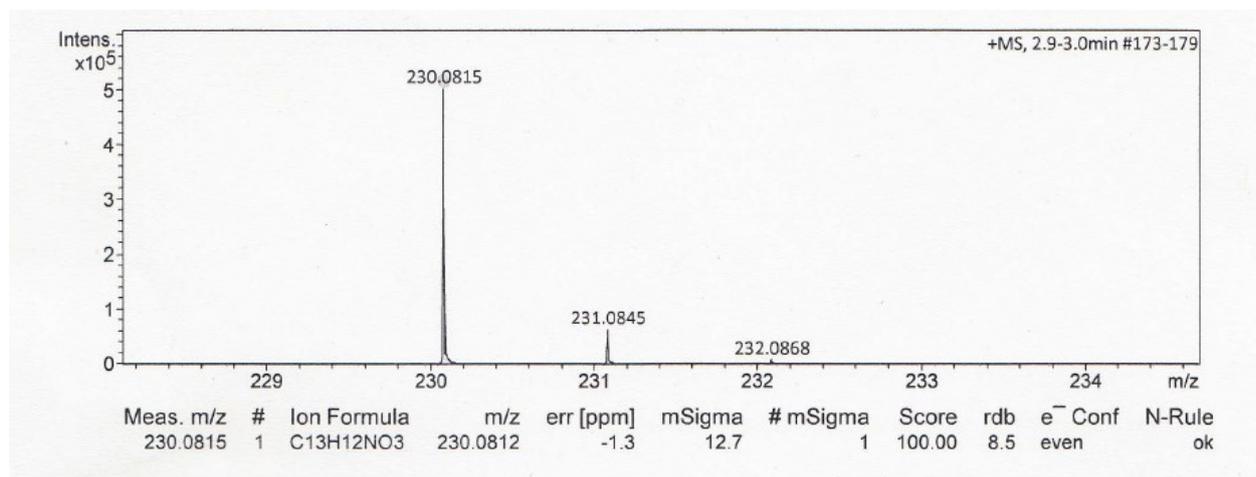
Verbindung **27** wurde in einer Ausbeute von 1,2 mg als weißliche, amorphe Substanz aus der Fraktion MB.D-VII-9-4 isoliert. Im Dünnschichtchromatogramm (DC-Fließmittel DC-3) zeigte die Substanz eine Fluoreszenzlöschung bei 254 nm bei einem  $R_f$  Wert von 0,31 (s. Kap. 6.1.1). Mit Naturstoffreagenz A erhielt man im Gegensatz zu den Flavonoiden keine Veränderung der Farbe im Tageslicht bzw. keine Fluoreszenz im UV-Licht (366 nm). Nach dem Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz resultierte eine Violettärfärbung. (s. Kap. 6.1.1)

Das bei der HPLC mit dem Dioden-Array-Detektor erhaltene UV-Spektrum (s.u.) bestätigt, dass es sich bei **27** nicht um ein Flavonoid handeln sollte, da die langwellige Bande im Spektrum fehlt.



Bei der hochauflösenden Massenspektrometrie mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation bilden sich Quasimolekülonen durch Anlagerung eines Protons, wodurch das detektierte Molekülon  $[M+H]^+$  eine ungerade Masse besitzt, wenn es nur aus Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Wasserstoffatomen zusammengesetzt ist. Die Molmasse solcher Verbindungen ist dann geradzahlig und durch 2 teilbar. Befindet sich ein Stickstoff im Molekül, dann resultiert ein ungerades Molekulargewicht, dessen Quasimolekülon durch die Protonierung geradzahlig ist. Verbindung **27** zeigte sein Molekülon  $[M+H]^+$  bei  $m/z = 230.0815$ , was darauf hindeutet, dass

es sich um ein Alkaloid mit der molekularen Masse von 229 u handeln könnte. Die durch die genaue Massenmessung errechnete Summenformel  $C_{13}H_{11}NO_3$  für die unprotonierte Verbindung bestätigte diese Annahme. Aus der Summenformel lassen sich neun Doppelbindungsäquivalente errechnen.

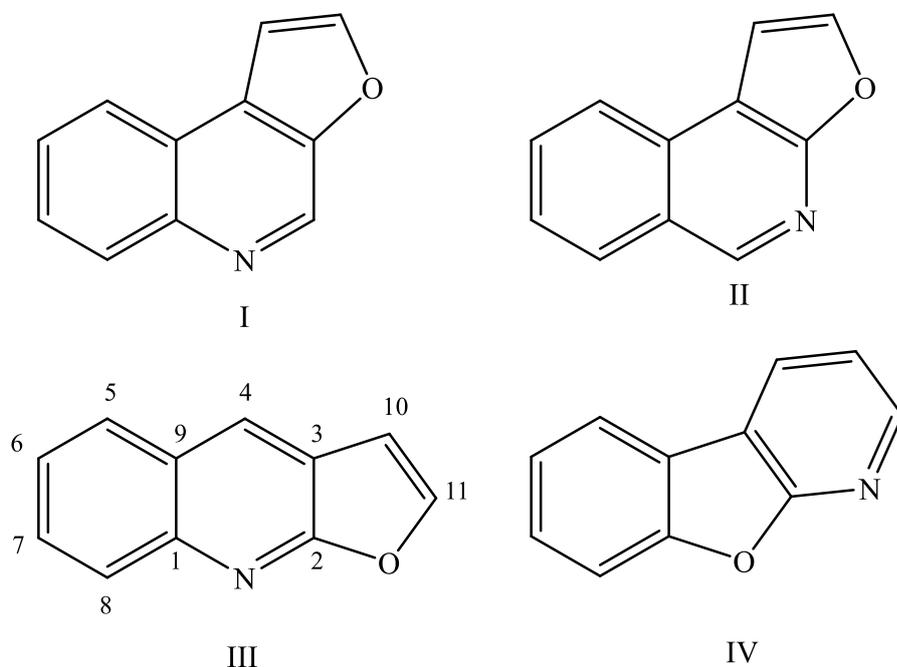


**Abbildung 207:** HRESIMS von Verbindung **27**

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden die 1D- und 2D NMR Spektren von **27** in DMSO- $d_6$  aufgenommen. Das  $^1H$ -NMR Spektrum (Abbildung 210 und Tabelle 35) zeigte sieben Signale für insgesamt 11 Protonen. Aus den Integralen der beiden Singulets bei  $\delta_H = 4.03$  ppm und 4.58 ppm, ging hervor, dass es sich um die Signale von jeweils drei äquivalenten Methylprotonen handeln musste. Aufgrund der Lage im Spektrum sollte es sich um zwei Methylether handeln. Die zugehörigen Kohlenstoffe fanden sich über das HSQC-Spektrum (Abbildung 212) bei  $\delta_C = 55.39$  und 59.39 ppm im Shiftbereich aromatischer Methoxygruppen. Die anderen 5 Protonensignale traten alle im Tieffeldbereich des Spektrums auf, es handelte sich daher höchstwahrscheinlich um aromatische Protonen. Drei der fünf Signale, zwei Dubletts bei  $\delta_H = 8.11$  ( $J = 9.2$  Hz) und 7.27 ( $J = 2.5$  Hz) ppm sowie ein Dublett vom Dublett bei  $\delta_H = 7.13$  ( $J = 9.2$  und 2.5 Hz) ppm, zeigten das typische Aufspaltungsmuster eines ABX-Systems, das trisubstituierte Aromaten charakterisiert. Die beiden anderen Dubletts bei  $\delta_H = 7.96$  und 7.43 ppm konnten aufgrund der Kopplungskonstanten als zweites Spinsystem ausgemacht werden.

Im  $^{13}C$ -NMR (Abbildung 211), fanden sich neben den Signalen für die beiden bereits angesprochenen Methylkohlenstoffe der Methoxysubstituenten am Aromaten, die Signale für

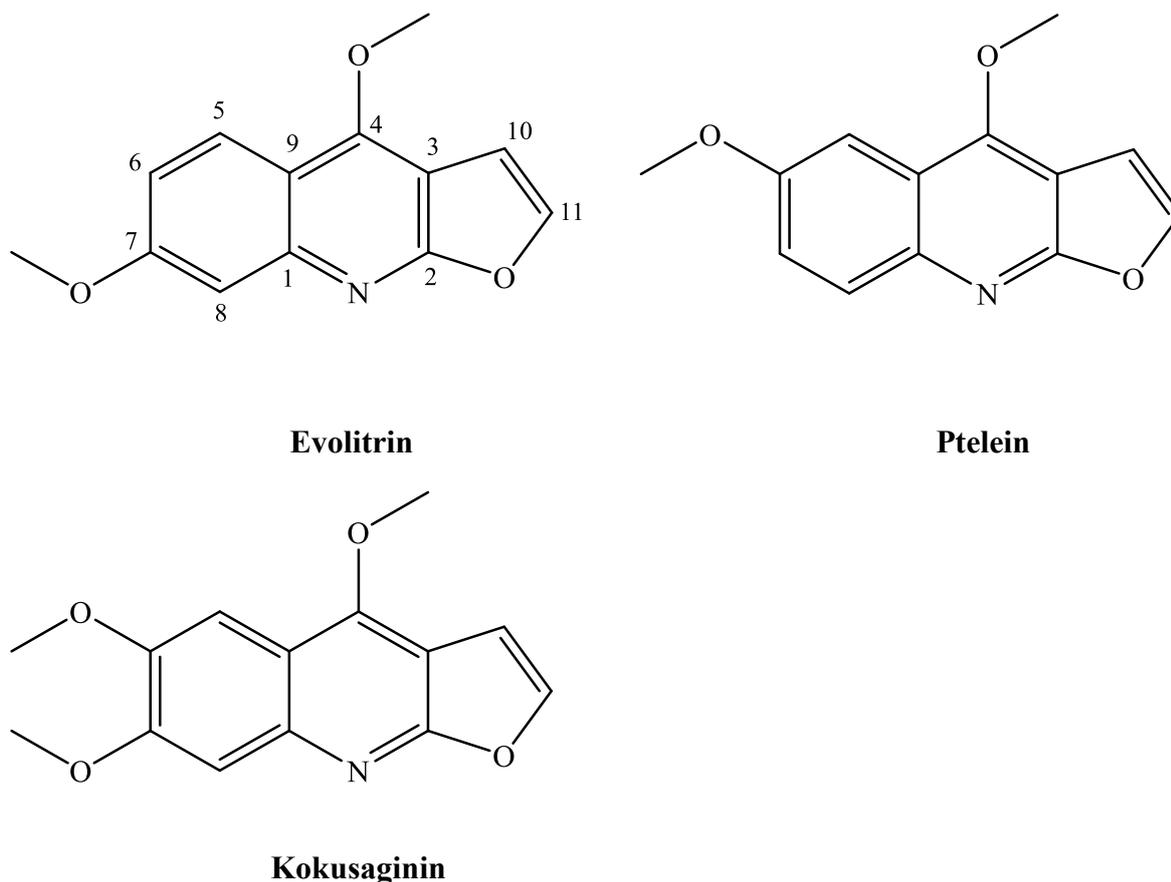
elf weitere Kohlenstoffe, von denen sechs aufgrund fehlender Korrelationen im HSQC-Spektrum (Abbildung 212) als quartäre Kohlenstoffe erkannt wurden. Die fünf protonierten C-Atome korrespondieren zu den oben angesprochenen aromatischen Protonen (Abbildung 210 und Tabelle 35). Aufgrund der Korrelationen im HSQC-Spektrum ist zu festzustellen, dass alle Protonen an Kohlenstoffe gebunden sind. An Sauerstoff bzw. Stickstoff gebundene Protonen treten im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **27** nicht auf. Da es bei Verwendung von  $\text{DMSO-d}_6$  im Gegensatz zu  $\text{CDCl}_3$  oder  $\text{CD}_3\text{OD}$  nicht zum Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium kommen kann, muss Verbindung **27**, entsprechend der errechneten Summenformel  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$  neben den beiden Methoxysauerstoffen einen dritten heterozyklisch gebundenen Sauerstoff besitzen, vermutlich wie bei den Verbindungen **23-26** in Form eines Furanrings. Auch der Stickstoff muss heterocyclisch gebunden sein. Das Ringsystem wird daher von elf Kohlenstoffen, einem Sauerstoff und einem Stickstoff gebildet. Es könnte sich, unter Berücksichtigung der errechneten 9 Doppelbindungsäquivalente, um ein trizyklisches Ringsystem handeln, das aus einem Benzol-, einem Pyridin- und einem Furanring besteht, wodurch 3 Ringe und sechs Doppelbindungen im Ringsystem vorhanden wären. Abbildung 208 zeigt eine Auswahl von möglichen trizyklischen Ringsystemen mit 9 Doppelbindungsäquivalenten.



**Abbildung 208:** Beispiele für Trizyklen mit 9 Doppelbindungsäquivalenten und zwei Heteroatomen

Alle Ringsysteme besitzen einen außen liegenden Benzolring, dessen Protonen durch eine zu den Brückenkopfkohlenstoffen meta-angordnete Methoxygruppe ein ABX-System bilden

könnten. Bei einem außen liegenden Pyridin wäre das nicht möglich. Sowohl die linear als auch angular angeordneten Ringsysteme besitzen 4 quartäre Kohlenstoffe, die jeweils zu zwei benachbarten Ringen gehören. Zwei weitere quartäre Kohlenstoffe entstehen durch den Austausch zweier Protonen durch die beiden Methoxygruppen. Die Auswertung des HMBC-Spektrums (Abbildung 217) zeigt, dass die beiden OCH<sub>3</sub>-Gruppen an den aromatischen, quartären Kohlenstoffen bei  $\delta_C = 160.45$  und  $156.50$  ppm gebunden sind. Beide Kohlenstoffe zeigen eine Korrelation zum Dublett bei  $\delta_H = 8.11$  ppm, wodurch die Positionen der Methoxygruppen am C-4 und C-7 des Grundgerüsts III (Abbildung 213) angeordnet sein müssen. Weitere Korrelationen zu den Protonen des ABX-Systems beweisen die Position der Methoxygruppe an C-7 ( $\delta_H$  3.90;  $\delta_C$  55.39 ppm). Alle übrigen Korrelationen belegen die Struktur von **27** als 4,7-Dimethoxyfuro[2,3-*b*]quinoline, ein Furanochinolinalkaloid, dessen Vorkommen unter den Namen „Evolitrin“ bereits mehrfach beschrieben wurde. [49]



**Abbildung 209:** Evolitrin und einige seiner Derivate aus *Comptonella sessiliflora* [163]

Eine Arbeitsgruppe um den Franzosen Jacques Puset veröffentlichte die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Evolitrine in CDCl<sub>3</sub> zusammen mit denen seiner Derivate Pteleine und Kokusaginine (Abbildung 209) und weiteren anders substituierten Alkaloiden. [163] Die Autoren wiesen in ihrem Paper bereits daraufhin, dass die Zuordnung der Kohlenstoffe aufgrund der großen

Anzahl an quartären Kohlenstoffen schwierig sei, weshalb man von Pteleine und Kokusagine heteronuclear-single bond und long-range C-H-Korrelationsspektren aufgenommen hat. Um sicher zu sein, dass die hier ermittelte Struktur richtig ist, wurden weitere Spektren in CDCl<sub>3</sub> von **27** aufgenommen (s. Tabelle 36 und Abbildung 214 bis Abbildung 217). Im Gegensatz zu Pusset et al., die die Zuordnung der Kohlenstoffe nur indirekt über den Vergleich zu Pteleine und Kokusagine vorgenommen haben, standen uns hier auch die HSQC- und HMBC-Spektren in CDCl<sub>3</sub> zur Verfügung. [163] Während es bei den Protonendaten nur geringe Abweichungen gibt, geben Pusset et al. (1991) für die Kohlenstoffe von Evolitrin zum Teil abweichende Werte an, die wegen des Fehlens der Korrelationsspektren möglicherweise revidiert werden müssen.

Furanochinolinalkaloide sind typische Inhaltsstoffe der Rutaceae. Das Evolitrin (**27**) wurde bereits in einigen *Melicope* Arten gefunden. [70,164,165] Über das Vorkommen dieser Substanz in *Melicope barbiger*a wird hier zum ersten Mal berichtet.

**Tabelle 35:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von **27** ( $\delta$  in ppm, 600/150 MHz in DMSO- $d_6$ )

Position	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
1	-	147.05
2	-	164.13
3	-	101.78
4	-	156.50
5	8.11 d (9.2)	123.42
6	7.13 dd (9.2; 2.5)	116.28
7	-	160.45
8	7.27 d (2.5)	106.07
9	-	112.70
10	7.43 d (2.78)	105.54
11	7.96 d (2.7)	143.30
OCH <sub>3</sub> an C-4	4.43 s	59.39
OCH <sub>3</sub> an C-7	3.90 s	55.39

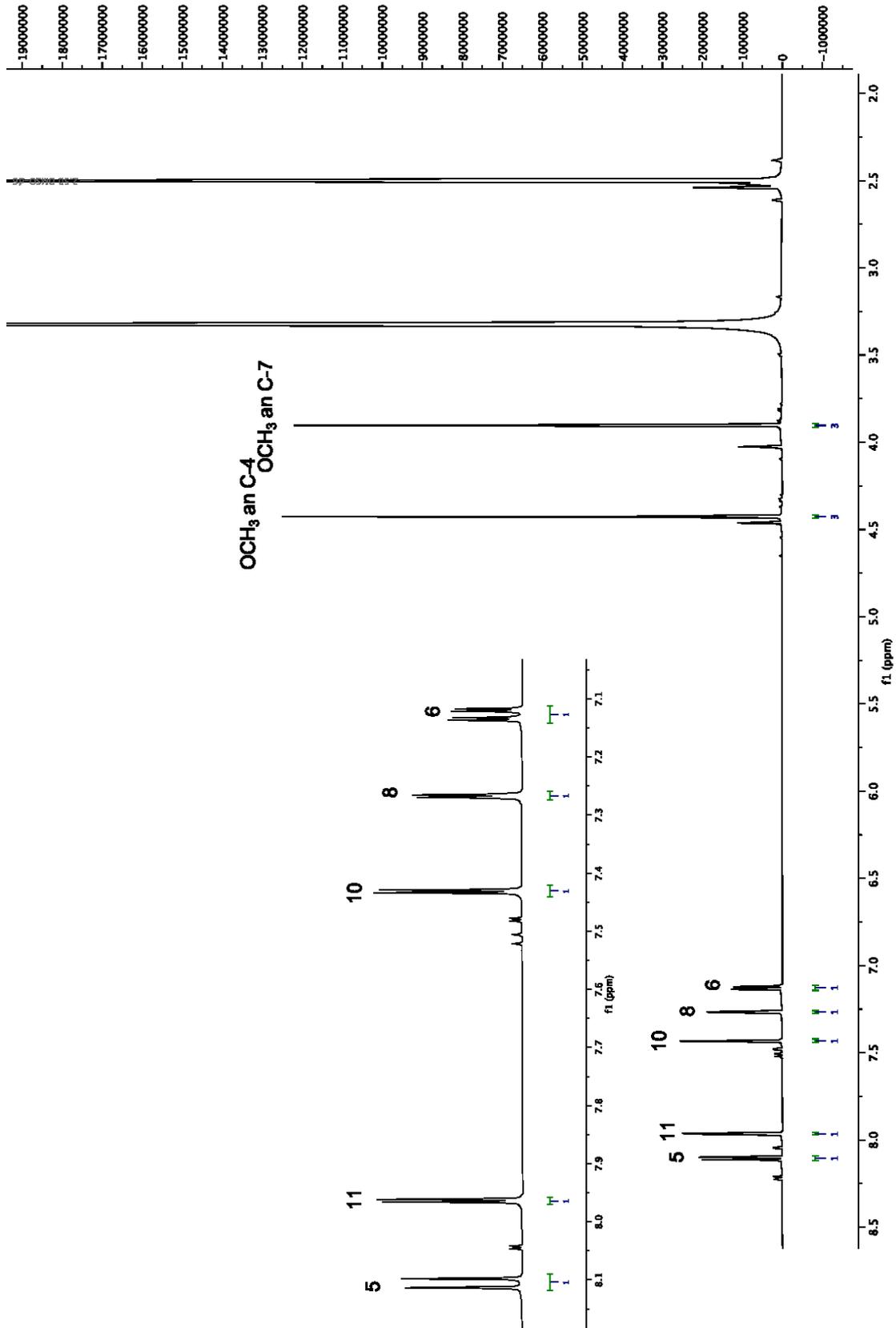


Abbildung 210:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **27** (600 MHz in  $\text{DMSO-d}_6$ )

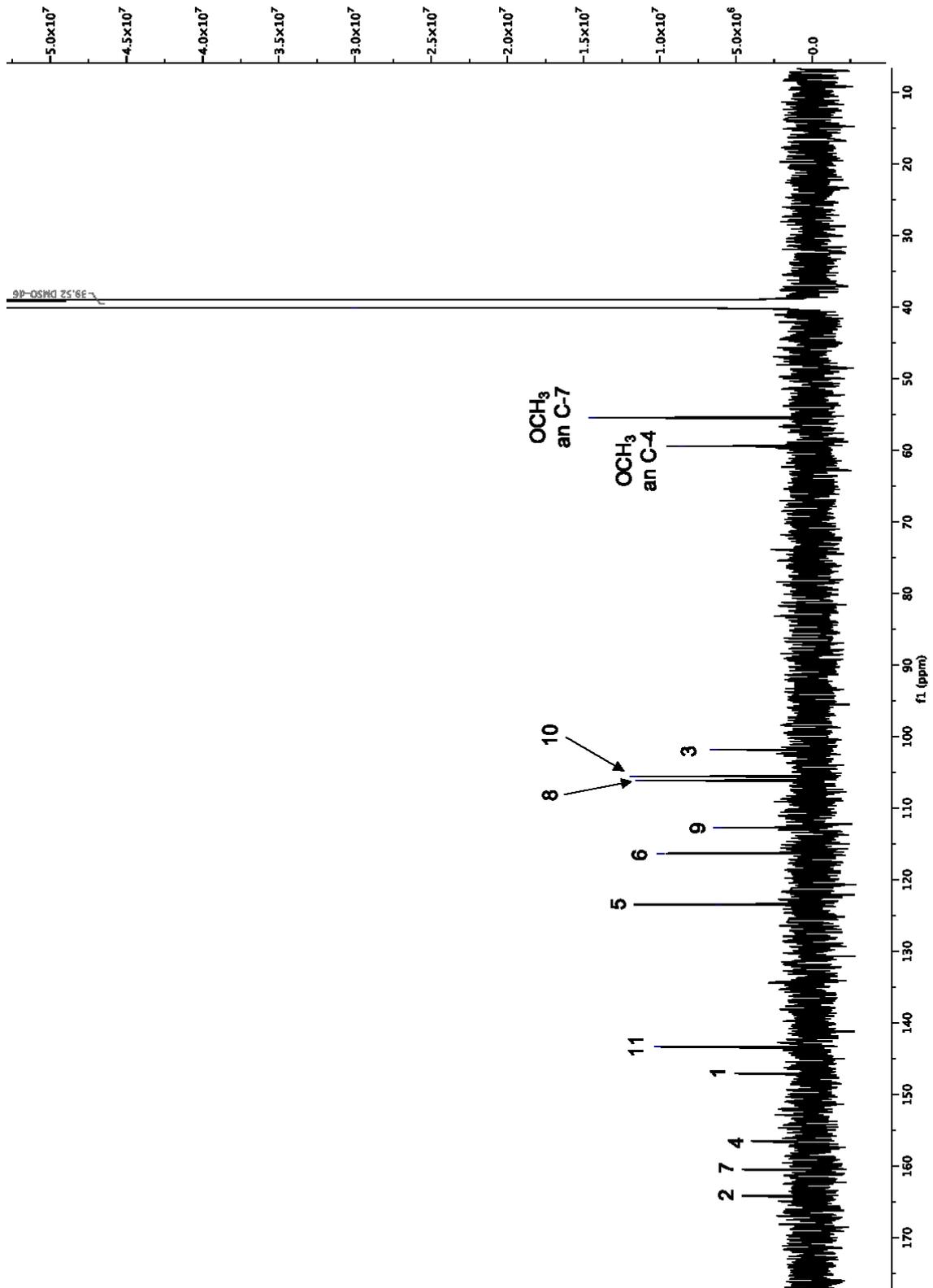


Abbildung 211:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 27 (150 MHz in DMSO- $d_6$ )

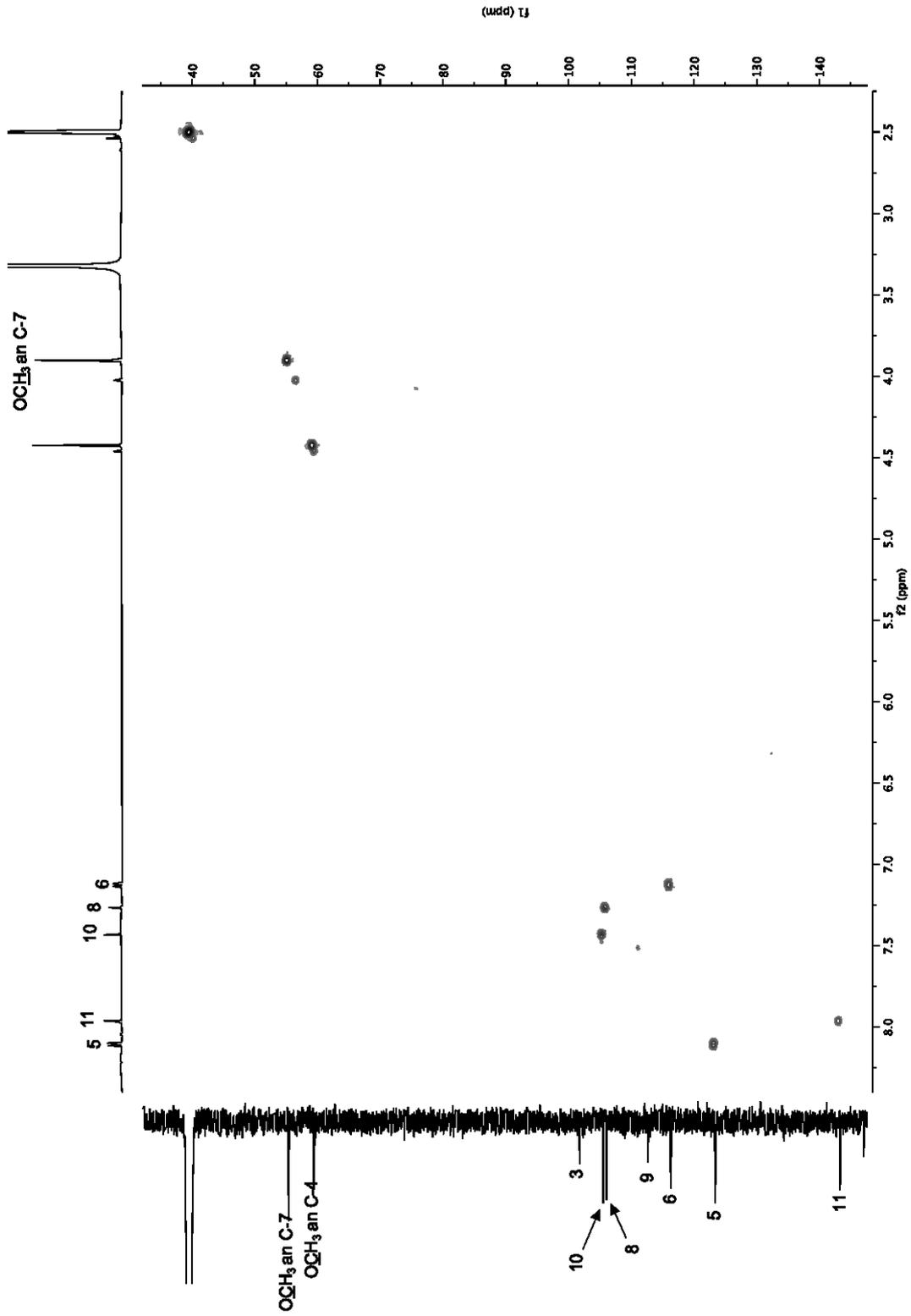


Abbildung 212: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 27 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

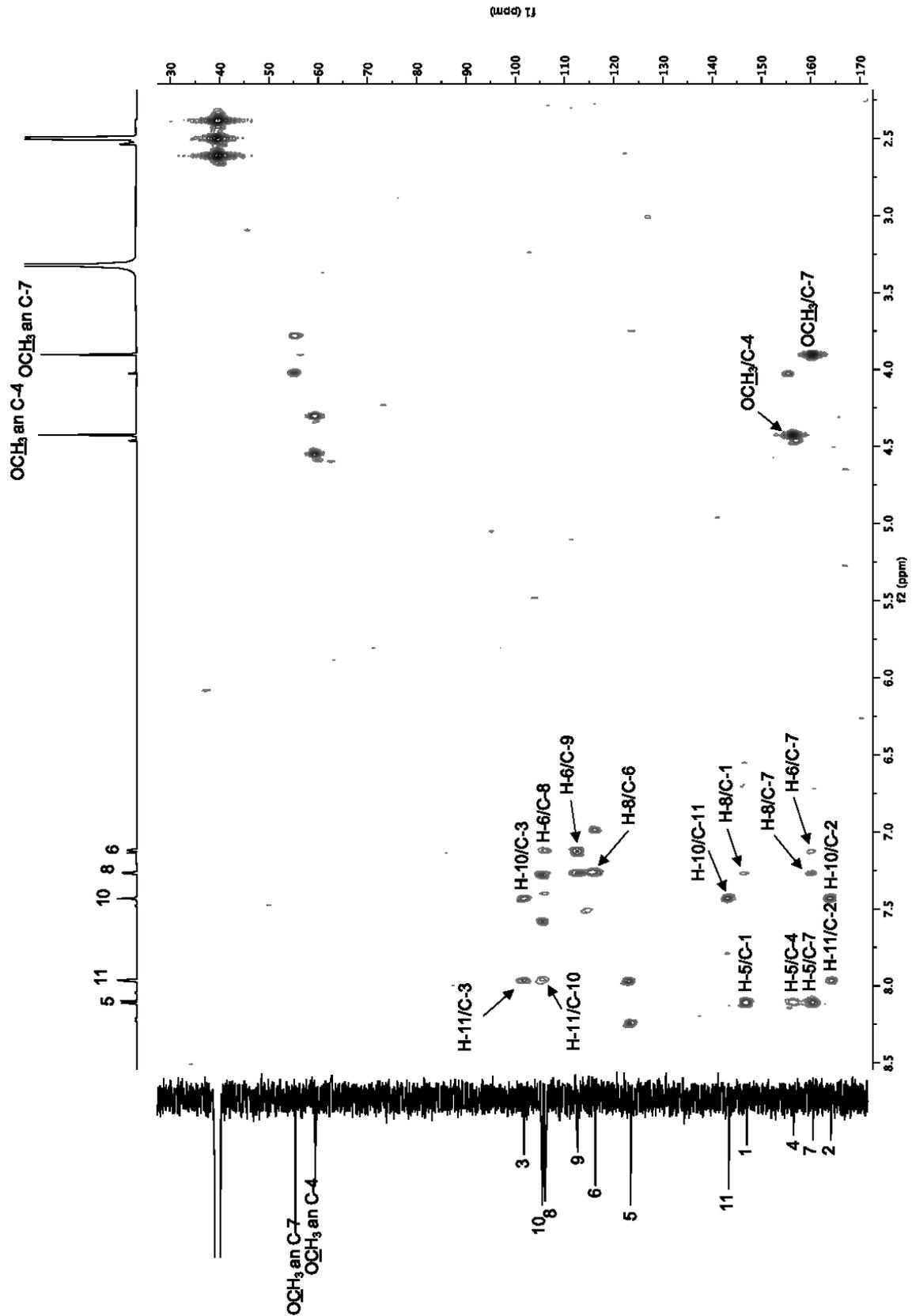


Abbildung 213: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 27 (600 MHz in DMSO-d<sub>6</sub>)

**Tabelle 36:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von **27** ( $\delta$  in ppm (J in Hz), 600/150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Position	27		Literaturwerte nach [163]	
	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
1	-	142.56	-	142.5
2	-	161.28	-	161.3
3	-	102.76	-	102.2
4	-	161.28	-	157.3
5	8.20 d (9.3)	124.40	8.15 d (9.3)	116.8
6	7.19 dd (9.3; 2.3)	118.74	7.09 dd (9.3; 2.6)	123.6
7	-	163.70	-	147.7
8	7.77 d (2.3)	101.75	7.33 d (2.6)	106.0
9		112.59	-	113.6
10	7.17 d (2.5)	105.63	7.05 d (2.8)	104.9
11	7.67 d (2.5)	143.45	7.57 d (2.8)	142.5
OCH <sub>3</sub> an C-4	4.56 s	60.06	4.43 s	59.0
OCH <sub>3</sub> an C-7	4.01 s	55.10	3.95 s	55.5

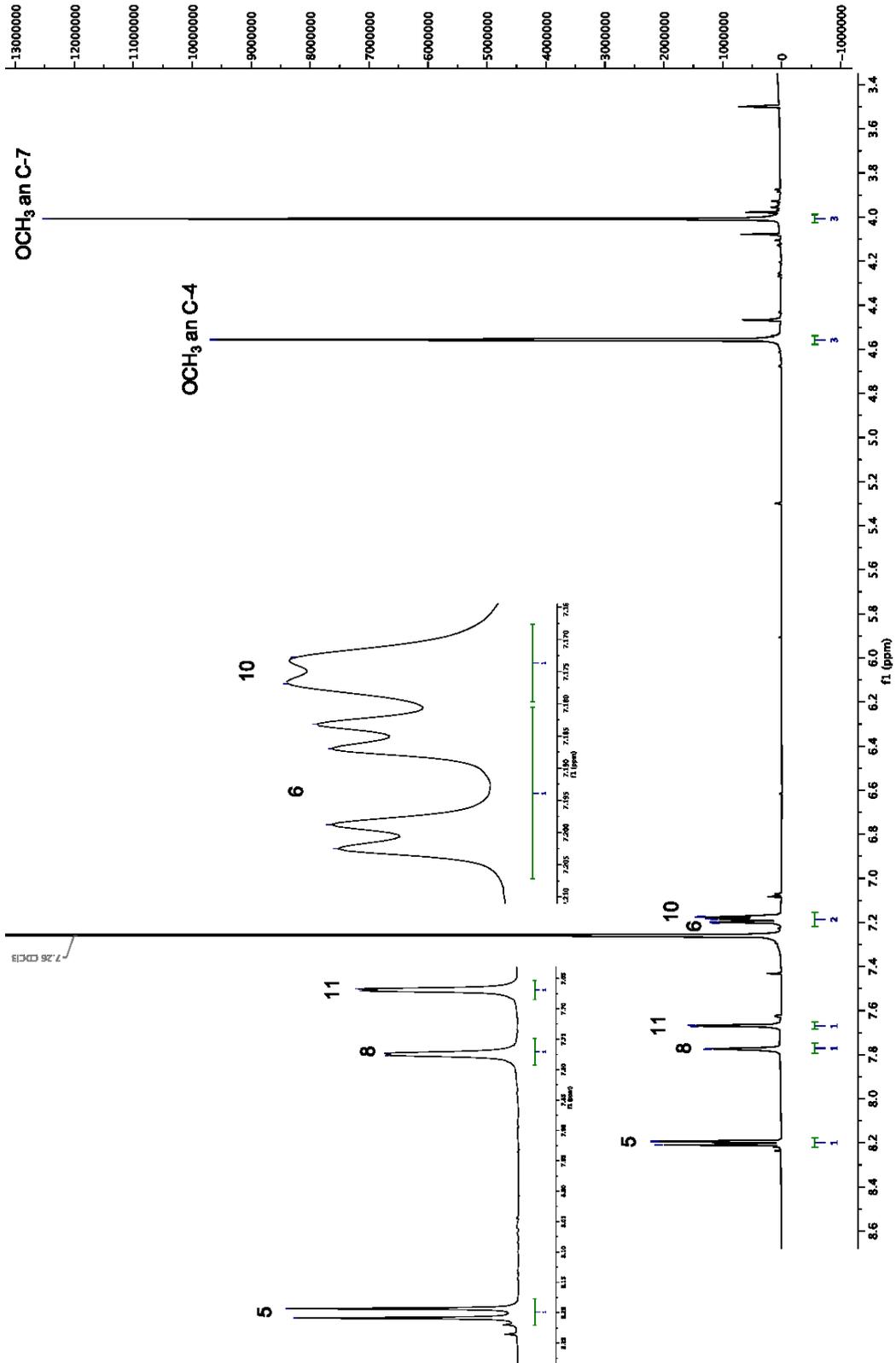


Abbildung 214:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 27 (600MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

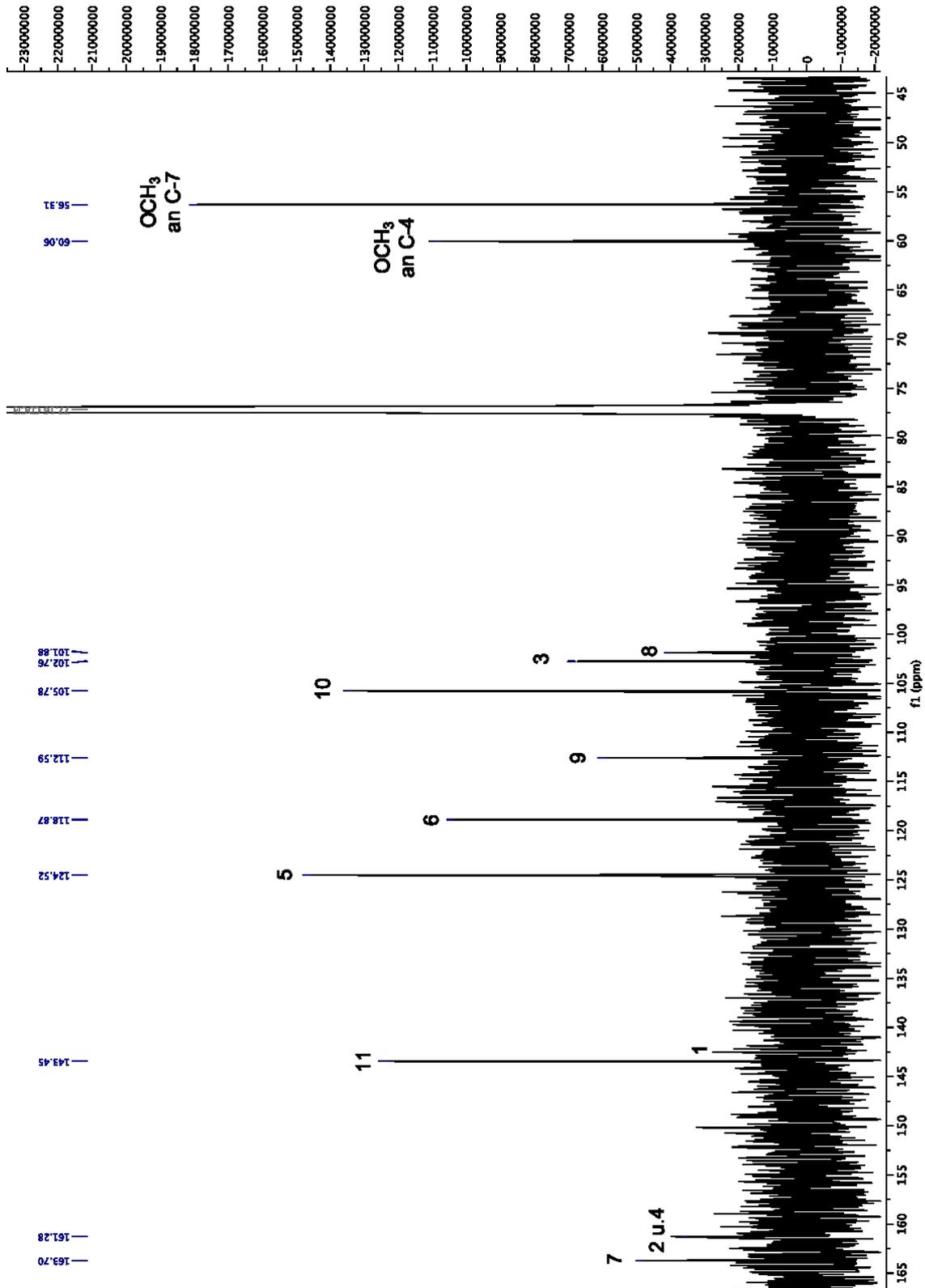


Abbildung 215:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 27 (150 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

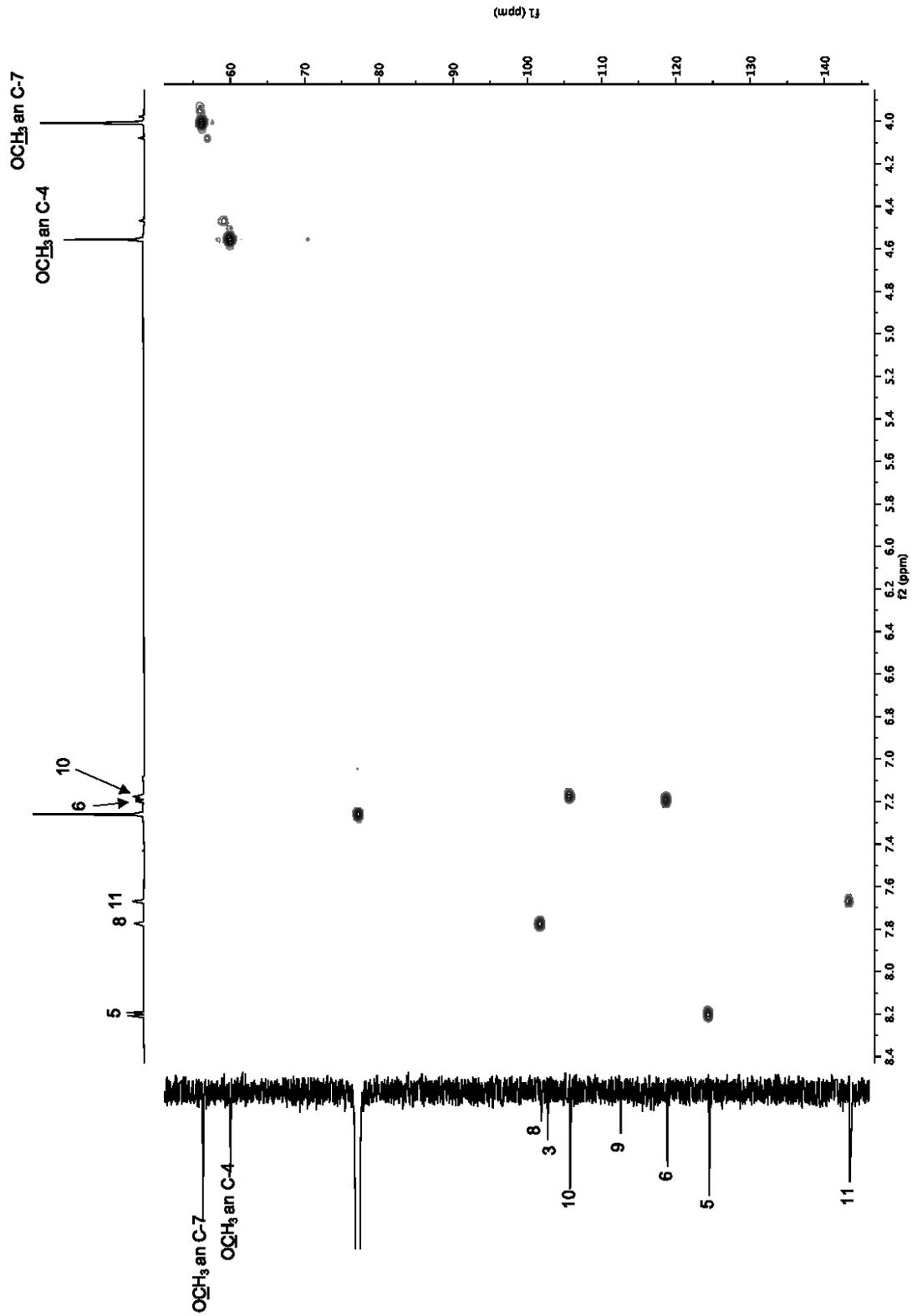


Abbildung 216: 2D-HSQC-Spektrum von Verbindung 27 (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

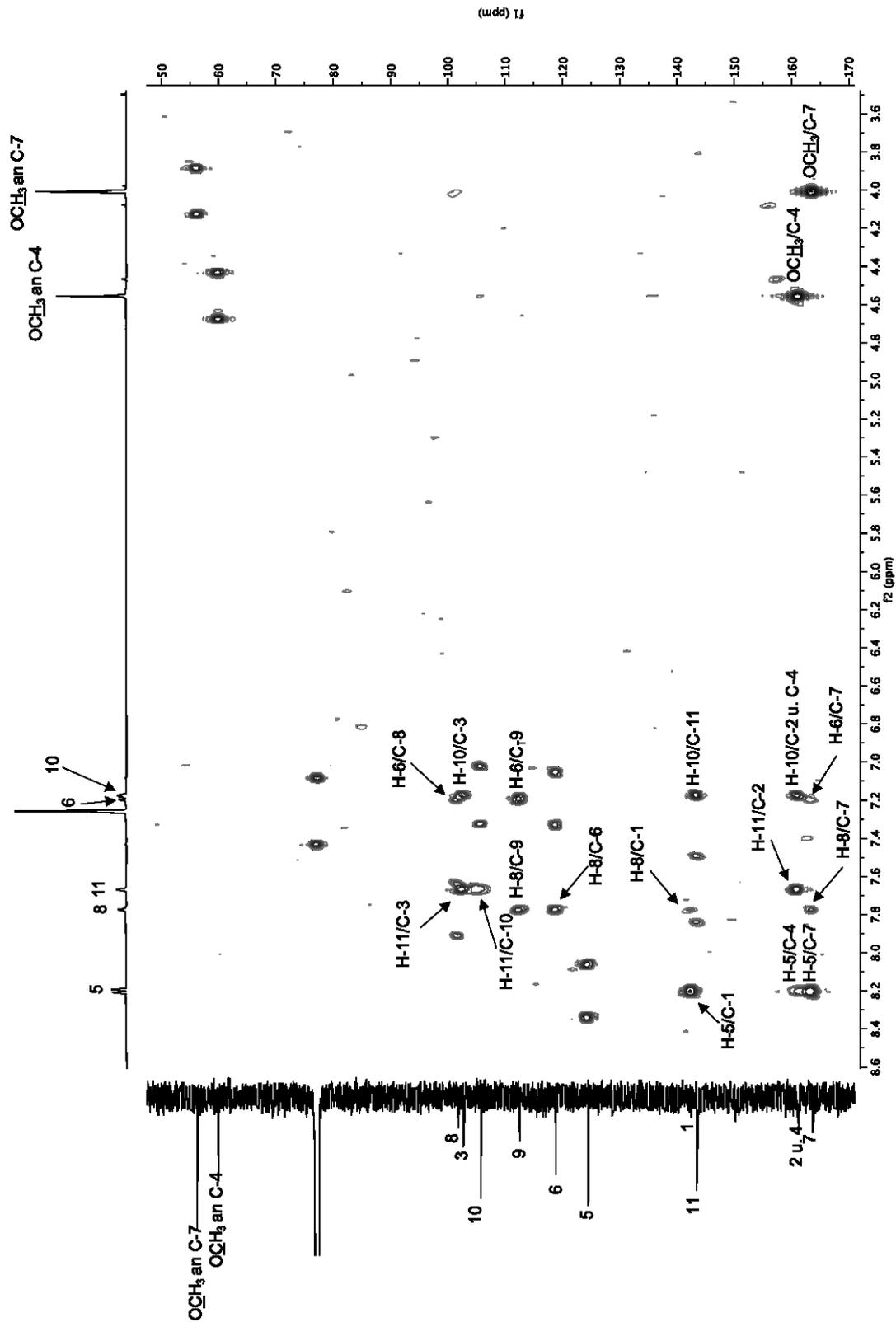


Abbildung 217: 2D-HMBC-Spektrum von Verbindung 27 (600 MHz in CDCl<sub>3</sub>)

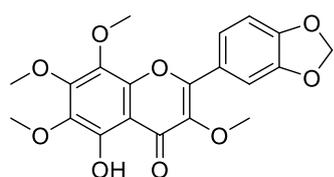
### **3 Nachweis von Flavonoiden im Blattmaterial von *Melicope barbiger* mit Hilfe der HPLC im qualitativen Maßstab**

Ein Ziel der hier durchgeführten Identifizierung von Inhaltsstoffen aus den Blättern der hawaiianischen *Melicope barbiger* war es, Kenntnisse zu den Flavonoiden in dieser Species zu erhalten. Flavonoide sind aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in Landpflanzen wichtige chemotaxonomische Marker, mit deren Hilfe sich infragenerische Unterschiede zwischen einzelnen Species erkennen lassen, so dass Aussagen zu den Verwandtschaftsbeziehungen zwischen einzelnen Arten innerhalb einer Gattung möglich sind. [166,167] Auch bei der Unterscheidung von Unterarten und chemischen Rassen ist die Kenntnis des Flavonoidmusters sehr hilfreich. [166,167] Da es sich bei den Hawaiianischen *Melicope*-Arten um endemische Species handelt und später Pflanzenmaterial von verschiedenen Standorten, das nur in geringer Menge zur Verfügung steht, miteinander verglichen werden soll, ist es notwendig die Analyse mit Proben, die nur aus 1 – 2 g getrockneten Blättern gewonnen wurden, durchzuführen.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 14 Flavonoide isoliert und identifiziert. Bei den meisten dieser Verbindungen handelt es sich um relativ lipophile, mehrfach methoxylierte Flavonole, es wurden aber auch Verbindungen mit Methylendioxygruppen und prenylierte Derivate gefunden. Die beiden Isomere trans- und cis-Tilirosid (**21**) und (**22**) waren die einzigen glykosidierten Flavonoide, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden. Nach weiteren Flavonoidglykosiden, die in anderen, nicht untersuchten Fraktionen des Methanolextraktes aus den getrockneten Blättern enthalten sein könnten, wurde in Rahmen dieser Arbeit nicht gesucht.

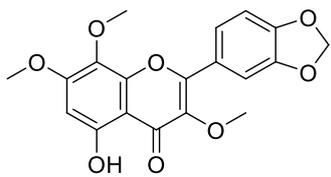
Da die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Flavonoide teilweise nur in sehr geringen Mengen isoliert und identifiziert werden konnten, war es nötig zu überprüfen (Abbildung 218), welche der hier gefundenen Substanzen sich bereits in einem mit einfachen Mitteln hergestellten Blattextrakt wiederfinden lassen. Mithilfe einer Literaturrecherche wurde nach geeigneten Analysemethoden gesucht. 1998 veröffentlichte eine französische Arbeitsgruppe um Pierre Mouly eine HPLC-Methode zur simultanen Bestimmung von Flavanoglykosiden, polymethoxylierten Flavonen und Flavonolen aus Zitrusfruchtsäften, insbesondere Orange, Mandarine und Grapefruit, deren Stammpflanzen, wie die Gattung *Melicope*, zur Familie der Rutaceae gehören. [168]

Mouly et al. (1998) verwendeten als stationäre Phase eine HPLC-Säule (250x4.6 mm) gepackt mit Altima C18 (5 µm) Material der Firma Alltech (Paris, Frankreich), ein in Bezug auf Retention und Selektivität klassisches Reverse-Phase-Säulenmaterial.



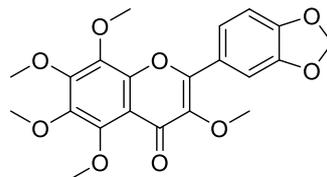
**9**

Chemical Formula:  $C_{20}H_{18}O_9$   
Exact Mass: 402,0951



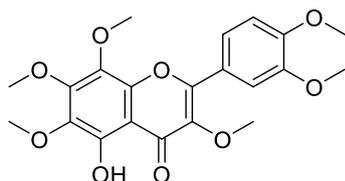
**10**

Chemical Formula:  $C_{19}H_{16}O_8$   
Exact Mass: 372,0845



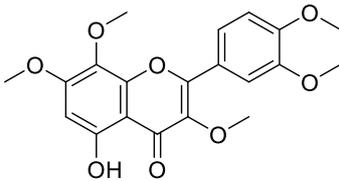
**11**

Chemical Formula:  $C_{21}H_{20}O_9$   
Exact Mass: 416,1107



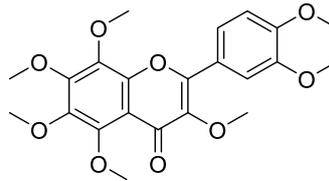
**12**

Chemical Formula:  $C_{21}H_{22}O_9$   
Exact Mass: 418,1264



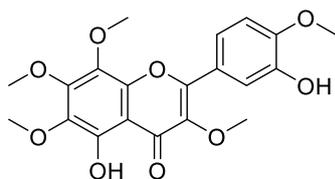
**13**

Chemical Formula:  $C_{20}H_{20}O_8$   
Exact Mass: 388,3680



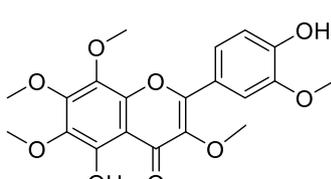
**14**

Chemical Formula:  $C_{22}H_{24}O_9$   
Exact Mass: 432,1420



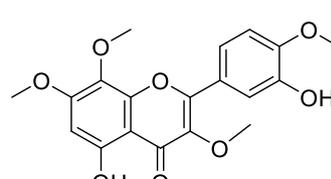
**15**

Chemical Formula:  $C_{20}H_{20}O_9$   
Exact Mass: 404,1107



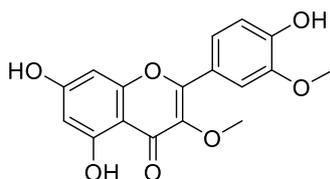
**16**

Chemical Formula:  $C_{20}H_{20}O_9$   
Exact Mass: 404,1107



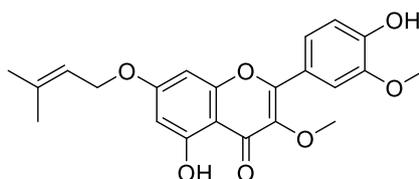
**17**

Chemical Formula:  $C_{19}H_{18}O_8$   
Exact Mass: 374,1002



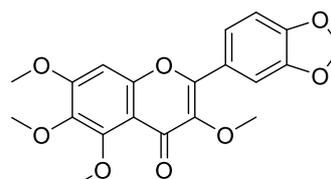
**18**

Chemical Formula:  $C_{17}H_{14}O_7$   
Exact Mass: 330,2889



**19**

Chemical Formula:  $C_{22}H_{22}O_7$   
Exact Mass: 398,1366



**20**

Chemical Formula:  $C_{20}H_{18}O_8$   
Exact Mass: 386,1002

**Abbildung 218:** Aus *M. barbiger* isolierte polymethoxylierte Flavonoide

Als mobile Phase verwendeten sie einen Gradienten aus Acetonitril und einem Wasser-Essigsäuregemisch (96:4), beginnend mit 100 % Wasser-Essigsäure und Zugabe von Acetonitril mit drei Steigerungsraten bis zu maximal 70 %. Die Probenvorbereitung gestaltete sich relativ einfach, weil es sich um Säfte aus den Früchten der genannten Pflanzen handelte und nicht um Blattmaterial. [168]

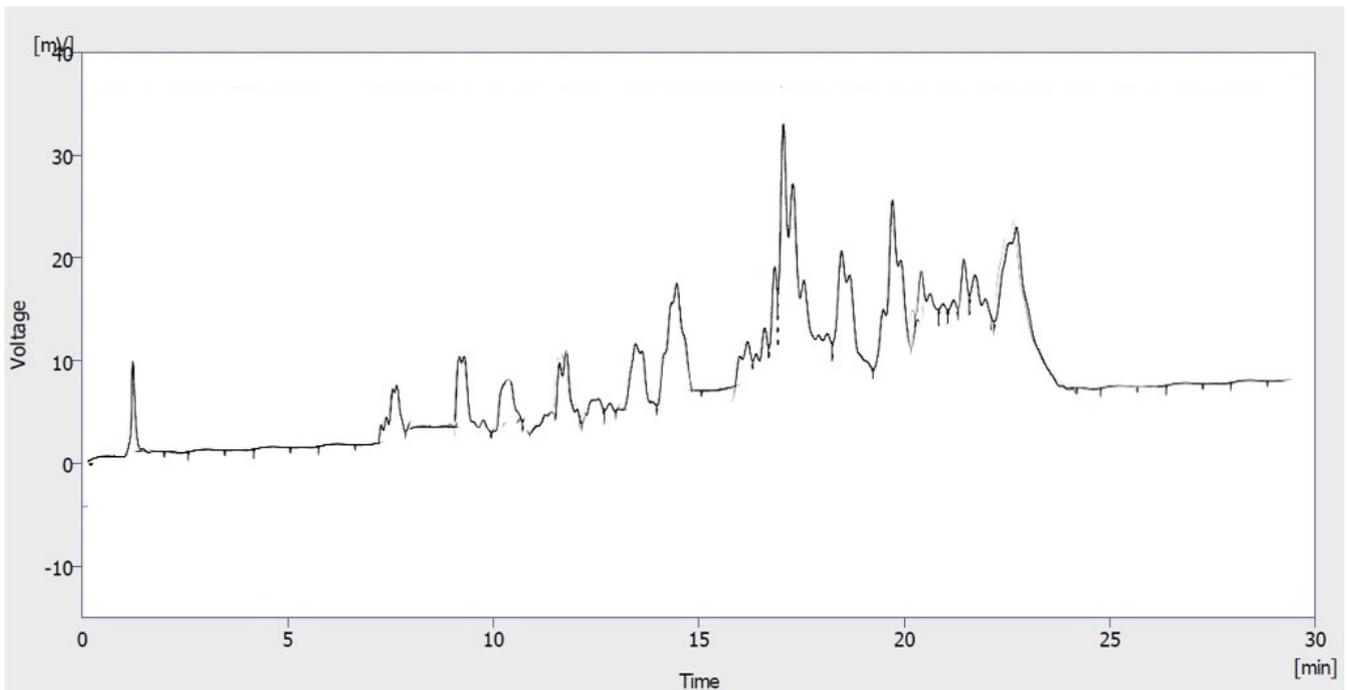
Mouly et al. (1998) versuchten mit Hilfe der von ihnen entwickelten HPLC-Methode sowohl sehr hydrophile, als auch lipophile Verbindungen nachzuweisen. Der von ihnen verwendete Konzentrationsgradient der eingesetzten Fließmittel war dementsprechend abgestimmt. Da im Rahmen dieser Arbeit nur die methoxylierten Flavonoidglyka bestimmt werden sollten, wurde das Fließmittel und der Gradient diesen Bedürfnissen angepasst. Die von Mouly et al. als Fließmittel A verwendete 4 %-ige wässrige Essigsäurelösung wurde hier durch eine 0.1 %-ige Lösung von Ameisensäure in Wasser ersetzt. Da Mouly et al. (1998) bei ihren Analysen Retentionszeiten für die die methoxylierten Flavonole zwischen 50 und 60 Minuten fanden, wurde die Chromatographie, zur Verkürzung der Analysezeit, hier bereits mit einem Zusatz von 10 % Acetonitril begonnen. Auch der Gradient wurde steiler eingestellt, in dem die Konzentration von Acetonitril im Fließmittelgemische pro Minute um 3 % erhöht wurde (Tabelle 37)

Für die Analyse wurden, wie oben erwähnt, nur 1,5 g der getrockneten Blätter von *Melicope barbiger* verwendet. Das Blattmaterial wurde zunächst in einer Mühle zerkleinert und mittels Soxhlet-Extraktion für 5 h mit Petrolether extrahiert. Nach Entfernen des Petrolethers im Vakuum wurde der erhaltende Extrakt (351,53 mg) in Methanol (HPLC-Grade) aufgenommen und filtriert. Die so resultierende Lösung entsprach einer Konzentration von 1mg Extrakt pro Milliliter. 20 µl dieser Lösung wurden anschließend in die HPLC injiziert.

**Tabelle 37:** HPLC Gradient zum Nachweis der in *M. barbiger* enthaltenen Flavonoide

<b>Zeit [min]</b>	<b>[%] A</b>	<b>[%] B</b>
0	90	10
20	30	70
25	30	70
30	0	100

**A: 0,1% Ameisensäure in Wasser (v/v); B: Acetonitril (v/v)**



**Abbildung 219:** HPLC Chromatogramm des Extraktes aus 1.5 g getrockneten Blättern von *M. barbiger*

Abbildung 219 zeigt das, mithilfe des DAD bei  $\lambda = 254$  nm erhaltene, HPLC-Chromatogramm. Die Signale der isolierten Flavonoide wurden im Bereich von 15 bis 20 Minuten detektiert. Obwohl hier keine Reinigung des aus der geringen Blattmenge hergestellten Extraktes erfolgte, sind die Flavonoide deutlich zu erkennen. Dennoch wäre für spätere Analysen hilfreich zu untersuchen, ob eine schnelle Aufreinigung des Extraktes, z.B. über eine kurze Sephadex LH-20 Säule, einige der hier störenden Substanzen aus der Probe entfernen könnte. Um zu überprüfen, ob die Peaks im Retentionsbereich der zum Vergleich eingespritzten, aus *M. barbiger* isolierten Flavonoide auch tatsächlich diesen Verbindungen zugeordnet werden können, wäre es wünschenswert gewesen, die Massenspektren durch direkte Kopplung mit einem Massenspektrometer zu erhalten, das möglichst über eine genaue Massenmessung verfügt, so dass auch die Summenformel der jeweiligen Verbindung ermittelt werden kann. Dadurch könnte ausgeschlossen werden, dass andere, bisher nicht charakterisierte Stoffe, mit zufällig gleicher Masse, für die hier gesuchten Flavonoide gehalten werden könnten. In Ermangelung eines solchen Gerätes in unserem Institut, wurde der Kontakt zu Dr. Tommes vom „Center for Molecular and Structural Analytics (CeMSA) der Heinrich-Heine-Universität gesucht, der über ein solches Gerät verfügt.

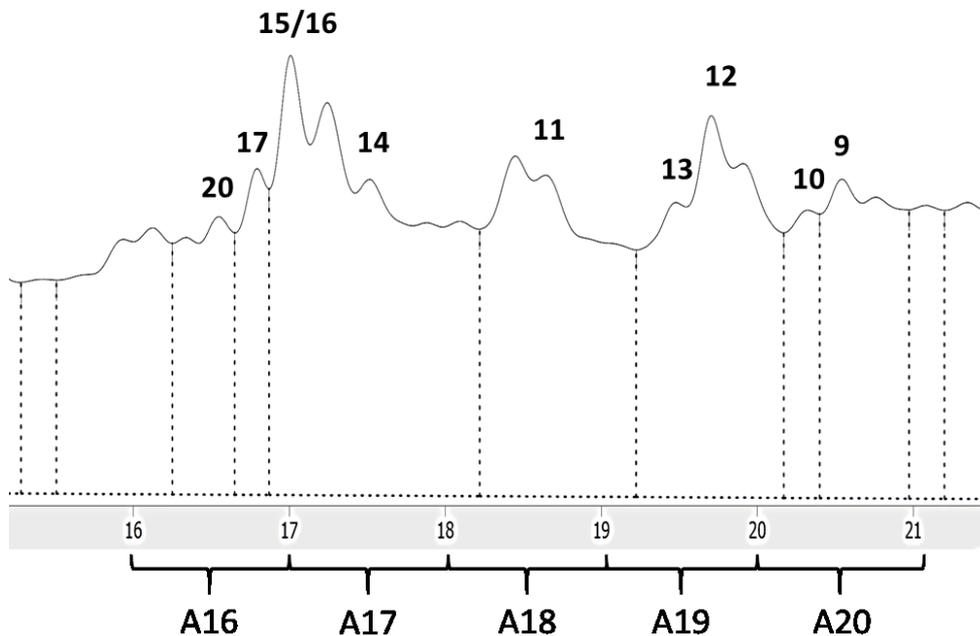
Da an der externen, hochauflösenden (UHP) LC/HRESIMS aufgrund der Gerätekonfiguration keine Säule mit unseren Konditionen, sondern nur eine sehr kurze Säule verwendet werden kann, war die von uns entwickelte Trenntechnik mit der HRESIMS gerätebedingt nicht direkt kombinierbar. Deshalb haben wir uns dazu entschlossen, Fraktionen nach Trennung des Extraktes mit dem von uns verwendeten HPLC-Gerät zu bilden. Im Retentionsbereich der Flavonoide zwischen 16 und 21 Minuten wurden die Eluate jeweils über eine Minute lang aufgefangen. Die folgende Abbildung zeigt den Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms und die fünf gebildeten Fraktionen A16 bis A20.

Diese Fraktionen (A16-A20), wurden anschließend mit dem hochauflösenden Massenspektrometer untersucht, um die hochauflösenden Massenspektren der Flavonoide, die in diesen Fraktionen enthalten sein mussten zu bekommen.

**Tabelle 38:** In den jeweiligen Fraktionen identifizierte Flavonoide

Verbindung Nr.	Masse [g/mol]	Retentionszeit [min]	Enthalten in Fraktion	Bemerkung
9	402	20,47	A20	
10	372	20,12	A20	10 im Gemisch mit 9
11	416	18,63	A18	
12	418	19,75	A 19	
13	388	19,60	A19	13 im Gemisch mit 12
14	432	17,54	A17	
15	404	17,27	A16	
16	404	17,27	A16	16 im Gemisch mit 15
17	374	16,84	A17	
18	330	14,24	n.d.	
19	398	22,27	n.d.	
20	386	16,66	A16/17	

n.d. nicht detektiert

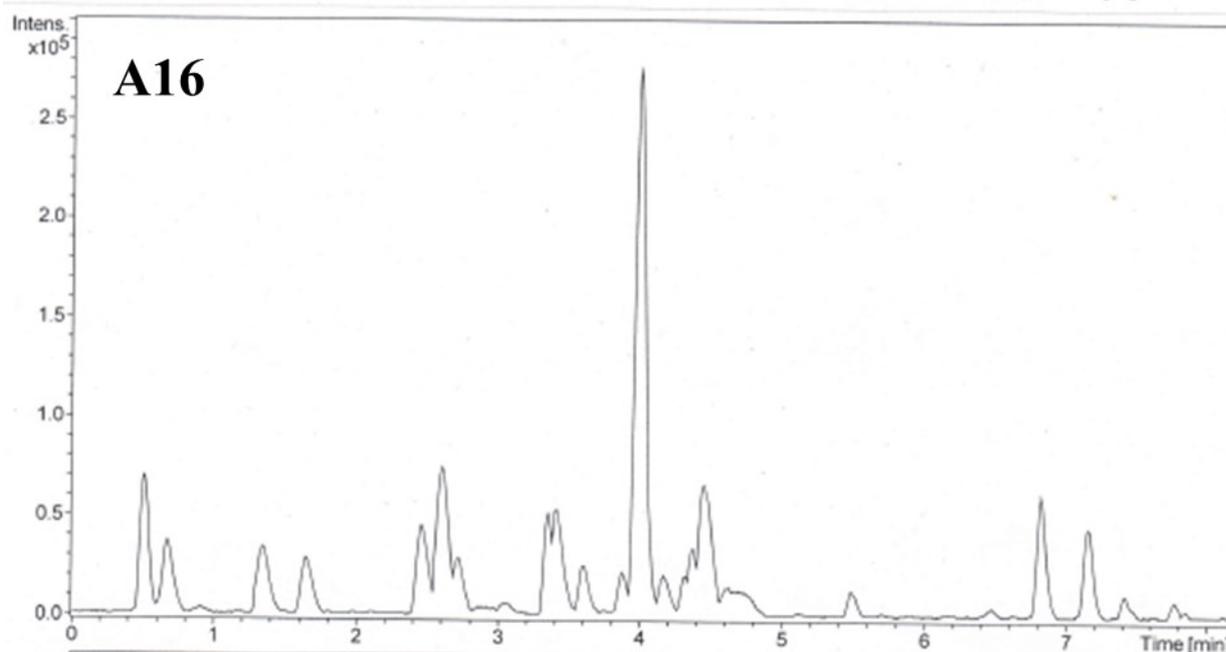


**Abbildung 220:** Ausschnitt vom 15,5 – 21,5 min des o. g. Chromatogramms

Insgesamt konnten 8 der 10 isolierten Flavonoiden mittels der angepassten Mouly-Methode und der darauffolgenden (UHP)LC/HRESIMS identifiziert werden. (Tabelle 38).

Bei den Verbindungen **15**, **16**, **17** und **20** war zu erwarten, dass diese sowohl in den Fraktionen A16 als auch in A17 enthalten sein müssten. Leider konnten diese Verbindungen mittels UHPLC-ESIMS nicht in jedem Fall in beiden Fraktionen nachgewiesen werden, sondern manchmal fanden wir die Verbindungen nur in einer Fraktion. Dies war der geringen Menge geschuldet, die bei Verteilen auf mehrere Fraktionen dann unter die Nachweisgrenze abfiel.

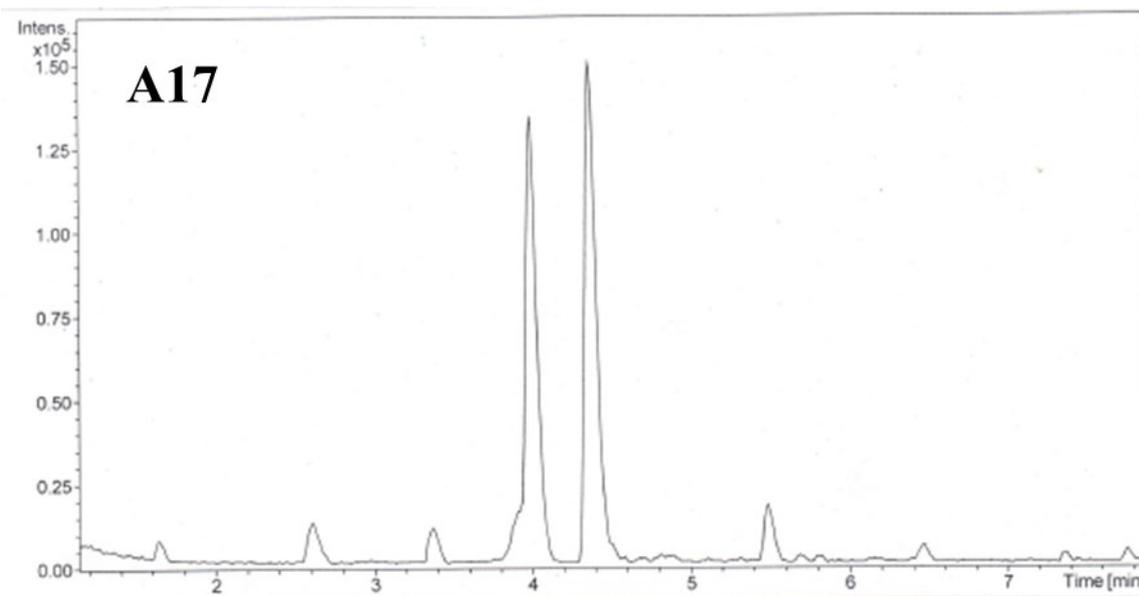
Bei den vier nicht nachweisbaren Flavonoiden, konnte entweder die RT nur als Gemisch ermittelt werden oder die Nachweisgrenze in dieser Methode (Rohextrakt) war zu gering.



**Abbildung 221:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion A16

Identifizierte Flavonoide in der Fraktion A 16

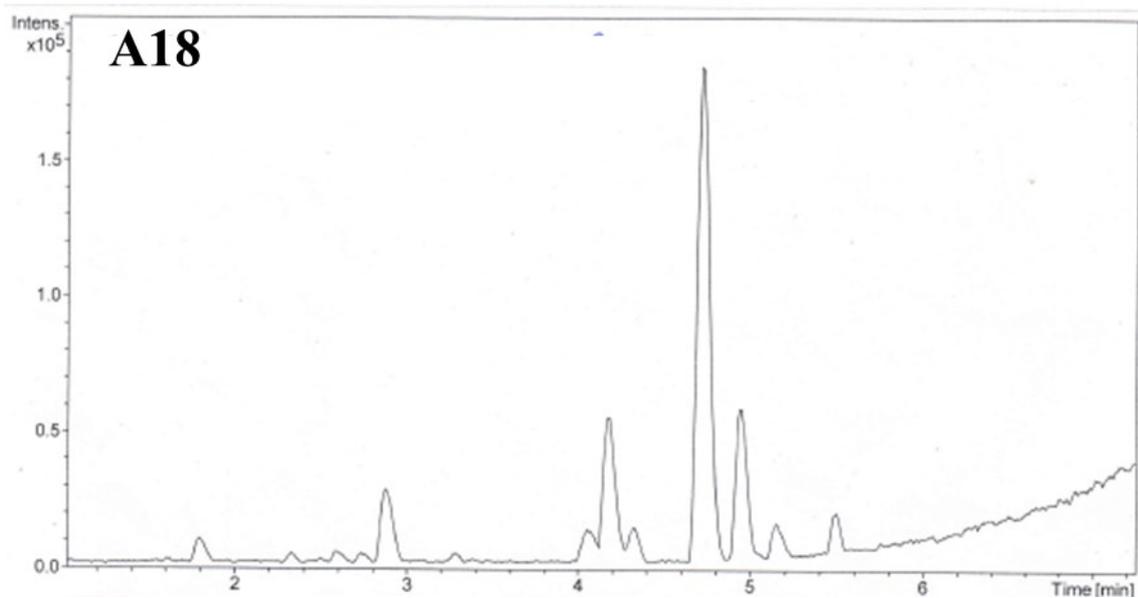
HRESIMS [M+H] <sup>+</sup>	Summenformel	Retentionszeit [min]	Gefundene Flavonoide
387.1074	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	4,0	<b>20</b>
405.1193	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	4,5	<b>15/16</b>



**Abbildung 222:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion A17

Identifizierte Flavonoide in der Fraktion A 17

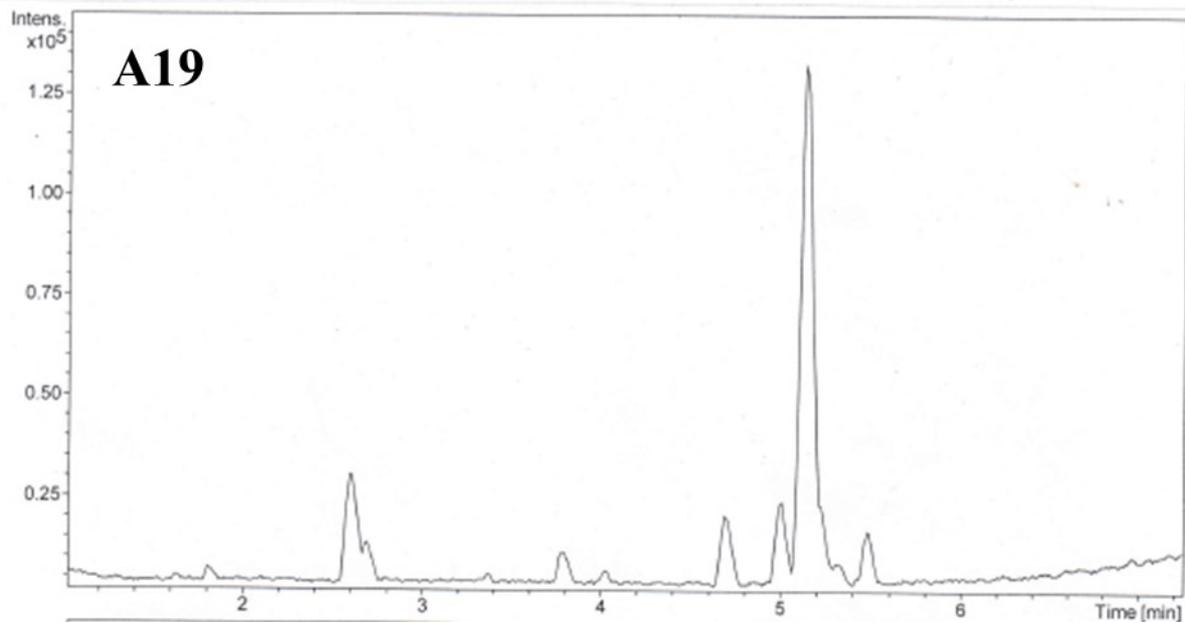
HRESIMS [M+H] <sup>+</sup>	Summenformel	Retentionszeit[min]	Gefundene Flavonoide
375.1075	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	2,6	<b>17</b>
386.1088	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	4,0	<b>20</b>
433.1495	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> O <sub>9</sub>	4,4	<b>14</b>



**Abbildung 223:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion A18

Identifizierte Flavonoide in der Fraktion A18

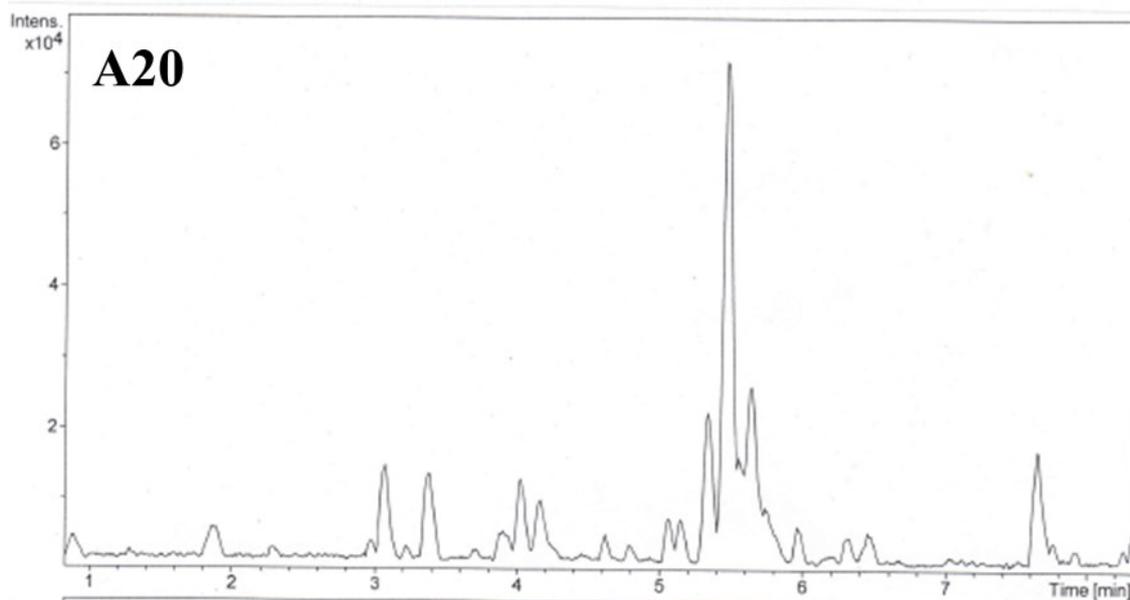
HRESIMS [M+H] <sup>+</sup>	Summenformel	Retentionszeit[min]	Gefundene Flavonoide
417.1176	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	4,7	<b>11</b>



**Abbildung 224:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion A19:

Identifizierte Flavonoide in der Fraktion A 19:

HRESIMS [M+H] <sup>+</sup>	Summenformel	Retentionszeit[min]	Gefundene Flavonoide
419.1340	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub>	5,1	<b>12</b>



**Abbildung 225:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion A20

Identifizierte Flavonoide in der Fraktion A 20

HRESIMS [M+H] <sup>+</sup>	Summenformel	Retentionszeit[min]	Gefundene Flavonoide
403,1005	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	5,5	<b>9</b>

Die Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis der Flavonoide auch in einer kleinen Menge Blattmaterial möglich ist. Die Methode sollte aber weiter verfeinert werden, um den Nachweis der Flavonoide auch über normale analytische Daten, wie z.B. über die Retentionszeit in Verbindung mit einem bei der HPLC aufgenommenen UV-Spektrums, oder in Verbindung mit einer normalen LC-MS ohne Hochauflösung zu führen. Dazu ist es natürlich notwendig, dass alle anderen Stoffe, die im gleichen Retentionsbereich stören, zunächst entfernt werden.

## 4 Ergebnisse der Untersuchungen zur Zytotoxizität der isolierten Verbindungen

Am Institut für pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, im Arbeitskreis von Prof. Dr. Kassack, wurden die zytotoxischen Eigenschaften der aus *Melicope barbigera* isolierten Acetophenonderivate **1 – 7**, der Flavonoide **9, 11,12, 14,15, 17-19** und der Furanocumarine **23, 25** und **26** sowie des Alkaloides **27** an der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 untersucht (s. Kap. 6.7, Exp. Teil). Das Acetophenon **8**, das Flavonoid **20** und das Furanocoumarin **24** wurden erst nach Abschluss der pharmakologischen Untersuchungen isoliert und identifiziert, weshalb diese Verbindungen nicht getestet wurden. Bei den Flavonoiden wurden auch die Gemische getestet. Aufgrund der geringen Aussagekraft der Aktivitäten der nur im Gemisch vorliegenden Verbindungen **10, 13, 16, 21** und **22** wurden die erhaltenen Ergebnisse aber nicht weiter berücksichtigt.

**Tabelle 39:** Getestete Verbindungen aus *Melicope barbigera*

Acetophenone		Flavonoide		Furanocumarine		Alkaloide	
Verb.-Nr.	Code	Verb.-Nr.	Code	Verb.-Nr.	Code	Verb.-Nr.	Code
1	KL-18	9	KL-2	23	KL-9	27	KL-7
2	KL-19	9+10	KL-4	24	-		
3	KL-16	11	KL-1	25	KL-10		
4	KL-17	12+13	KL-3	26	KL-8		
5	KL-20	14	KL-24				
6+7	KL-6	15	KL-23				
8	KL-21	15+16	KL-5				
		17	KL-25				
		18	KL-13				
		19	KL-12				
		20	-				
		21+22	KL-11				

Die Apoptose ist die wichtigste Form des programmierten Zelltods und ein energieabhängiger zellulärer Mechanismus, der die Aktivierung von Signaltransduktionswegen erfordert. [169,170] Im Gegensatz dazu ist die Nekrose eine zufällige, unkontrollierte und energieunabhängige Form des Zelltods, die zu einem unkontrollierten Abbau von Zellbestandteilen führt. Dadurch ist die Integrität der Zellmembran aufgehoben und es kommt

zu einer Freisetzung von Zellbestandteilen in den extrazellulären Raum, was wiederum zu Entzündungsprozessen führt. Die Auslösung von Nekrosen durch Naturstoffe als potenzielle zytotoxische Therapeutika ist daher absolut unerwünscht. Therapeutika, die z.B. bei Tumorerkrankungen zur gezielten Zerstörung von Tumorzellen führen sollen, sollten die Zelle bevorzugt in die Apoptose führen. Bei Säugetieren gibt es verschiedene Signalwege, die eine Apoptose auslösen können. Als Hauptwege sind der extrinsische und der intrinsische Weg bekannt, letzteren bezeichnet man auch als mitochondrialen Weg. [171] Extrinsisch wird die Apoptose über die Bindung von Liganden an Rezeptoren in der Zellmembran, die so genannten Death-Rezeptoren ausgelöst, also durch Signale von außen, die über die Rezeptoren in das Zellinnere weitergeleitet werden. [172,173]

Ein Beispiel für solche Liganden ist der TNF-related apoptosis-inducing ligand (*TRAIL*), es gibt aber auch andere ähnliche Proteine sowie einige Zytokine, die alle von Immunzellen, z.B. von aktivierten Makrophagen, freigesetzt werden. [172] Im Gegensatz dazu wird der intrinsische Signalweg durch intrazelluläre Stressbedingungen ausgelöst, z. B. durch Induktion von DNA-Schäden oder oxidativem Stress. [174] Beide Signalwege hängen von der Aktivierung proteolytischer Enzyme ab, bei denen es sich um Cysteinproteasen handelt, weil sie einen Cysteinrest im aktiven Zentrum besitzen. Diese Enzyme werden als Caspasen bezeichnet, weil sie Proteine hinter einem Aspartatrest spalten (**Cystein Aspartat Proteasen**). [175] Caspasen befinden sich im Cytoplasma der Zelle in Form ihrer als Pro-Caspasen bezeichneten Vorstufen. [176] Binden Liganden an den extrazellulären Death Rezeptor, induziert dies eine Konformationsänderung und ermöglicht die Anlagerung von weiteren Rezeptoren, Adapterproteinen und den Initiatorcaspasen. [177] Dieser Komplex wird als DISC („Death-Inducing-Signaling-Complex“) bezeichnet. Dadurch dimerisieren die Pro-Caspasen, wodurch sie sich selber spalten können, was zur Aktivierung der Effektor-Caspasen führt. [178,179]

Der intrinsische Weg verläuft über die Freisetzung mitochondrialer Proteine zur Anlagerung von Caspasen und dem Protein Apaf-1 (Apoptotic-Protease-Activating Factor-1). Dieser Proteinkomplex (Apoptosom) führt die Zelle durch Aktivierung proteolytischer Caspasen in den programmierten Zelltod. [178]

Wenn sich eine Zelle im Stadium der Apoptose befindet erfolgt eine Reihe morphologischer Veränderungen. Zu diesen morphologischen Veränderungen zählen unter anderem auch das Schrumpfen der Zellkerne, dass auf einer Abnahme des Zellvolumens beruht und als Indikator

für die Apoptoseinduktion dienen kann [180]. Tayeh et al. (2018) [181] konnten diese Schrumpfung der Zellkerne für das aus den Blättern von *Rhodomyrtus tomentosa* isolierte Acylphloroglucinolderivat Rhodomyrtone nachweisen. Nach Anfärben der DNA mit dem fluoreszierenden Farbstoff Hoechst-33342 (= (2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol trihydrochlorid) kann dieser Prozess im Fluoreszenzmikroskop detektiert bzw. visualisiert werden. Bei der Schrumpfung der Zellkerne durch Einwirken der Testsubstanzen verringert sich das Volumen der Kerne, wodurch sich die Fluoreszenz der angefärbten DNA intensiviert (Abbildung 233 und Abbildung 234). Zur Analyse der Zytotoxizität der in dieser Arbeit isolierten und identifizierten Verbindungen wurde daher ein „Nuclear Shrinkage Assay“ an der humanen Ovarialkarzinom Zelllinie A2780 durchgeführt (s. Kap. 6.7). [182]

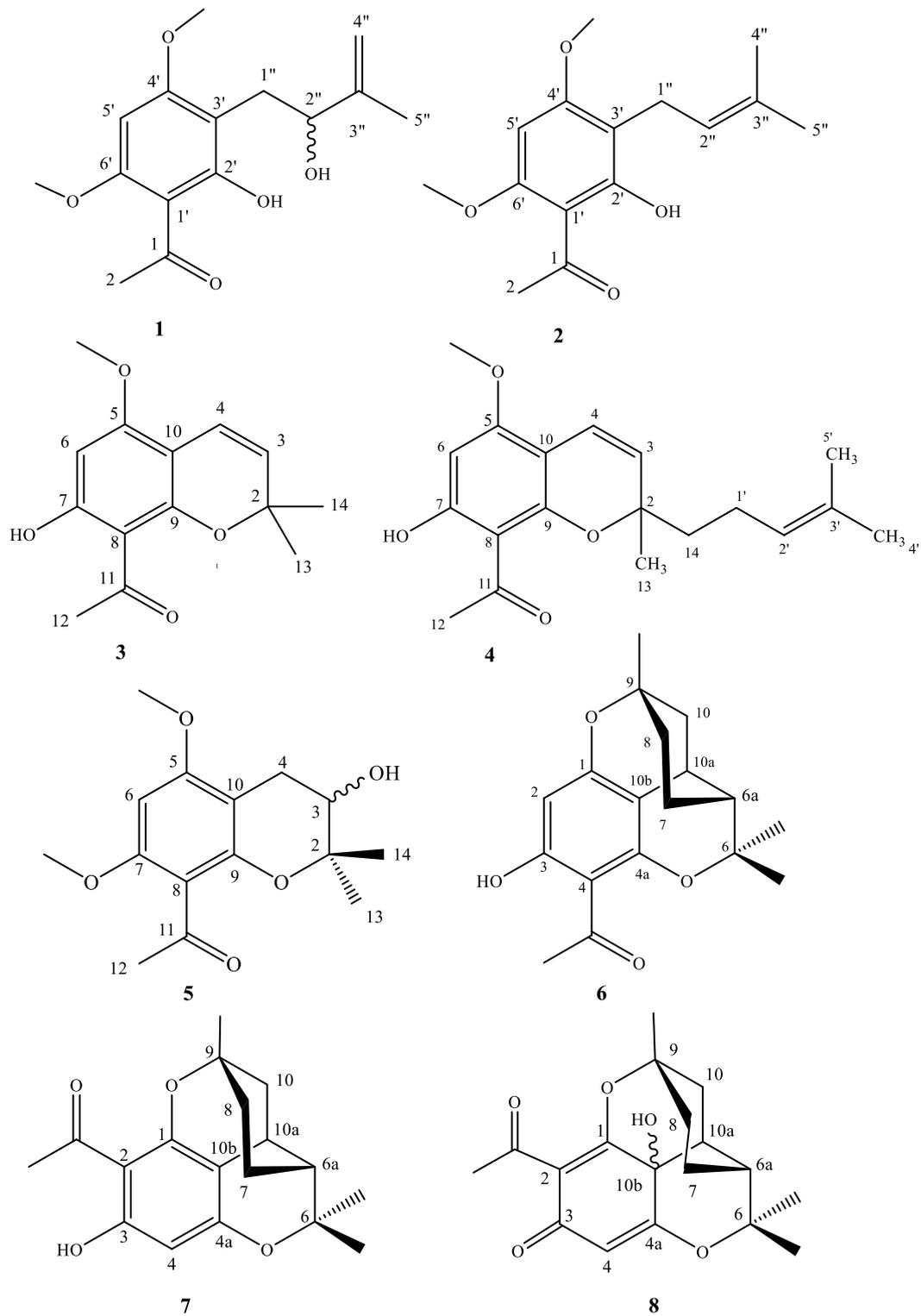
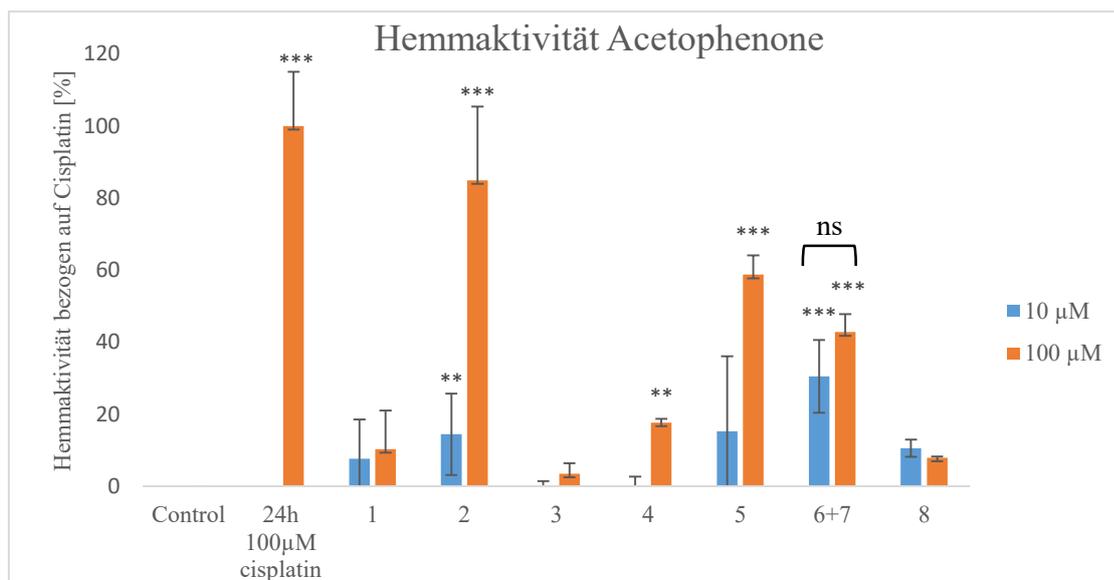


Abbildung 226: Strukturen der getesteten Phloroglucinderivate (Acetophenone/Chromene)

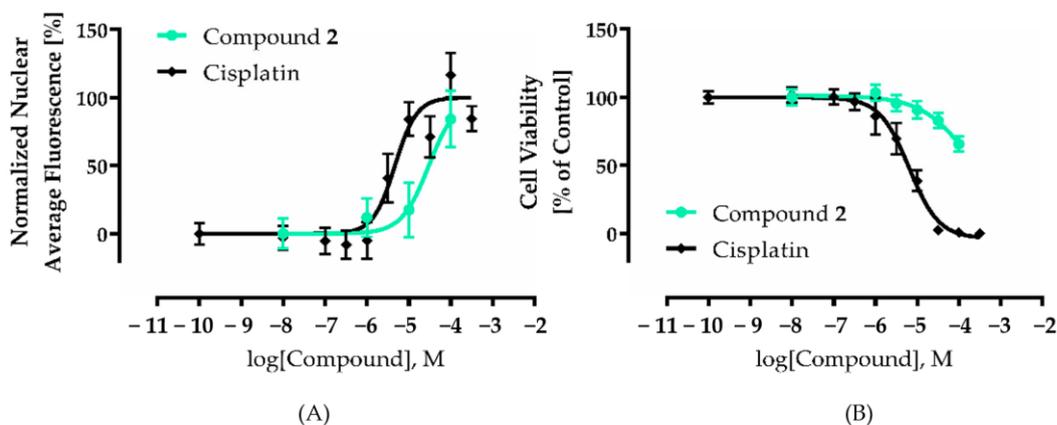
Die Ovariakarzinomzelllinie A2780 wurde für 72 Stunden mit den in Abbildung 227 aufgeführten Phloroglucinderivaten in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Diese spezielle Zelllinie wurde aufgrund der bisher in der Arbeitsgruppe von Prof. Kassack gemachten Erfahrungen im Screening von Naturstoffen ausgewählt. [183–185] Als Negativkontrolle diente Kulturmedium, als Positivkontrolle wurde Cisplatin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  für 24 Stunden inkubiert. Das Ausmaß der Substanz-induzierten Kernschrumpfung als Maß für die Zytotoxizität wurde mit dem Array Scan XTI High Content Screening System (HCS) der Firma Thermo Scientific (Wesel, Germany) (Abbildung 233 und Abbildung 234). Die Abbildung 227 zeigt das Ergebnis des Nuclear Shrinkage Assays für die Verbindungen 1 – 8. In diesem Diagramm sind normalisierte Werte dargestellt, die dadurch erhalten wurden, dass die Werte für die Negativ- und Positivkontrolle auf 0 % bzw. 100 % gesetzt wurden.



**Abbildung 227:** Normalisierte Toxizitätswerte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 3$ )) der Verbindungen 1 - 8 im Nuclear Shrinkage Assay, \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ), ns (= nicht signifikant) adaptiert nach Le et al. 2021 [186]

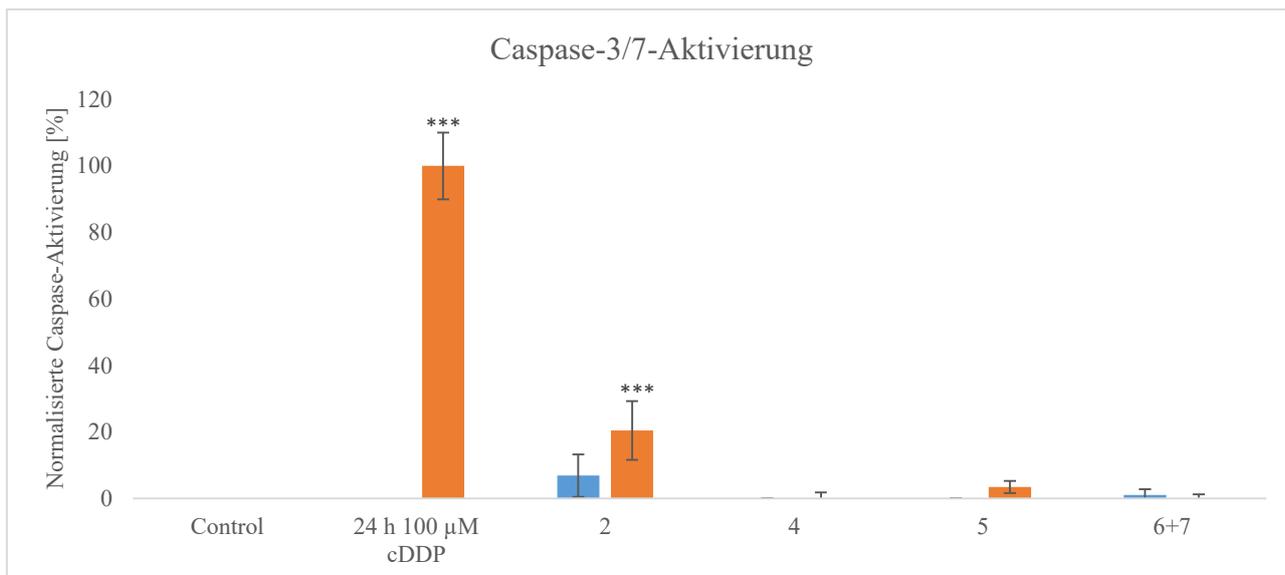
Die Verbindungen zeigten mehr oder weniger starke zytotoxische Effekte an der Ovariakarzinom-Zelllinie A2780 [186]. Die höchste zytotoxische Aktivität wurde für die Verbindungen 2 und 5 ermittelt, sodass für diese beiden Verbindungen eine Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte durchgeführt wurde. Da das ebenfalls recht aktive Gemisch von 6 und 7 bei 10 und 100  $\mu\text{M}$  etwa die gleiche Toxizität aufwies, war für dieses Gemisch kein  $\text{IC}_{50}$ -Wert bestimmbar. Verbindung 2 wies mit einem  $\text{IC}_{50}$  von 30,0  $\mu\text{M}$  die höchste zytotoxische Potenz auf, während Verbindung 5 eine 2,5-fach geringere Zytotoxizität zeigte ( $\text{IC}_{50} = 75,7 \mu\text{M}$ ). Zur

Charakterisierung des antiproliferativen Effektes, wurde für Verbindung **2** ein MTT-Assay durchgeführt (Abbildung 228). Der antiproliferative Effekt war allerdings sehr gering ausgeprägt, erkennbar an einem  $IC_{50}$ -Wert größer  $100 \mu\text{M}$ . Vielleicht liegt das daran, dass die generelle Zytotoxizität von **2** relativ gering ist und so ein längeres Überleben der Mitochondrien sowie deren Regeneration, was im MTT-Assay gemessen wird, möglich ist. Offenbar kommt es in Gegenwart von **2** eher zu einer Beeinflussung der Zellkerne als der Mitochondrien. Da keines der Acetophenone **1-8** in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  eine höhere Zytotoxizität aufwies, wurden niedrigere Konzentrationen gar nicht gemessen. Die Ergebnisse bestätigen jedoch die bisher gefundenen Zytotoxizitäten anderer Acetophenone. [187,188]



**Abbildung 228:** Zytotoxizität von **2** im Nuclear Shrinkage (A) und MTT-Assay (B) [186]

Anschließend wurde mit einem Caspase-3/7-Assay analysiert, ob die substanzinduzierten Effekte im Nuclear Shrinkage Assay auf eine Auslösung der Apoptose zurückgeführt werden können. In Abbildung 229 ist der Effekt der im Nuklear Shrinkage Assay aktiven Verbindungen auf die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3/7 [189] dargestellt. Für die Verbindungen **2** und **5** konnte gezeigt werden, dass sie die Caspase 3/7 signifikant beeinflussen, wenn auch in wesentlich geringerem Ausmaß als Cisplatin.



**Abbildung 229:** Beeinflussung der Caspase 3/7 durch **2**, **5** und **6+7** im Vergleich zu Cisplatin. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\*( $p \leq 0,001$ ), ns (= nicht signifikant) adaptiert nach Le et al. 2021 [186]

**Tabelle 40** Ergebnisse der Caspase 3/7 Aktivierung der Acetophenone in %

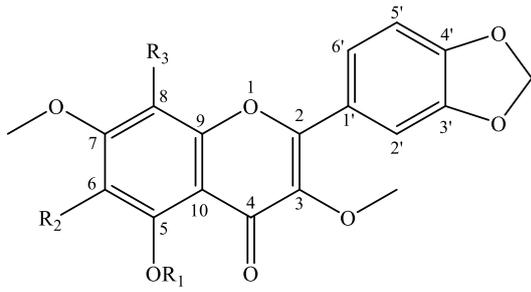
Verbindung	10 µM	100 µM
<b>2</b>	6,92	20,47
<b>4</b>	0	0
<b>5</b>	0	3,49
<b>6+7</b>	3	0

Insgesamt gesehen zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse aber, dass die Acetophenone aus *Melicope barbiger*a vergleichbare Ergebnisse liefern, wie sie für ähnliche Verbindungen in der Literatur beschrieben wurden. [188,190,191]

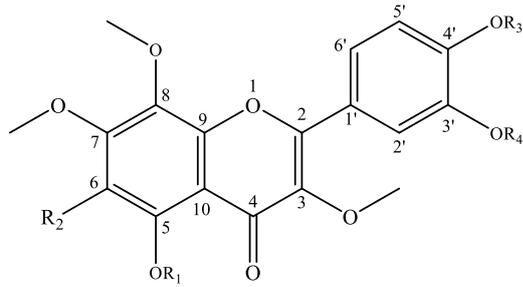
Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass prenylierte Acetophenone stärker zytotoxisch wirken, als vergleichbare Verbindungen ohne dieses Strukturelement. Dies wurde bereits zuvor für Pflanzen der Gattung *Acronychia* gezeigt [69,70,84,187,192] und wir konnten dies in unserer Arbeitsgruppe an der Zunahme der Toxizität für prenylierte Flavonoide und Isoflavonoide aus der Gattung *Erythrina* ebenfalls zeigen. [193–195]

Neben den Acetophenonen und Chromenen wurden auch die Flavonoide **9 – 22** aus den Extrakten von *Melicope barbiger*a in unterschiedlicher Konzentration und Reinheit isoliert und identifiziert. Auch diese Stoffe mit Ausnahme, der nur im Gemisch vorliegenden Verbindungen **10, 13, 16, 21** und **22** wurden hinsichtlich ihrer Zytotoxizität mit Hilfe des „Nuclear Shrinkage Assay“ bestimmt (s. Tabelle 39, Abbildung 234). Abbildung 231 zeigt die Balkendiagramme

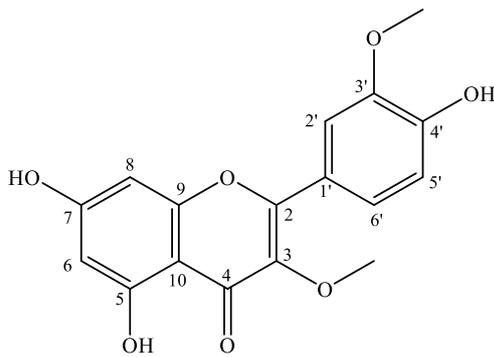
(Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 3$ )) für die Verbindungen **9 – 19** ebenfalls in normalisierter Darstellung bezogen auf Cisplatin (100%-Hemmung) und Medium (0%-Hemmung).



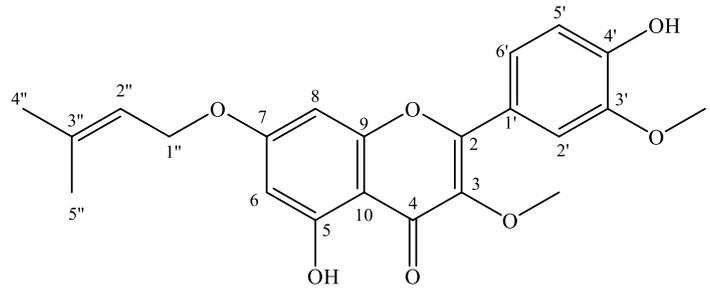
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>9</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>10</b>	H	H	OCH <sub>3</sub>
<b>11</b>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>20</b>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H



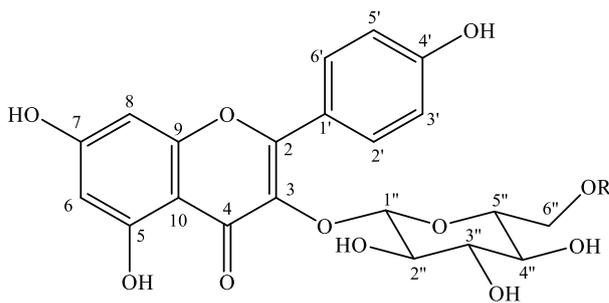
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>12</b>	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>13</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>14</b>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>15</b>	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
<b>16</b>	H	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<b>17</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	H



**18**

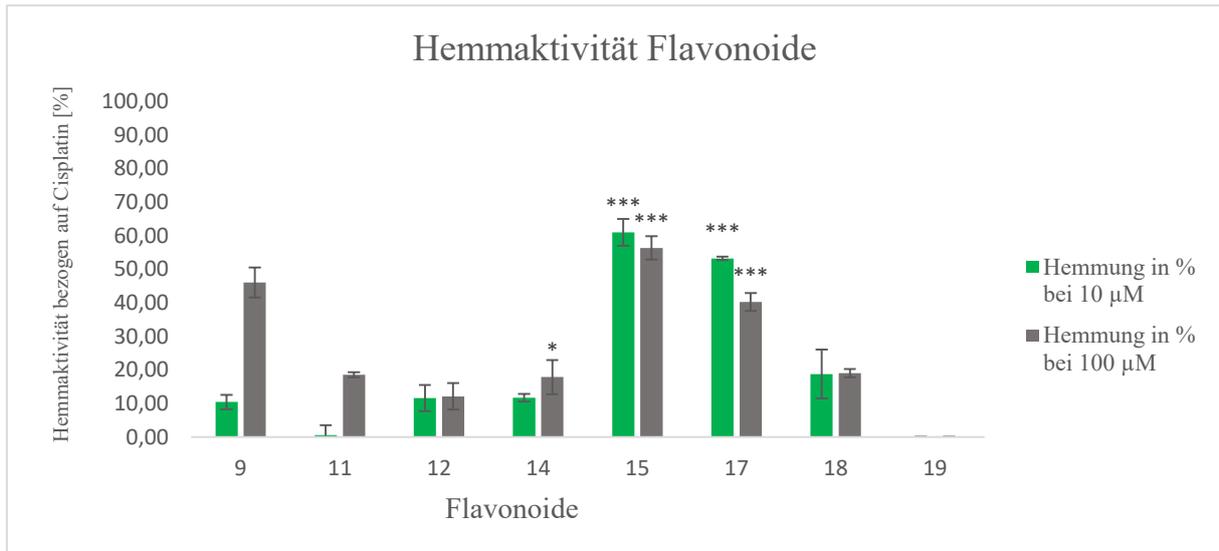


**19**



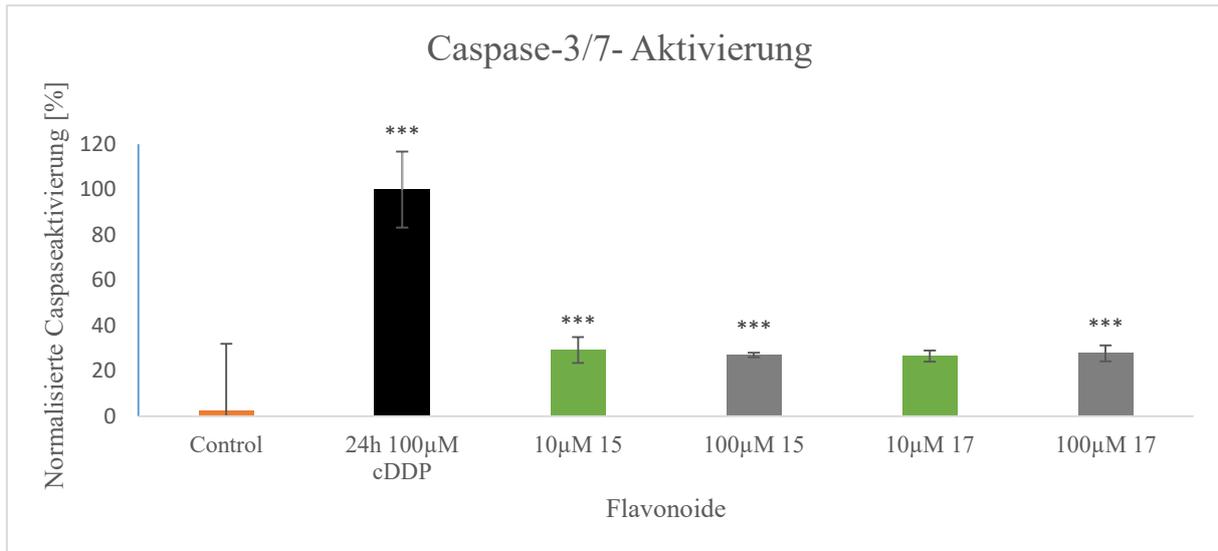
	R
<b>21</b>	trans-p-Cumarsäure
<b>22</b>	cis-p-Cumarsäure

**Abbildung 230:** Strukturen der in *M. barbiger*a gefundenen Flavonoide, die mit Ausnahme von **10**, **13**, **16**, **20** und **22** im Nuclear Shinkage Assay getestet wurden



**Abbildung 231:** Normalisierte Toxizitätswerte der Flavonoide im Nuclear Shrinkage Assay, \*( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\*( $p \leq 0,001$ ), ns (= nicht signifikant)

Von den getesteten Flavonoiden zeigten die meisten Verbindungen entweder keine zytotoxischen Eigenschaften oder die normierte Zytotoxizität lag unter 20 % im Vergleich zu Cisplatin. Eine Ausnahme stellten die Verbindungen **15** und **17** dar, deren Hemmwerte in der Konzentration von 10 µM zwischen 53,2 % für **17** und 60,9 % für **15** lagen. Überraschenderweise zeigten beide Verbindungen genauso wie das Gemisch der Verbindungen **6** und **7** keine konzentrationsabhängige Toxizität im Nuclear-Shrinkage Assay (Abbildung 227), weshalb auch für diese beiden aktiven Flavonoide kein  $IC_{50}$ -Wert bestimmt wurde. Da es sich im Gegensatz zu den Acetophenonen und Chromenen um bekannte Substanzen handelt, wurde diesem Sachverhalt nicht weiter nachgegangen.



**Abbildung 232:** Beeinflussung der Caspase 3/7 durch **15** und **17** im Vergleich zu Cisplatin. signifikanter Unterschied mit  $p = 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle, \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ), ns (= nicht signifikant)

**Tabelle 41** Ergebnisse der Caspase 3/7 Aktivierung der Flavonoide in %

Verbindung	10 µM	100 µM
<b>15</b>	29,19	26,97
<b>17</b>	26,50	27,67

Wie bei den Acetophenonen wurde auch mit den Flavonoiden **15** und **17** ein Caspase-3/7-Assay durchgeführt, um festzustellen, ob auch bei diesen Verbindungen der Effekt im Nuclear Shrinkage Assay auf eine Auslösung der Apoptose zurückgeführt werden kann.

Für beide Verbindungen konnte gezeigt werden, dass sie die Caspase 3/7 in einer Konzentration von 10 µM signifikant beeinflussen (**15** = 29,2 %, **17** = 26,5 % im Vergleich zu Cisplatin = 100%, siehe (Abbildung 232)).

Über die zytotoxischen Eigenschaften von Verbindung **15** wurde bereits in vielen Publikationen berichtet. So zeigte dieses Flavonoid im MTS Assay nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden toxische Eigenschaften gegenüber epidermalen Karzinomzellen des Nasopharynx (KB-Zellen) und Tumorzellen der promyeloischen Leukämie (HL-60) mit  $IC_{50}$ -Werten von 8 nM bzw. 50 nM. [196,197] Während an den KB-Zellen hauptsächlich der antiproliferative Effekt nachgewiesen werden sollte, dienen die Versuche mit den HL60-Zellen dem Nachweis einer Aktivität gegenüber der Caspase-3/7. [196,197] Darüber hinaus wurde auch untersucht inwieweit die Testsubstanzen die Polymerisation des Tubulins und damit den Aufbau des Spindelapparates hemmen [196,197]. Der  $IC_{50}$ -Wert der hier isolierten Verbindung **15** lag bei 1.3 µM. [196,197] Die Verbindung war dabei etwa doppelt so stark wirksam wie

Deoxypodophyllotoxin (DPPT), ein ebenfalls natürlich vorkommendes Lignan, das in vielen ethnopharmakologisch interessanten Pflanzen gefunden wurde. [198] Neben der Verbindung **15** testeten Lewin et al. auch Verbindung **17**, die sich durch das Fehlen der Methoxygruppe an C-6 von **15** unterscheidet. [197] In allen Testsystemen fanden sie eine um etwa den Faktor 10 geringere Aktivität. Im Nuclear Shrinkage Assay ist die 6-Methoxygruppe für die Aktivität der Flavonoide offenbar nicht so wichtig, denn hier war **17** nur um den Faktor 1,4 weniger aktiv als **15**. Verbindung **16** unterscheidet sich von **15** durch die Substitution des B-Ringes. Während es sich bei **15** um einen 3'-Hydroxy-4'-Methoxy-Flavonolmethylether handelt, ist bei **16** die Hydroxylgruppe an C-3' methyliert, es handelt sich daher um einen 4'-Hydroxy-3'-Methoxy-Flavonolmethylether. Im hier durchgeführten Nuclear Shrinkage Assay geht die Aktivität dabei verloren (s. Abbildung 231), obwohl **16** zu etwa 20 Prozent mit **15** verunreinigt ist. Verbindung **16** wurde neben **15** von Lichius et al. (1994) auch aus der Rutaceae *Acronychia porteri* isoliert [196]. Die Autoren dieser Arbeit gaben für **15** einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,04 µM gegenüber KB-Zellen an. [196] Der nur aus der Literatur übernommene, wesentlich schlechtere Wert für **16** (0,2 µM) [196], kann nicht überprüft werden, weil die zitierten Arbeiten [199,200], entweder gar keine Toxizitätsdaten enthalten [199], bzw. die Toxizität gegenüber KB-Zellen mit 2,0 x 10<sup>-1</sup> ohne Angabe der Einheit ebenfalls nur aus der Literatur entnommen haben. [200] Bei den dort zitierten Arbeiten handelt es sich einmal um eine in Cancer Chemother. Reports unter der Autorenbezeichnung Anon. für „Anonymus“ gekennzeichnete, unauffindbare Veröffentlichung aus dem Jahre 1962 und um eine zweite Arbeit, die 1969 von Hartwell und Abbott veröffentlicht wurde [201]. Unsere Ergebnisse bestätigen die Befunde von Shi et al. aus dem Jahr 1995, der die beiden isomeren Verbindungen **15** und **16** aus *Polanisia dodecandra* isoliert und deren Aktivität gegenüber sechs verschiedenen Tumorzelllinien bestimmt hat [129]. Während Verbindung **15** in allen Testsystemen stark zytotoxische Eigenschaften zeigte, war **16** in allen Testsystemen bis auf eines inaktiv. [129] Die Aktivität gegenüber epidermalen Tumorzellen des Nasopharynx (KB-Zellen) wurde auch bestimmt, für **16** fanden Shi et al. einen EC<sub>50</sub>-Wert von 8,4 µM. [129]

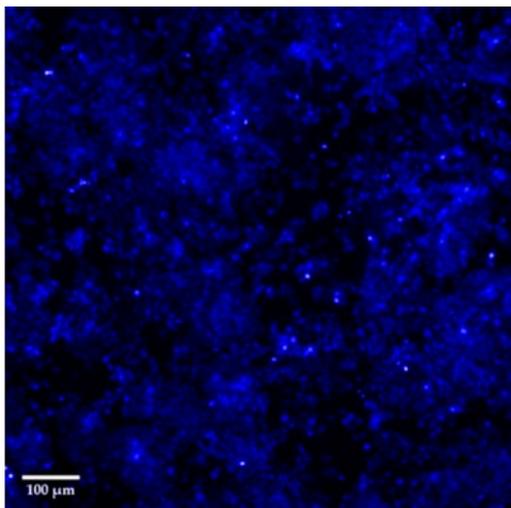
Für Verbindung **19** konnte keinerlei Zytotoxizität ermittelt werden, was vermutlich an der zu geringen Substanzmenge lag. Da andere prenylierte Flavonoide bereits häufig als zytotoxische Substanzen nachgewiesen werden konnten, wäre auch hier eine Zytotoxizität zu erwarten gewesen. [193–195]

Die übrigen im Rahmen dieser Arbeit isolierten Cumarine und Alkaloide **23** - **27** wurden ebenfalls getestet, keine dieser Verbindungen zeigte eine Aktivität im Nuclear Shrinkage Assay bei einer Testkonzentration von 10µM.

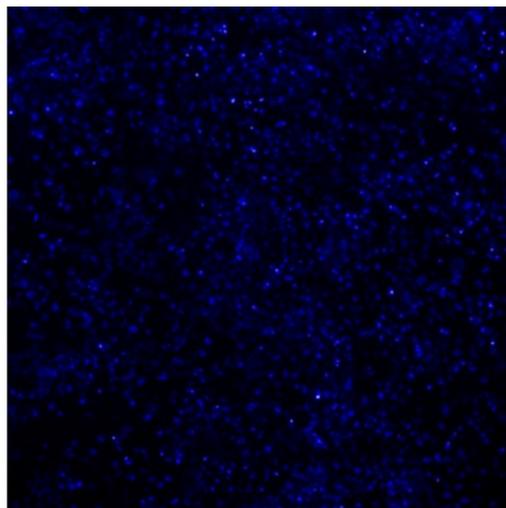
**Tabelle 42:** Normalisierte Toxizitätswerte in % der getesteten Verbindungen aus *M. barbiger* im Nuclear Shrinkage Assay gegen A2780

Verbindungen	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
1	7,65	10,28
2	14,44	84,90
3	0,00	3,48
4	0,00	17,66
5	15,29	58,73
6/7	30,54	42,79
9	10,48	46,07
11	0,60	18,55
12	11,63	12,11
14	11,72	17,88
15	60,98	56,39
17	53,24	40,29
18	18,80	19,03
19	0,00	0,00
22	0	0
24	0	8,98
25	0	0
26	0	0
27	0	0

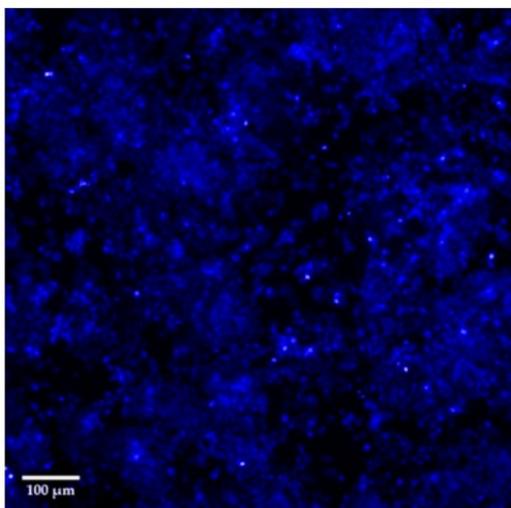
In der folgenden Abbildung wurden die Bilder während des Nuclear Shrinkage Assays im High Content Screening des Array Scan XTI aufgenommen. Auf der linken Seite der Abbildung ist jeweils die Kontrolle und auf der rechten Seite die betreffende Verbindung mit der jeweiligen gemessenen Konzentration in  $\mu$ M dargestellt.



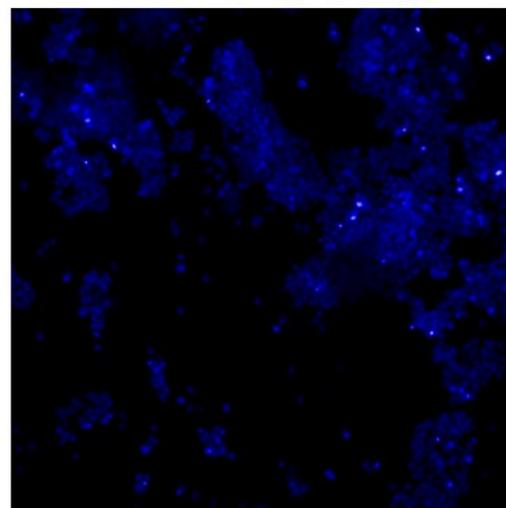
**Kontrolle**



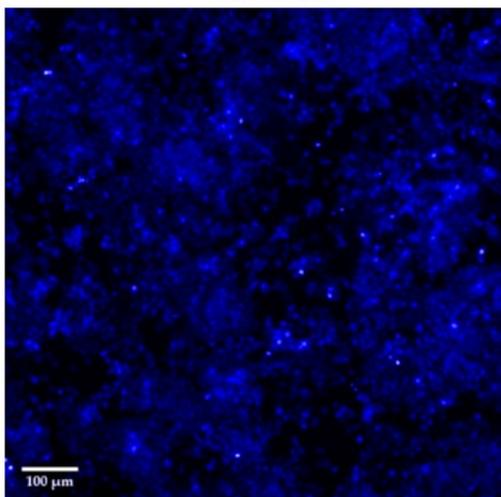
**24 h 100 μM (Cisplatin)**



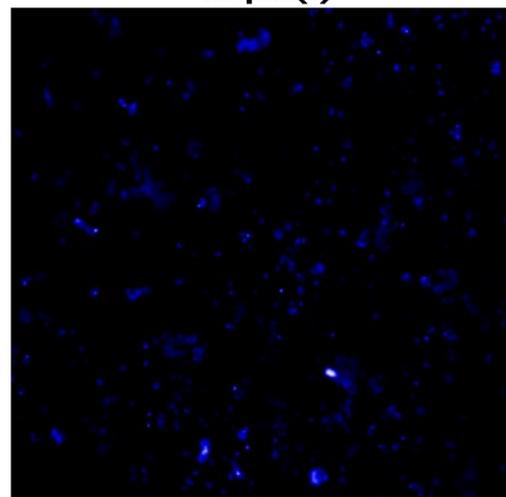
**Kontrolle**



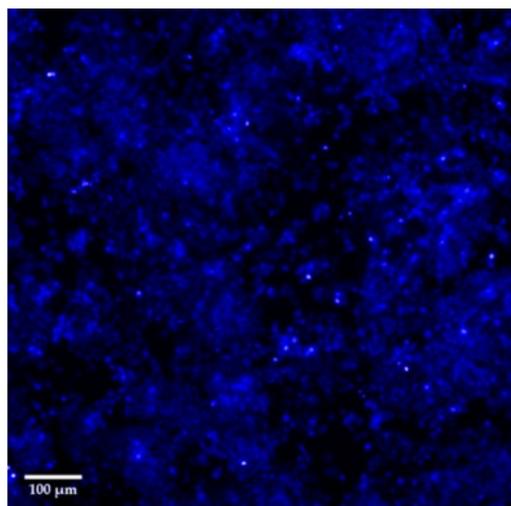
**10 μM(2)**



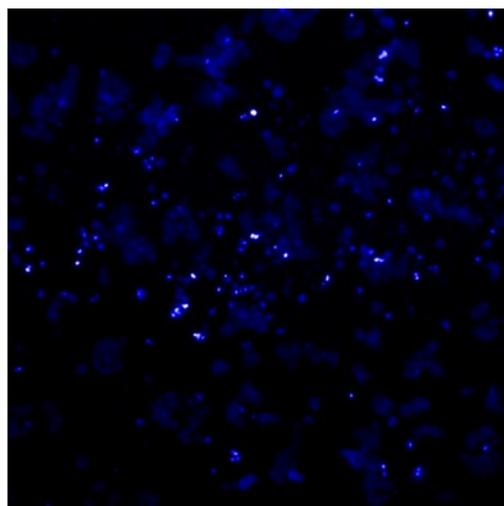
**Kontrolle**



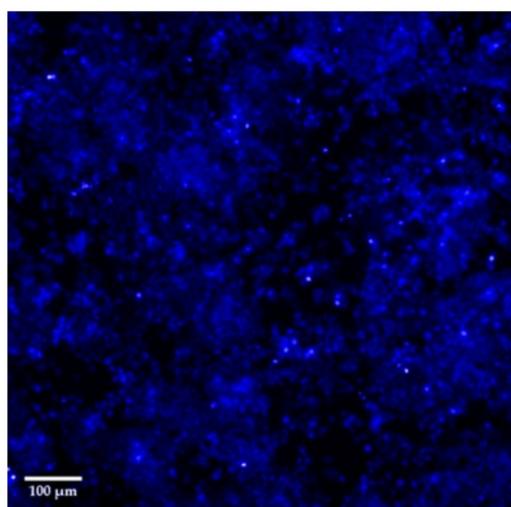
**100 μM(2)**



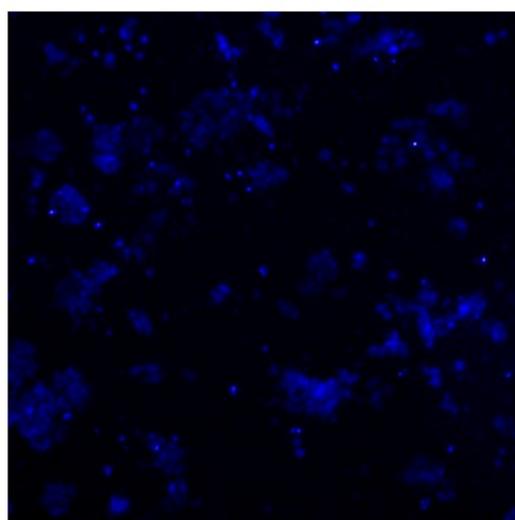
**Kontrolle**



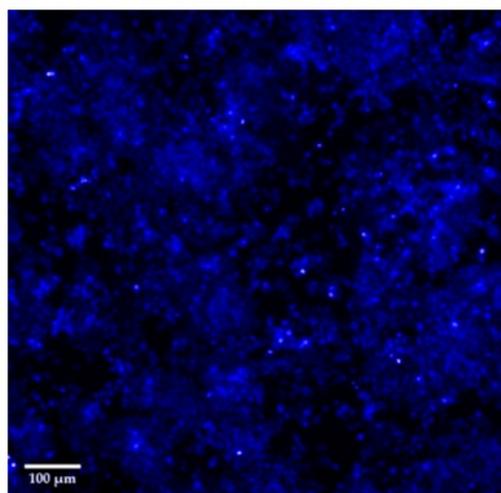
**100 μM (4)**



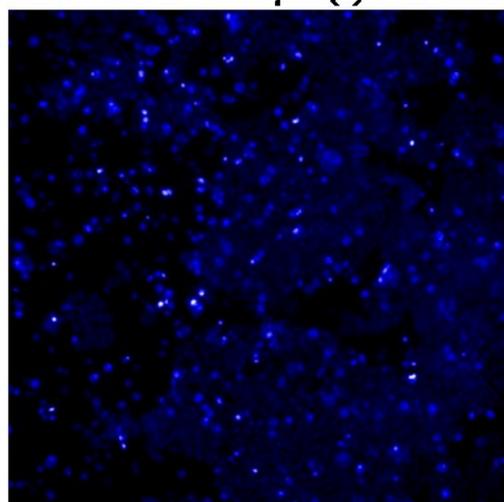
**Kontrolle**



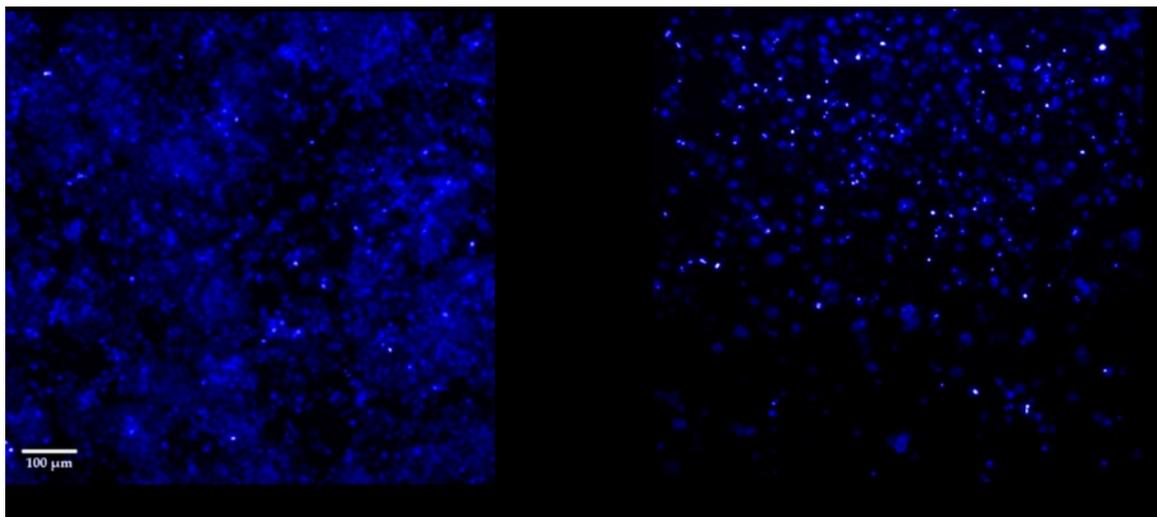
**100 μM (5)**



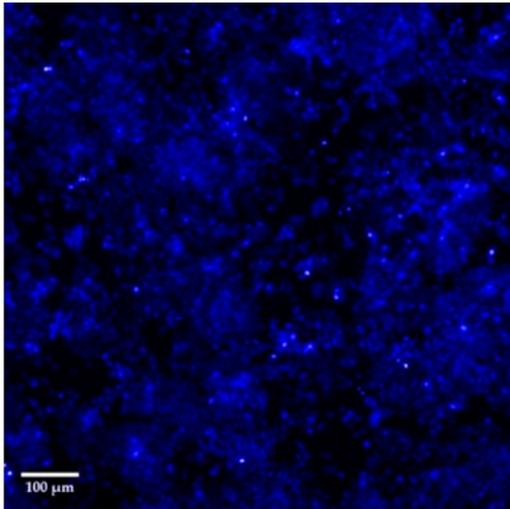
**Kontrolle**



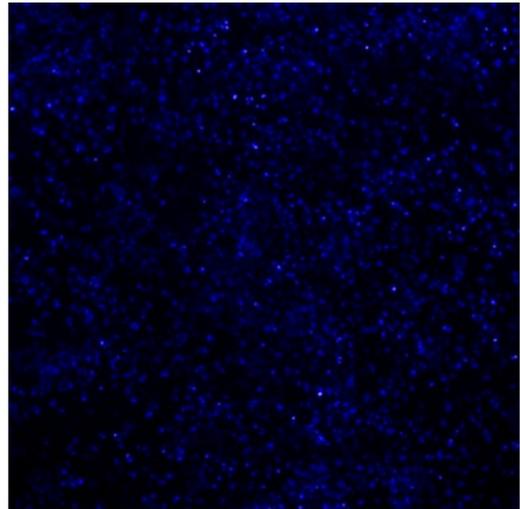
**10 μM (6+7)**



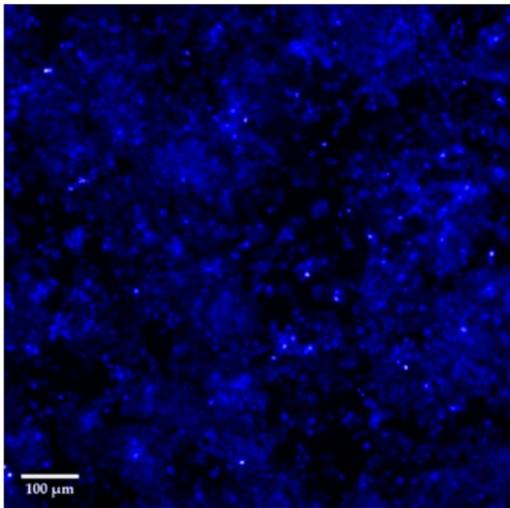
**Abbildung 233:** Zytotoxische Aktivität der Acetophenone **2**, **5** und Gemisch von **6** und **7**. Repräsentative Fluoreszenz Imaging Aufnahmen von Verbindungen mit signifikanten Effekt auf die A2780-Zelllinie. Der Maßstab, der für die Kontrolle angegeben wird, gilt für alle Abbildungen.



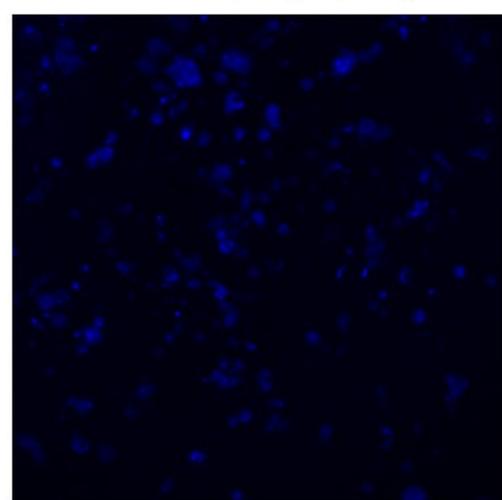
**Kontrolle**



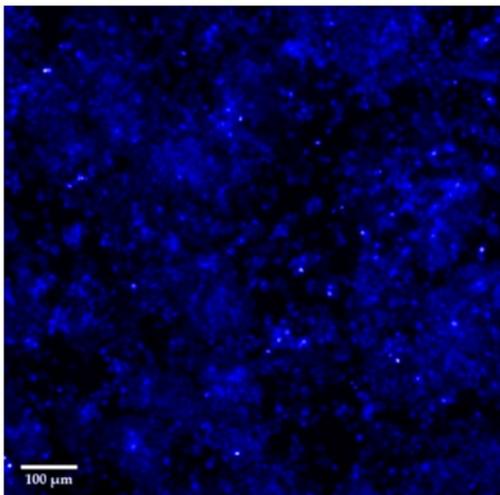
**24 h 100 μM (Cisplatin)**



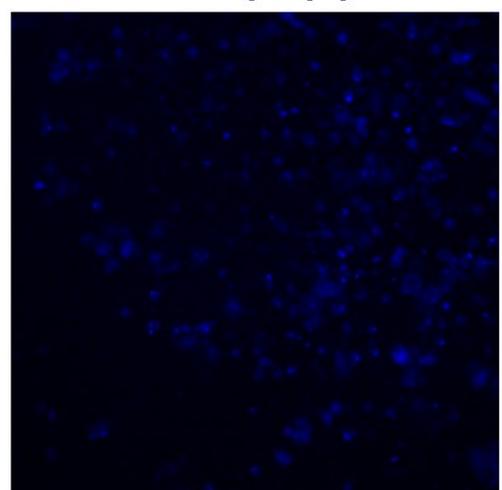
**Kontrolle**



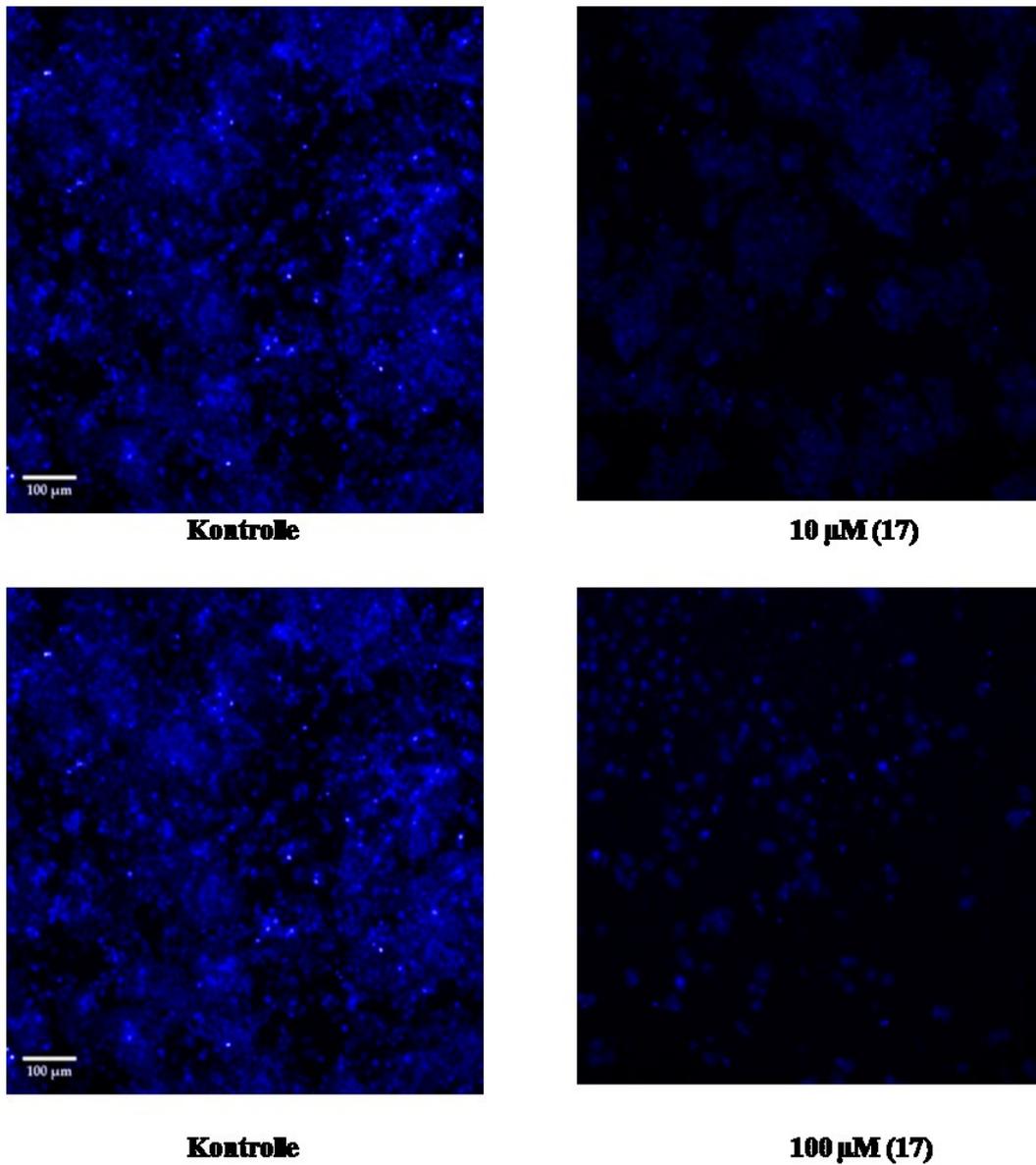
**10 μM (15)**



**Kontrolle**



**100 μM (15)**



**Abbildung 234:** Zytotoxische Aktivität der Flavonoide **15** und **17**.  
Repräsentative Fluoreszenz-Imaging Aufnahmen von Verbindungen, mit  
signifikanten Effekt auf die Zelllinie A2780. Der Maßstab, der für die  
Kontrolle angegeben wird, gilt für alle Abbildungen.

## 5 Diskussion

Die Gattung *Melicope* umfasst nach den Angaben von Ahmadpourmir et al. (2024) ungefähr 250 Arten. [202] In der Tabelle 43 sind 247 dieser Species aufgeführt, basierend auf der Veröffentlichung von Hartley zur Taxonomie und Biogeography der nahe verwandten Gattungen *Euodia* und *Melicope* (Rutaceae) [203], ergänzt durch einige weitere Arbeiten von Hartley et al. und Appelhans et al. [30,32,204] Die Gattung ist insgesamt für den Naturstoffchemiker schwer zu überblicken, weil Ergänzungen und Reduktionen der Species mit den verwandten Gattungen *Euodia* und *Pelea* mehrfach durchgeführt wurden. [30,32,204], wobei die von den Botanikern verwendeten Zeitschriften nicht immer zugänglich sind. Zusätzlich erschwert wird die Suche nach bereits in *Melicope* gefundener, pflanzlicher Sekundärstoffe dadurch, dass die verwandte Gattung *Euodia*, aus der eine gewisse Anzahl von Species in die Gattung *Melicope* überführt worden ist, bis zum Ende der 1950er Jahre fehlerhaft *Evodia* genannt wurde. [203] Es ist daher möglich, dass Veröffentlichungen von Untersuchungen an ein- und derselben Species unter der Gattungsbezeichnung *Evodia*, *Euodia* und *Melicope* publiziert wurde [143,153,205–210].

Hartley hat bereits vor mehr als 20 Jahren in seiner Arbeit dargestellt, dass die in dieser ganz aktuellen Publikation erwähnte *Evodia lepta*, die eigentlich *Euodia lepta* heißen müsste, als *Melicope pteleifolia* zur Gattung *Melicope* gehört. [203,211] Leider ist das offenbar nicht alle Autoren bekannt, so dass sich Arbeiten zu allen drei Bezeichnungen dieser Species finden, was die Suche nach Inhaltsstoffen enorm erschwert.

Die Problematik besteht bis heute, z.B. erschien in diesem Jahr eine Arbeit zur Nephrotoxizität des Evodiamins bei der Verwendung der als Fructus Evodiae in der traditionellen chinesischen Medizin bekannten Früchte von *Evodia rutaecarpa*. [212] Bei dieser Pflanze handelt es sich jedoch um eine *Euodia*-Art, die heute zur Gattung *Tetradium* gehört, wie die Publikation von Na et al. zur antibakteriellen Wirkung von *Tetradium ruticarpum* Früchten zeigt, die ebenfalls als *Evodiae fructus* bezeichnet werden. [213]

Hartley (2001) teilt die Gattung *Melicope* in die vier Sektionen *Melicope*, *Vitiflorae*, *Pelea* und *Lepta* ein und beschreibt, dass 38 Arten die Sektion *Melicope* bilden, nur 8 Arten zur Sektion *Vitiflorae* gehören, 85 Arten in die Sektion *Pelea* eingeteilt werden und dass die Sektion *Lepta* mit 112 Arten die größte Gruppe darstellt. [203]

In seiner im Februar 2001 erschienenen Arbeit zur Taxonomie und Biogeographie der Gattungen *Euodia* und *Melicope* schreibt Hartley, dass bisher nur eine *Euodia* Species (*E. hortensis*) und insgesamt nur 17 *Melicope*-Arten phytochemisch untersucht worden sind. [203] Hartley bezieht sich dabei auf eine von ihm als Co-Autor mitverfasste Arbeit von Ng et al. aus dem Jahr 1987. [214] Von den dort gelisteten 17 *Melicope*-Species, werden zwei Arten heute unter einem anderen Namen geführt, *Melicope perspicuinervia* heißt heute *Melicope reticulata* und *Melicope sarcococca* wird heute *Melicope durifolia* genannt. [203,214]

Eine Literaturrecherche in den Chemical Abstracts mit dem Stichwort „*Melicope*“ lieferte im Juli 2024 insgesamt 353 Treffer, inklusive unserer eigenen Publikation zu den Acetophenonen von *Melicope barbiger*a und deren Zytotoxizität. [49,186] Wenn man davon ausgeht, dass Hartley nur die Literatur bis einschließlich 2000 zur Verfügung stand, reduziert sich die Anzahl der Paper auf 81, wovon etwa 60 die Isolierung und Identifizierung von Verbindungen aus den Stoffgruppen der Alkaloide, Flavonoide, Acetophenone, und Cumarine beschreiben. Dabei hätte man mit *M. hayesii*, *M. erromagensis*, *M. micrococca* und *M. pteleifolia* vier weitere *Melicope* species finden können, so dass die Anzahl der bis 2000 phytochemisch untersuchten Arten auf 21 erhöht werden müsste. Weitere 21 *Melicope* Arten aus Tabelle 43, inklusive der in dieser Arbeit untersuchten *Melicope barbiger*a, wurden seit der Jahrtausendwende phytochemisch untersucht, wobei neben Alkaloiden, Flavonoiden und Acetophenonen auch das ätherische Öl untersucht wurde. Weitere Inhaltsstoffe waren Cumarine, Furanocumarine und Lignane. [215] Abziehen muss man eventuell die Arbeit zu *M. quercifolia*, bei der es sich nach Hartley um *M. denhamii* handelt [36]. Gemessen an der großen Anzahl an Species in der Gattung *Melicope*, zu der auch noch weitere in Tabelle 43 noch nicht aufgeführte Arten hinzugefügt wurden, ist der Anteil der untersuchten Arten mit 41 oder 42 von insgesamt über 200 Species immer noch sehr gering. Wie bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit erwähnt, wurden in den untersuchten Arten der Gattung *Melicope* Alkaloide, Acetophenone, Cumarine und Flavonoide gefunden. In anderen Arbeiten wurde über die Zusammensetzung des ätherischen Öls berichtet [216] und es wurden auch andere, eher ubiquitäre Inhaltsstoffe erwähnt, wie z.B. das  $\beta$ -Sitosterol. [63] Leider ist bei vielen Publikationen zu den Inhaltsstoffen von *Melicope* nicht klar, ob das Auffinden von Sekundärstoffen aus einer bestimmten Inhaltsstoffgruppe darauf zurückzuführen ist, dass speziell und nur danach gesucht wurde, oder ob die ausschließliche Isolierung von einer Gruppe bedeutet, dass andere Stoffe nicht oder nur in so geringer Menge enthalten waren, dass sie nicht isoliert werden konnten. Betrachtet man die vier Sektionen, die Hartley gebildet hat, so lässt sich feststellen, dass Species aus jeder der

Sektionen phytochemisch untersucht wurden [36]. Aus der Sektion Melicope (Tabelle 43) sind mit *M. broadbentiana*, *M. contermina*, *M. indica*, *M. mantellii*, *M. patulinervia*, *M. reticulata*, *M. simplex*, *M. ternata* und *M. xanthylodes* insgesamt neun Arten untersucht worden. Alkaloide wurden nur in *M. indica*, *M. reticulata* und *M. xanthoxyloides* gefunden [114,214], nur *M. indica* enthält auch Flavonoide. [217,218] Acetophenone wurden jedoch bisher in keiner dieser Arten gefunden.

**Tabelle 43:** *Melicope* Arten und deren Einordnung in unterschiedliche Sektionen [30,32,203,204]

I. Sektion <i>Melicope</i>		III. Sektion <i>Pelea</i>		IV. Sektion <i>Lepta</i>			
1	<i>M. aequata</i>	66	<i>M. fatuhivensis</i>	132	<i>M. accendens</i>	201	<i>M. micrococca</i>
2	<i>M. balgooyi</i>	67	<i>M. feddei</i>	133	<i>M. acuminata</i>	202	<i>M. mindorensis</i>
3	<i>M. broadbentiana</i>	68	<i>M. fulva</i>	134	<i>M. affinis</i>	203	<i>M. moluccana</i>
4	<i>M. burtiana</i>	69	<i>M. glaberrima</i>	135	<i>M. alpestris</i>	204	<i>M. monticola</i>
5	<i>M. carrii</i>	70	<i>M. haleakalae</i>	136	<i>M. anomala</i>	205	<i>M. neglecta</i>
6	<i>M. contermina</i>	71	<i>M. haupuensis</i>	137	<i>M. balankazo</i>	206	<i>M. nishimurae</i>
7	<i>M. dicksoniana</i>	72	<i>M. hawaiiensis</i>	138	<i>M. bakeri</i>	207	<i>M. obscura</i>
8	<i>M. evansensis</i>	73	<i>M. hiiakae</i>	139	<i>M. belahe</i>	208	<i>M. obtusifolia</i>
9	<i>M. flaviflora</i>	74	<i>M. hivaoaensis</i>	140	<i>M. benguetensis</i>	209	<i>M. obtusifolia ssp. gigas</i>
10	<i>M. goalensis</i>	75	<i>M. hosakae</i>	141	<i>M. blancoi</i>	210	<i>M. obtusifolia ssp. gigas var. brachypoda</i>
11	<i>M. homoephylla</i>	76	<i>M. inopinata</i>	142	<i>M. bonwickii</i>	211	<i>M. obtusifolia ssp. gigas var. cuneifolia</i>
12	<i>M. indica</i>	77	<i>M. kaalensis</i>	143	<i>M. borbonica</i>	212	<i>M. obtusifolia var. arborea</i>
13	<i>M. jugosa</i>	78	<i>M. kavaensis</i>	144	<i>M. borbonica var. acuminata</i>	213	<i>M. obtusifolia var. inaequalis</i>
14	<i>M. longior</i>	79	<i>M. knudsenii</i>	145	<i>M. buennemeijeri</i>	214	<i>M. pachyphylla</i>
15	<i>M. lucida</i>	80	<i>M. lamii</i>	146	<i>M. burmahia</i>	215	<i>M. pachypoda</i>
16	<i>M. macgregorii</i>	81	<i>M. lasioneura</i>	147	<i>M. buwaldae</i>	216	<i>M. pahangensis</i>
17	<i>M. mantellii</i>	82	<i>M. lauterbachii</i>	148	<i>M. calycina</i>	217	<i>M. palawensis</i>
18	<i>M. mucronata</i>	83	<i>M. lobocarpa</i>	149	<i>M. celebica</i>	218	<i>M. pauciflora</i>
19	<i>M. novoguineensis</i>	84	<i>M. lydgatei</i>	150	<i>M. chapelieri</i>	219	<i>M. pendula</i>
20	<i>M. oblanceolata</i>	85	<i>M. macrophylla</i>	151	<i>M. chapelieri var. sessilis</i>	220	<i>M. peninsularis</i>
21	<i>M. patulinervia</i>	86	<i>M. macropus</i>	152	<i>M. chunii</i>	221	<i>M. pergamentacea</i>
22	<i>M. perryae</i>	87	<i>M. makahae</i>	153	<i>M. clemensiae</i>	222	<i>M. pteleifolia</i>
23	<i>M. petiolaris</i>	88	<i>M. molokaiensis</i>	154	<i>M. coodeana</i>	223	<i>M. pulgarensis</i>
24	<i>M. phanerophlebia</i>	89	<i>M. mucronulata</i>	155	<i>M. confusa</i>	224	<i>M. quadrilocularis</i>
25	<i>M. pubifolia</i>	90	<i>M. munroi</i>	156	<i>M. corneri</i>	225	<i>M. ramuliflora</i>
26	<i>M. reticulata</i>	91	<i>M. nealae</i>	157	<i>M. cornuta</i>	225	<i>M. remyi</i>
27	<i>M. ridsdalei</i>	92	<i>M. nubicola</i>	158	<i>M. cornuta var. decurrens</i>	227	<i>M. rhytidocarpa</i>
28	<i>M. robusta</i>	93	<i>M. nukuhivensis</i>	159	<i>M. crassifolia</i>	228	<i>M. rigoensis</i>
29	<i>M. sororia</i>	94	<i>M. oahuensis</i>	160	<i>M. crassiramis</i>	229	<i>M. rostrata</i>
30	<i>M. simplex</i>	95	<i>M. obovata</i>	161	<i>M. cravenii</i>	230	<i>M. rubra</i>
31	<i>M. stellulata</i>	96	<i>M. orbicularis</i>	162	<i>M. crispula</i>	231	<i>M. sambiranensis</i>
32	<i>M. suberosa</i>	97	<i>M. ovalis</i>	163	<i>M. cucullata</i>	232	<i>M. schraderi</i>
33	<i>M. sudestica</i>	98	<i>M. ovata</i>	164	<i>M. decaryana</i>	234	<i>M. segregis</i>
34	<i>M. tahitensis</i>	99	<i>M. pallida</i>	165	<i>M. denhamii</i>	235	<i>M. semecarpifolia</i>
35	<i>M. taveuniensis</i>	100	<i>M. paniculata</i>	166	<i>M. discolor</i>	236	<i>M. sessilifoliola</i>
36	<i>M. ternata</i>	101	<i>M. pedicellata</i>	167	<i>M. doormani-montis</i>	237	<i>M. spathulata</i>
37	<i>M. trachycarpa</i>	102	<i>M. peduncularis</i>	168	<i>M. dubia</i>	238	<i>M. steenisii</i>
38	<i>M. whitapensis</i>	103	<i>M. perlmanii</i>	169	<i>M. elleryana</i>	239	<i>M. stonei</i>
39	<i>M. xanthoxyloides</i>	104	<i>M. polyadenia</i>	170	<i>M. eriophylla</i>	240	<i>M. subunifoliolata</i>
		105	<i>M. ponapensis</i>	171	<i>M. euneura</i>	241	<i>M. timorensis</i>
		106	<i>M. pseudoanisata</i>	172	<i>M. exuta</i>	242	<i>M. trichanta</i>
40	<i>M. bracteata</i>	107	<i>M. puberula</i>	173	<i>M. fatraina</i>	243	<i>M. trichopetala</i>
41	<i>M. capillacea</i>	108	<i>M. quadrangularis</i>	174	<i>M. fellii</i>	244	<i>M. tsaratnanensis</i>
42	<i>M. erromangensis</i>	109	<i>M. radiata</i>	175	<i>M. floribunda</i>	245	<i>M. villosa</i>
43	<i>M. laevis</i>	110	<i>M. reflexa</i>	176	<i>M. forbesii</i>	246	<i>M. viticina</i>
44	<i>M. littoralis</i>	111	<i>M. retusa</i>	177	<i>M. glabella</i>	247	<i>M. zambalensis</i>
45	<i>M. margaretae</i>	112	<i>M. revoluta</i>	178	<i>M. glabra</i>		
46	<i>M. polybotrya</i>	113	<i>M. richii</i>	179	<i>M. glomerata</i>		
47	<i>M. vitiflora</i>	114	<i>M. robbinsii</i>	180	<i>M. grisea</i>		
		115	<i>M. rotundifolia</i>	181	<i>M. hayesii</i>		
		116	<i>M. saint-johnii</i>	182	<i>M. hiepkoi</i>		
48	<i>M. aberrans</i>	117	<i>M. sandwicensis</i>	183	<i>M. hookeri</i>		
49	<i>M. adscendens</i>	118	<i>M. savaiensis</i>	184	<i>M. idiocarpa</i>		
50	<i>M. alba</i>	119	<i>M. sessilis</i>	185	<i>M. incana</i>		
51	<i>M. albiflora</i>	120	<i>M. sterrophylla</i>	186	<i>M. improvisa</i>		
52	<i>M. aneura</i>	121	<i>M. sulcata</i>	187	<i>M. irifica</i>		
53	<i>M. anisata</i>	122	<i>M. tekaoensis</i>	188	<i>M. jonesii</i>		
54	<i>M. balloui</i>	123	<i>M. triphylla</i>	189	<i>M. kainantuensis</i>		
55	<i>M. barbiger</i>	124	<i>M. vatiana</i>	190	<i>M. kjellbergii</i>		
56	<i>M. boweriana</i>	125	<i>M. versteeghii</i>	191	<i>M. kostermansii</i>		
57	<i>M. brassii</i>	126	<i>M. viellardii</i>	192	<i>M. latifolia</i>		
58	<i>M. christophersenii</i>	127	<i>M. vinkii</i>	193	<i>M. laxa</i>		
59	<i>M. cinerea</i>	128	<i>M. volcanica</i>	194	<i>M. lumu-ankenda</i>		
60	<i>M. clusiiifolia</i>	129	<i>M. waialealae</i>	195	<i>M. macrocarpa</i>		
61	<i>M. conjugata</i>	130	<i>M. wawraeana</i>	196	<i>M. madagascariensis</i>		
62	<i>M. cruciata</i>	131	<i>M. zahlbruckneri</i>	197	<i>M. magnifolia</i>		
63	<i>M. degeneri</i>			198	<i>M. maliliensis</i>		
64	<i>M. durifolia</i>			199	<i>M. maxii</i>		
65	<i>M. elliptica</i>			200	<i>M. megastima</i>		

Diese Stoffgruppe konnte bisher in *M. broadbentiana*, *M. patulinervia*, *M. simplex* und *M. ternata*, fast immer zusammen mit Flavonoiden, nachgewiesen werden. [75,112,214,219] In *M. mantellii* wurden nur Flavonoide zusammen mit Furanocumarinen gefunden, die bisher aus keiner weiteren Art der Sektion *Melicope* isoliert werden konnten. [214]

Von *M. contermina* wurde nur das ätherische Öl untersucht. [220] Aus der Sektion *Vitiflorae* wurden drei Arten auf Inhaltsstoffe untersucht. *M. vitiflora* enthält Acetophenone und Alkaloide [214], *M. erromagensis* nur Acetophenone. [221] Auch aus der Sektion *Pelea*, zu der die in dieser Arbeit untersuchte *Melicope barbiger*a gehört, und die nach Hartley 85 Arten umfasst (Tabelle 43) [203], wurden mit *M. anisata*, *M. durifolia*, *M. lasioneura* und *M. triphylla* nur vier Species auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. In *M. anisata* wurden nur Cumarine gefunden [222], *M. triphylla* enthält Cumarine, Alkaloide und Flavonoide [102,111,125,214,223–228], während *M. lasioneura* nur Alkaloide und *M. durifolia* (früher *M. sarcococca*) nur Flavonoide enthält. [214] Die Sektion, zu der die größte Anzahl an *Melicope*-Arten gehört ist die Sektion *Lepta*. Aus dieser Gruppe wurden bereits 23 Arten phytochemisch analysiert. Die am besten untersuchte Species ist *M. pteleifolia*. [50,51,88,90,229–235], in der Alkaloide, Acetophenone und Flavonoide gemeinsam gefunden wurden. Grund für das große Interesse an *M. pteleifolia* ist die Verwendung der Blätter dieser Pflanze in der traditionellen chinesischen Medizin und in der Naturheilkunde anderer asiatischer Länder. [236] Sekundärstoffe aus diesen drei Substanzgruppen wurden auch in *M. elleryana* gefunden. [131,237–239]. In *M. denhamii* und *M. lunu-ankenda* fand man zusätzlich Cumarine. [70,224,240] Diese beiden Arten sind, neben der hier untersuchten *M. barbiger*a, die einzigen Species der Gattung *Melicope* aus denen Substanzen aus allen vier gattungstypischen Stoffgruppen bekannt sind. *M. borbonica* und *M. latifolia* enthalten Acetophenone und Cumarine [94,157,241–245] sowie zusätzlich Flavonoide (*M. borbonica*) [61] und Alkaloide (*M. latifolia*). [157]

Aus den anderen untersuchten Arten der Sektion *Lepta*, ist bisher nur das Vorkommen von Substanzen aus der einen oder der anderen dieser drei dominierenden Stoffgruppen bzw. aus zwei dieser Stoffgruppen gemeinsam in einer Pflanze beschrieben worden. So wurden in *M. bonwickii*, *M. confusa*, *M. euneura* und *M. moluccana* nur Alkaloide [55,62,214,237] in *M. obtusifolia* var. *arborea* und *M. viticina* nur Acetophenone [86,246,247]) und in *M. hookeri* und *M. subunifoliolata* nur Flavonoide gefunden [105,247,248] Während aus *M. coodeana* und Acetophenone und Flavonoide bekannt sind [34,53,117,148,157,243,249,250], enthalten *M. accendens* und *M. madagascariensis* und *M. micrococca* Alkaloide und Flavonoide

[59,76,205,251] *M. belaha* enthält Cumarine und Alkaloide [206], *M. glabra* Cumarine und Flavonoide [134,207,242,248,252,253] Darüber hinaus wurden in einigen Species ätherisches Öl und Furanocumarine nachgewiesen. [70,220]

Die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen zur Isolierung und Identifizierung von Sekundärstoffen aus den Blättern von *Melicope barbiger* aus der Sektion Pelea (Rutaceae), lieferten erst zum vierten Mal phytochemische Ergebnisse aus dieser Sektion innerhalb der Gattung *Melicope*. Insgesamt gesehen ist *M. barbiger* die 43. Species der artenreichen Gattung, über deren Inhaltsstoffe berichtet wird. Es konnten insgesamt 8 Acetophenone und Chromene, 14 Flavonoide, 4 Furanocumarine und 1 Alkaloid isoliert und identifiziert werden (s. Kap.2.1 – 2.19 und Experimenteller Teil Kap. 6). Die meisten dieser Verbindungen wurden auch auf ihre Zytotoxizität gegenüber humanen Krebszellen untersucht.

## 5.1 Acetophenone

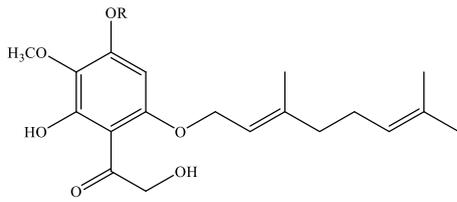
Acetophenone sind phenolische Naturstoffe, die in vielen Familien des Pflanzenreichs und auch in Pilzen gefunden wurden. Eine Übersicht über natürlich vorkommende Acetophenone und deren pharmakologische Eigenschaften gibt eine in diesem Jahr ganz aktuell erschienene Übersichtsarbeit von Ahmadpourmir et al. (2024), in der der auch die bereits vor einigen Jahren veröffentlichten Teilergebnisse aus der hier vorgelegten Arbeit berücksichtigt wurden. [202]

Bei Acetophenonen handelt es sich streng genommen um phenolische Substanzen, die neben einer Acetylgruppe eine oder mehrere phenolische Hydroxylgruppen an einem Phenylring aufweisen. Wie bei vielen anderen pflanzlichen Sekundärstoffen auch, konnte mit einigen Acetophenonen gezeigt werden, dass sie eine ökologische Bedeutung für die produzierende Pflanzen besitzen und diese z.B. vor Fraß durch Insekten schützen. [202]

Einige Acetophenone wie z.B. das Apocynin aus der *Picrorhiza kurroa*, einer aus dem Himalaya stammenden, in der Ayurveda-Medizin Indiens verwendeten Lamiaceae, sind wegen ihrer antiinflammatorischen Wirkung auch pharmakologisch interessant. [254] Gleiches gilt für den Methylether des Apocynins, das Paeonol aus der einkeimblättrigen *Dioscorea japonica* (Dioscoreaceae), dem antimutagene Eigenschaften nachgewiesen werden konnten [255], Ahmadpourmir et al. listet in seiner Publikation insgesamt 252 verschiedene Substanzen, deren Struktur von ganz einfachen Verbindungen, wie dem Apocynin, über prenylierte Verbindungen bis hin zu Substanzen mit komplexen polycyclischen Grundgerüsten reicht, deren biogenetische Herkunft nicht sofort erkennbar ist. [202]

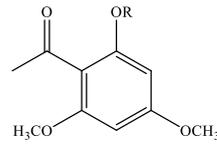
Ihr Hauptvorkommen haben die Acetophenone in der Familie der Rutaceae, zu der auch die Gattung *Melicope* gehört. Nach Angaben von Ahmadpourmir et al. wurden aus dieser Familie bereits 124 verschiedene Substanzen isoliert und identifiziert. [202]

**I. *Melicope broadbentiana* [75,219]**



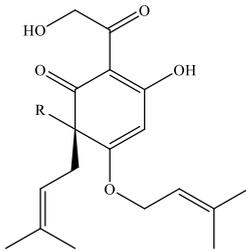
- #1 Melicopol (R = H)  
#2 Methylmelicopol B (R = CH<sub>3</sub>)

**II. *Melicope borbonica* [241]**



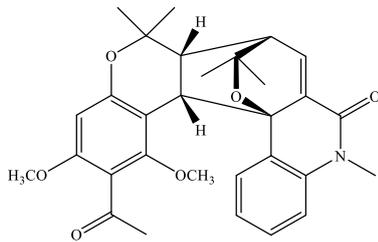
- #3 Xanthoxylin (R = H)  
#4 Methylxanthoxylin

**III. *Melicope coodeana* [53]**

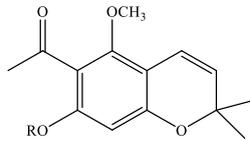


- #5 Coodeanone A (R = 3-Methyl-2-butenyl)  
#6 E-Coodeanone B (R = 3,7-dimethyl-8-hydroxy-2E,6E-octadienyl)  
#7 Z-Coodeanone B (R = 3,7-dimethyl-8-hydroxy-2Z,6Z-octadienyl)  
#8 Coodeanone C (R = 3,7-dimethyl-8-oxo-2E,6E-octadienyl)

**IV. *Melicope denhamii* [136,225]**

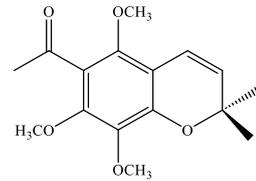


#9 Melicodenine B

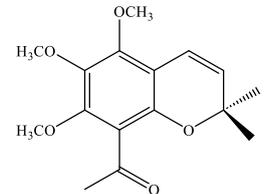


- #10 Evodionol (R = H)  
#11 Methyl-evodionol (R = CH<sub>3</sub>)

**V. *Melicope elleryana* [238]**

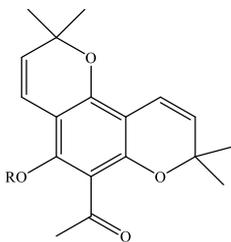


#12 Evodione

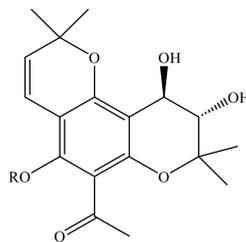


#13 Alloevodione

**VI. *Melicope erromagensis* [221]**



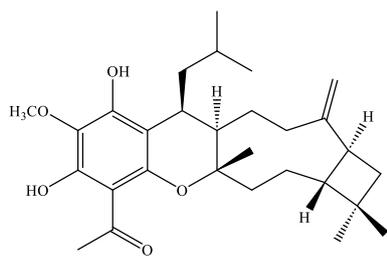
- #14 Octandrenolone (R = H)  
#15 O-Methyloctandrenolone (R=CH<sub>3</sub>)



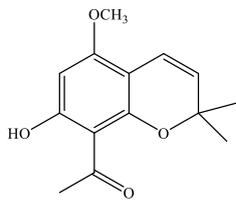
- #16 (+)-trans-3''',4'''-Dihydro-3''',4'''-dihydroxy-octandrenolone (R = H)  
#17 (+)-trans-3''',4'''-Dihydro-3''',4'''-dihydroxy-O-Methyloctandrenolone (R=CH<sub>3</sub>)  
#18 cis-3''',4'''-Dihydro-3''',4'''-dihydroxy-octandrenolone (R = H)  
#19 (+)-trans-3'',4'''-Dihydro-3'',4'''-dihydroxy-octandrenolone (R = H)  
#20 (+)-trans-3'',4'''-Dihydro-3'',4'''-dihydroxy-O-methyloctandrenolone (R=CH<sub>3</sub>)  
#21 cis-3'',4'''-Dihydro-3'',4'''-dihydroxy-octandrenolone (R = H)

Abbildung 235: Acetophenone und Chromene aus Species der Gattung *Melicope* - Teil I

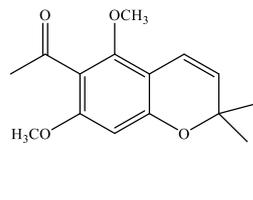
VII. *Melicope latifolia* [94,148,157,243]



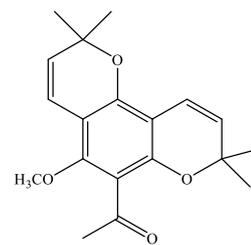
#22 Amelicarin



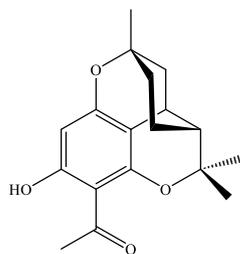
#23 Alloevodionol



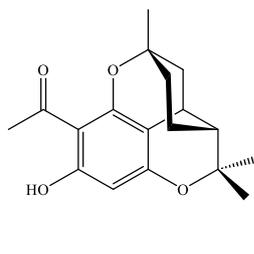
#11 Methylevodionol



#15 O-Methyloctandrenolone

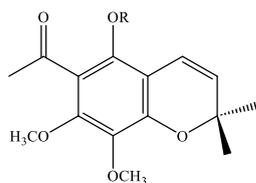


#24 Melifolione A

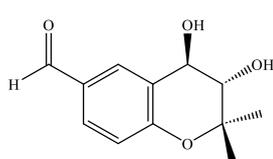


#25 Melifolione B

VIII. *Melicope lunu-ankenda* [70,256]

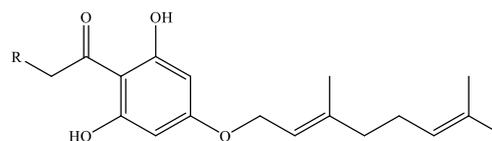


#26 Leptonol (R = H)  
#12 Evodione (R = CH<sub>3</sub>)

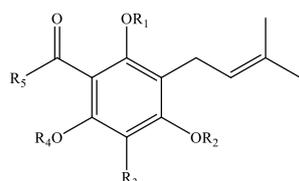


#27 Melilunumane

IX. *Melicope obscura* [246]

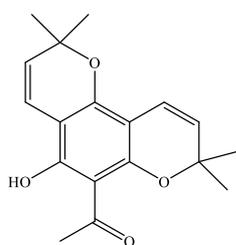


#28 2,6-Dihydroxy-4-geranyloxyacetophenone (R = H)  
#29 4-Geranyloxy-2,6,β-trihydroxyacetophenone (R = OH)



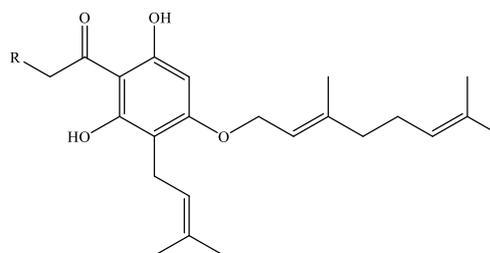
#30 1-[2',4'-dihydroxy-3',5'-di(3''-methyl-2''-butenyl)-6'-methoxy]-phenylethanone (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>= isoprenyl; R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub>=H)  
#31 4-Geranyloxy-3-prenyl-2,6,β-trihydroxyacetophenone (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=geranyl, R<sub>3</sub>=H; R<sub>4</sub>=H; R<sub>5</sub>=OH)

X. *Melicope octandra* [136]



#14 Octandrenolone

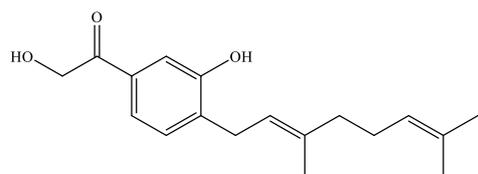
XII. *Melicope obtusifolia* ssp. *obtusifolia* var. *arborea* [246]



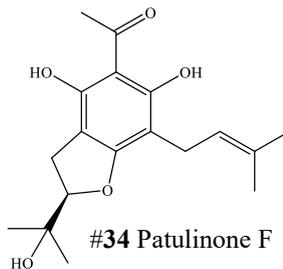
#32 2,6-Dihydroxy-4-geranyloxy-3-prenylacetophenone (R = H)  
#31 4-Geranyloxy-3-prenyl-2,6,β-trihydroxyacetophenone (R = H)

Abbildung 236: Acetophenone und Chromene aus Species der Gattung *Melicope* – Teil II

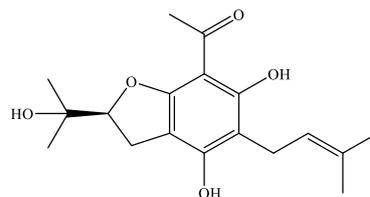
**XIII. *Melicope patulinervia* [215]**



#33 Patulinone E

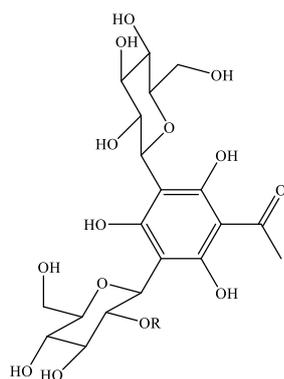


#34 Patulinone F



#35 Patulinone G

**XIV. *Melicope pteleifolia* [50–52,88,90,229–232]**



#36 Pteleifolol A (R = E-p-coumaroyl)

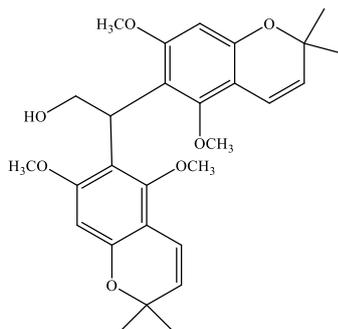
#37 Pteleifolol B (R = Z-p-coumaroyl)

#38 Pteleifolol C (R = E-feruloyl)

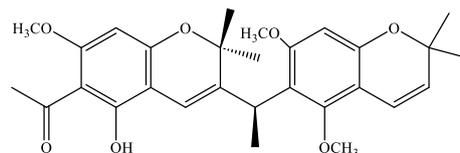
#39 Pteleifolol D (R = benzoyl)

#40 2,4,6-trihydroxyacetophenone-

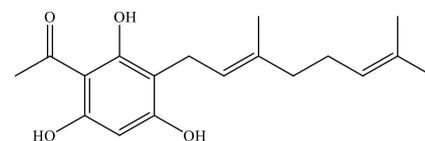
#41 3,5-di-C-glucopyranoside (R = H)



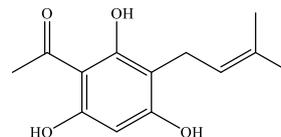
#42 Pteleifolol E



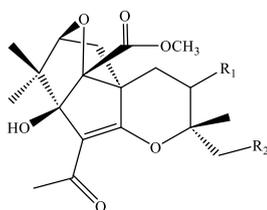
#42a Bisevoleptin A



#43 2,4,6-trihydroxy-3-geranylacetophenone



#44 2,4,6-trihydroxy-3-prenylacetophenone

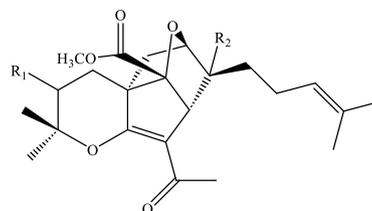


#45 Melicolone A (R<sub>1</sub> = β-OH; R<sub>2</sub> = H)

#46 Melicolone B (R<sub>1</sub> = α-OH; R<sub>2</sub> = H)

#47 Melicolone G (R<sub>1</sub> = β-OH; R<sub>2</sub> = isoprenyl)

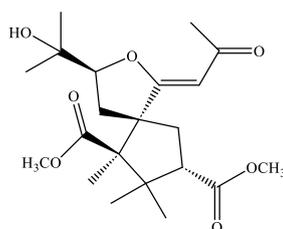
#48 Melicolone I (R<sub>1</sub> = α-OH; R<sub>2</sub> = isoprenyl)



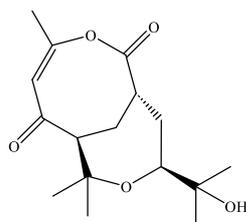
#49 Melicolone H (R<sub>1</sub> = β-OH; R<sub>2</sub> = α-CH<sub>3</sub>)

#50 Melicolone J (R<sub>1</sub> = α-OH; R<sub>2</sub> = β-CH<sub>3</sub>)

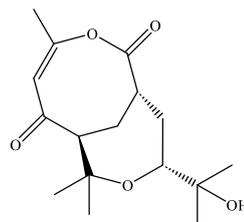
#51 Melicolone K (R<sub>1</sub> = α-OH; R<sub>2</sub> = α-CH<sub>3</sub>)



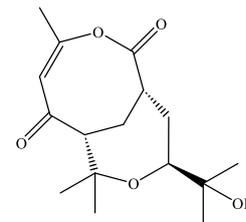
#52 Melicolone C



#53 Melicolone D



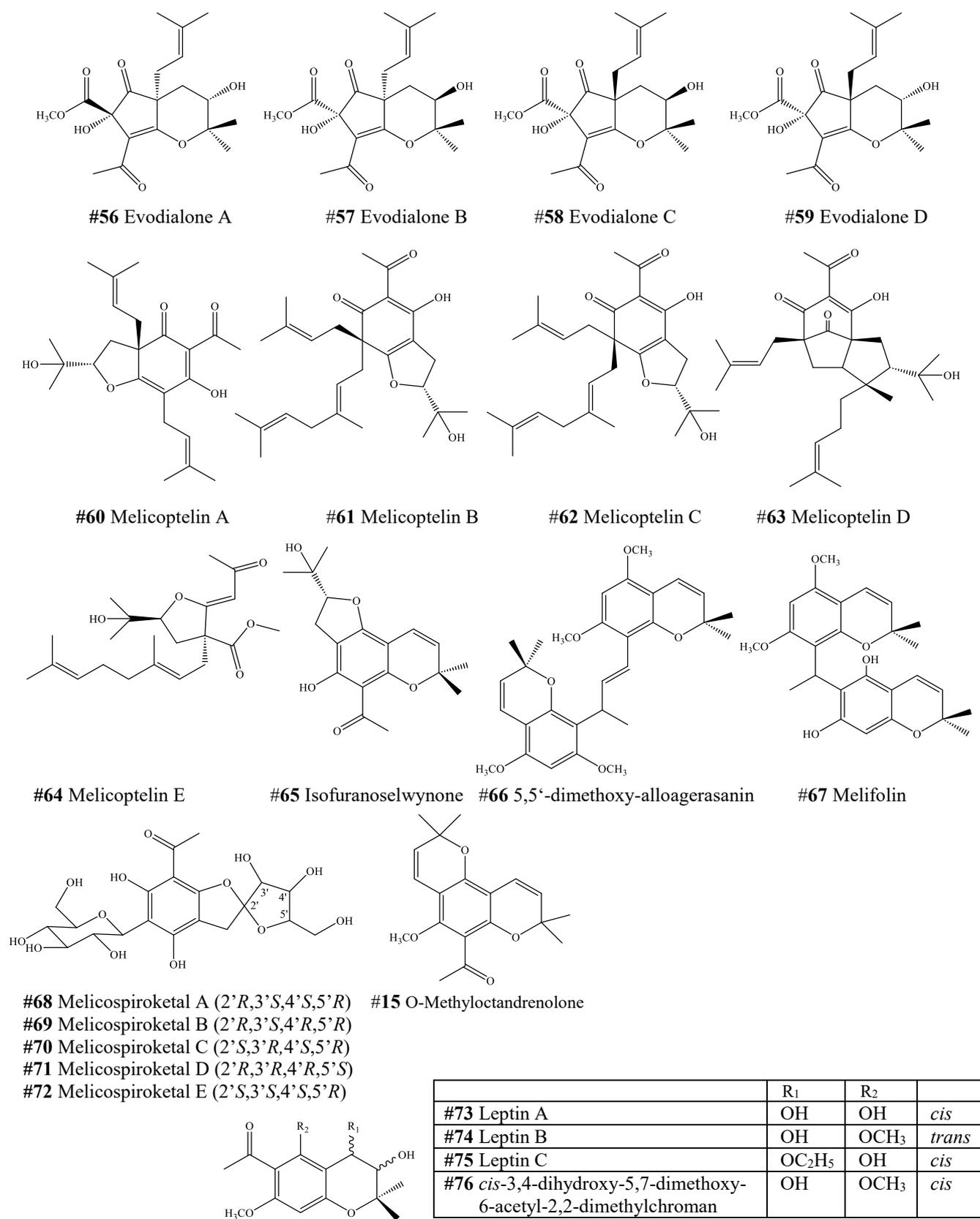
#54 Melicolone E



#55 Melicolone F

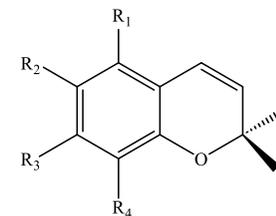
**Abbildung 237: Acetophenone und Chromene aus Species der Gattung *Melicope* – Teil III**

**XIV. *Melicope pteleifolia*** [51,52,88,90,229–232,234]



**Abbildung 238:** Acetophenone und Chromene aus Species der Gattung *Melicope* – Teil IV

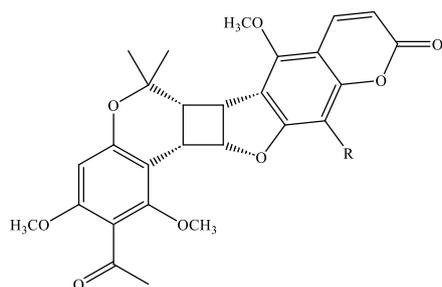
XIV. *Melicope pteleifolia* [51,52,88,90,229–232,234]



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#26 Leptonol	OH	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#77 Isoevodionol	OH	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#78 8-Acetyl-5,7-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-2H-1-benzopyran	OH	prenyl	H	COCH <sub>3</sub>
#10 Evodionol	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OH	H
#79 Acronyculatin G	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OH	<i>prenyl</i>
#11 Evodionolmethylether	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#80 6-Acetyl-8-hydroxy-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
#12 Evodione	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#81 7-Acetyl-6-Hydroxy-5,8-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	OH	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#23 Alloevodionol	OCH <sub>3</sub>	H	OH	COCH <sub>3</sub>
#82 Alloevodionolmethylether	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>
#83 8-Acetyl-7-hydroxy-5,6-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	COCH <sub>3</sub>
#13 Alloevodione	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>
#84 Leptol B	OCH <sub>3</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#85 6-(1-Hydroxyethyl)-5,7,8-trimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#86 Methylleptol B	OCH <sub>3</sub>	CH(OCH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#87 5,7,8-Trimethoxy-6-(1-methoxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	CH(OCH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#88 Ethylleptol B	OCH <sub>3</sub>	CH(OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#89 5,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-6-[1-[[[(2E,7R,11R)-3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-yl]oxy]ethyl]-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	CH(OC <sub>20</sub> H <sub>39</sub> )CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#90 5,6,8-Trimethoxy-7-(1-methoxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH(OCH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#91 8-(1-Hydroxyethyl)-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>
#92 5,7-Dimethoxy-8-(1-methoxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	CH(OCH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>
#93 5,6,7-Trimethoxy-8-(1-methoxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH(OCH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>
#94 8-Ethenyl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>
#95 Leptene A	OCH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#96 Leptene B	OCH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#97 5,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-8-ol	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH

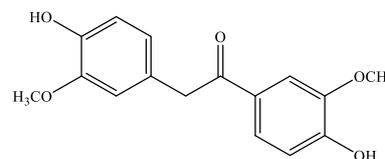
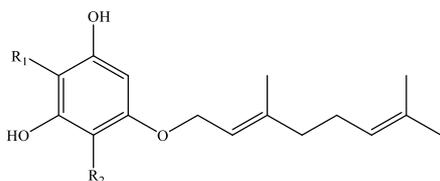
Abbildung 239: Acetophenone und Chromene aus Species der Gattung *Melicope* -Teil V

**XV. *Melicope quercifolia* [72]**

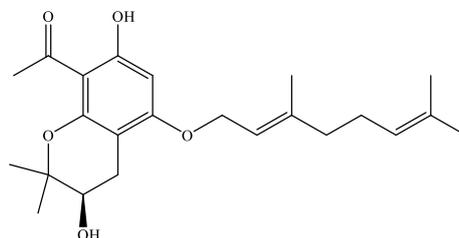
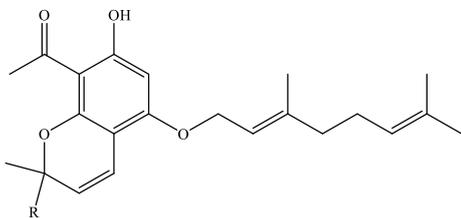


#98 Meliquercifolin A (R = H)  
#99 Meliquercifolin B (R = OCH<sub>3</sub>)

**XVI. *Melicope semecarpifolia* [257]**

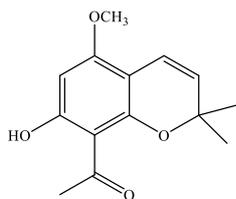


- #100 2-(1'-Geranyloxy)-4,6-dihydroxyacetophenone (R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = Acetyl) (R = H)  
#101 2-(1'-Geranyloxy)-4,6,β-trihydroxyacetophenone (R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = 2-Hydroxyacetyl)  
#102 4-(1'-Geranyloxy)-2,6-dihydroxyacetophenone (R<sub>1</sub> = COCH<sub>2</sub>OH; R<sub>2</sub> = H)  
#103 4-(1'-Geranyloxy)-2,6,β-trihydroxyacetophenone (R<sub>1</sub> = COCH<sub>2</sub>OH; R<sub>2</sub> = H)  
#104 3-Acetyl-6-(1'-Geranyloxy)-2,4-dihydroxybenzoic acid (R<sub>1</sub> = Acetyl; R<sub>2</sub> = COOH)  
#105 3-Acetyl-4-(1'-Geranyloxy)-2,6-dihydroxybenzoic acid (R<sub>1</sub> = COOH; R<sub>2</sub> = Acetyl)

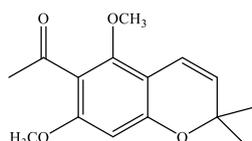


- #107 1-(5-(1'-Geranyloxy)-7-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromen-8-yl)ethanone (R = CH<sub>3</sub>)  
#108 1-(5-(1'-Geranyloxy)-7-hydroxy-2-dimethyl-2(4-methylpent-3-enyl)-2H-chromen-8-yl)ethanone (R = 4-methylpent-3-enyl)  
#109 (R,E)-1-(5-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyloxy)-3,7-dihydroxy-2,2-dimethylchroman-8-yl)ethanone

**XVII. *Melicope simplex* [112]**



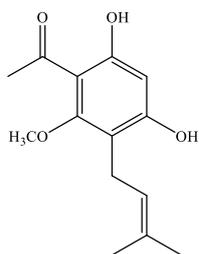
#23 Alloevodionol



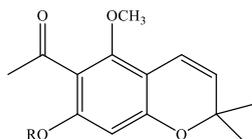
#11 Methylevodionol

**Abbildung 240:** Acetophenone und Chromene aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VI

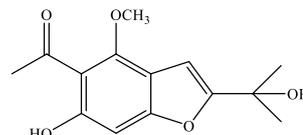
**XVIII. *Melicope stipitata* [160]**



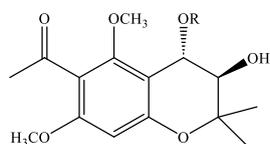
**#110** Acronylin



**#110** Evodionol (R = H)  
**#111** Evodionolmethylether (R = CH<sub>3</sub>)

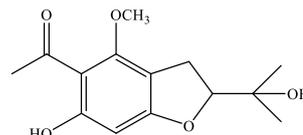


**#111** Furostipitol



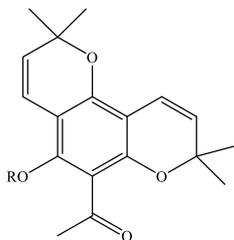
**#112** 6-Acetyl-3,4-dihydro-3β,4α-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran (R = H)

**#113** 6-Acetyl-3,4-dihydro-4α-ethoxy-3β-hydroxy-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran (R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)



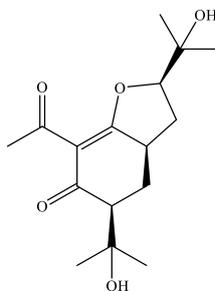
**#114** 5-Acetyl-6-hydroxy-2-(2-hydroxyisopropyl)-4-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran

**XIX. *Melicope ternata* [112]**

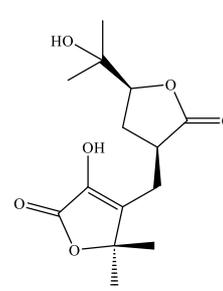


**#14** Octandrenolone (R = H)  
**#15** O-Methyloctandrenolone (R=CH<sub>3</sub>)

**XX. *Melicope viticina* [86]**



**#115** Meliviticine A



**#116** Meliviticine B

**Abbildung 241:** Acetphenone und Chromene aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VII

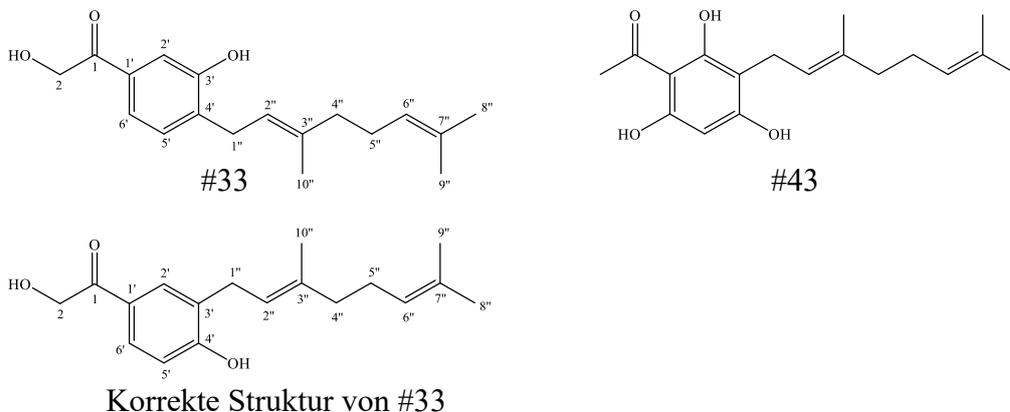
Weitere wichtige Quellen für Acetophenone sind die Asteraceae mit 31 Verbindungen gefolgt von den Euphorbiaceae und den Asclepiadaceae. [202]

Eine Literaturrecherche in den Chemical Abstracts mit Hilfe von SciFinder® [49] im Frühjahr 2024 lieferte 34 Literaturstellen, auf die die Schlüsselworte *Melicope* und Acetophenone passen. Eine Suche mit den gleichen Stichworten bei <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> der National Library of Medicine, Bethesda, USA, liefert 55 Treffer. Nicht alle diese „Hits“ sind verwertbar, weil sie, wie z.B. die beiden ältesten, in den Chemical Abstracts verzeichneten Arbeiten aus den Jahren 1949 und 1966, nicht die Isolierung von Acetophenonen als Inhaltsstoffe von *Melicope ternata* beschreiben, sondern nur die Synthese von in dieser *Melicope*-Art enthaltenen Flavonoiden, die mit Hilfe von Acetophenonen als Ausgangsstoffen synthetisiert werden können. [74,258]

Bei Durchsicht der Literatur lässt sich aber erkennen, dass Acetophenone und Chromene bisher in 20 *Melicope* Arten gefunden worden sind, die in der sich über mehrere Seiten erstreckenden oberen Abbildungen aufgeführt sind. Ahmadpourmir et al. listen inklusive *M. barbiger*, die als 21. Art in den Abbildungen oben fehlt, nur 14 *Melicope*-Arten, was möglicherweise an der Komplexität der botanischen Namen und der bereits oben angesprochenen Verschiebung von Pflanzen zwischen den Gattungen *Euodia*, *Pelea*, *Acronychia*, *Dinosperma* und *Medicosma* liegt. In einigen Fällen existieren unter verschiedenen Gattungsbezeichnungen unterschiedliche Publikationen, deren Inhaltsstoffe dann letztlich einer Species zuzuordnen sind.

Auch in unserer Abbildung gibt es zwei problematische Arten. Bei *Melicope octandra*, die in der Übersichtsarbeit von Ahmadpourmir et al. nicht erwähnt wird [202], handelt es sich nach heutiger Auffassung um eine Species der Gattung *Acronychia* (*A. octandra*) [203] und auch *Melicope stipitata*, die allerdings auch bei Ahmadpourmir als *Melicope*-Art erwähnt wird [202] gehört heute nicht mehr zur Gattung *Melicope* sondern wird als *Dinosperma stipitata* der Gattung *Dinosperma* zugeordnet [203]. Wenn man diese zwei Species abzieht, dann ist *Melicope barbiger* die 19. *Melicope*-Art, in der Acetophenone gefunden wurden. Wie man anhand der o. g. Abbildungen erkennen kann, ist Vielfalt der in *Melicope* Arten gefundenen Acetophenone in Bezug auf deren Struktur sehr groß. Bei vielen Verbindungen, z.B. #1- #8, #28- #33, #36-#41, #43-#44, #100-#105 sowie #110, handelt es sich um einfache offenkettige Acetophenone mit einem unterschiedlich substituierten, aromatischen Ring. Viele der Verbindungen sind am Sauerstoff prenyliert, d.h. mit einem 3-Methyl-3-butenylrest

substituiert. Sie sind daher vermutlich enzymatisch mit einem Isopentenylpyrophosphat, also einem Hemiterpen verbunden worden.



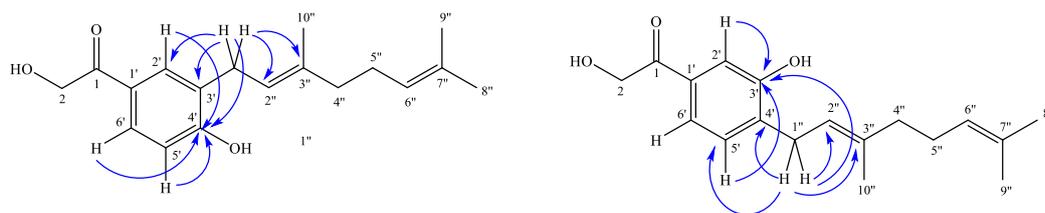
**Abbildung 242:** Geranylsubstituierte Acetophenone aus *M. patulinervia* und *M. pteleifolia*

Neben der Substitution am Sauerstoff sind etliche Verbindungen auch am Phenylring des Acetophenons mit einem Hemiterpen (C<sub>5</sub>-Körper) substituiert (#5-#8, #30-#32, #44 und #110 in Abbildung 235) oder sie besitzen einen C<sub>10</sub>-Körper (Monoterpen) nach enzymatischer Substitution mit einem Geranylpyrophosphat. Die in Abbildung 242 dargestellten Verbindungen #33 aus *M. patulinervia* und #43 aus *M. pteleifolia* sind dabei die einzigen bisher in *Melicope* Arten gefundenen, am Phenylring mit einem Geranylrest substituierten, offenkettigen Acetophenon-Derivate. Betrachtet man die Gesamtheit der einfachen, monocyclischen Acetophenone (#1-#8, #28-#33, #36-#41, #43-#44, #100-#105 sowie #110) aus der Abbildung 235 dann fällt auf, dass es sich bei allen Verbindungen bis auf # 34 um 4-Hydroxyacetophenone handelt. Auch bei den Chromenen und Benzofuranen handelt es sich ausnahmslos um bi- oder tricyclische Derivate des 4-Hydroxyacetophenons. Dieser Umstand hat uns dazu veranlasst uns die Publikation von Vu et al. als aus dem Jahre 2021 einmal genauer anzusehen. [215]

Die Autoren beschreiben dort die Isolierung und Identifizierung von 6 mg des neuen Naturstoffs Patulinone E (Verbindung 5 in deren Arbeit), der Verbindung #33 in Abbildung 235. Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe der IR- und UV-Spektren sowie mit <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR. mit zusätzlicher Auswertung von zweidimensionalen COSY, HSQC- und HMBC-Spektren. Leider wurden die Spektren in CDCl<sub>3</sub> aufgenommen, welches aufgrund seiner protischen Eigenschaften das Proton der phenolischen OH-Gruppe mit einem Deuterium austauscht, wodurch das Signal der Hydroxylgruppe nicht mehr im Spektrum auftritt. Wäre hier z.B.

deuteriertes Dimethylsulfoxid verwendet worden, dann wäre das Protonensignal der Hydroxylgruppe leicht zu erkennen gewesen, worüber das hydroxylierte, aromatische C-Atom ( $^2J$ -Korrelation) und seine Nachbarn ( $^3J$ -Korrelationen) eindeutig über das HMBC-Spektrum zuzuordnen gewesen wären. Im Fall der von Vu et al. (2021) publizierten Struktur hätte es Korrelationen mit dem aromatischen Methinkohlenstoff C-2' und dem quartären C-4', der den Geranylsubstituenten trägt, gegeben. Im anderen Fall, bei dem sich die Hydroxylgruppe an C-4' befindet, hätte man Korrelationen zum Methinkohlenstoff C-5' sowie zum quartären, die Seitenkette tragenden C-3' gefunden. Die korrespondierenden Protonen an C-5' und C-3' bilden aufgrund des 1,3,4-trisubstituierten Phenylrings mit dem H-6' ein ABX-System, weshalb das Proton an C-2' aufgrund seiner Metastellung zum H-6' zum Dublett mit einer Kopplungskonstanten  $J$  von ca. 2 Hz aufspaltet, während die Kopplungskonstante des ebenfalls zum Dublett aufgespaltenen Signals von H-5' bei ca. 8 Hz liegen sollte. Dadurch wäre die Position der Hydroxylgruppe an C-3' oder C-4' eindeutig bestimmbar gewesen. In dem zur Strukturaufklärung des Patulinons verwendeten  $\text{CDCl}_3$  kann dies nur über die Korrelationen der beiden Protonen an der ersten Methylengruppe H-1'' mit C-3', C-4' und C-5', bei der von Vu et al. vorgeschlagenen Struktur als 3-Hydroxyacetophenon, oder mit C-2', C-3' und C-4' bei einem 4-Hydroxyacetophenon, wie es sonst üblicherweise gefunden wurde, erfolgen. Umgekehrt muss das H-5', welches Vu et al. bei  $\delta = 6.87$  ppm (d,  $J=8.5$  Hz) gefunden haben, einen Cross-peak zum Kohlenstoff C-1'' zeigen. [215] Im anderen Fall träfe das auf das H-2' bei  $\delta = 7.73$  ppm (d,  $J=2.0$  Hz) zu. Vu et al. geben die Signale für das C-1'' bei  $\delta = 29.8$  ppm und H-1'' bei  $\delta = 3.42$  ppm (d,  $J=7.0$  Hz) an. Um zu zeigen, dass die für das Patulinone D angegebene Struktur richtig ist, geben Vu et al. ein Schaubild mit den im HMBC-Spektrum gefundenen long-range Korrelationen an. [215] Für die beiden zum Dublett aufspaltenden Protonen sind nur zwei Korrelationen zu C-3' und C-5' eingezeichnet. Schaut man in den zur Publikation vorhandenen Appendix A mit dem „Supplementary data“ so sieht man insgesamt 5 Cross-Peaks zwischen dem H-1'' und benachbarten Kohlenstoffen. Bei der von Vu et al. vorgeschlagenen Struktur wären das die  $^3J$ -Kopplungen zu den Kohlenstoffen C-3', C-5' und C-3'' sowie  $^2J$ -Kopplungen zum C-4', an dem der Geranylrest gebunden ist und zum C-2'' in der Seitenkette. Dies trifft allerdings nur für die Crosspeaks bei  $\delta = 120.7$  ppm (H-1''/C-2''), 140.0 ppm (H-1''/C-3''), 127.6 ppm (H-1''/C-4') und  $\delta = 160.2$  ppm (H-1''/C-3') zu. Überraschenderweise findet sich kein Cross-Peak zum Kohlenstoffsignal bei  $\delta = 116.2$  ppm (C-5'). Stattdessen findet man den fünften Cross-Peak bei  $\delta = 130.4$  aufgrund der  $^3J$ -Kopplung mit dem aromatischen Kohlenstoff C-2' der über die Korrelation mit dem Protonensignal bei  $\delta = 7.73$  ppm (d,  $J=2.0$  Hz) eindeutig zugeordnet ist. [215] Das bedeutet, dass die

Geranylseitenkette am C-3' und nicht am C-4' gebunden ist. Man hätte den Fehler auch noch an einer anderen Stelle bemerken können. Vu et al. haben die beiden am weitesten im tiefen Feld liegenden Kohlenstoffsignale bei  $\delta = 196.9$  und  $160.2$  ppm dem Carbonylkohlenstoff C-1 und dem hydroxylierten quartären C-Atom des Phenylrings zugeordnet. Das ist korrekt, allerdings kann die Position der Hydroxylgruppe und der Geranylseitenkette an C-3' oder C-4' daraus nicht abgeleitet werden. Das Signal des hydroxylierten, quartären, aromatischen Kohlenstoffs C-3' oder C-4' besitzt insgesamt vier Kreuzsignale zu den Signalen der Methylenprotonen H-1'' bei  $\delta = 3.42$  ppm der am Nachbarkohlenstoff gebundenen Geranylseitenkette, sowie drei weitere gut erkennbare Crosspeaks zu allen drei aromatischen Protonen  $\delta = 7.73$  (H-2'),  $7.71$  (H-6') und  $6.87$  (H-5'). Dies ist nur möglich, wenn die Hydroxylierung am C-4' des Aromaten, in para-Stellung zur Acetylgruppe erfolgt ist. Bei einer Hydroxylierung an C-3', meta zur Acetylgruppe würde das Kreuzsignal zwischen H-6' und C-4' fehlen (Abbildung 243).

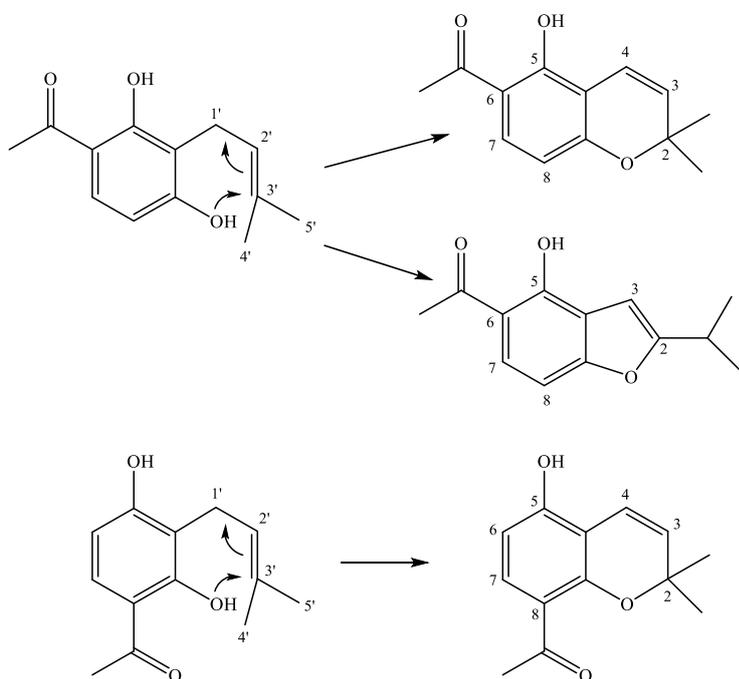


**Abbildung 243:** Vergleich der strukturbeweisenden Kreuzsignale der Verbindung #33 als 4-Hydroxyacetophenon (links, richtige Struktur) und 3-Hydroxyacetophenon (rechts, falsch angegebene Struktur [215])

Dieser Umstand und das Fehlen des Kreuzsignals zwischen H-1'' und C-5' lassen eindeutig erkennen, dass es sich bei dem Acetophenon #33 aus *Melicope patulinervia* um das 3-Geranyl-4-hydroxyacetophenon handelt. Die Verbindung besitzt daher eine Hydroxylgruppe in para-Stellung zur Acetylgruppe, wie alle anderen aus *Melicope* isolierten Acetophenone. Die von Vu et al. vorgeschlagene Struktur ist zu revidieren. Die Zuordnung der Signale der Kohlenstoffe C-3' und C-4' sind zu vertauschen. Auch wenn die Seitenkette und die OH-Gruppe vertauscht werden, handelt es sich immer noch um einen neuen Naturstoff.

Neben den offenkettigen Acetophenonen enthalten viele *Melicope*-Arten auch 2,2-Dimethylbenzopyrane, auch Chromene genannt (Abbildung 244), die biosynthetisch vermutlich aus

prenylierten 4-Hydroxy-bzw. 2,4-Dihydroxy- Acetophenonen durch Ringschluss entstanden sind.



**Abbildung 244:** Strukturelle Beziehungen zwischen Acetophenonen, Benzopyranen und Benzofuranen

Aus 2,4-Dihydroxychomenen können so neben den 6-Acetyl- auch 8-Acetylbenzopyrane entstehen (Abbildung 245). Findet die Cyclisierung nicht zwischen dem phenolischen Hydroxylsauerstoff und dem C-3' sondern dem C-2' der Prenylseitenkette statt, bilden sich Benzofurane, die dann einen Isopropylsubstituenten am C-2 des Furanrings besitzen (Abbildung 245). Sowohl Benzofurane als auch Chromene können weitere Prenylsubstituenten besitzen, die dann einen weiteren Ringschluss zu einem Trizyklus ermöglichen. Ein Beispiel dafür ist das Octandrenolon aus *Melicope octandra* (Verbindung #14 in Abbildung 236). Darüber hinaus gibt es viele polyzyklische und oder rekombinierte Verbindungen mit kompliziertem Grundgerüst, die meistens nur einmal gefunden wurden (Abbildung 245). Bicyclische Chromene finden sich in *M. denhamii*, *M. elleryana*, *M. latifolia*, *M. lunu-ankenda*, *M. pteleifolia*, *M. semecarpifolia*, *M. simplex* und *M. stipitata*, während trizyklische Chromene in *M. erromagensis*, *M. latifolia*, *M. octandra* und *M. ternata* gefunden wurden. Benzofurane kommen nur in *M. patulinervia*, *M. pteleifolia*, *M. stipitata* und *M. viticiana* vor. Bis auf die sechs Verbindungen #10-#12, #14, #15 und #23 wurden alle Derivate nur einmal gefunden.

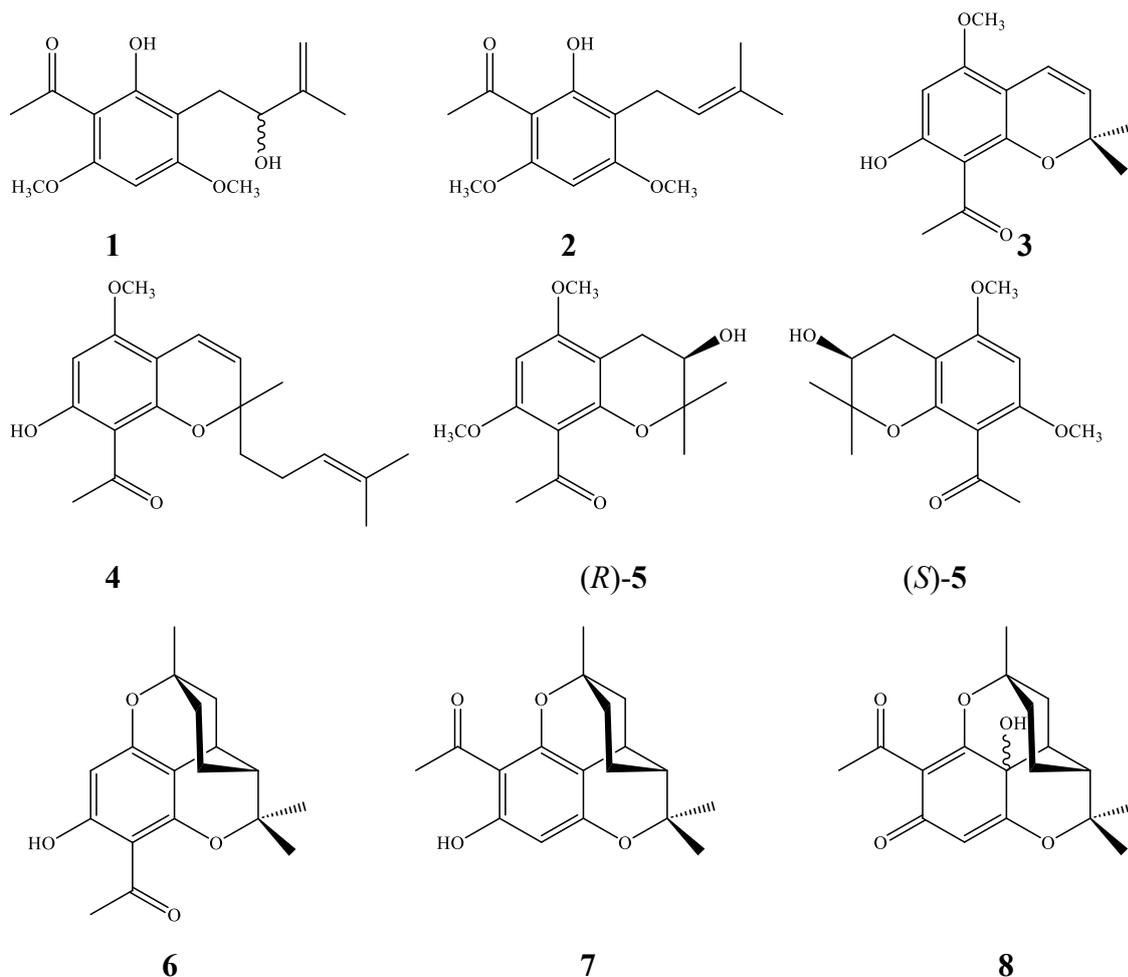


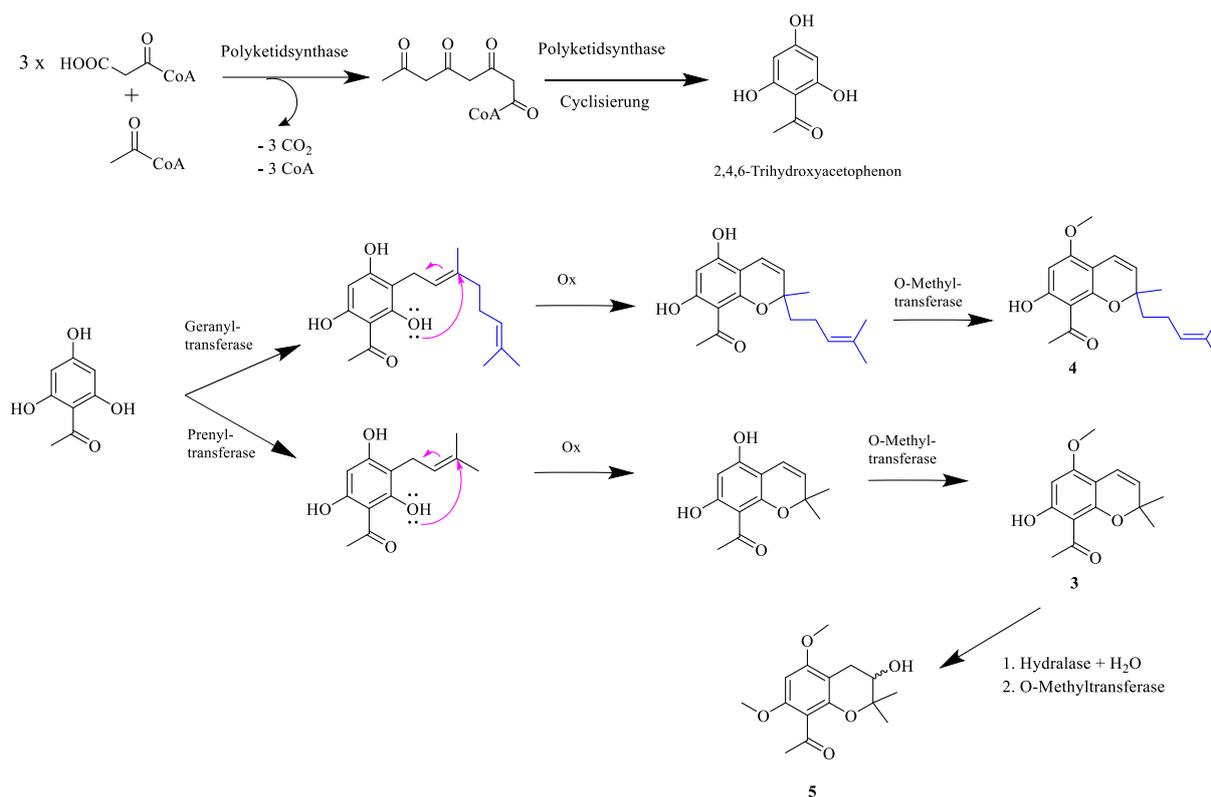
Abbildung 245: Acetophenone aus *Melicope barbigeria*

Bei den in *M. barbigeria* gefundenen 8 Acetophenonen (Abbildung 245) handelt es sich um zwei einfache Acetophenone (**1** und **2**), drei bicyclische (**3** - **5**) und drei tetracyclische Chromene (**6** - **8**). Bei vier der sechs Chromene handelt es sich um 8-Acetylchromene, zwei Verbindungen stellen 6-Acetylderivate dar.

Die beiden einfachen Acetophenone **1** und **2** konnten hier erstmals als natürlich vorkommende Substanzen isoliert und identifiziert werden. Bei **1** handelt es sich um das 2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxy-3'(2-hydroxy-3-methyl-3-buten-1-yl)acetophenon für das wir den Trivialnamen Melibarbinon A vorgeschlagen haben. Diese Verbindung war bisher noch nicht beschrieben worden. Melibarbinon B (**2**), über dessen natürliches Vorkommen hier ebenfalls erstmals berichtet wurde, war jedoch eine bereits bekannte Substanz, die als Zwischenprodukt bei der Synthese von 4'-O-Methylxanthohumol anfiel und dort beschrieben wurde. [126] Bei den Verbindungen **3** – **5** handelt es sich um einfache Benzopyrane, die alle drei 8-Acetyl-2,2-

dimethyl-2*H*-bezopyrane sind. Während das Alloevodionol (**3**), als eines der wenigen öfters in *Melicope* Species gefundenen Acetophenonderivate, bereits aus *M. latifolia*, *M. pteleifolia* und *M. simplex* isoliert werden konnte, handelt es sich bei **4** und **5** um neue Naturstoffe. Die Struktur von **4** wurde als 1-[7-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-2*H*-chromen-8-yl]-ethan-1-on eindeutig bestimmt. Diese Verbindung war wie **2** bereits als Intermediat einer chemischen Synthese beschrieben worden.[92] In diesem Fall ging es um das Boesenbergin A, das sich von **4** dadurch unterscheidet, dass es anstelle der Acetylgruppe einen Cinnamoylresst an C-8 trägt. Boesenbergin A ist eine natürliche Verbindung aus *Boesenbergia rotundifolia* (Zingiberaceae). [92] Da auch **4** erstmals als pflanzlicher Sekundärstoff isoliert und identifiziert wurde, wurde der Trivialname „Melibarbichromen A“ vorgeschlagen.

Bei allen aus *M. barbiger*a isolierten Acetophenonen handelt es sich um Derivate des 1,3,5-Trihydroxybenzols, des Phloroglucins. Solche Verbindungen werden auf dem Polyacetatweg (Polyketidweg) gebildet, bei dem ein über die Bindung an Coenzym-A (CoA) aktiviertes Acetatmolekül an die aktivierte Methylengruppe eines Malonyl-CoA gebunden wird. Im ersten Schritt entsteht dann nach Decarboxylierung Acetoacetyl-CoA. Diese Verbindung reagiert dann erneut mit einem Malonyl-CoA, wodurch eine an CoA gebundene Oligoketosäure und später eventuell eine Polyketosäure entsteht, weshalb der Stoffwechselweg Polyacetat oder Polyketidweg genannt wurde. [68] In Abbildung 246 ist der mögliche Biosyntheseweg der Verbindungen **3** und **4** dargestellt. Aus einer Triketosäure, die sich aus drei Malonyl- und einem Acetyl-CoA bildet, entsteht zuerst ein Acyl-Phloroglucin, das dann mit Hilfe einer Geranyl- bzw. Prenyltransferase substituiert wird. Durch Reaktion einer phenolischen OH-Gruppe mit der Doppelbindung in der Prenyl- bzw. Geranylseitenkette könnten dann die Chromene **3** und **4** in einer Cyclisierungsreaktion gebildet werden. (Abbildung 246)



**Abbildung 246:** Möglicher Biosyntheseweg der Chromene **3**, **4** und **5** über Acetophenone angepasst nach [186]

Neben Alloevodionol (**3**) wurden in *Melicope* auch weitere ähnliche Chromene gefunden. Ein solches Derivat ist der Alloevodiolmethylether (Verbindung 84 in Abbildung 239), der bisher nur in *Melicope pteleifolia* gefunden wurde (Abbildung 239). Durch Anlagerung von Wasser an die 2,3-Doppelbindung eines solchen 8-Acetyl-5,7-Dimethoxy-2,2-Dimethyl-2*H*-chromens kann formal das 8-Acetyl-3,4-dihydro-3-hydroxy-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromen entstehen. Durch die Hydroxylierung entsteht eine chirale Verbindung, die wir als racemisches Gemisch der *R*- und *S*-Enantiomeren isolieren konnten.

Die Annahme, dass die Biosynthese solcher Chromene aus den entsprechenden Acetophenonen erfolgen könnte wurde zuvor schon von Schmidt et al. gemacht, die über die offensichtliche Bildung solcher Derivate am Beispiel der Empetrifranzine A und B aus *Hypericum empetrifolium* (Hypericaceae) berichteten. [97] Auch das tetracyclische Ringsystem der Melifolione und Empetrifranzine könnte sich nach Schmidt durch die Reaktion eines acetylierten Phloroglucinderivates (Acetophenone), wie z.B. dem 1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)ethan-1-one (Abbildung 247) nach Anknüpfung mit der Geranylseitenkette bilden. [68]

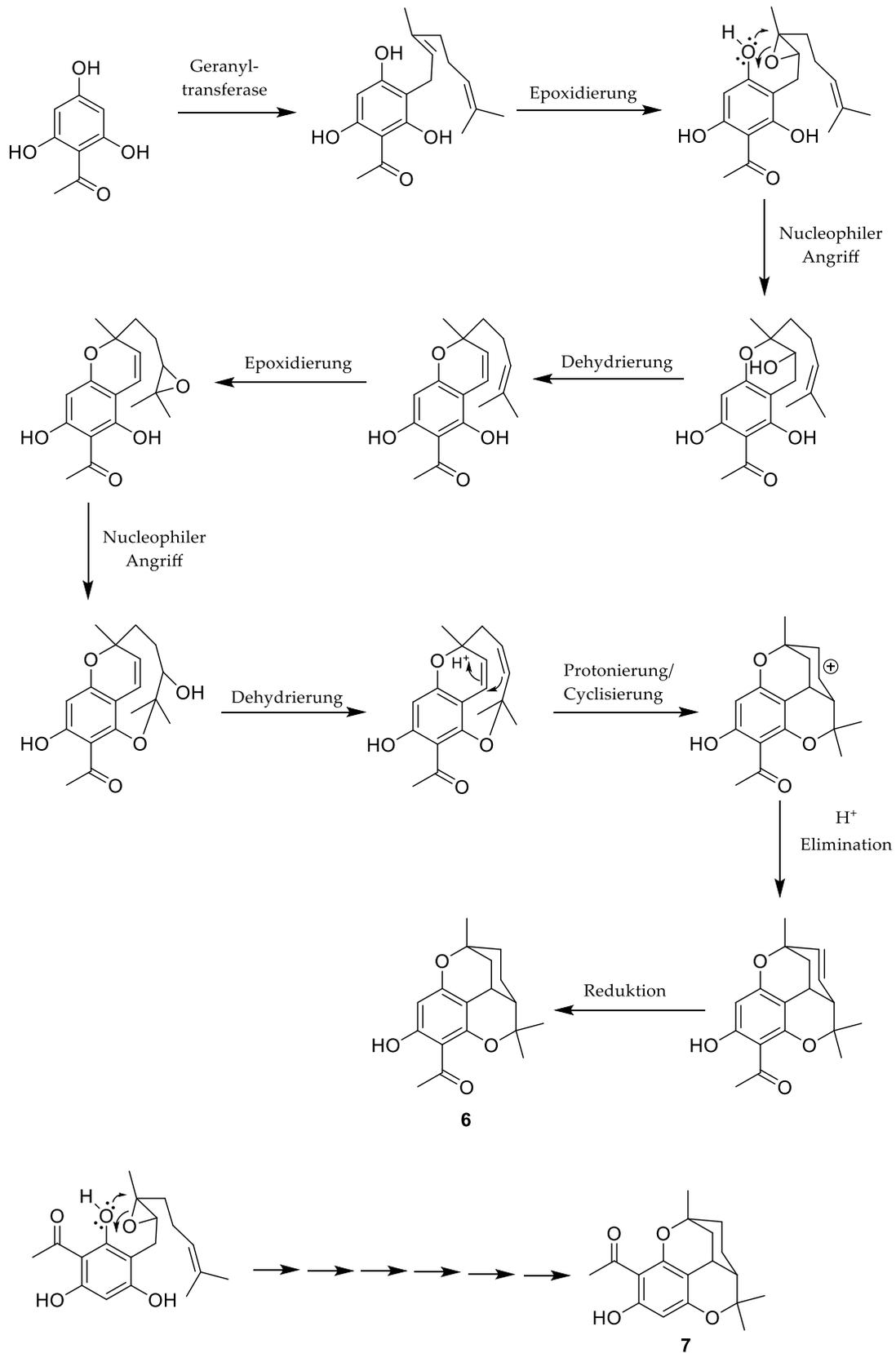


Abbildung 247: Mögliche Biosynthese von 6 und 7 nach Schmidt et al. 2015 [97]

Es käme dann aber nicht zur einfachen Reaktion mit einer der phenolischen OH-Gruppen mit der 2',3'-Doppelbindung der Seitenkette, was in unserem Fall zu **4** führt, sondern in einem mehrstufigen Biosyntheschema über ein 2',3'-Epoxid zunächst zur Bildung eines Pyranrings mit einer der beiden im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen. Die weiteren von Schmitt et al. vorgeschlagenen Reaktionsschritte sind in Abbildung 247 dargestellt und führen zu den Verbindungen **6** und **7**.

Die beiden von Schmidt et al. identifizierten Empetrifranzinane A und B besitzen große Ähnlichkeit zu den hier gefundenen Verbindungen **6** und **7**. Statt der für die Verbindungen aus *Melicope* Arten typischen Acetylgruppe tragen die Verbindungen aus *Hypericum empetrifolium* eine Isobutylgruppe an der aromatischen Phloroglucinteilstruktur. Die Verbindungen **6** and **7**, wurden zuvor bereits von Goh et al. aus *Melicope latifolia* isoliert, die damals noch *Euodia latifolia* hieß. Goh nannte die beiden Verbindungen Melifolione A und B und isolierte sie ebenfalls nur als Gemisch. [94] Auch Schmidt konnte die beiden Empetrifranzinane nicht einzeln isolieren. [97]

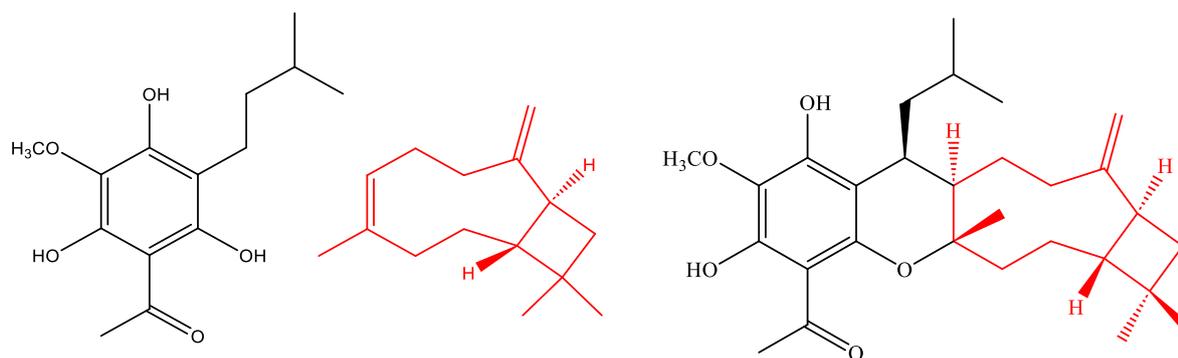
Verbindung **8** stellt ein Oxidationsprodukt von **7** dar. Am Anfang wurde vermutet, dass es sich dabei um ein Artefakt handelt, das entweder durch die thermische Belastung bei der Soxhlet-Extraktion oder den weiteren Aufarbeitungsschritten entstanden ist. Da ein entsprechendes Produkt von **6** jedoch nicht gefunden wurde, sind wir der Frage weiter nachgegangen. Dabei zeigte sich, dass Verbindung **7** unter normalen Bedingungen mit allen gängigen Oxidationsmitteln nicht in **8** überführt werden kann. Eine Artefaktbildung ist daher so gut wie ausgeschlossen.

Wir konnten zeigen, dass die aus *M. barbiger*a isolierten Acetophenone und Chromene **1** – **8** zytotoxisch gegenüber einer Zelllinie des Ovarialkarzinoms (A2780) waren. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, weil wir bereits über Erfahrungen mit dieser Krebszelllinie bei der Testung anderer Naturstoffe gesammelt haben und sich die Ergebnisse so besser einordnen lassen. [183–185] Die Verbindungen **2** und **5** zeigten dabei zytotoxische Effekte, die dosisabhängig waren. Verbindung **2** zeigte dabei die größere Aktivität und war bereits in einer 30.0 µM wirksam. Die übrigen Acetophenone zeigten keine Konzentrationsabhängigkeit, so dass kein IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden konnte. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Zytotoxizität der beiden aktiven Substanzen die Caspase 3/7 beeinflussen, die bei der Auslösung und Durchführung der

Apoptose von entscheidender Bedeutung ist. [189] Sowohl für **2** als auch für **5** konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen die Caspase 3/7 aktivieren und so die Tumorzelle in die Apoptose führen.

Unsere Befunde unterstützen damit die zuvor mit anderen Acetophenonen erhaltenen Daten. [188,190,191,259] Zusätzlich können wir durch den Vergleich von **2** mit den anderen hier isolierten Acetophenonen und Chromenen sagen, dass Verbindungen, die einen Prenylrest tragen, verhältnismäßig stärker zytotoxisch wirken als solche, denen dieses Strukturelement fehlt. Dieser Befund zeigte sich auch in der Gattung *Acronychia* [84,187,192,260,261] und in unsere Arbeitsgruppe konnte dies zuvor auch schon an prenylierten Flavonoiden und Pterocarpanen der Gattung *Erythrina* (Fabaceae) gezeigt werden. [78,193–195]

Im Jahre 2023 erschien eine Übersichtsarbeit von Ahmed et al. über die volksmedizinische Verwendung, die Phytochemie und die Wirkungen von Inhaltsstoffen aus *Melicope* Arten gegenüber Krebs [2], in der auch das aus dieser Arbeit resultierende Paper zu den Acetophenonen und deren Zytotoxizität zitiert wird. [186] In der Übersichtsarbeit werden die vier am häufigsten gefundenen Stoffgruppen, die Acetophenone, Alkaloide, Cumarine und Flavonoide neben einigen weiteren Stoffen aus insgesamt 11 verschiedenen *Melicope* Arten und ihre Zytotoxizität zusammengefasst. [2] Als zytotoxische Acetophenone geben Ahmed et al. nur die hier aus *M. barbiger*a isolierten Verbindungen, insbesondere das in unseren Tests aktivste Melibarbinon B (**2**) an. Leider verwechseln die Autoren in einer Übersichtstabelle das Melibarbinon mit dem Melibarbichromen B (**5**), das eine wesentlich geringere Aktivität besaß. [2] Ein weiteres Acetophenon, das in der Übersichtsarbeit aber als Sesquiterpen bezeichnet wird ist das Amelicaridin aus *M. latifolia*. Die Autoren bezeichnen diese Substanz als ein Meroterpenoid, das aus einem Polyketid (Acetophenon) und Polyprenyl (Terpenoid) gebildet wurde. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit zum  $\beta$ -Caryophyllen, einem in sehr vielen Pflanzen als Bestandteil des ätherischen Öls vorkommenden Sesquiterpen, gehen die Autoren davon aus, dass die Verbindung aus einem prenylierten Acetophenon und diesem Sesquiterpen entstanden ist. [243]



**Abbildung 248:** Mögliche biogenetische Herkunft des Amelicarins aus *M. latifolia*

Bei den weiteren zytotoxischen Stoffen aus *Melicope* Arten handelt es sich um Alkaloide aus *M. xanthyloides*, *M. madagascariensis* und *M. triphylla*, Quinolinone aus *M. denhamii*, Flavonoide aus *M. madagascariensis*, *M. glabra* und *M. triphylla*, Cumarine aus *M. lunu-ankenda* und *M. quercifolia*, ein Parachinon aus *M. semecarpifolia* und die 4-Geranyloxyzimtsäure aus *M. lunu-ankenda*. [2] Von vier dieser Species (*M. denhamii*, *M. lunu-ankenda*, *M. quercifolia* und *M. semecarpifolia*) ist bekannt, dass sie auch Acetophenone enthalten, in allen Fällen wurden aber nur die beschriebenen Substanzen isoliert und deren Zytotoxizität in unterschiedlichen Bioassays bestimmt. In keinem Fall wurde eine über den Zytotoxizitätstest gesteuerte Isolierung („bioguided fractionation“) durchgeführt, mit deren Hilfe man auch andere aktive Stoffe hätte finden können. Es wäre daher wünschenswert, wenn die Acetophenone aus diesen Pflanzen auch auf ihre Zytotoxizität überprüft werden würden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass wenig untersuchte und insbesondere endemische Pflanzen, wie *M. barbiger* vielversprechende Quellen für weitere, umfangreichere Untersuchungen sein können. Außer in den oben dargestellten *Melicope*-Arten wurden Acetophenone und Chromene auch in den nahe verwandten Gattungen *Acronychia* und *Medicosma* gefunden. [260,262–266] Die Variabilität der Verbindungen ist sehr groß und es gibt eine ganze Reihe von Substanzen, die bisher nur in einer Art gefunden wurden. Möglicherweise eignen sich diese Substanzen daher als Biomarker in der Chemotaxonomie.

Acetophenone und Chromene sind bisher inklusive der hier untersuchten *M. barbiger* in 20 *Melicope* Species gefunden worden, wenn man die beiden, oben erwähnten, ausgegliederten Species abzieht, dann verbleiben 18 Arten, die Acetophenone enthalten (s. Abbildung 235 bis Abbildung 241). Gemessen an der Gesamtzahl der zur Gattung gehörenden Species sind das weniger als 10 Prozent. Die Ergebnisse unserer Arbeiten zum Thema Acetophenone und deren

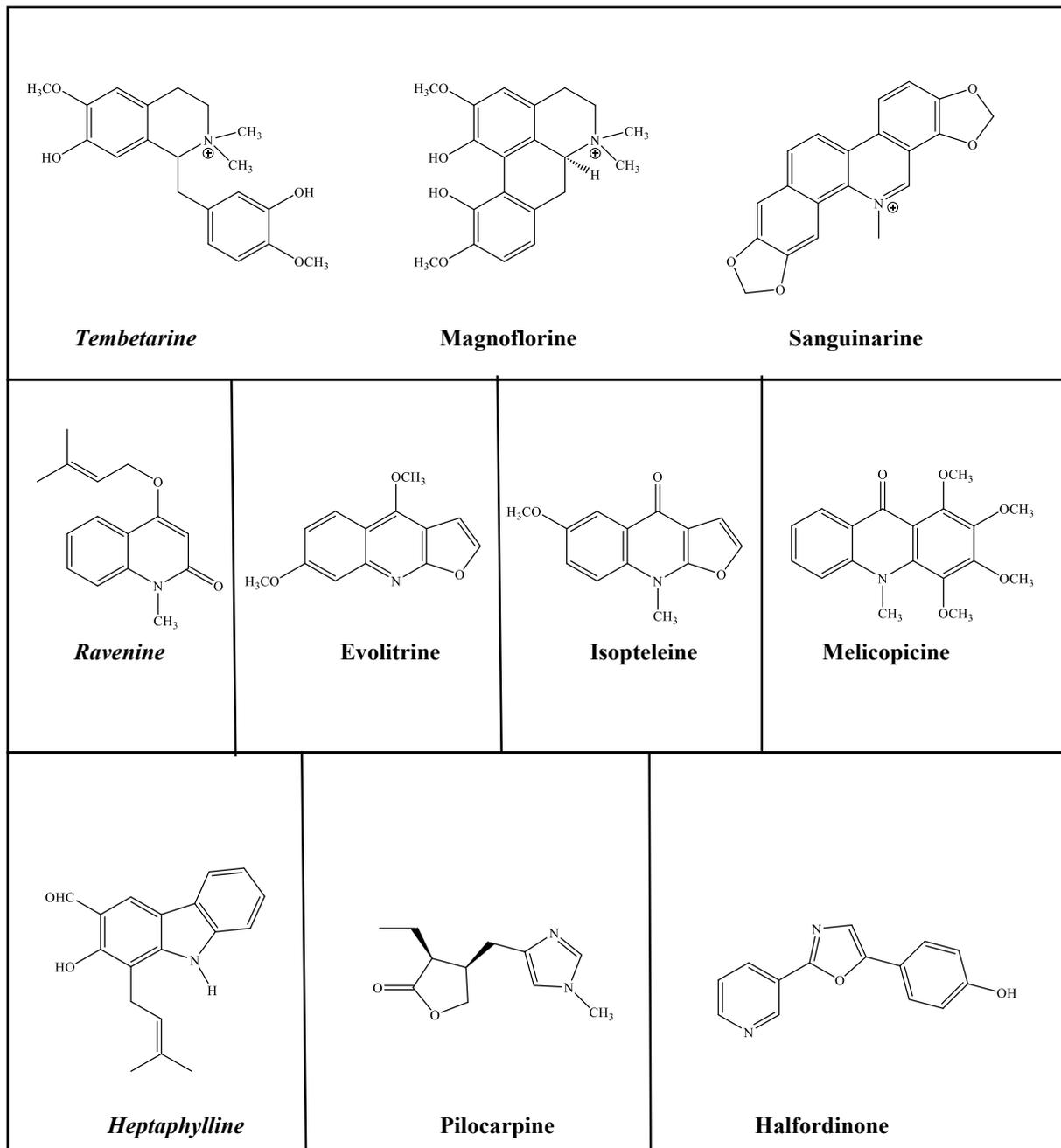
Zytotoxizität wurden im Open Access Journal Molecules wurde am 28. Januar 2021 veröffentlicht. [186] Bei der Literaturrecherche Mitte 2020 haben wir nur 14 *Melicope* Arten gefunden, in den Acetophenone isoliert und identifiziert wurden, [186] inzwischen sind ein paar neue Arbeiten dazugekommen und einige *Euodia* Arten gehören jetzt zur Gattung *Melicope* (Abbildung 241). Das zeigt, dass das Interesse an der wenig untersuchten Gattung *Melicope* und speziell auch an den Acetophenonen in den letzten Jahren größer geworden ist. Das wird in einer kürzlich erschienenen Übersichtsarbeit von Ahmadpourmir et al. zur Chemie und Pharmakologie von natürlich vorkommenden Acetophenonen deutlich, die zeigt, dass die Anzahl der Publikationen zu Acetophenonen in den letzten 10 Jahren deutlich zugenommen hat. [202]

Insgesamt wurden nur 8 Acetophenone und Chromene mehr als einmal in *Melicope* Arten gefunden. Methylevodionol (#11) wurde bisher in vier *Melicope* species (*M. denhamii*, *M. latifolia*, *M. pteleifolia* und *M. simplex*) gefunden. Das Vorkommen in *M. stipitata* wird nicht mitgerechnet, da diese Pflanze inzwischen aus der Gattung *Melicope* entfernt wurde. Evodione (#12), Octandrenolonmethylether (#15) und Alloevodionol (#23) wurden in drei Pflanzen während Evodionol (#10), Alloevodione (#13), Octandrenolone (#14), Leptonol (#26) und 2,6-Dihydroxy-4-geranyloxy-3-prenylacetophenone (#32) nur aus zwei verschiedenen *Melicope* Arten isoliert werden konnten. Bezogen auf die *Melicope* Species, lässt sich sagen, dass in *M. denhamii* und *M. pteleifolia* die Verbindungen #10 und #11 enthalten sind, dass *M. pteleifolia* und *M. elleryana* die Chromene #12 und #13 enthalten und dass *M. pteleifolia* und *M. lunu-ankenda* die Substanzen #12 und #26 gemeinsam sind. Diese vier Species gehören innerhalb der Gattung *Melicope* alle zur Sektion Lepta und sind daher eng miteinander verwandt. Das Evodione (#12) ist in allen drei dieser vier Arten enthalten. Weitere Substanzen, die in mehr als einer Art der Sektion Lepta gefunden wurden sind das Alloevodionol (#23) in *M. latifolia*, *M. pteleifolia* und *M. simplex* und 2,6-Dihydroxy-4-geranyloxy-3-prenylacetophenone (#32) in *M. lunu-ankenda* und *M. obtusifolia* var. *Arborea*. Das Octandrenolone (#14) und sein Methylether (#15) wurden in *M. ternata* aus der Sektion *Melicope* und *M. erromagensis* aus der Sektion *Vitiflorae* gefunden (Abbildung 235). Die anderen drei untersuchten Arten aus der Sektion *Melicope* enthalten keine Substanzen, die auch in anderen *Melicope* Arten gefunden wurden. Charakteristische prenylierte Acetophenonderivate sind auch in der Gattung *Acronychia* gefunden worden. [261] Möglicherweise könnten prenylierte Acetophenone und insbesondere solche Verbindungen, die mit einem Geranylrest substituiert sind, als chemotaxonomische Marker auf Gattungs- und/oder

Speiesebene verwendet werden. Die in der vorgelegten Arbeit untersuchte *Melicope barbiger* ist die bisher einzige phytochemisch untersuchte Species aus der Sektion *Pelea*. Vergleicht man die Acetophenone und Chromene, die hier aus *M. barbiger* isoliert werden konnten mit den anderen *Melicope* species, dann fällt auf, dass Verbindung **3** (Alloevodionol, #23 Abbildung 235) die einzige mehrfach in *Melicope* gefundene Substanz ist. Alloevodionol wurde auch in *M. latifolia*, *M. pteleifolia* und *M. simplex* gefunden, drei Species aus der Sektion *Lepta*, die eigentlich nicht nah mit *M. barbiger* verwandt sind. Dennoch finden sich in *M. latifolia* auch die beiden tetracyclischen Chromenderivate **6** und **7**, die bisher in keiner anderen *Melicope*-Art gefunden wurden. Was die anderen, insbesondere die offenkettigen prenylierten Verbindungen angeht, besteht größere Ähnlichkeit zu *M. pteleifolia*. Aus der Sektion *Lepta* wurden Acetophenone und Chromene in 10 Species gefunden, während *M. barbiger* die bisher einzige untersuchte Art aus der Sektion *Pelea* ist, wäre es wünschenswert, dass weitere Arten auf das Vorkommen von Acetophenonen untersucht werden.

Alloevodionol (**3**) kommt, wenn man seine Derivate mit einbezieht, in mindestens fünf *Melicope* Arten vor, die zu drei verschiedenen Sektionen gehören und auch in Pflanzen der Gattung *Medicosma* wurden solche Verbindungen gefunden. [220] Das zeigt ebenfalls, dass mindestens einige Acetophenone und Chromene in *Melicope* und verwandten Gattungen möglicherweise so häufig vorkommen, dass sie für chemotaxonomische Überlegungen nicht in Frage kommen. Betrachtet man aber die Vielzahl an unterschiedlichen Strukturen, dann scheint die Nutzung dieser Substanzgruppe für chemotaxonomische Überlegungen, nach Gewinnung weiterer Informationen zum Vorkommen, gut möglich zu sein.

## 5.2 Alkaloide



**Abbildung 249:** Alkaloide aus der Familie der Rutaceae [267]

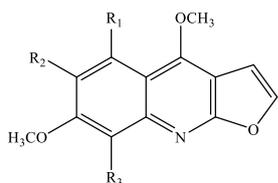
Die 1-Benzyltetrahydroisochinolinalkaloide sind jedoch von Besonderer Bedeutung, dass sie gehäuft in den Taxa *Zanthoxylum*, *Phellodendron*, *Toddalia*, *Fagaropsis* und *Tetradium* vorkommen und damit eine mögliche evolutionäre Verbindung zu einfacheren Pflanzenfamilien, wie der Berberidaceae und den Papaveraceae aufzeigen. [214] Gerade das Vorkommen solcher Alkaloide, wie z.B. Berberin, kann dabei helfen Species der nah verwandten Gattungen *Euodia*, *Melicope* und *Tetradium* genau zu platzieren. Während in der Gattung *Melicope* bisher keine Isochinolin- und Indolopyridochinazolinalkaloide sowie keine N-Butylamide gefunden worden sind, kommen diese in der Gattung *Tetradium* vor. Auf der

anderen Seite wurden in den untersuchten *Tetradium*arten bisher keine Acridone gefunden, die in vielen *Melicope* Arten vorkommen. [214]

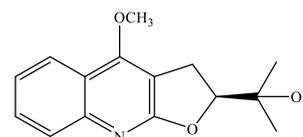
Das Auftreten bzw. die Abwesenheit der einen oder andere Gruppe von Alkaloiden kann also dabei helfen, die Frage zu beantworten, ob eine *Euodia*-Species in die Gattung *Melicope* oder die Gattung *Tetradium* eingeordnet werden sollte. [214] Voraussetzung dafür ist natürlich, dass die in Frage kommende Species umfassend phytochemische untersucht wird. Neben den Alkaloiden sind dabei auch die Acetophenone und Chromene sowie die Flavonoide von Bedeutung. [214] Die nachfolgenden Abbildungen (Teil I – VIII) zeigt die *Melicope* Arten, in den bisher Alkaloide gefunden wurden. Die Alkaloide der hier untersuchte *Melicope barbiger*a sind, wie bei den Stoffgruppen zuvor gesondert aufgeführt (Abbildung 258). Insgesamt fanden sich 25 Species, deren Alkaloide entweder unter der Gattungsbezeichnung, *Melicope*, *Euodia* (*Evodia*) oder *Pelea* publiziert wurden. Von den *Euodia* Arten wurden nur diejenigen aufgeführt, die nach Hartley (2001) zur Gattung *Melicope* gehören. [203] Unter diesen 25 Arten befinden sich auch drei *Melicope* Species (*M. fareana*, *M. leptococca* und *M. leratii*), die von Hartley als zur Gattung *Medicosma* gehörig bezeichnet wurden. [203] Die hier als *M. perspicuinervia* bezeichnete Species heißt heute *Melicope reticulata*. [203]

Es sind daher 22 Arten auf ihre Alkaloidführung untersucht worden (siehe nachfolgende Abbildungen: Teil I-VIII). Insgesamt wurden 70 verschiedene Alkaloide isoliert. Gefunden wurden nur Furochinoline, Furochinolone, Acridone und 2-Chinolone, deren gemeinsame biogenetische Vorstufe die Anthranilsäure (2-Aminobenzoesäure) ist. [267] Bezogen auf die vier Sektionen der Gattung *Melicope* [203] ist festzuhalten, dass in *M. indica* und *M. xanthoxyloides* bisher nur in zwei Species aus der Sektion *Melicope* und in *M. vitiflora* nur in einer Species aus der Sektion *Vitiflorae* Alkaloide gefunden wurden.

### *Melicope accendens* [94]

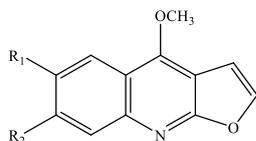


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#155 Evolitrine	H	H	H
#156 Kokusaginine	H	OCH <sub>3</sub>	H
#157 Skimmianine	H	H	OCH <sub>3</sub>



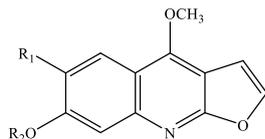
#158 S-(+)-Platydesmine

**Melicope belahe [206]**

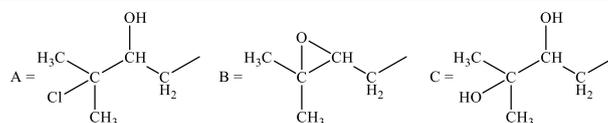


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#159 Dictamnine	H	H
#155 Evolitrine	H	OCH <sub>3</sub>
#156 Kokusaginine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

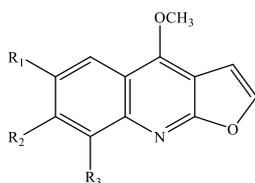
**Melicope bonwickii [62]**



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#160 7-(2'-Hydroxy-3'-chloroprenyloxy)-4-methoxyfuroquinoline	H	A
#161 Epoxymelineurine (Anhydroevellerine)	H	B
#162 Evellerine	H	C
#156 Kokusaginine	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



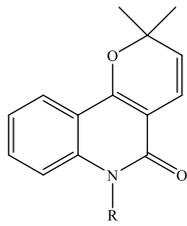
**Melicope confusa [268–270]**



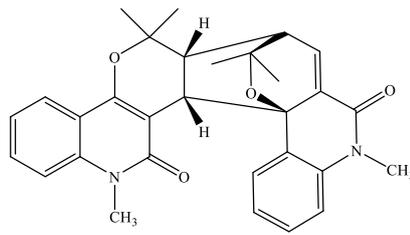
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#163 Confusameline	H	OH	H
#155 Evolitrine	H	OCH <sub>3</sub>	H
#157 Skimmianine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#164 Heliparvifoline	OCH <sub>3</sub>	OH	H
#156 Kokusaginine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

**Abbildung 250:** Alkaloide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil I

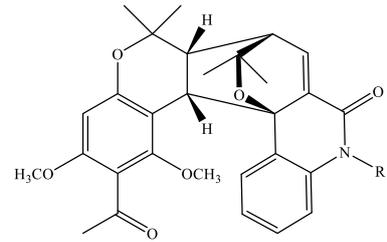
*Melicope denhamii* [56,58,61,63,72,271]



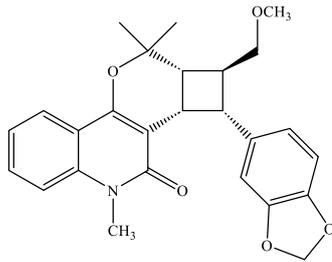
#165 Flindersine (R=H)  
#166 Methylflindersine (R=CH<sub>3</sub>)



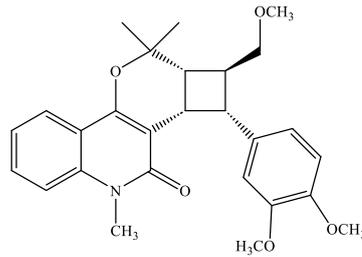
#167 Melicodenine A



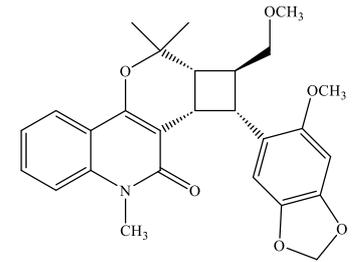
#9 Melicodenine B



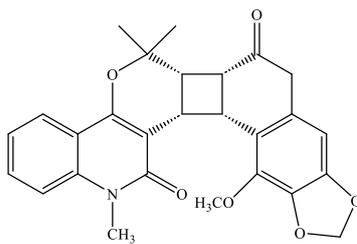
#168 Melicodenine C



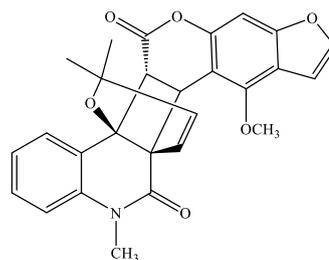
#169 Melicodenine D



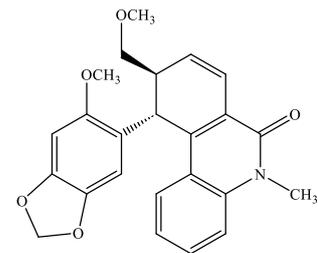
#170 Melicodenine E



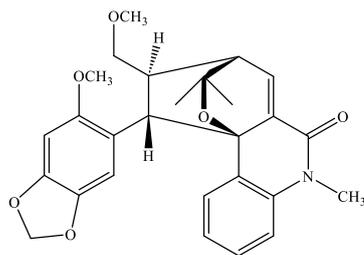
#171 Melicodenine F



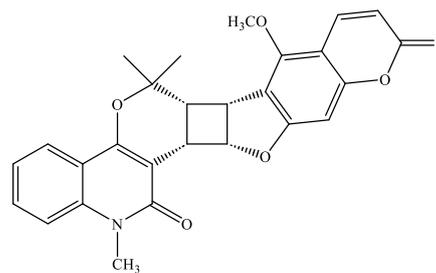
#172 Melicodenine G



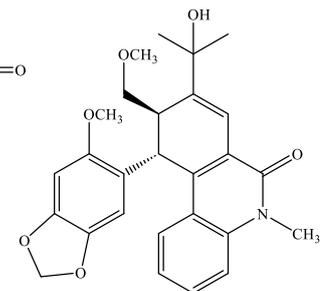
#173 Melicodenine H



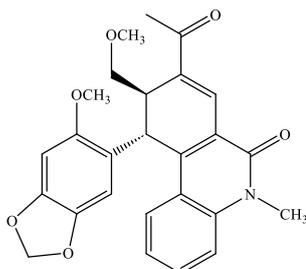
#174 Melicodenine I



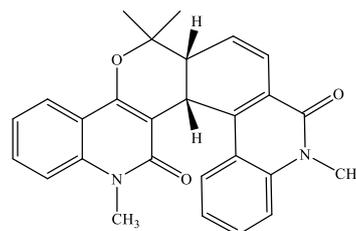
#175 Melicodenine J



#176 Melicodenine K



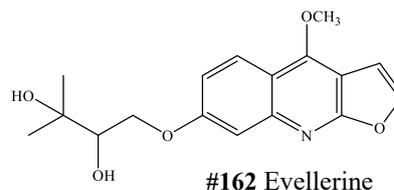
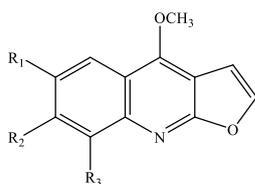
#177 Melicodenine L



#178 Melicobisquinoline B

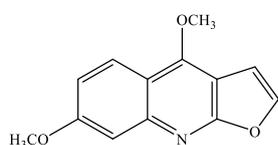
Abbildung 251: Alkaloide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil II

***Melicope elleryana* [237]**

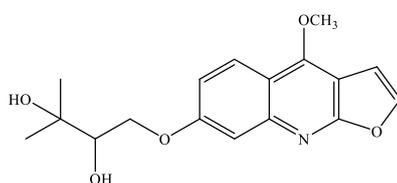


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#163 Confusameline	H	OH	H
#157 Skimmianine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

***Melicope euneura* [94]**

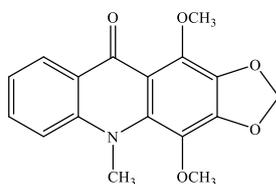


#155 Evolitrine

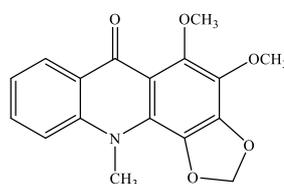


#162 Evellerine

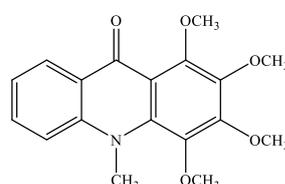
***Melicope fareana* [54,272]**



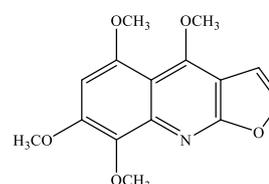
#179 Melicopidine



#180 Melicopine

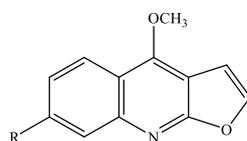
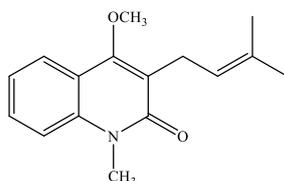


#181 Melicopicine



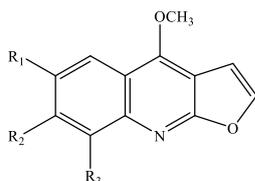
#182 Acronycidine

***Melicope indica* [114]**



	R
#159 Dictamnine	H
#155 Evolitrine	OCH <sub>3</sub>

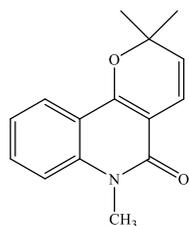
***Melicope lasioneura* [237]**



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#163 Confusameline	H	OH	H
#155 Evolitrine	H	OCH <sub>3</sub>	H
#157 Skimmianine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#183 Haplopine	H	OCH <sub>3</sub>	OH
#156 Kokusaginine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#184 Melineurine	H	O-isoprenyl	H
#185 7-(Isopentenyloxy)-γ-fagarine	H	O-isoprenyl	OCH <sub>3</sub>

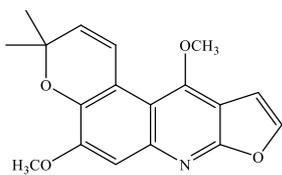
**Abbildung 252:** Alkaloide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil III

*Melicope latifolia* [157]

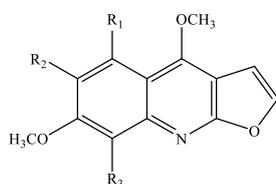


#166 N-Methylflindersine

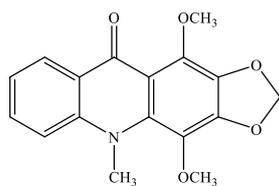
*Melicope leptococca* [273]



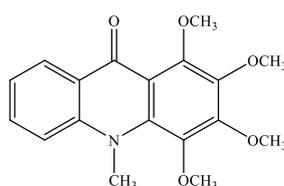
#186 Acronyidine



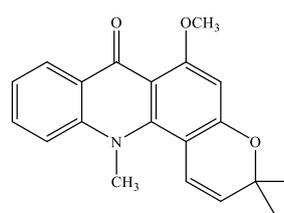
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#156 Kokusaginine	H	OCH <sub>3</sub>	H
#182 Acronyidine	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>



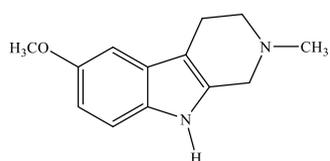
#179 Melicopidine



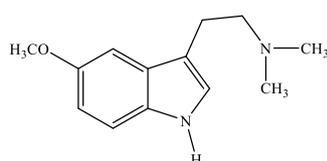
#181 Melicopicine



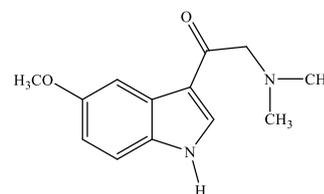
#187 Acronydicine



#188 Methyl-6-methoxy-tetrahydro-β-carboline

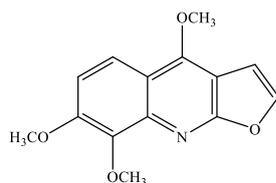


#189 O-Methylbufotenine

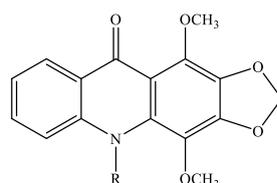


#190 3-Dimethylaminoacetyl-5-methoxyindol

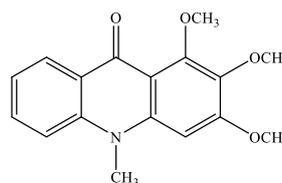
*Melicope leratii* [94]



#157 Skimmianine



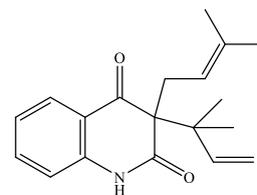
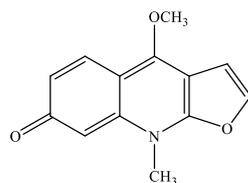
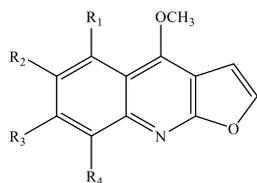
#191 Xanthevodine (R=H)  
#179 Melicopidine (R=CH<sub>3</sub>)



#192 1,2,3-Trimethoxy-10-methylacridone

Abbildung 253: Alkaloide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil IV

*Melicope lunu-ankenda* [94,274,275]

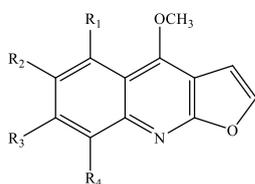


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#159 Dictamnine	H	H	H	H
#155 Evolitrine	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
#157 Skimmianine	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#156 Kokusaginine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

#193 Melicarpinone

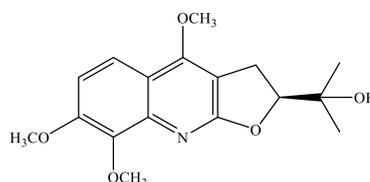
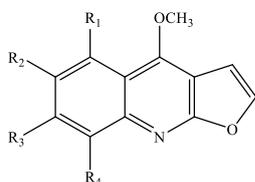
#194 Buchapine

*Melicope macrocarpa* [94]



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#159 Dictamnine	H	H	H	H
#155 Evolitrine	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
#195 Pteleine	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
#156 Kokusaginine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

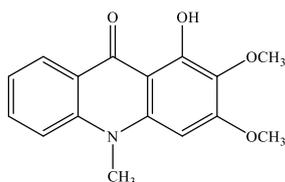
*Melicope madagascariensis* [276]



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#159 Dictamnine	H	H	H	H
#155 Evolitrine	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
#163 Confusameline	H	H	OH	H
#157 Skimmianine	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#195 Pteleine	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
#164 Heliparvifoline	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H

#192 7,8-Dimethoxyplatydesmine

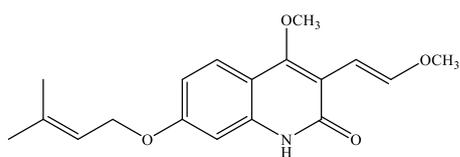
*Melicope micrococca* [76]



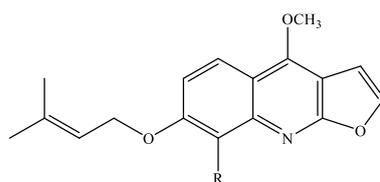
#196 Arborinine

Abbildung 254: Alkaloide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil V

*Melicope moluccana* [55,277]

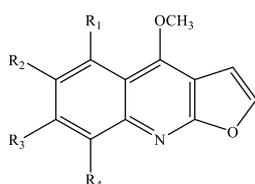


#197 Melimoluccanine  
#185 7-O-isoprenyl-γ-fagarin (R=OCH<sub>3</sub>)



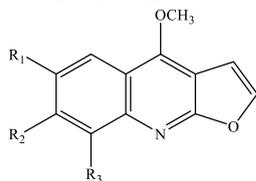
#198 Leptanoine C (R=H)

*Melicope pachyphylla* [94]

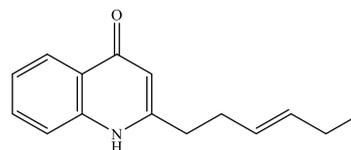


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#159 Dictamnine	H	H	H	H
#155 Evolitrine	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
#157 Skimmianine	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#156 Kokusaginine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

*Melicope perspicuinervia* (*M. reticulata*) [237]

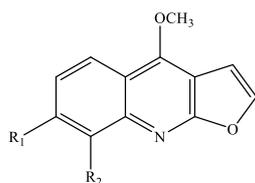


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#157 Skimmianine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#156 Kokusaginine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#199 Halfordinine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

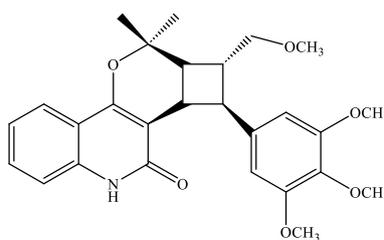


Acutine

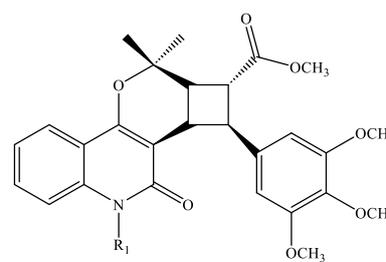
*Melicope pteleifolia* [88,234,274]



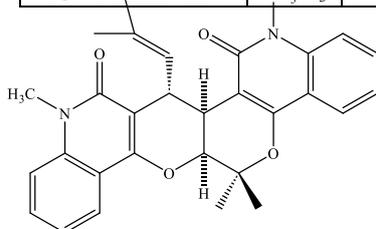
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#159 Dictamnine	H	H
#155 Evolitrine	OCH <sub>3</sub>	H
#157 Skimmianine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



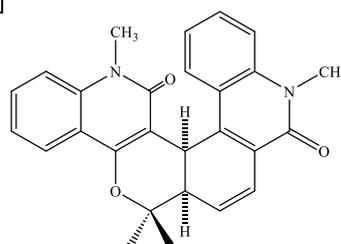
#200 Melicoptine A



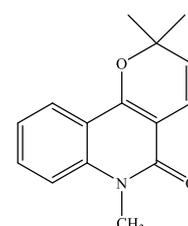
#201 Melicoptine B (R=H)  
#202 Melicoptine C (R=CH<sub>3</sub>)



#203 Melicobisquinolinone A



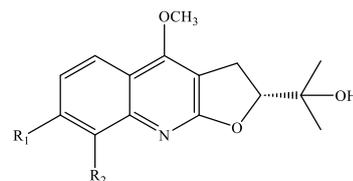
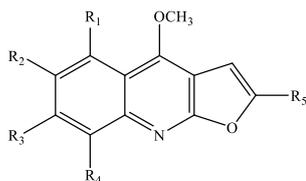
#176 Melicobisquinolinone B



#166 N-Methylflindersine

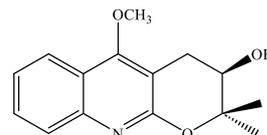
Abbildung 255: Alkaloide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VI

*Melicope semecarpifolia* [60,257,268]

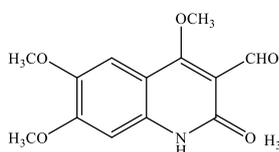


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
#204 2-Acetylpteleine	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	Acetyl
#205 2-Acetylevolitrin	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	Acetyl
#159 Dictamine	H	H	H	H	H
#155 Evolitrine	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
#157 Skimmianine	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#163 Confusameline	H	H	OH	H	H
#183 Haplopine	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
#156 Kokusaginine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H

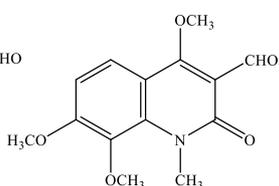
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Platydesmine	H	H
#192 7,8-Dimethoxyplatydesmine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#206 8-Methoxyplatydesmine	H	OCH <sub>3</sub>



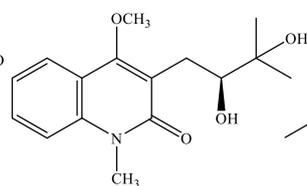
#207 (3*R*)-3,4-Dihydro-5,8,9-trimethoxy-2,2-dimethyl-2*H*-pyrano[2,3-*b*]quinolin-3-ol



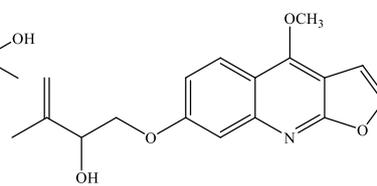
#208 Melisemine



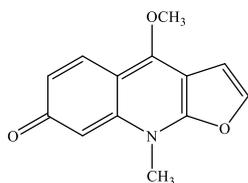
#209 Glycocitridine



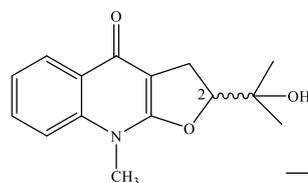
#210 Edulinine



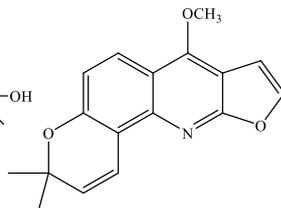
#211 Conduasidine



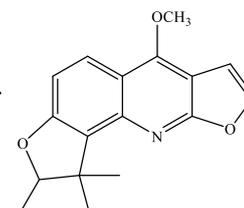
#193 Melicarpinone



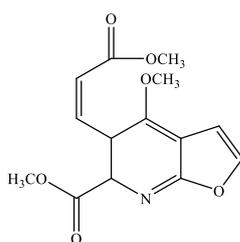
#158 Platydesmine (2*S*)  
#212 Isoplatydesmine (2*R*)



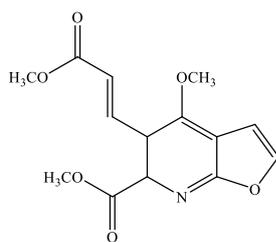
#213 Dutadrupine



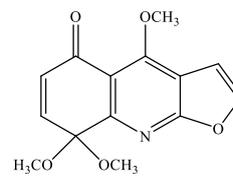
#214 Semecarpine



#215 Dimethyl (Z)-rhoifolinate

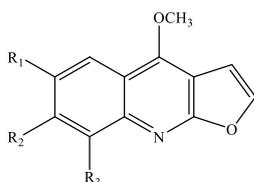


#216 Dimethyl (E)-rhoifolinate



#217 Melicarpine

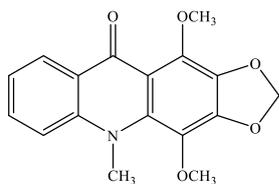
*Melicope triphylla* [225]



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#159 Dictamine	H	H	H
#195 Pteleine	OCH <sub>3</sub>	H	H
#155 Evolitrine	H	OCH <sub>3</sub>	H
#157 Skimmianine	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#156 Kokusaginine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

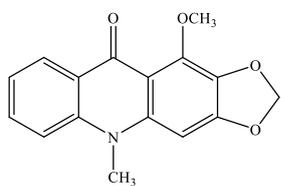
Abbildung 256: Alkaloide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VII

*Melicope vitiflora* [278]

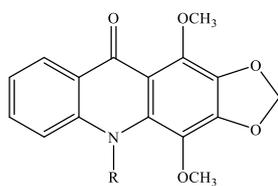


#187 Xanthevodine

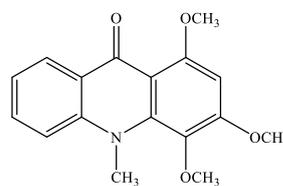
*Melicope xanthoxyloides* [64,279,280]



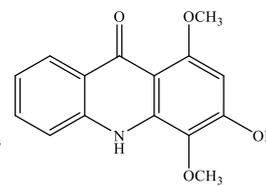
#218 Evoxanthine



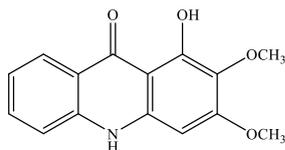
#179 Melicopidine (R=CH<sub>3</sub>)  
#191 Xanthevodine (R=H)



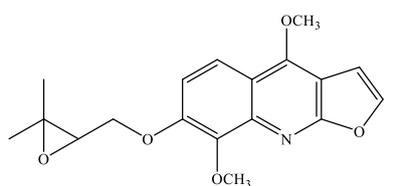
1,3,4-Trimethoxy-*N*-methylacridone



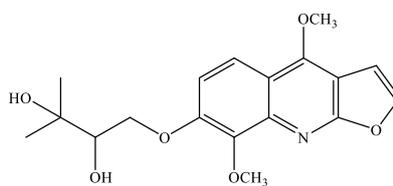
#219 Melixyloidin



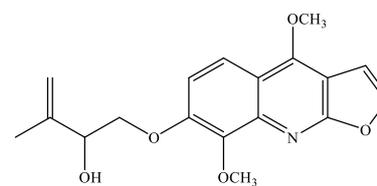
#220 Xanthoxoline



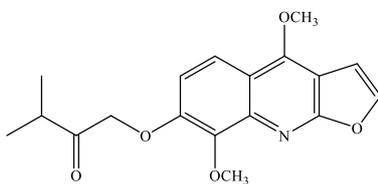
#221 Anhydroevoxine



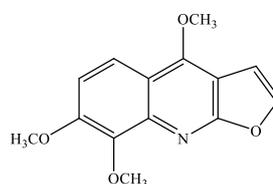
#222 Evoxine



#223 Evodine



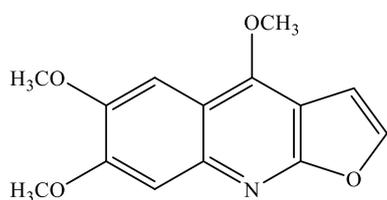
#224 Evoxidine



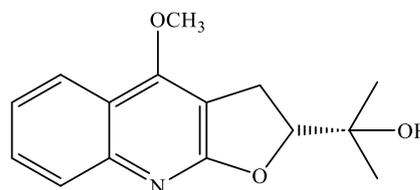
#157 Skimmianine

Abbildung 257: Alkaloide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VIII

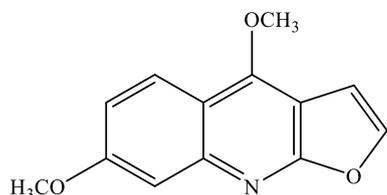
In Pflanzen der Sektion Pelea ist das Vorkommen von Alkaloiden aus *M. barbiger*, *M. lasioneura* und *M. triphylla* bekannt. Am besten untersucht ist die Sektion Lepta. Dort wurden Alkaloide in insgesamt 16 Arten gefunden (*M. accendens*, *M. belae*, *M. bonwickii*, *M. confusa*, *M. denhamii*, *M. elleryana*, *M. euneura*, *M. lafifolia*, *M. lunu-ankenda*, *M. macrocarpa*, *M. madagascariensis*, *M. micrococca*, *M. molluccana*, *M. pachyphylla*, *M. pteleifolia* und *M. semecarpifolia*). Wie Waterman bereits 1975 bemerkt hat, sind die Furanquinoline am weitesten verbreitet. [267] Nur in 4 Species (*M. denhamii*, *M. latifolia*, *M. micrococca*, *M. vitiflora*) wurden bisher keine Verbindungen dieses Typs gefunden (Abbildung 258). Während in *M. denhamii* und *M. latifolia* (beide Sektion Lepta) nur 2-Chinolone gefunden worden sind, enthalten *M. micrococca* (Sektion Lepta) und *M. vitiflora* (Sektion Vitiflorae) jeweils ein Acridon-Alkaloid (s. Abb. 249 - 256). Furochinolone, wie z.B. das Platydesmine (#158; Abbildung 256) wurden bisher nur in *M. accendens* und *M. semecarpifolia*. beide gehören zur Sektion Lepta, gefunden. Über das Vorkommen der Alkaloide Kokusagine, Isoplatydesmine und (+)-Eduline aus *Pelea barbiger* (heute *Melicope barbiger*) war bereits 1974 berichtet worden. [6] Higa und Scheuer berichten darüber, dass das Kokusagine das Hauptalkaloid aus den Blättern und Zweigen von *Pelea barbiger* (*M. barbiger*) ist. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen, die allerdings nicht auf die Gewinnung von Alkaloiden ausgerichtet waren, konnte diese Verbindung nicht isoliert werden.



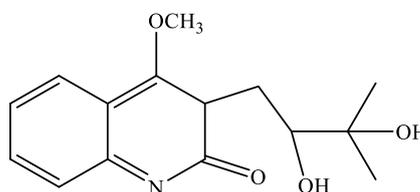
Kokusagine (#156)



Isoplatydesmine (#212)



Verbindung 27 (Evolitrin (#155))



Eduline (#210)

**Abbildung 258:** Alkaloide aus *M. barbiger*

Stattdessen fanden wir das Evolitrin, das sich vom Kokusagine nur durch das Fehlen einer Methoxygruppe unterscheidet. Die Struktur des hier isolierten Evolitrins wurde durch

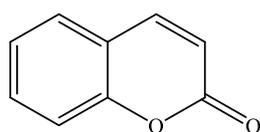
HRESIMS und NMR eindeutig aufgeklärt. Higa und Scheuer (1974) haben die Identität des Kokusagininins seinerzeit nur durch Vergleich mit einer authentischen Probe der Substanz, die von Werny und Scheuer im Jahre 1963 aus *Platydesma campanulata* isoliert worden war, nachgewiesen. [281] In dieser Arbeit findet man, dass das Kokusaginine zuerst auskristallisiert und danach der Schmelzpunkt (169.0 – 169.5 °C) bestimmt wurde. Mit Hilfe der Elementaranalyse wurde die Summenformel aus dem prozentualen Verhältnis der bestimmbareren Atome ermittelt und anschließend wurde der Schmelzpunkt des Pikrates mit einer Probe Kokusagininepikrat, die von Dr. J.R. Price aus Melbourne zur Verfügung gestellt wurde, identifiziert. McKenzie und Price (1952) hatten die Struktur des Kokusagininins über die prozentuale Verteilung der enthaltenen Atome aus der Elementaranalyse und DC-Vergleich mit dem im gleichen Jahr aus *Flindersia collina* Anet et al. (1952) isolierten Kokusaginine identifiziert. [208,282] Anet et al. bezogen sich wiederum auf Terasaka, der das Kokusaginine 1933 erstmals beschrieben hatte [283], und befanden gleiches Verhalten im UV und den Nachweis funktioneller Gruppen nach chemischer Degradierung als ausreichend. Massenspektrometrie oder NMR-Spektroskopie kamen nicht zum Einsatz, wodurch das Vorkommen des Kokusagininins in *M. barbiger*a wahrscheinlich, aber nicht zu 100% gesichert ist. Dies ist insbesondere fraglich, weil Higa und Scheuer (1974) einen Schmelzpunkt des Pikrates von 205-207 °C ermittelt haben. [6] Terasaka fand aber einen um mehr als 10 °C höheren Schmelzbereich (217-218 °C). [283] Rapoport und Hiem veröffentlichten 1960 die Isolierung des Evolitrins aus *Cusparia macrocarpa*. [284] Auch diese Autoren stellten ein Pikrat des isolierten Alkaloids her, dessen Schmelzpunkt mit 201-202 °C angegeben wurde. Möglicherweise handelt es sich um eine Verwechslung zwischen Kokusagininins und Evolitrin. Das Isoplatydesmin wurde in *Pelea barbiger*a erstmals als Naturstoff isoliert. Die Struktur wurde über die Behandlung des Platydesmins (#158, Abbildung 256) mit Methyljodid charakterisiert. Das erhaltene Isoplatydesmin wurde dann mit dem erhaltenen Syntheseprodukt verglichen. Bei der dritten Verbindung, dem Edulinin soll es sich nach Ansicht der Autoren um ein Artefakt handeln. [6] Es scheint dringend geboten die vor 60 Jahren durchgeführten Untersuchungen erneut zu überprüfen, um, abgesehen von Evolitrin, Klarheit über das Vorkommen der Alkaloide in *M. barbiger*a zu erhalten.

Evolitrin wurde bereits auf seine Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Tumorzellen getestet [285] Dabei stellte sich heraus, dass das Alkaloid gegenüber resistenten KB-Zellen einen EC<sub>50</sub>-Wert von 2,8 µg/ml aufwies, unabhängig von der gleichzeitigen Verwendung von Vinblastin. Gegen Zellen eines humanen Mamma-Karzinoms war Evolitrin ebenfalls, aber um den Faktor 2

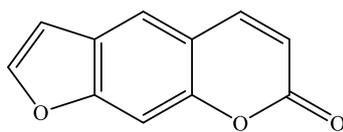
schwächer, wirksam ( $EC_{50} = 5.8 \mu\text{g/ml}$ ). [285] Gegen andere Tumorzellen (Lunge, Colon) erwies es sich als nicht effektiv. [285] In dem von uns verwendeten Nuclear Shrinkage Assay zeigte Evolitrin keine Aktivität.

### 5.3 Cumarine

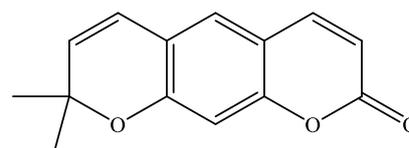
Cumarine besitzen wie die Chromene ein Benzopyrangrundgerüst. Biosynthetisch leiten sie sich jedoch nicht von prenylierten Acetophenonen, sondern von der ortho-Cumarsäure, der *cis*-2-Hydroxycimtsäure ab. Sie stammen daher aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel und werden über den so genannten Shikimisäureweg gebildet. [286] Wie in der Einleitung bereits erwähnt, handelt es sich bei Cumarinen um für die Familie der Rutaceae typische Sekundärstoffe. [287] In einer 2023 erschienenen Übersichtsarbeit über die Cumarine der Rutaceae, schreiben Santos et al., dass es in Bezug auf die Struktur drei verschiedene Arten von Cumarinen gibt, einfache Cumarine, Furanocumarine und Pyranocumarine. [286] In Abbildung 259 sind die verschiedenen Grundgerüste zu sehen. Bei den Furano- und Pyranocumarinen, die durch einen ankondensierten Furan- bzw. Pyranring ein trizyklisches Grundgerüst besitzen, kann zwischen Verbindungen mit angularer bzw. linearer Struktur unterschieden werden. Der Furan- bzw. Pyranring bildet sich nach Prenylierung eines einfachen Cumarin (Abbildung 259).



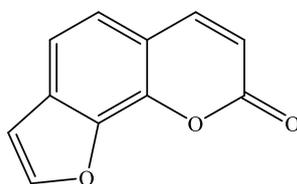
**Einfaches Cumarin**



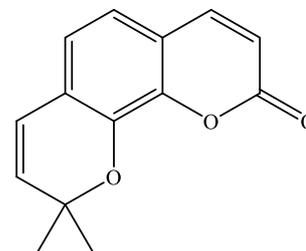
**Lineares Furanocumarin**



**Lineares Pyranocumarin**



**Anguläres Furanocumarin**



**Anguläres Pyranocumarin**

**Abbildung 259:** Strukturtypen von Cumarinen in der Familie der Rutaceae [286]

Die bisher in der Gattung *Melicope* gefundenen Cumarine sind in der Abbildung 260 bis Abbildung 264 (Teil I – IV) aufgeführt. Es handelt sich um insgesamt 39 verschiedene Verbindungen, die in 14 *Melicope* Species gefunden wurden. Zwei dieser Substanzen, die aus *M. quercifolia* isoliert wurden, gehören wegen der darin enthaltenen Strukturelemente sowohl zu den Cumarinen als auch zu den Acetophenonen. Von den 247 Species von Hartley genannten Species (Tabelle 43) sind bisher in nur 11 Arten Cumarine bekannt. Aus der Sektion *Melicope* führen mit *M. mantellii* und *M. ternata* zwei Arten Cumarine, aus der Sektion *Vitiflorae* nur die namengebende Art, *M. vitiflora* und aus der Sektion *Pelea* ist es nur *M. triphylla*. Von diesen vier Arten sind Acetophenone bisher nur in *M. ternata* gefunden worden. Aus der großen Sektion *Lepta* wurden mit *M. belae*, *M. borbonica*, *M. denhamii*, *M. glabra*, *M. hayesii*, *M. latifolia* und *M. lunu-ankenda* bisher sieben Arten ausgemacht, die Cumarine führen. Vier davon (*M. borbonica*, *M. denhamii*, *M. latifolia*, *M. lunu-ankenda*) enthalten auch Acetophenone.

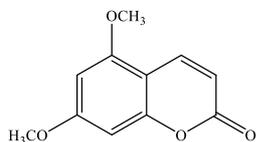
Wie bei den Acetophenonderivaten gibt es auch unter den Publikationen zu den Cumarinen drei Species (*M. melanophloia*, *M. quercifolia*, *M. stipitata*) [11,106,107109], die Hartley in seiner Publikation (s. Tabelle 43) nicht als zur Gattung *Melicope* gehörig bezeichnet. [203] Dass *M. quercifolia* nach Hartley mit *M. denhamii* identisch ist und *M. stipitata* zur Gattung *Dinosperma* gehört [203], wurde bereits bei den Acetophenonen erwähnt, da in diesen beiden Pflanzen beide Stoffgruppen gefunden wurden. Auch *M. melanophloia* gehört nach Hartley zur Gattung *Dinosperma* (*D. melanophloia*). [203]

Die hier untersuchte *M. barbiger* ist der Einteilung von Hartley folgend, die 12. *Melicope* Art die Cumarine führt, im anderen Fall ist es die 15. Species. Im Gegensatz zu den Acetophenonen ist *M. barbiger* hier nicht die einzige Species aus der Sektion *Pelea*, in der Cumarine gefunden wurden, mit *M. triphylla* gibt es einen zweiten Vertreter aus dieser Sektion. In Bezug auf die Strukturen gibt es bei den bisher in der Gattung *Melicope* gefundenen Cumarinen eine geringere Vielfalt als bei den Acetophenonen (s. Abbildung 260 bis Abbildung 264).

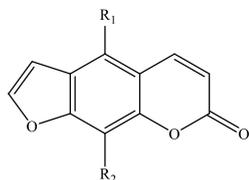
Wie oben erwähnt, sind in der Familie der Rutaceae drei Strukturtypen typisch. [287] Das gilt auch für die Gattung *Melicope*, in der einfache Cumarine und Furanocumarine in jeweils acht Arten gefunden wurden (Abbildung 259). In sechs dieser Species finden sich beide Strukturtypen. Bei der dritten Gruppe, den Pyranocumarinen sind es nur fünf Arten. Nur in *M. glabra* aus der Sektion *Lepta* und der möglicherweise nicht zur Gattung gehörenden *M. stipitata* finden sich alle drei Strukturtypen. Bei vier anderen Pflanzen aus der Sektion *Lepta* (*M. belae*,

*M. borbonica*, *M. latifolia*, *M. lunu-ankenda*) sind einfache Cumarine gemeinsam mit Furanocumarinen gefunden worden.

***Melicope anisata*** [222]

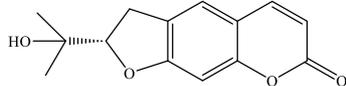


#121 Limettine

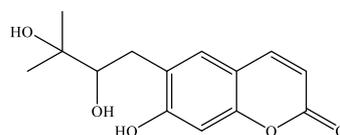


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#119 Psoralen	H	H
#140 Xanthotoxin	H	OCH <sub>3</sub>
#141 Isopimpinellin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

***Melicope belahe*** [206]

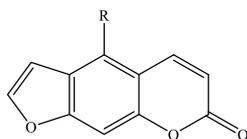


#117 Marmesin



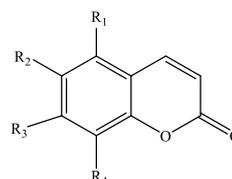
#118 (-)-Peucedanol

***Melicope borbonica*** [241,244,245]



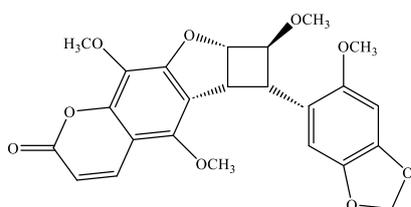
#119 Psoralene (R= H)

#120 Bergapten (R=OCH<sub>3</sub>)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#121 Limettine	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
#122 Scoparone	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#123 6,8-Dimethoxycoumarin	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
#124 Prenyletinmethylether	H	OCH <sub>3</sub>	O-isoprenyl	H
#125 Cedrelopsin	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Isoprenyl

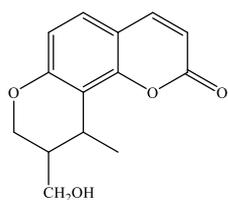
***Melicope denhamii*** [224]



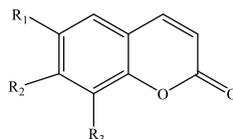
#126 Melicodin C

Abbildung 260: Cumarine aus Species der Gattung *Melicope* – Teil I

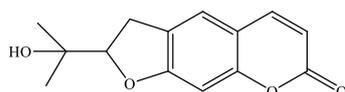
*Melicope glabra* [207,242]



#127 Glabranin

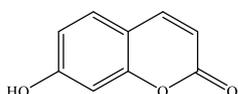


#122 Scoparone	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#128 Scopoletin	OCH <sub>3</sub>	OH	H
#129 Umbelliferon	H	OH	H
#130 6,7,8-Trimethoxycoumarin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

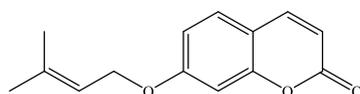


#117 Marmesin

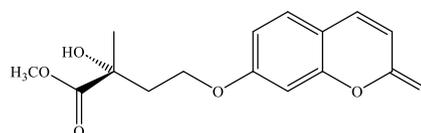
*Melicope hayesii* [71]



#129 Umbelliferon

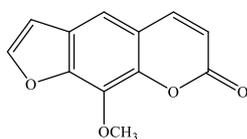


#131 O-Prenylumbelliferon

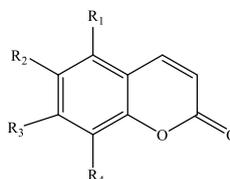


#132 Methyl (2*R*)-2-hydroxy-2-methyl-4-[(2-oxo-2*H*-1-benzopyran-7-yl)oxy]butanoate

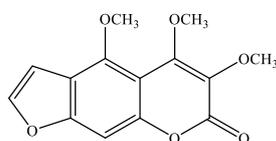
*Melicope latifolia* [94,148]



#120 Bergapten



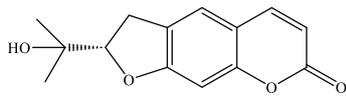
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#133 5,7,8-trimethoxycoumarin	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#134 Fraxetindimethylether	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



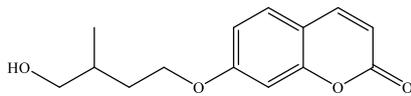
#135 Halfordin

Abbildung 261: Coumarine aus Species der Gattung *Melicope* – Teil II

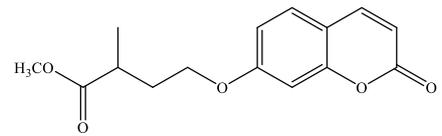
*Melicope lunu-ankenda* [70,240]



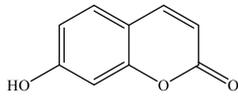
#117 Marmesin



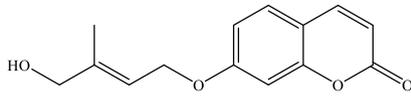
#136 Melilunumarin A



#137 Melilunumarin B

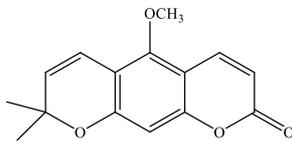


#129 Umbelliferon



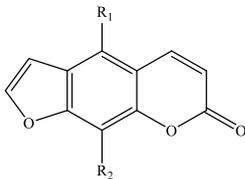
#138 6-Deoxyhaplopinol

*Melicope mantellii* [112]

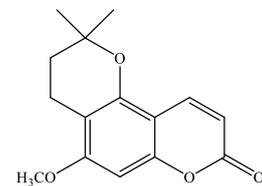


#139 Xanthoxvletin

*Melicope melanophloia* [159,161]

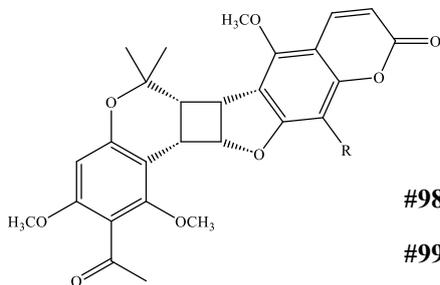


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#120 Bergapten	OCH <sub>3</sub>	H
#140 Xanthotoxin	H	OCH <sub>3</sub>
#141 Isopimpinellin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



#142 Alloxanthoxyletin

*Melicope quercifolia* [72]

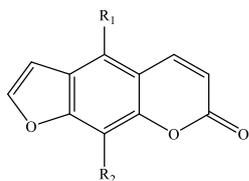


#98 Meliquercifolin A (R = H)

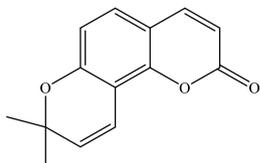
#99 Meliquercifolin B (R=OCH<sub>3</sub>)

Abbildung 262: Coumarine aus Species der Gattung *Melicope* – Teil III

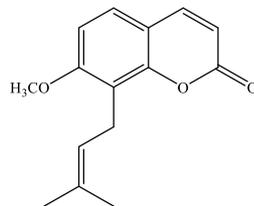
*Melicope stipitata* [46]



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#120 Bergapten	OCH <sub>3</sub>	H
#143 Isopimpinellin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
#144 Imperatorin	H	O-isoprenyl
#145 Phellopterin	OCH <sub>3</sub>	O-isoprenyl

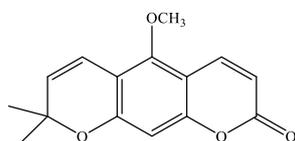


#146 Seselin



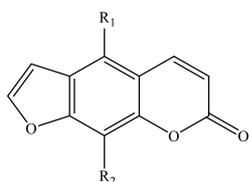
#147 Osthol

*Melicope ternata* [74]

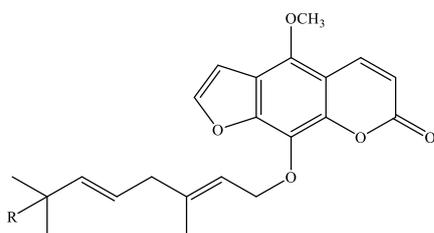


#139 Xanthoxyletin

*Melicope triphylla* [223,224]

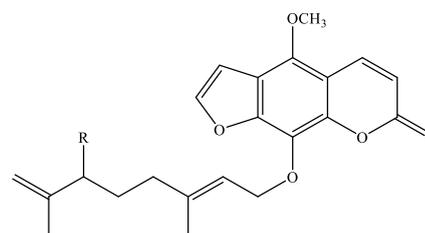


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#144 Imperatorin	H	O-isoprenyl
#145 Phellopterin	OCH <sub>3</sub>	O-isoprenyl
#148 8-Geranyloxy-5-methoxypsoralen	OCH <sub>3</sub>	O-geranyl



#149 Melicotriphyllin A (R=OH)

#150 Melicotriphyllin B (R=OOH)

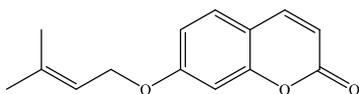


#151 Melicotriphyllin C (R=OH)

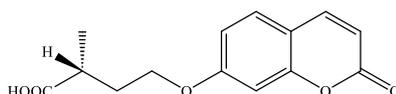
#152 Melicotriphyllin D (R=OOH)

Abbildung 263: Coumarine aus Species der Gattung *Melicope* – Teil IV

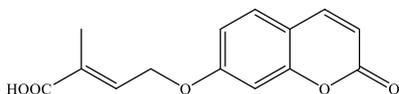
*Melicope vitiflora* [278]



#131 O-Prenylumbelliferon



#153 7-(3-Carboxybut-2-enoxy)coumarin

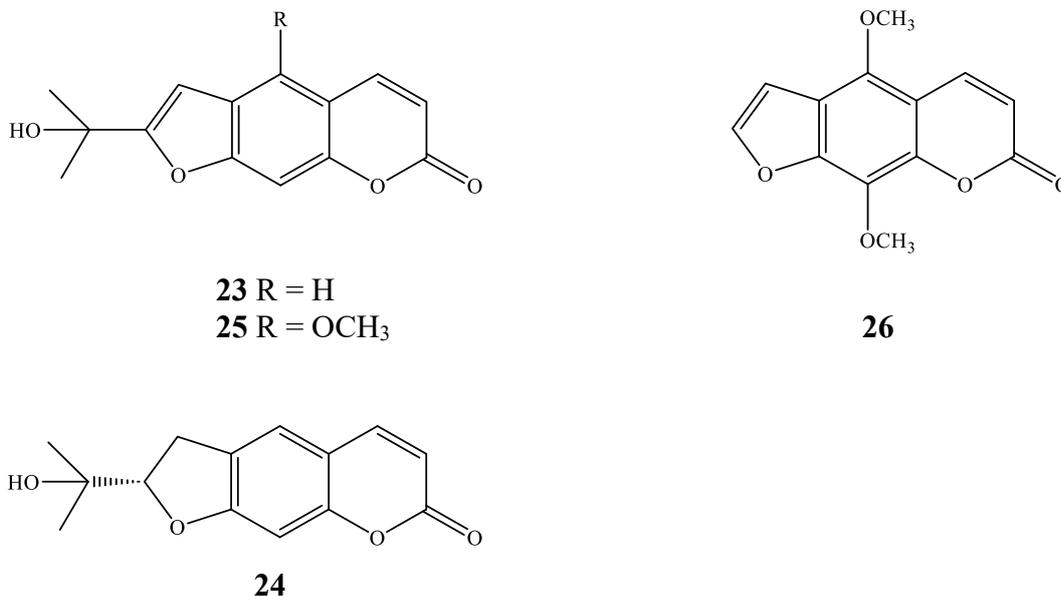


#154 7-(3'-Carboxybutoxy)-coumarin

**Abbildung 264:** Cumarine aus Species der Gattung *Melicope* – Teil V

In *M. hayesii* (s. Abb. 260) fanden sich nur einfache Cumarine und in *M. denhamii*, beide gehören ebenfalls zur Sektion Lepta finden sich nur einfache bzw. besondere Cumarine (Abbildung 260), die auch zu den Acetophenonen gehören (*M. denhamii*). In den beiden zur Sektion Melicope gehörenden Pflanzen (*M. mantellii*, *M. ternata*) sind bisher nur Pyranocumarine gefunden worden und aus der einzigen, bisher untersuchten, zur Sektion Vitiflora gehörenden Species fanden sich nur einfache Cumarine, die allerdings an der Hydroxylgruppe des Umbelliferons prenyliert sind (Abbildung 262 und Abbildung 263). In *M. barbiger*a haben wir vier Cumarine gefunden (Abbildung 265), bei denen es sich ausschließlich um Furanocumarine handelt. Substanzen aus den beiden anderen Gruppen konnten hier nicht isoliert werden. Das deckt sich mit den Cumarinen von *M. triphylla*, der zweiten aus der Sektion Pelea untersuchten Species, die auch nur Furanocumarine enthält. *M. triphylla* besitzt allerdings nur Derivate des Psoralens (#119), die Isoprenyloxy- oder Geranyloxysubstituenten tragen, die Furanocumarine aus *M. barbiger*a sind lediglich methoxyliert (Abbildung 260). Möglicherweise ist das alleinige Vorkommen von Furanocumarinen aber dennoch ein Charakteristikum für die Sektion Pelea. In *M. anisata* (früher *P. anisata*), der dritten untersuchten Species aus der Sektion Pelea sind mit Ausnahme von Limettine (#121) auch nur methoxylierte Furanocumarine gefunden worden (Abbildung 260). Es wäre wünschenswert, wenn weitere Arten aus dieser Sektion und auch aus anderen Sektionen auf das Vorkommen von Cumarinen untersucht werden würden. In *M. barbiger*a ist im Gegensatz zu *M. triphylla* auch das Marmesin (24, #117 in Abbildung 260 bzw. Abbildung 261) enthalten, das sich auch in drei Arten aus der Sektion Lepta findet (Abbildung 260). Die beiden anderen Verbindungen, Dehydroderivate des Marmesins wurden in *Melicope*-Arten bisher noch nicht gefunden, allerdings sind diese Verbindungen aus der Gattung *Euodia* bekannt. [209]

Das Isopimpinellin (**26**) gibt es außer in *M. barbiger*a nur noch in *M. melanophloia* (Abbildung 262), bei der es sich nach Hartley aber um *Dinosperma melanophloia* handelt. [203]



**Abbildung 265:** Coumarine aus *M. barbiger*a

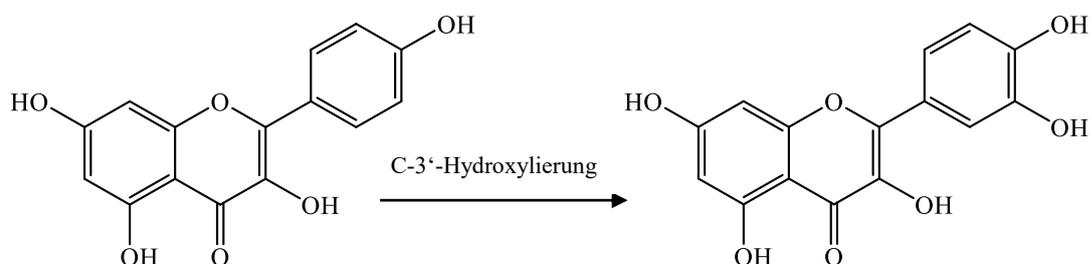
Auch Coumarine sind Naturstoffe mit vielfältigen pharmakologischen Wirkungen [120]. Substanzen aus dieser Stoffgruppe sind bereits antiphlogistische (Aesculetin), spasmolytische (Scopoletin), blutgerinnungshemmende (Dicoumarol), antibakterielle (Umbelliferon) Wirkungen und Wirkung gegen die Psoriasis (Bergapten) nachgewiesen worden. [288] Darüber hinaus gibt es auch eine Reihe von Coumarinderivaten, die zytotoxische Aktivität gegenüber Krebszellen gezeigt haben. [289,290]

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Coumarine **23** - **26** wurden ebenfalls auf ihre mögliche Zytotoxizität getestet. Keine dieser Verbindungen zeigte jedoch eine Aktivität im von uns verwendeten Nuclear Shrinkage Assay. In der Literatur finden sich jedoch auch Hinweise zur Zytotoxizität dieser Verbindungen. Dong et al. veröffentlichten 2018 *in vitro* und *in vivo* Effekte von Marmesin (**24**) gegenüber menschlichen Leukämie-Zellen [291] und Wang et al. fanden 2021 entsprechende Wirkungen gegenüber Karzinomzellen des Ösophagus. [292] Offenbar ist die Datenlage aber nicht so klar, denn Dong et al. zogen ihre Arbeit von 2018 drei Jahre später wieder zurück. [293] Auch für Isopimpinellin (**26**) wurden Zytotoxizitätsdaten veröffentlicht, die Wirkung war aber weniger stark ausgeprägt als es für das 5-Geranyloxy-7-methoxycoumarin der Fall war. [294] Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um das mögliche Potential dieser Substanzklasse zu überprüfen. Wie bei den Acetophenonen

scheinen die prenylierten Verbindungen besonders interessant zu sein, die in anderen *Melicope* Arten vorkommen (Abbildung 261 bis Abbildung 264), in *M. barbiger*a aber noch nicht gefunden wurden.

## 5.4 Flavonoide

Eine weitere für die Chemotaxonomie wichtige Stoffgruppe sind die Flavonoide. [295–297] Auch für Gattungen der Rutaceae wurden, aufgrund des Vorkommens von Flavonoiden, bereits taxonomische Überlegungen durchgeführt. In einer im Jahre 1983 erschienen Arbeit zur Chemotaxonomie der Flavonoide und Monoterpene der Gattung *Acmadenia* (Rutaceae), haben Waterman et al. insgesamt 15 Species dieser Gattung hinsichtlich ihrer Flavonoide und Terpenoide verglichen. [298] Als Waterman et al. ihre Arbeiten publiziert haben, gehörte die Gattung *Acmadenia* innerhalb der Familie der Rautengewächse (Rutaceae) zur Unterfamilie Rutoideae und darin zur Tribus Rutoideae. [298] Aufgrund neuerer Untersuchungen gehört die Gattung in die Unterfamilie Zanthoxyloideae, in die auch die Gattung *Melicope* eingeordnet wird. [299] Waterman et al. befanden die Flavonoide aus der Gattung *Acmadenia* für chemotaxonomische Überlegungen für wertvoller als die ebenfalls untersuchten Monoterpene. [298] In der Auswertung konzentrieren sich die Autoren auf die Substitution des B-Rings, der entweder einfach an C-4' hydroxyliert (Kämpferolderivate), doppelt an C-3' und C-4' hydroxyliert (Quercetinderivate) oder dreifach an C-3', C-4' und C-5' hydroxyliert (Myricetinderivate) vorgelegen hat. Nach Harborne ist das Vorkommen von Flavonoiden mit einer Trihydroxylierung im B-Ring als ursprüngliches Merkmal zu sehen, genauso wie das Vorkommen von Flavonolen im Vergleich zu Flavonen. Im 1981 in zweiter Auflage von Christian Czygan herausgegebenen Buch mit dem Titel „Pigments in plants“, veröffentlichte Tony Swain seine Arbeit zu Flavonoiden als chemotaxonomische Marker in Pflanzen. [296] Er beschreibt darin, dass die Anzahl der notwendigen Schritte in der Biosynthese eines Flavonoids mit der Entwicklung der Pflanze einhergeht, in der diese Biosynthese möglich ist. Einfache Flavonoide, wie das Flavonol Kämpferol mit einer 3,5,7,4'-Hydroxylierung dienen dabei innerhalb der Gruppe der Flavonole als Ausgangsstoff für die weitere Biosynthese. [296] Durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion wird dann z.B. die 3'-Position im B-Ring hydroxyliert, wodurch das ebenfalls noch häufig vorkommende Quercetin entsteht (Abbildung 266). [296]



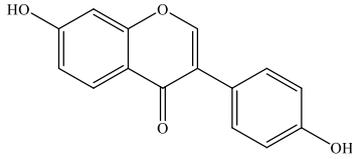
**Abbildung 266:** Biosynthetischer Zusammenhang zwischen Kämpferol und Quercetin

Jede weitere Substitution erfordert weitere Enzyme zur Einführung weiterer Hydroxylgruppen z.B. an C-6 und C-8. Nach Einführung solcher phenolischer Hydroxylgruppen können dann bei Vorhandensein der entsprechenden Enzyme die Methylether biosynthetisiert werden oder es kann zu einer Prenylierung kommen. Je komplexer das Substitutionsmuster ist, desto mehr Enzyme werden benötigt. Das Vorkommen solcher Flavonoide ist daher ein Anhaltspunkt dafür, dass diese Art entsprechend weit entwickelt ist. [296]

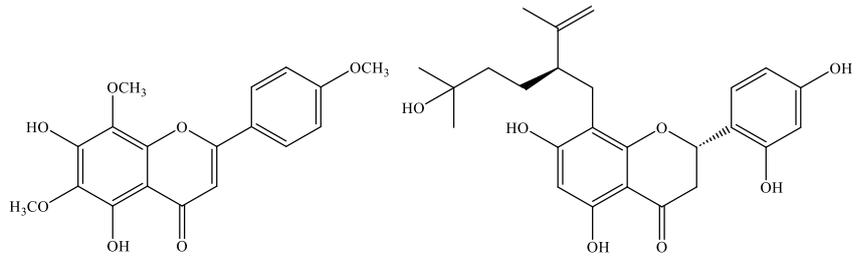
In den folgenden Abbildungen sind die, abgesehen von der hier beschriebenen *M. barbiger*a bisher untersuchten *Melicope* Species mit den in diesen Arten gefundenen Flavonoiden in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Bei der Mehrzahl der Substanzen handelt es sich um Flavonole, die sich vom Kämpferol bzw. Quercetin ableiten. Insgesamt wurden in der uns zur Verfügung stehenden Literatur (Abbildung 266) über 100 verschiedene Flavonoide beschrieben. Die Quercetinderivate stellen dabei etwas mehr als 75 % der Verbindungen, etwas weniger als die Hälfte davon besitzen einen Methylendioxygruppe in 3',4'-Position des B-Rings. Circa 20 % aller bisher gefundenen Flavonoid sind prenyliert, die meisten davon am Sauerstoff (Abbildung 269 und Abbildung 270). Daneben wurden auch 10 Kämpferolderivate, 7 Flavone, 2 Isoflavonoide (#225 und #287) und je ein Flavanon (#227) und ein Flavanonol (#286) als selten auftretende Verbindungen gefunden (Abbildung 270).

Aus der hier untersuchten *M. barbiger*a konnten insgesamt 14 Flavonoide isoliert und identifiziert werden. Zwölf dieser Verbindungen wurden als Quercetinderivate identifiziert (Abbildung 275). Nur bei den Isomeren, im Gemisch isolierten Verbindungen **21** und **22** (*cis*- und *trans*-Tilirosid), die sich nur in der Konfiguration der an die Glucose gebundenen *p*-Cumarsäure unterscheiden, handelt es sich um Derivate des Kämpferols. Diese zwei Verbindungen und die Verbindung **15** (5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon) sind bisher nur im *M. barbiger*a gefunden worden. Dies ist auch bei der überwiegenden Mehrzahl der in *Melicope*-Arten gefundenen Flavonoiden der Fall. Nur etwa 20 Prozent der Stoffe wurde bisher in mehr als einer Art gefunden (Abbildung 275). In Tabelle 42 sind die bisher mehrfach im *Melicope*-Arten gefunden Flavonoide übersichtlich dargestellt. Bis auf das Kämpferolderivat Kumatakenin (#252) aus *M. glabra* und *M. hookeri* und das Isoflavonoid Daidzein (#225) aus *M. accendens* und *M. pteleifolia* sind alle mehrfach gefundenen Verbindungen Derivate des Quercetins.

*Melicope accendens* [251]

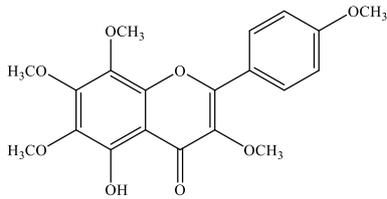


#225 Daidzein (LC/MS)

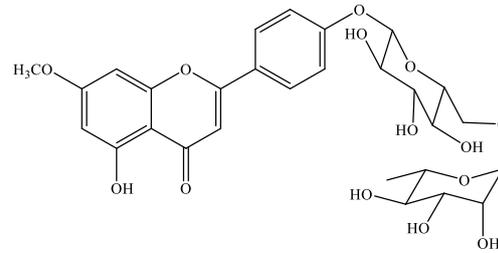


#226 Nevadensin

#227 Norkurarinol

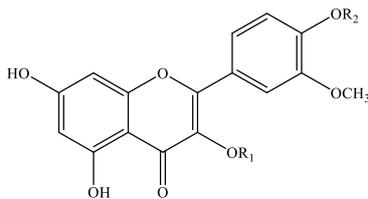


#228 5-Hydroxyauranetin (LC/MS)



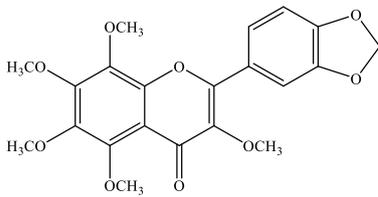
#229 Genkwanin 4'-O-β-D-rutinosid

*Melicope borbonica* [117]



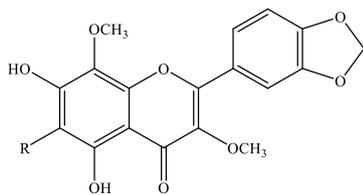
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#230 Isorhamnetin	H	H
#231 Quercetin 3',4'-dimethylether	H	CH <sub>3</sub>
#232 Quercetin 3,3'-dimethylether	CH <sub>3</sub>	H
#233 Quercetin 3,3',4'-trimethylether	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

*Melicope broadbentiana* [75]

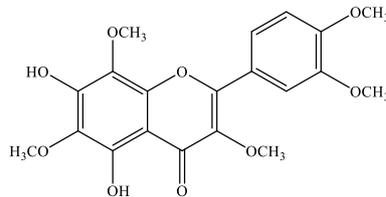


#234 Melibentin

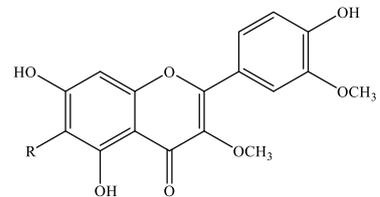
*Melicope coodeana* [249]



#235 5,7-Dihydroxy-3,8-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon (R = H)



#237 5,7-Dihydroxy-3,6,8,3',4'-pentamethoxyflavon



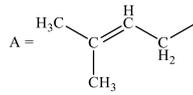
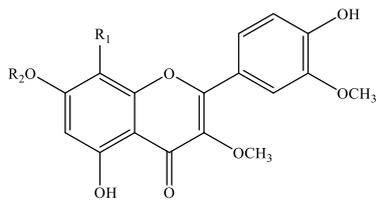
#232 Quercetin 3,3'-methylether (R = H)

#236 5,7-Dihydroxy-3,6,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon (R = OCH<sub>3</sub>)

#238 Quercetin 3,6,3'-trimethylether (R = CH<sub>3</sub>)

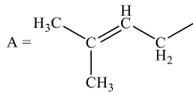
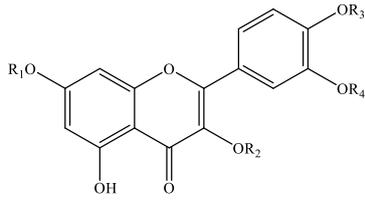
Abbildung 267: Flavonoide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VIII

**Melicope elleryana [131,239]**

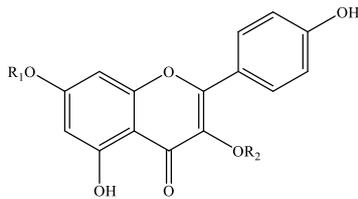


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#239 Pachypodol	H	CH <sub>3</sub>
#240 5,4'-Dihydroxy-3,8,3'-trimethoxy-7-prenyloxyflavon	H	A
#241 Ternatin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

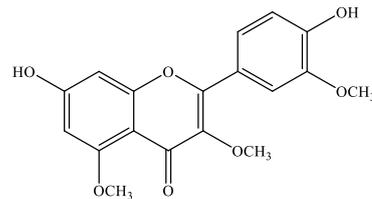
**Melicope glabra [134,148,242,248,253]**



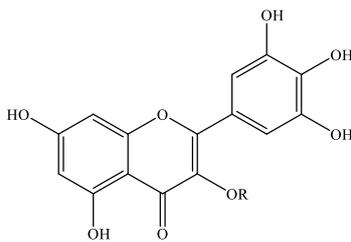
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#242 Quercetin	H	H	H	H
#243 Quercetin 3-O-glucosid	H	Glc	H	H
#230 Isorhamnetin	H	H	H	CH <sub>3</sub>
#244 Quercetin 4'-methylether	H	H	CH <sub>3</sub>	H
#232 Quercetin 3,3'-dimethylether	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#245 Quercetin 3,4'-dimethylether	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
#239 Pachypodol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#246 Pteleifolosin E	A	H	H	CH <sub>3</sub>
#247 5,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7-prenyloxyflavon	A	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#248 Pteleifolosin C	A	H	CH <sub>3</sub>	H



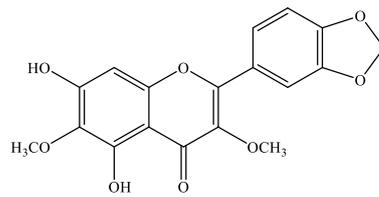
- #249 Kämpferol (R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>=H)
- #250 Kämpferol 3-O-glucosid (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Glc)
- #251 Kämpferol 3-O-glucuronid (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Glu)
- #252 Kumatakenin (R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>)



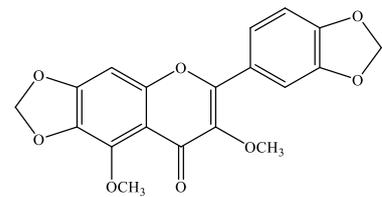
- #253 Isorhamnetin 3,5-dimethylether



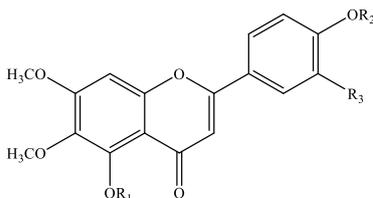
- #254 Myricetin (R=H)
- #255 Myricetin 3-O-glucosid (R = Glc)



- #256 Meliglabrin



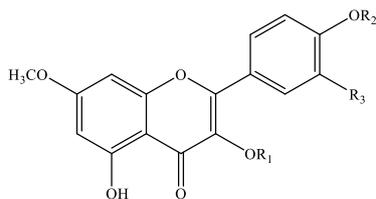
- #257 Meliternatin



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#258 5,3',4'-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon	H	H	OH
#259 5,6,7,4'-Tetramethoxyflavon	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H

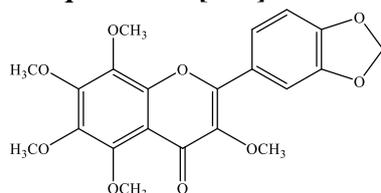
Abbildung 268: Flavonoide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil II

**Melicope hookeri [247]**

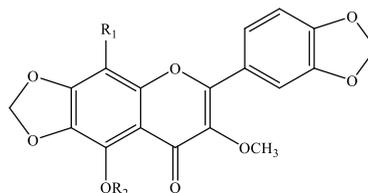


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#260 Ombuin	H	CH <sub>3</sub>	OH
#252 Kumatakenin	CH <sub>3</sub>	H	H
#261 Ayanin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH

**Melicope indica [114]**

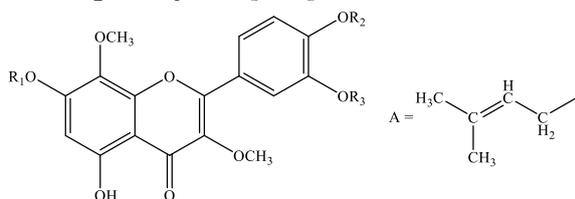


#234 Melibentin



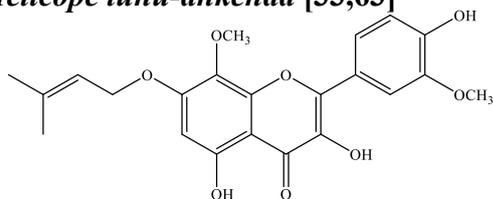
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#257 Meliternatin	H	CH <sub>3</sub>
#262 8-Methoxymeliternatin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

**Melicope latifolia [250]**

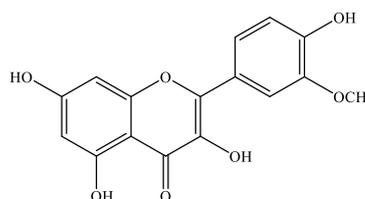


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#240 5,4'-Dihydroxy-3,8,3'-trimethoxy-7-prenyloxyflavon	A	H	CH <sub>3</sub>
#263 3'-Hydroxyflindulatin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
#264 5-Hydroxy-3,7,8,3',4'-pentamethoxyflavon	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

**Melicope lunu-ankenda [33,63]**

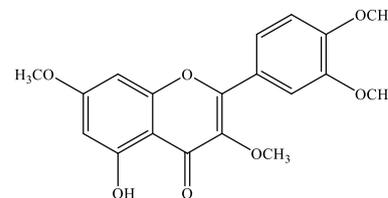
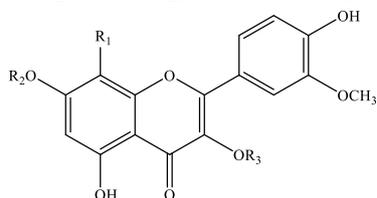


#265 3,5,4'-Trihydroxy-8,3'-dimethoxy-7-isoprenyloxyflavon



#230 Isorhamnetin

**Melicope madagascariensis [205]**

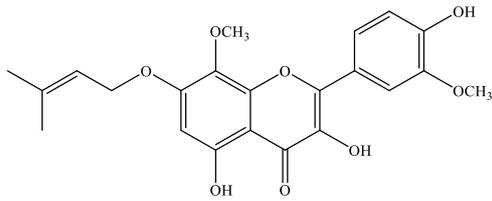


#268 Retusin

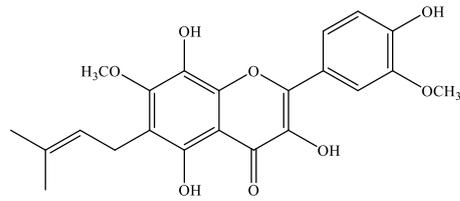
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#230 Isorhamnetin	H	H	H
#266 Isorhamnetin 3-O-diglucosid	H	H	Glc-Glc
#239 Pachypodol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#241 Ternatin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#267 8-Methoxyisorhamnetin 3-O-diglucosid	OCH <sub>3</sub>	H	Glc-Glc

Abbildung 269: Flavonoide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil II

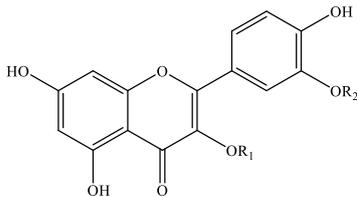
*Melicope micrococca* [76]



#265 3,5,4'-Trihydroxy-8,3'-dimethoxy-7-isopentenylxyflavon

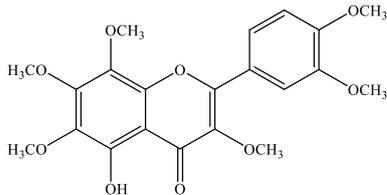


#269 3,5,8,4'-Tetrahydroxy-7,3'-dimethoxy-6-isopentenylflavon



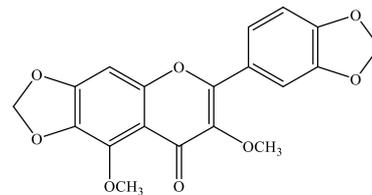
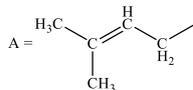
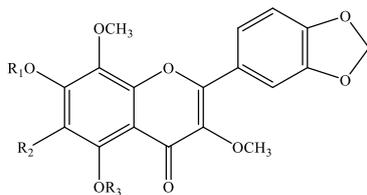
	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>
#243 Quercetin 3-O-glucosid	Glc	H
#270 Isorhamnetin 3-O-rutinosid	Glc-Rha	CH <sub>3</sub>

*Melicope obscura* [117]



#271 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavon

*Melicope patulinervia* [113]



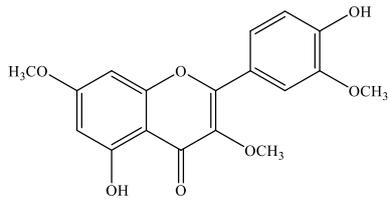
#257 Meliternatin (R=H)

#262 8-Methoxymeliternatin (R=OCH<sub>3</sub>)

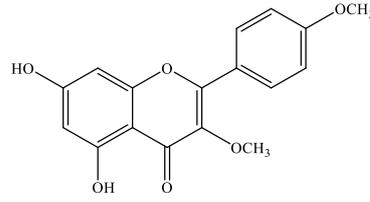
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#272 5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	H	H	H
#273 5-Hydroxy-3,6,8-trimethoxy-7-isoprenyloxy-3',4'-methylenedioxyflavon	A	OCH <sub>3</sub>	H
#234 Melibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#274 5-Demethylmelibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

Abbildung 270: Flavonoide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil IV

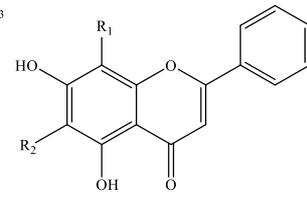
**Melicope pteleifolia [142,210,230,231,252,270,300]**



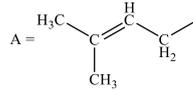
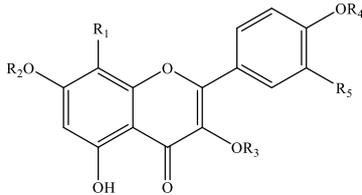
#239 Pachypodol



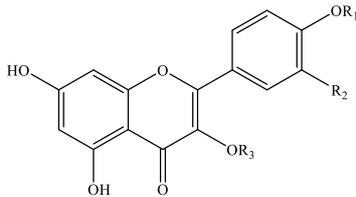
#275 Ermanin



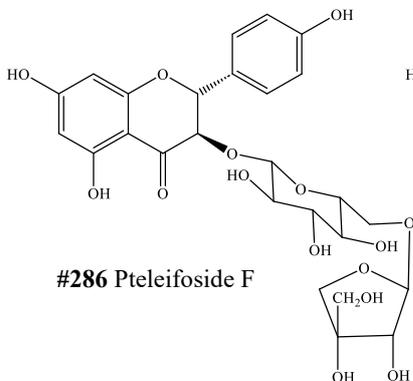
#276 Oroxylin (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>)  
#277 Wogonin (R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H)



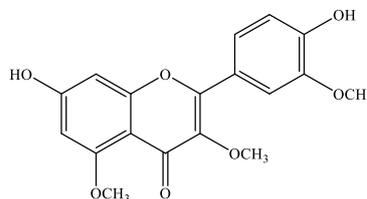
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
#278 Kämpferol 3,4'-dimethylether	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
#279 7,4'-Dihydroxy-3,5,3' -trimethoxyflavon	H	H	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
#280 Kämpferol 3,7-dimethylether	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
#265 3,5,4'-Trihydroxy-8,3'-dimethoxy-7-isoprenyloxyflavon	OCH <sub>3</sub>	A	H	H	OCH <sub>3</sub>
#281 3,5,3'-Trihydroxy-8,4'-dimethoxy-7-isoprenyloxyflavon	OCH <sub>3</sub>	A	H	CH <sub>3</sub>	OH
#248 Ptelefolosin C	H	A	H	CH <sub>3</sub>	OH



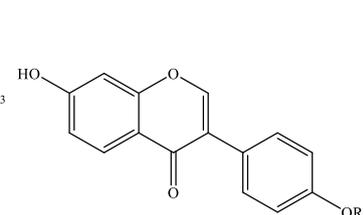
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#282 Kaempferol 3-robinobiosid	H	H	$\alpha$ -rha(1→6) $\beta$ -gal
#283 Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1→2)- $\alpha$ -D-xylopyranosid	H	H	$\beta$ -glu(1→2) $\alpha$ -xyl
#284 Tamarixetin	CH <sub>3</sub>	OH	H
#285 Tamarixetin 3-robinobiosid	CH <sub>3</sub>	OH	$\alpha$ -rha(1→6) $\beta$ -gal



#286 Pteleifoside F



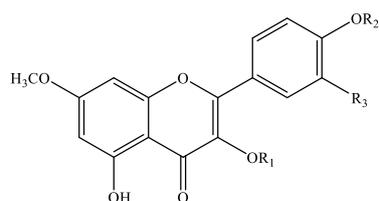
#253 Isorhamnetin  
3,5-dimethylether



#225 Daidzein (R=H)  
#287 Formononetin (R=CH<sub>3</sub>)

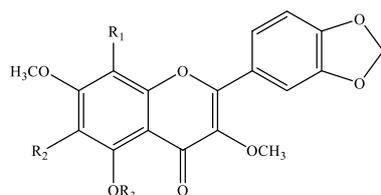
**Abbildung 271: Flavonoide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil V**

*Melicope quercifolia (M. denhamii) [301]*

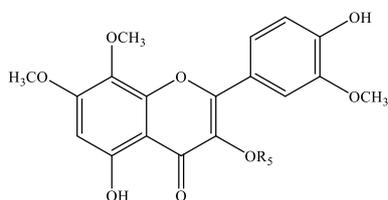


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#239 Pachypodol	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
#261 Ayanin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH

*Melicope simplex [112,302]*

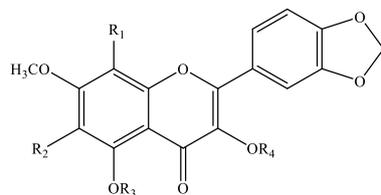


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#288 Isokanugin	H	H	CH <sub>3</sub>
#289 Melisimplin	H	OCH <sub>3</sub>	H
#290 Melisimplexin	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#291 5-Demethylmeliternin	OCH <sub>3</sub>	H	H
#292 Meliternin	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>

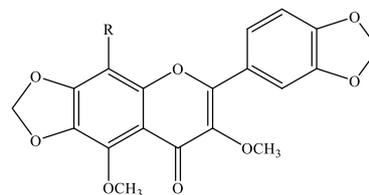


#241 Ternatin

*Melicope subunifoliolata [106]*

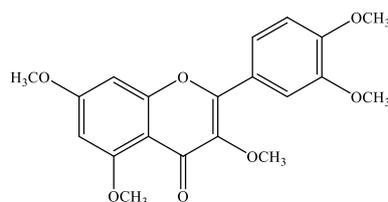


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#288 Isokanugin	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#290 Melisimplexin	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#274 5-Demethylmelibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#291 3-Demethylmelibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
#234 Melibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



#257 Meliternatin (R=H)

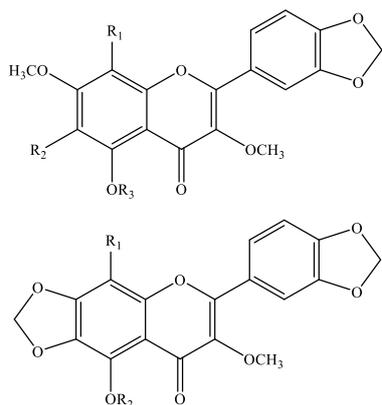
#262 8-Methoxymeliternatin (R=OCH<sub>3</sub>)



#293 Quercetin 3,5,7,3',4'-pentamethyl ether

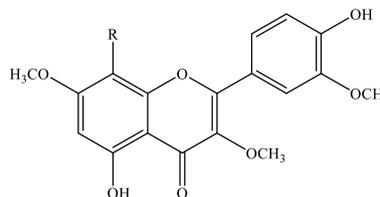
Abbildung 272: Flavonoide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VI

**Melicope ternata [112]**



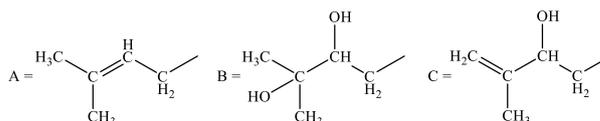
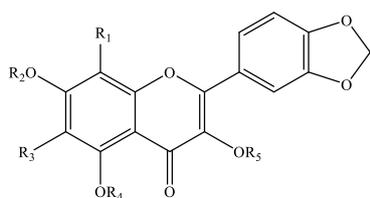
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
#288 Isokanugin	H	H	CH <sub>3</sub>
#289 Melisimplin	H	OCH <sub>3</sub>	H
#290 Melisimplexin	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#292 Meliternin	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#274 5-Demethylmelibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
#234 Melibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#257 Meliternatin	H	CH <sub>3</sub>
#294 5-Demethylmeliternatin	H	H



	R
#239 Pachypodol	H
#241 Ternatin	OCH <sub>3</sub>

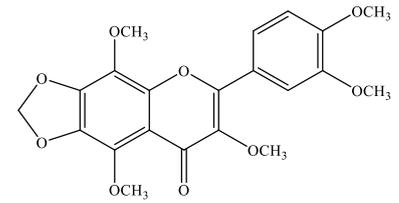
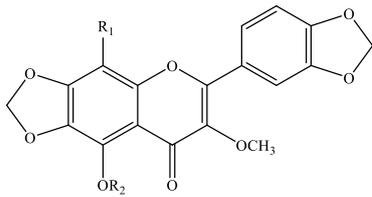
**Melicope triphylla [102,111,125,225,227,228,303]**



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
#295 5,7-Dihydroxy-3-methoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>
#296 3,5-Dihydroxy-7-methoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	H	CH <sub>3</sub>	H	H	H
#297 7-Hydroxy-3,5-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#298 5-Hydroxy-3,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
#299 5-Hydroxy-7-Methoxy-3',4'-methylenedioxy-3-prenyloxyflavon	H	CH <sub>3</sub>	H	H	A
#288 Isokanugin	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#300 3,5-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxy-7-[(2-hydroxy-3-methyl-3-buten-1-yl)oxy]-flavon	H	C	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#301 3,5-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxy-7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-flavon	H	B	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#289 Melisimplin	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#290 Melisimplexin	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#302 8-Hydroxy-3,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
#235 5,7-Dihydroxy-3,8-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>
#303 7-Hydroxy-3,5,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#304 3,5-Dihydroxy-7,8-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
#272 5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
#292 Meliternin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#305 5-Hydroxy-3,8-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxy-7-prenyloxyflavon	OCH <sub>3</sub>	A	H	H	H
#306 8-Methoxy-3',4'-methylenedioxy-7-prenyloxyflavon	OCH <sub>3</sub>	A	H	H	CH <sub>3</sub>
#307 3,5,8-Trimethoxy-3',4'-methylenedioxy-7-prenyloxyflavon	OCH <sub>3</sub>	A	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#308 3,5,8-Trimethoxy-3',4'-methylenedioxy-7-[(2-hydroxy-3-methyl-3-buten-1-yl)oxy]-flavon	OCH <sub>3</sub>	C	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#274 5-Demethylmelibentin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#291 3-Demethylmelibentin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
#234 Melibentin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

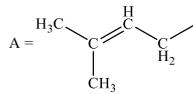
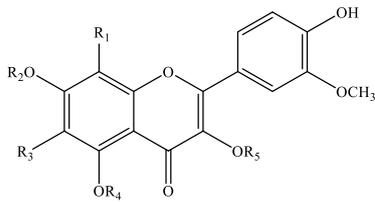
Abbildung 273: Flavonoide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VII

**Melicope triphylla [69,102,111,125,227,228,303]**

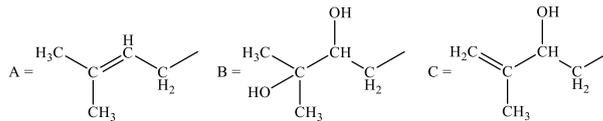
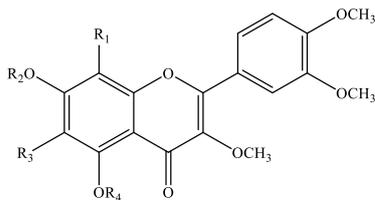


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
#257 Meliternatin	H	CH <sub>3</sub>
#262 8-Methoxymeliternatin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#309 5-Hydroxy-3,8-dimethoxy-6,7;3',4'-dimethylenedioxyflavon	OCH <sub>3</sub>	H

#310 Melicophylline

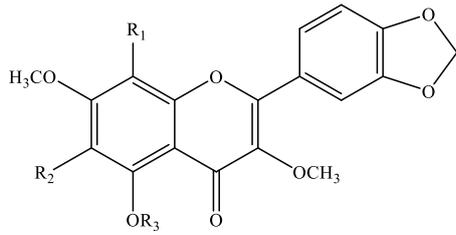


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
#232 Quercetin 3,3'-dimethylether	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>
#311 Quercetin 3,5,3'-trimethylether	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#239 Pachypodol	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
#312 Quercetin 3,5,7,3'-tetramethylether	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#313 4'-Hydroxy-3,5,3'-trimethoxy-7-prenyloxyflavon	H	A	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#314 7,4'-Dihydroxy-3,5,8,3'-tetramethoxyflavon	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#315 Gossypetin 3,8,3'-trimethyl ether	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>
#316 Gossypetin 7,8,3'-trimethyl ether	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
#241 Ternatin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
#317 4'-Hydroxy-3,5,7,8,3'-pentamethoxyflavon-	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#318 5,4'-Dihydroxy-3,6,7,8,3'-pentamethoxyflavon	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>

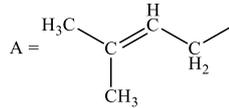
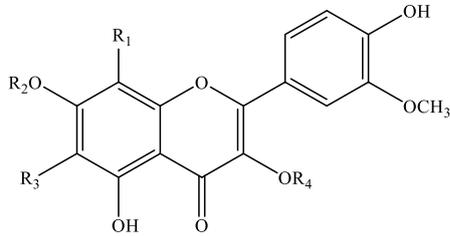


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
#268 Retusin	H	CH <sub>3</sub>	H	H
#319 3,5,7,3',4'-Pentamethylquercetin	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#320 3,5,3',4'-Tetramethoxy-7-prenyloxyflavon	H	A	H	CH <sub>3</sub>
#321 3,5,3',4'-Tetramethoxy-7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-flavon	H	B	H	CH <sub>3</sub>
#322 3,5,3',4'-Pentamethoxy-7-[(2-hydroxy-3-methyl-3-buten-1-yl)oxy]-flavon	H	C	H	CH <sub>3</sub>
#323 Gossypetin 3,8,3',4'-tetramethyl ether	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
#324 7-Hydroxy-3,5,8,3',4'-pentamethoxyflavon	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
#325 3,5,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavon	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
#326 3-Methoxynobletin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
#327 3,5,8,3',4'-Pentamethoxy-7-prenyloxyflavon	OCH <sub>3</sub>	A	H	CH <sub>3</sub>
#328 3,5,8,3',4'-Pentamethoxy-7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-flavon	OCH <sub>3</sub>	B	H	CH <sub>3</sub>
#329 3,5,8,3',4'-Pentamethoxy-7-[(2-hydroxy-3-methyl-3-buten-1-yl)oxy]-flavon	OCH <sub>3</sub>	C	H	CH <sub>3</sub>

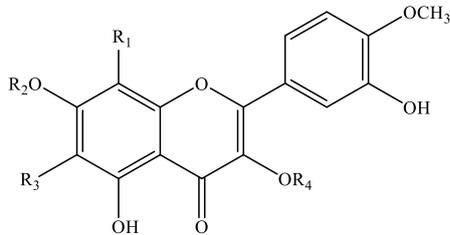
Abbildung 274: Flavonoide aus Species der Gattung *Melicope* – Teil VI



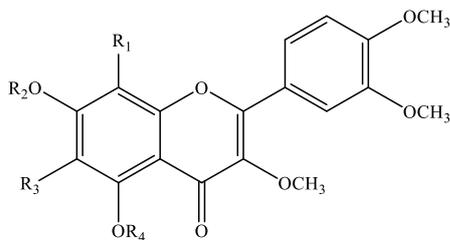
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>20 (#290)</b> Melisimplexin	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>9 (#274)</b> 5-Demethylmelibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>10 (#292)</b> Meliternin	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<b>11 (#234)</b> Melibentin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



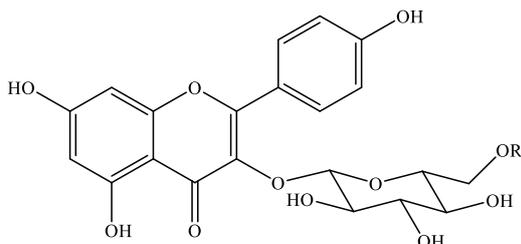
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>18 (#232)</b> Quercetin 3,3'-dimethylether	H	H	H	CH <sub>3</sub>
<b>19 (#247)</b> 5,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7-isoprenyloxyflavon	H	A	H	CH <sub>3</sub>
<b>16 (#318)</b> 5,4'-Dihydroxy-3,6,7,8,3'-pentamethoxyflavon	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



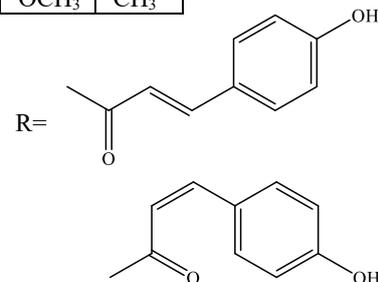
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>17 (#263)</b> 3'-Hydroxyflindulatin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<b>15</b> 5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
<b>12 (#271)</b> 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavon	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>13 (#264)</b> 5-Hydroxy-3,7,8,3',4'-pentamethoxyflavon	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
<b>14 (#325)</b> 3-Methoxynobiletin	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



**21 trans-Tilirosid**



**Abbildung 275:** Aus *M. barbiger* isolierte Flavonide

Das Quercetin (#242) selber, welches ein in der Natur sehr weit verbreitetes Flavonol darstellt, ist allerdings nur in *M. glabra* gefunden worden und auch sein 3-O-Glucosid (Isoquercitrin, #243), kommt außer in *M. glabra* nur noch in *M. micrococca* vor. Möglicherweise ist der Grund dafür, dass insgesamt noch zu wenige Arten bezüglich ihrer Inhaltsstoffe und insbesondere auch bezüglich des Vorkommens von Flavonoiden untersucht wurden.

Das am Häufigsten gefundene Flavonoid ist das 3,5,6,7,8-Pentamethoxy-3',4'-methylendioxyflavon (Melibentin, #234). Es ist in vier der fünf bisher untersuchten Arten aus der Section *Melicope* enthalten (s. Tabelle 44). In den Species der Section *Lepta* ist es bisher nur in *M. subunifoliolata* gefunden worden.

In der hier vorgelegten Arbeit konnte Melibentin (11) aus *M. barbiger*a auch isoliert werden. In *M. triphylla*, der zweiten bisher aus der Section *Pelea* untersuchten Species, ist Melibentin ebenfalls enthalten (s. Tabelle 44)

Mit Pachypodol (#239) und Meliternatin (#257) wurden zwei weitere Quercetinderivate jeweils 6-mal gefunden. Beide Verbindungen kommen in *M. triphylla* auch vor, konnten hier aus *M. barbiger*a jedoch nicht isoliert werden. Die Verbindungen Quercetin-3,3'-methylether (#232), Ternatin (#241), 5-Demethylmelibentin (#274) und Melisimplexin (#290) sind in fünf *Melicope* Species enthalten. Während alle vier Verbindungen in *M. triphylla* nachgewiesen werden konnten, ist Ternatin (#241) in *M. barbiger*a nicht enthalten (s. Tabelle 44). Insgesamt sind 7 der in *M. barbiger*a enthaltenen Flavonoide auch als Sekundärstoffe von *M. triphylla* beschreiben worden (Tabelle 44), was sich durch die Zugehörigkeit zur gleichen Section und die dadurch bedingte nahe Verwandtschaft erklären lässt. Leider ist mit *M. triphylla* bisher nur eine Pflanze aus dieser Sektion untersucht worden.

Die geringe Anzahl (20 von 247) der bisher hinsichtlich des Vorkommens von Flavonoiden untersuchten *Melicope* Arten, macht chemotaxonomische Überlegungen schwierig, da die Datenlage dafür sehr dünn ist. Hartley beschreibt in seiner im Jahre 2001 erschienen Arbeit, dass sich die Arten der Section *Melicope* zuerst aus *Euodia*-ähnlichen Vorfahren entwickelt haben. Die Section *Vitiflorae* erschien erst zu einem späteren Zeitpunkt, gefolgt von den jüngeren Sectionen *Pelea* und *Lepta*, die die jüngste Section darstellt. [203] Folgt man den Ausführungen von Waterman et al. (1983) zur Chemotoxonomie der Gattung *Acmadenia*, die zur gleichen Unterfamilie der Rutaceae gehört wie die Gattung *Melicope*, dann wäre das Kämpferol innerhalb der Flavonole die ursprüngliche Verbindung aus der alle anderen Flavonole nach Hydroxylierung und weiterer Substitution entstehen. [298] Durch eine Hydroxylierung an C-3' entsteht das Quercetin und davon leiten sich dann alle anderen

Quercetinderivate ab. In Tabelle 45 sind alle bisher auf Flavonoide untersuchten *Melicope* species mit den darin gefundenen Flavonoid-Strukturtypen dargestellt. Dass aus der Section Vitiflorae, der nach Hartley zweitältesten Sektion, bisher keine dazugehörige Pflanze untersucht wurde, ist für Überlegungen zur Chemotaxonomie ein großer Nachteil. Quercetinderivate finden sich in Species aus allen bisher untersuchten Sektionen. In der Tabelle 43 sind die 6,7- bzw. 3',4'-Methylendioxyderivate unter der Bezeichnung Methylendioxyflavonoide separat aufgeführt. Da es sich dabei auch um Quercetinderivate handelt, ist die Spalte nur dann markiert, wenn zusätzlich auch Quercetinderivate enthalten sind, die keine Methylendioxygruppe im Molekül enthalten. Alle sieben bisher untersuchten Pflanzen aus den Sektionen *Melicope* und *Pelea* enthalten solche Methylendioxyderivate (Tabelle 45), aber nur in zwei Arten aus der Sektion *Melicope* kommen auch die anderen Quercetinderivate vor. In *M. triphylla* und *M. barbiger*a sind Substanzen beider Strukturtypen enthalten. In der Sektion *Lepta* ist das Verhältnis umgekehrt. Bis auf *Melicope accendens*, deren Flavonoide aber auch nur mit Hilfe der LC/MS nachgewiesen wurden enthalten alle Species „normal“ substituierte Quercetinderivate, nur in *M. coodeana*, *M. glabra* und *M. subunifoliolata* sind Methylendioxyderivate des Quercetins enthalten.

Tabelle 44: Mehrfach in *Melicope*-Arten gefundene Flavonoide

	Kämpferol-Derivate	Quercetin-Derivate																				Isoflavonoide
		#252	#232	#234	#235	#239	#241	#243	#247	#248	#257	#261	#262	#263	#264							
<b>Section Melicope</b>																						
<i>M. broadbentia</i>				■																		
<i>M. indica</i>				■																		
<i>M. patulinervia</i>				■							■	■						■	■			
<i>M. simplex</i>									■									■	■	■	■	
<i>M. ternata</i>				■		■		■			■							■	■	■	■	
<b>Section Vitiflorae</b>																						
<b>Section Pelea</b>																						
<i>M. barbiger</i>			■	■														■	■		■	
<i>M. triphylla</i>			■	■														■	■	■	■	
<b>Section Lepta</b>																						
<i>M. accendens</i>																					■	
<i>M. borbonica</i>			■	■																		
<i>M. coodeana</i>					■																	
<i>M. denhamii</i>					■							■										
<i>M. elleryana</i>					■																	
<i>M. glabra</i>			■	■																		
<i>M. hookeri</i>																						
<i>M. latifolia</i>																						
<i>M. lumu-ankenda</i>			■																			
<i>M. madagascariensis</i>						■		■												■		
<i>M. micrococca</i>																				■		
<i>M. obscura</i>																				■		
<i>M. pteleifolia</i>																				■		
<i>M. subunifoliolata</i>				■																		

**Tabelle 45:** Bisher auf Flavonoide untersuchte *Melicope*-Arten und darin gefundene Strukturtypen

	Kämpferol derivate	Quercetin derivate	Methylen- dioxy- flavonoide	Flavanone	Flavan- onole	Isopren- Derivate	Flavone	Isoflavo- noide
<b>Section Melicope</b>								
<i>M. broadbentia</i>								
<i>M. indica</i>								
<i>M. patulinervia</i>								
<i>M. simplex</i>								
<i>M. ternata</i>								
<b>Section Vitiflorae</b>								
<b>Section Pelea</b>								
<i>M. barbigera</i>								
<i>M. triphylla</i>								
<b>Section Lepta</b>								
<i>M. accendens</i>								
<i>M. borbonica</i>								
<i>M. coodeana</i>								
<i>M. denhamii</i>								
<i>M. elleryana</i>								
<i>M. glabra</i>								
<i>M. hookeri</i>								
<i>M. latifolia</i>								
<i>M. lunu-ankenda</i>								
<i>M. madagascariensis</i>								
<i>M. micrococca</i>								
<i>M. obscura</i>								
<i>M. pteleifolia</i>								
<i>M. subunifoliolata</i>								

Die Sektion Lepta weist weitere Besonderheiten auf, denn nur in Pflanzen dieser Gruppe wurden vereinzelt Flavanone, Flavanonole, Flavone und Isoflavonoide gefunden. Nach Harborne et al. spricht das Auftreten von Flavonen für weiter entwickelte Pflanzen innerhalb einer Gattung, während Flavonole für weniger entwickelte Pflanzen sprechen. [304] Ob die Unterschiede im Substitutionsmuster auch bei dem Vergleich der Methylenedioxyderivate des Quercetins zu den anderen Verbindungen zu derartigen Überlegungen herangezogen werden können, bleibt fraglich, solange man die verantwortlichen Enzyme bzw. die für deren Bildung verantwortlichen Gene nicht kennt. Untersuchungen zu den für die Biosynthese der verschiedenen Flavonoide verantwortlichen Enzyme sind teilweise bereits durchgeführt worden. [305] Insbesondere bei den letzten Schritten in der Biosynthese eines speziellen Flavonoids, z.B. Hydroxylierungen und Methylierungen muss davon ausgegangen werden, dass individuellere Gene für die Steuerung dieser Prozesse verantwortlich sein könnten [306], wodurch die Unterschiede im Substitutionsmuster z.B. der Quercetinderivate dann nicht für phylogenetische Überlegungen herangezogen werden sollten.

Viele der Flavonoide aus der Gattung *Melicope* wurden erfolgreich auf ihre Zytotoxizität getestet. Wir konnten dies mit unseren Testsystemen nur für die Flavonoide **15** und **17** bestätigen. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um Derivate des Quercetins. Beide Verbindungen besitzen eine 3'-Hydroxy-4'-Methoxy-Substitution. Für beide Verbindungen konnte auch gezeigt werden, dass die Zytotoxizität über eine Beeinflussung der Caspase 3/7 ausgelöst wird. Die Quercetinderivate **15** und **17** sind die einzigen beiden Substanzen, die mit dieser Substitution des B-Rings aus *M. barbiger*a isoliert werden konnten. Offenbar ist diese Substitution essentiell für die Wirkung, denn alle anderen von uns getesteten Flavonoide zeigten keine zytotoxischen Eigenschaften in den von uns verwendeten Assays. Überraschenderweise war das an der C-7 Hydroxygruppe prenylierte Flavonoid **19** inaktiv. Wir hatten wegen der Erfahrungen mit C-prenylierten Flavonoiden aus unserer Arbeitsgruppe eine Verstärkung der Aktivität erwartet [16,24,25,76,77,189,190]. Möglicherweise sind O-prenylierte Flavonoide weniger aktiv als solche, die am Kohlenstoff substituiert sind, es kann aber auch sein, dass der Grund für die fehlende Aktivität in der Substitution des B-Rings zu suchen ist. Verbindung **17** besitzt eine 4'-Hydroxy-3'-Methoxy-substitution am B-Ring, genauso wie Verbindung **16**, das als Isomer von **15** ebenfalls inaktiv ist. Weitere Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen, insbesondere zu den prenylierten Verbindungen, wären wünschenswert.

Abschließend lässt sich festhalten, dass *Melicope barbiger*a viele interessante Inhaltsstoffe besitzt, die auch von pharmazeutischem Interesse sein können. Dies trifft insbesondere auf die Acetophenone und Chromene zu. Insgesamt gesehen wäre es wünschenswert, wenn weitere und insbesondere auch endemische Arten aus unterschiedlichen Ökosystemen hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe untersucht werden. Um chemotaxonomische Zusammenhänge zu erkennen, wäre es aber unerlässlich, dass nicht nur einzelne Verbindungen aus einer Stoffgruppe aus den Pflanzen isoliert und identifiziert werden, sondern dass möglichst viele Substanzen aus einer Stoffgruppe isoliert werden. Aus der Sektion *Pelea*, zu der *Melicope barbiger*a gehört, wurden bisher nur 4 Species auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Es wäre wünschenswert diese Anzahl wesentlich zu steigern. Dann wäre es möglich Cluster verwandter Pflanzen zu bilden und gleichzeitig mögliche Unterschiede in der Entwicklung endemischer Arten zu erkennen.

## 6 Experimenteller Teil

Für die vorliegende Arbeit werden zunächst die eingesetzten chromatographischen Methoden, erläutert und deren Anwendung dargestellt. Danach erfolgt die Darstellung der spektroskopischen Methoden, die zur Strukturaufklärung der isolierten Substanzen herangezogen wurden. Im Anschluss werden die durchgeführten Extraktionen und die Untersuchungen zur Bestimmung der Bioaktivität näher erläutert.

### 6.1 Chromatographische Methoden

#### 6.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie wurde für den Nachweis der in den gewonnenen Fraktionen enthaltenen Substanzen und für die Reinheitsprüfung der isolierten Substanzen verwendet. Zudem wird die DC verwendet, um ein geeignetes Fließmittelsystem für die weitere Auftrennung der Fraktionen mit Hilfe der Säulenchromatographie zu bestimmen. DC-Kieselgelplatten 60 F<sub>254</sub> von der Firma Merck wurden hierbei als stationäre Phase verwendet. Als Laufstrecke wurde 8 cm gewählt.

Abhängig vom jeweiligen Trennproblem sind folgende Fließmittelsysteme für die Dünnschicht- bzw. Säulenchromatographie getestet worden:

<u>Fließmittelsysteme:</u>	DC-1: n-Hexan / EtOAc	8:2
	DC-2: n-Hexan / EtOAc	6:4
	DC-3: n-Hexan / DCM / MeOH	5:4:1
	DC-4: n-Hexan / DCM / MeOH	6:4:0,5
	DC-5: n-Hexan / EtOAc / MeOH	6:4:0,5

Alle Fließmittelsysteme wurden im Vorfeld bzgl. ihrer Trennschärfe untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Fließmittelsystem DC-3 die besten Trenneigenschaften aufwies, weshalb DC-3 durchgehend für die Analytik und Bestimmung der isolierten Substanzen eingesetzt wurde.

Die mit dem Fließmittel befüllte DC-Kammer wurde nach Einfüllen für ungefähr 5 min stehengelassen, um eine Sättigung des Luftraums mit den Lösemitteldämpfen zu erreichen.

Nach der Entwicklung im entsprechenden Fließmittel wurde die DC-Platte im Warmluftstrom getrocknet. Danach wurde zunächst die Löschung des Fluoreszenzindikators bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$

der chromatographierten Verbindungen geprüft. Anschließend wurde bei  $\lambda = 365$  nm die Eigenfluoreszenz der Substanzen kontrolliert. Im Anschluss wurde mit einem geeigneten Sprühreagenz besprüht und wiederum getrocknet. Die Detektion der mit Naturstoffreagenz besprühten Platte erfolgte im UV-Licht bei  $\lambda = 366$  nm, die mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz besprühte Platte wurde nach Erhitzen auf der Heizplatte bei 105 °C im Tageslicht ausgewertet.

#### Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz

Für die Herstellung wurden 0,5 ml Anisaldehyd (Acros Chemicals), 10 ml Eisessig (VWR International) und 85 ml Methanol (VWR International) unter Zugabe von 5 ml Schwefelsäure 96% (technisch) in einem Eisbad vorsichtig gemischt und anschließend im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

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%-ige Lösung von Diphenylboryloxyethylamin (Carl Roth) in Methanol (technisch)

Lösung 2: 5%ige Lösung von Polyethylenglykol 400 (VWR International) in Ethanol (technisch)

Das Naturstoffreagenz A kann grundsätzlich zur Identifizierung von Flavonoiden eingesetzt werden. Andere Stoffgruppen reagieren zum Teil auch. Nach Besprühung mit Lösung 1 wurden die DC-Platten getrocknet im UV bei 365 nm und im Tageslicht kontrolliert, um zu prüfen ob die Entwicklung der entstehenden Farben vollständig abgeschlossen ist. Zur Fixierung der entstandenen Farben wurde Lösung 2 aufgesprüht.

Tabelle 46: R<sub>F</sub>-Werte der isolierten Verbindungen 1 - 27

Verb.	R <sub>F</sub> -Wert (DC-3)	Farbe nach Detektion mit Anisaldehyd/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Reagenz	Farbe nach Detektion mit Naturstoffreagenz A	
			UV-Licht (365 nm)	Tageslicht
1	0,56	orange	gelb fluoreszierend	gelb
2	0,83	orange-braun	gelb fluoreszierend	gelb
3	0,85	grau-blau	gelb-orange fluoreszierend	gelb
4	0,88	grau-blau	gelb-orange fluoreszierend	gelb
5	0,6	hell-braun	hell-blau	farblos
6	0,47	rot-braun	gelb fluoreszierend	gelb
7	0,47	rot-braun	gelb fluoreszierend	gelb
8	0,58	hellbraun	gelb fluoreszierend	gelb
9	0,6	rötlich orange	dunkel	gelb
10	0,6	rötlich orange	dunkel	gelb
11	0,51	rötlich orange	dunkel	gelb
12	0,56	rötlich orange	dunkel	gelb
13	0,56	rötlich orange	dunkel	gelb
14	0,5	rötlich orange	dunkel	gelb
15	0,41	rötlich orange	dunkel	gelb
16	0,41	rötlich orange	dunkel	gelb
17	0,44	rötlich orange	dunkel	gelb
18	0,35	rötlich orange	dunkel	gelb
19	0,45	rötlich orange	dunkel	gelb
20	0,47	rötlich orange	dunkel	gelb
21	0,28	rötlich orange	dunkel	gelb
22	0,28	violett	dunkel	gelb
23	0,41	blauviolett	hellblau	farblos
24	0,35	blauviolett	hellblau	farblos
25	0,43	blauviolett	hellblau	farblos
26	0,55	farblos	gelblich orange	farblos
27	0,31	farblos	bläulich	farblos

### 6.1.2 Flüssigchromatographie Sephadex

Sephadex, welches als Acronym für „Separation Pharmacia Dextran steht“, wird häufig als stationäre Phase für chromatographische Methoden verwendet [307]. Die Trennung an Sephadex wird auch als Gel-Filtration bezeichnet.

Das Sephadex Material für die Säulenchromatographie besteht aus hoch quervernetzten, porösen Dextranen, die unter Reaktion mit Epichlorhydrin hergestellt werden. Es resultieren verschiedene Sephadex Typen, die sich im Quervernetzungsgrad unterscheiden, was Einfluss auf das Quellvermögen und die Selektivität für spezifische Molekülgrößen hat. Durch die Quervernetzung der Monomere untereinander, besitzt Sephadex eine hohe physikalische als auch chemische Stabilität.

In der Biochemie werden beispielsweise zur Trennung von Proteinen Sephadex-Gele des Typs G verwendet. Diese besitzen jedoch keine große Bedeutung für die Naturstoffchemie. Eine wichtige stationäre Phase zur Trennung von Naturstoffen ist Sephadex LH-20. Dieses Sephadex ist im Unterschied zur Sephadex G an den Zuckereinheiten zusätzlich hydroxypropyliert. Aus diesem Grund erfolgt die Trennung mit Sephadex LH-20 nicht nur aufgrund der Molekülgröße, sondern auch durch die Verteilungskonstante der jeweiligen Verbindungen zwischen der stationären und mobilen Phase. Durch die Hydroxypropylierung kann Sephadex LH-20 sowohl mit lipophilen als auch hydrophilen mobilen Phasen benutzt werden. Die Wahl der stationären Phase beeinflusst allerdings das Quellvermögen von Sephadex LH-20, sodass daraus verschiedene Porengrößen resultieren.

Bei der säulenchromatographischen Trennung mit Sephadex LH-20 wurde Methanol (100 %, technisch, zur Reinigung 1x über eine Kolonne destilliert) als mobile Phase verwendet. Als Fraktionskollektor wurde der IKB Pharmacia S100 verwendet.

### 6.1.3 Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC, englisch für “High Performance Liquid Chromatography”, deutsch „Hochleistungsflüssigchromatographie“, ist ein chromatographisches Verfahren, welches sich je nach Ausstattung flexibel einsetzen lässt. Der generelle Aufbau der HPLC ist bei allen Systemen gleich. Zu der Mindestausstattung zählen Pumpe, Säule und Detektor. Die Wahl von Pumpe, Säule und Detektor entscheidet über die Ausrichtung der HPLC für analytische oder präparative Zwecke. Detektiert wird zumeist mit einem UV/VIS-Detektor, der die Substanzen

aufgrund ihrer Eigenschaften in diesem Bereich bestimmen lässt. Stoffe die weder im UV- noch in sichtbaren Bereich des Lichtes absorbieren sind nur detektierbar, wenn ein anderes Verfahren verwendet wird, das andere Eigenschaften der Stoffe ausnutzt, wie die elektrochemische Detektion (ECD), die Messung des Brechungsindex oder die Massenspektrometrie.

In dieser Arbeit wurde sowohl die analytische als auch die semi-präparative HPLC verwendet. Die analytische HPLC ist für kleine Probenmengen pro Injektion (bis zu 0,5 mg pro Injektion) ausgelegt mit dem Ziel die Identität sowie die Reinheit der Probe zu bestimmen. Daher werden vorzugsweisen kleine, kurze Säulen mit geringem Durchmesser verwendet. Da bei der herkömmlichen HPLC mit einen UV/VIS oder DAD-Detektor nicht alle Substanzen detektiert werden, ist es nicht möglich Verunreinigungen ohne Chromophor zu identifizieren.

### **Analytische HPLC**

In der vorliegenden Arbeit wurde die analytische HPLC mit diesen Parametern verwendet:

Dionex P580-System mit DAD-Detektor (UVD340S)

Säule: Eurospher 100 C<sub>18</sub> (10µm, Fa. Knauer), 125mm x 4mm

### **Standard-HPLC Programm mit einer Flussrate von 1 ml/min**

Zeit [min]	Wasser + 0,1 % Ameisensäure [%] [v/v]	Methanol [%] [v/v]
0	90	10
5	90	10
35	0	100
40	0	100
55	90	10
60	90	10

**Tabelle 47:** Retentionszeiten der aus *M. barbiger*a isolierten Verbindungen

Verbindung	Retentionszeit [min]
<b>1</b>	26,88
<b>2</b>	33,90
<b>3</b>	30,83
<b>4</b>	34,54
<b>5</b>	21,64
<b>6</b>	33,25
<b>7</b>	33,25
<b>8</b>	17,93
<b>9</b>	32,46
<b>10</b>	32,46
<b>11</b>	31,13
<b>12</b>	32,37
<b>13</b>	32,13
<b>14</b>	28,23
<b>15</b>	29,59
<b>16</b>	29,59
<b>17</b>	28,01
<b>18</b>	25,77
<b>19</b>	35,80
<b>20</b>	30,09
<b>21</b>	22,23
<b>22</b>	22,23
<b>23</b>	19,97
<b>24</b>	26,82
<b>25</b>	24,58
<b>26</b>	23,88
<b>27</b>	27,50

### Semi-präparative HPLC

Diese Methode wurde in dieser Arbeit ausschließlich für präparative Zwecke verwendet.

Folgende Konfiguration wurde für die Semi-präparative HPLC verwendet:

Lachrom-Merck Hitachi System: Pumpe L7100, UV Detektor L7400

Säule: Eurospher 100 C-18 (10 $\mu$ M, Fa. Knauer), 300x8mm

Das bei der analytischen HPLC erhaltene Chromatogramm wurde als Orientierung für die Entwicklung eines Programmes für die Semi-präparative HPLC genutzt. Pro Injektion betrug die Menge an zu trennendem Gemisch, je nach Verhalten auf der Säule, bis zu 3 mg. Bei allen präparativen Isolationsschritten wurde eine Flussrate von 5 ml/min verwendet.

Für alle Fraktionen wurde zunächst folgender Gradient verwendet (Standardprogramm) verwendet, um die tatsächliche Retentionszeit im Zusammenhang mit der Methanolkonzentration zu bestimmen.

Zeit [min]	Wasser + 0,1% Ameisensäure [%] [v/v]	Methanol [%] [v/v]
0	90	10
20	0	100
25	0	100
30	90	10

Im Anschluss daran wurden die Gradienten für die einzelnen Trennprobleme entsprechend angepasst.

**Verwendetes HPLC Programm (Acetophenone):**

Zeit [min]	Wasser+ 0,1% Ameisensäure [%] [v/v]	Methanol [%] [v/v]
0	30	70
1	30	70
30	0	100

**Verwendetes HPLC Programm (Flavonoide):**

Zeit [min]	Wasser+0,1 % Ameisensäure [%] [v/v]	Methanol [%] [v/v]
0	65	35
1	65	35
15	0	100

**Verwendetes HPLC Programm (Furanocumarine):**

Zeit [min]	Wasser+0,1%Ameisensäure [%] [v/v]	Methanol [%] [v/v]
0	50	50
15	0	100
20	0	100

#### 6.1.4 Vakuum-Flüssig-Chromatographie (VLC)

Die Vakuum-Flüssig-Chromatographie, im Englischen auch als „Vacuum Liquid Chromatography (VLC)“ bekannt, gehört zu den Methoden der Säulenchromatographie, welche eine schnelle und effiziente Auftrennung von Verbindungen aufweist. [308]

Die VLC-Säule besteht aus einem Büchner Trichter in Kombination mit einem Adapter, worin die stationäre Phase eingebettet wird. [309] Das Vakuum dient dazu das Fließmittel durch die stationäre Phase zu ziehen. Das Verhältnis aus Probe zu stationärer Phase liegt typischerweise zwischen 1:30 bis zu 1:300. [309] Geringere Verhältnisse wie 1:5 oder 1:10 können ebenfalls verwendet werden. [310] Mithilfe der VLC können sowohl große als auch kleine Extraktmengen in verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden. Je nach Extrakt wird ein geeignetes Elutionsschema mit verschiedenen Lösungsmitteln gewählt. Fällt die Wahl der stationären Phase auf Kieselgel wird die mobile Phase mit zunehmender Zahl der Fraktionen polarer. [311]

In dieser Arbeit wurden 95 g des Dichlormethan-Rohextraktes zur weiteren Fraktionierung auf eine VLC-Säule mit 150 g Kieselgel als stationärer Phase aufgetragen. Die Zusammensetzung der mobilen Phase und die damit verbundene Gewinnung der Fraktionen I – XII ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 48:** VLC-Fractionen

<b>Fraktion</b>	<b>% n-Hexan [v/v]</b>	<b>% Ethylacetat [v/v]</b>
I	100	-
II	95	5
III	90	10
IV	85	15
V	75	25
VI	65	35
VII	55	45
VIII	50	50
IX	25	75
X	0	100
<b>Fraktion</b>	<b>% Methanol [v/v]</b>	<b>% Dichlormethan [v/v]</b>
XI	50	50
XII	100	0

### 6.1.5 Säulenchromatographie

Das Prinzip ähnelt der VLC, es wird aber kein Unterdruck zur beschleunigten Separation verwendet. Die Chromatographie erfolgt über die Schwerkraft mit dem Elutionsmittel, die Trennung, wie bei der VLC durch unterschiedlich starke Adsorption der Substanzen an die stationäre Phase. Bei der normalen Säulenchromatographie beträgt das Verhältnis aus stationärer Phase und der zu trennenden Fraktion normalerweise 1:100. Als stationäre Phase wurde für die vorliegende Arbeit Kieselgel 60 von Merck mit einer Korngröße von 0,2 – 0,5 mm verwendet.

Die zu trennende Fraktion wird in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und zunächst mit einer ausreichenden Menge Kieselgel verrieben. Anschließend wird die Probe getrocknet und auf die mit Kieselgel gefüllte Säule aufgetragen (= trockene Einbringmethode). Das zu verwendende Fließmittel wird über das Trennverhalten der Fraktion mit Hilfe von vorgeschalteten Dünnschichtchromatogrammen ermittelt.

## 6.2 Spektroskopische Methoden

### 6.2.1 Flüssigchromatographie / Massenspektroskopie

Die Massenspektren wurden mit Hilfe des Thermo Finnigan LCQ Deca XP LC/MS-Gerätes generiert. Hochauflösende Massenspektren wurden von einer FT-ICR-Orbitrap (ThermoFisher) LC/MS-Anlage erhalten. Die zu bestimmende Verbindung (0,5mg/ml) wurde in HPLC-Methanol gelöst. Zur Aufnahme einfacher ESI-Massenspektren wurden die Proben direkt injiziert (Direkteinlass), während Proben zum Erhalt hochauflösender Massenspektren durch eine vorgeschaltete UHPLC (Agilent Systems) mit einer UHPLC-Säule von Supelco (C18, 2,0  $\mu\text{m}$  2.1 x 50 mm) aufgereinigt wurden (LC-HRESIMS-System). Als mobile Phase dienten Wasser/Acetonitril-Gemische. Die Konzentration des Acetonitrils betrug anfangs 0% und wurde während des 10-minütigen Laufes auf 100% bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min erhöht. Nach einer Injektion wurden die Daten mittels Bruker Compass Software bearbeitet und die möglichen Massenpeaks eruiert.

Mit dem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer TSQ 7000 der Firma Finnigan MAT wurden die jeweiligen EI-Spektren aufgenommen. Dieses Verfahren kann gewählt werden, wenn viele Fragmente identifiziert werden sollten, da Elektronenstoßionisation im Gegensatz zum Elektronensprayionisation energiereicher ist.

### 6.2.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Für die Aufnahme der NMR-Spektren wurden folgende NMR-Spektrometer verwendet:

- Bruker ARX 300, 300 MHz NMR-Spektrometer
- Bruker ARX 500, 500 MHz NMR-Spektrometer
- Bruker AVANCE DMX 600, 600 MHz NMR-Spektrometer

Deuterierte Lösemittel von der Firma Sigma-Aldrich und Deutero kamen zum Einsatz. Zunächst wurde die zu messende Verbindung im Gefriertrockner von Martin Christ bei  $-70^{\circ}\text{C}$  über Nacht getrocknet. Danach wurde die Verbindung in ca. 300  $\mu\text{l}$  deuteriertem Lösungsmittel gelöst und in ein sauberes NMR-Röhrchen überführt. Um eine Füllhöhe von ca. 3,5 cm im NMR-Röhrchen zu erreichen, wurde mit dem deuterierten Lösungsmittel aufgefüllt. Die Bearbeitung sowie Auswertung der Spektren erfolgte mit MNOVA-10 von Mestrelab Research, Spanien. Zur Kalibrierung der einzelnen erhaltenen Spektren wurde das jeweils verwendete Lösungsmittel verwendet. Die Shiftwerte wurden der bereitgestellten Lösemittelbibliothek von MNOVA entnommen.

### 6.2.3 Mosher-Methode

Die Herstellung der (R)- und (S)-MTPA ( $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluormethylphenyllessigsäure) von **1** und **5** wurde gemäß der Methode von Ohtani et al. durchgeführt. [312] Jeweils zwei Proben von **1** und **5** (0,8 mg pro Verbindung) wurden 0,75 ml Pyridin- $d_5$  gelöst und in einer Probe wurde (R)-MTPA und in der anderen Probe (S)-MTPA unter Argon-Atmosphäre, um Oxidation zu vermeiden, hinzugefügt. Danach wurde bei 20°C für 8 h equilibriert. Im Anschluss wurde eine semipräparative HPLC durchgeführt und  $^1\text{H-NMR}$  Spektren aufgenommen. Für die semipräparative HPLC wurde folgendes Programm verwendet: (MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ ; 0–2 min 40:60, 2–20 min, 100:0) [186]

### 6.2.4 Optische Drehung

Zur Bestimmung des optischen Drehwertes bei chiralen Verbindungen wurde ein PerkinElmer-241 MC Polarimeter verwendet. Dabei wurde die spezifische Drehung  $[\alpha]$  bei 20° und bei  $\lambda = 589$  nm (Natriumlampe) gemessen. Die Schichtdicke der Quarzküvette betrug 1 mm, Das eingesetzte Probenvolumen betrug jeweils 350  $\mu\text{l}$ . Es wurden Lösemittel in UV-VIS Qualität benutzt. Zur Kontrolle der Funktionalität des Polarimeters wurde zuerst eine Messung nur mit Methanol und anschließend mit einer 1% Rutinlösung in Methanol durchgeführt.

### 6.2.5 UV-VIS-Spektroskopie

Die UV Spektren der einzelnen Verbindungen wurden einerseits mit dem Dionex P580 System mit DAD Detektor, UV340S und andererseits mit der Freedom EVO von Tecan aufgenommen. Insbesondere die Verschiebungen der UV-Spektren der isolierten Flavonoide mittels Shift Reagenzien wurden damit untersucht.

Damit die Verbindungen frei von allen Lösungsmitteln waren, wurden diese zunächst gefriertrocknet, um anschließend mit Methanol (UV/VIS-Qualität) eine 1 mg/ml Stammlösung herzustellen. Diese Lösungen wurden jeweils 1:100 mit Methanol (UV/VIS-Qualität) verdünnt. Die frisch hergestellten Lösungen wurden in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Messungen der Absorption wurden mit Hilfe einer 96 Wells Platte durchgeführt. Für jedes Flavonoid wurde wie folgt vorgegangen:

- |                    |  |
|--------------------|--|
| 1 x 100 µl         | Stammlösung rein, Verdünnung (1:100)   |
| 1 x 100 µl + 10 µl | Aluminiumchlorid-Lösung (0,05g/ml in Methanol)   |
| 1 x 100 µl + 10 µl | Aluminiumchlorid-Lösung (0,05g/ml in Methanol) danach erfolgt eine Zugabe von 10 µl Salzsäure (25,0 ml konz. Salzsäure ad 50,0 ml) |
| 1 x 100 µl + 10 µl | Natriummethylat-Lösung (0,025 g/ml in Methanol)  |

Die Anwendung von Natriumacetat als Shift-Reagenz war aufgrund der Sedimentbildung nicht möglich, weil der Lichtstrahl von unten nach oben durch die 96 Wells Platte ging und Sedimente das Licht streuen würden.

### 6.3 Eingesetzte Chemikalien

Für die verschiedenen chromatographischen Methoden wurden Lösungsmittel in „technischer Qualität“ verwendet, vom zentralen Chemikalienlager der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen wurden. Ethylacetat für die Chromatographie wurde als analytische Ware bezogen. Vor Verwendung wurden die technischen Lösungsmittel zweifach destilliert. Für die HPLC/MS wurde Lösungsmittel in HPLC Grade Quality/MS Quality verwendet. Für spektroskopische Methoden wie NMR wurde deuteriertes Lösungsmittel (Acros Organics, Merck, VWR International) verwendet. Zur Bestimmung des optischen Drehwertes kam Lösungsmittel zur Spektroskopie zum Einsatz.

Die folgende Übersicht zeigt die verwendeten Chemikalien und deren Qualität:

Acetonitril	HPLC-grade, VWR International
Dichlormethan	technische Ware, 2x destilliert
Ethylacetat	zur Analyse, VWR International
Methanol	technische Ware, 2x destilliert HPLC grade, VWR international, Honeywell
n-Hexan	technische Ware, 2x destilliert

### Stationäre Phasen

Kieselgel	MN 60M, 0,04-0,063 mm, Merck Darmstadt
Kieselgel für DC	Silica Gel 60, F <sub>254</sub> , 20x20 cm, Merck Darmstadt
Sephadex LH20	GE-Healthcare

### Sprühreagenzien

Naturstoffreagenz A:

1,0 g Diphenylborylethylamin in 100,00 ml Methanol gelöst

Anisaldehyd-Reagenz:

10,00 ml Eisessig (min. 98%), 85,00 ml Methanol und 5,00ml konzentrierte Schwefelsäure werden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit NS 29/32 Schliff gemischt danach erfolgt die Zugabe von 0.5g Anisaldehyd.

### Shiftreagenzien

Zur Bestimmung der UV-Spektren und deren Beeinflussung durch verschiedene Mittel wurden folgende Reagenzien verwendet.

Aluminiumchlorid	Qualität: zur Synthese, Merck Darmstadt, 5g Aluminiumchlorid wurden (wasserfrei) in 100 ml Methanol gelöst
Natriummethylat:	Qualität: zur Synthese, Acros Chemicals; 5,95g Natriummethylat (entspricht 2,5g Natrium pro 100ml) wurden in Methanol gelöst
Salzsäure	Qualität: zur Analyse, Merck Darmstadt, 50,00 ml konzentrierte Salzsäure wurde in Nanopure Wasser zu 150,00 ml verdünnt

Alle Lösungen wurden frisch hergestellt und im Kühlschrank dunkel aufbewahrt.

### Weitere Reagenzien

Argon	Messer Group
(R) und (S)-MTPA)	Acros Organics

#### 6.4 Pflanzenmaterial

Das in dieser Arbeit untersuchte Pflanzenmaterial wurde aufgrund der Zusammenarbeit mit Dr. Marc Appelhans, Institut für Systematik, Biodiversität und Evolution der Pflanzen mit Herbarium, Georg-August-Universität Göttingen, 37073 Göttingen und Kenneth R. Wood (National Tropical Botanical Garden, Kalaheo, Kaua'i, USA) von Kenneth Wood in Kaua'i (Hawaii) gesammelt. Die Pflanzen wurden von ihm als *Melicope barbiger* A. Gray identifiziert. Ein Belegexemplar ist im Herbarium des National Tropical Botanical Garden, USA unter dem Barcode Ken hinterlegt (Voucher Nr.: PTBG1000062417). Das zu untersuchende Material bestand aus den getrockneten Blättern, von denen 1 Kilogramm zur Verfügung stand.

#### 6.5 Extraktion und Fraktionierung des Dichlormethan- und Methanolextraktes

Die getrockneten Blätter von *Melicope barbiger* A. Gray (1 kg) wurden pulverisiert und mit Dichlormethan erschöpfend (ca. 48 h) mittels Soxhletverfahren extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, resultierten 150 g eines schwarzen, sehr zähen Extraktes. Die erneute Extraktion (ca. 40 h) des Drogenmaterials mit Methanol ergab 110 g eines ebenfalls schwarzen, zähen, methanolischen Extraktes.

95 g des Dichlormethanextraktes wurden mit Kieselgel (q.s.) verrieben und nach erfolgter Trocknung auf eine zuvor mit ca. 95 g Kieselgel präparierte VLC-Säule aufgetragen. Als mobile Phase wurde ein Gradientengemisch aus Hexan und Ethylacetat verwendet, wobei die Polarität durch Erhöhung des Anteils an Ethylacetat bei jedem Trennungsschritt gesteigert wurde. Nach Erreichen von 100 % Ethylacetat wurde die Säule mit Methanol/Dichlormethan 50:50 und danach mit Methanol (100%) gespült. Dabei wurde die Fraktionen XI und XII gebildet (Tabelle 49).

**Tabelle 49:** VLC- Fraktionierung des Dichlormethanextraktes (MB.D)

<b>VLC-Fraktion</b>	<b>Menge [g]</b>	<b>n-Hexan v/v [%]</b>	<b>Ethylacetat v/v [%]</b>
MB.D-I	2,42	100	0
MB.D-II	6,42	95	5
MB.D-III	8,58	90	10
MB.D-IV	8,07	85	15
MB.D-V	4,61	75	25
MB.D-VI	9,45	65	35
MB.D-VII	8,83	55	45
MB.D-VIII	5,07	50	50
MB.D-IX	4,60	25	75
MB.D-X	2,50	0	100
<b>VLC-Fraktion</b>	<b>Menge [g]</b>	<b>Methanol v/v [%]</b>	<b>Dichlormethan v/v [%]</b>
MB.D-XI	4,60	50	50
MB.D-XII	5,20	100	0

Bei der Fraktionierung ergab sich ein Verlust an Masse in Höhe von 24,65 g  $\cong$  25,94 % ausgehend von der eingesetzten Menge für die VLC. Nachfolgernd werden nur VLC-Fraktionen beschrieben, die weiterbearbeitet wurden.

### Fraktion MB.D-II

Die Fraktion MB.D-II wurde an einer Sephadex-LH20-Säule mit Methanol (100%) über Nacht aufgetrennt. Insgesamt konnten die erhaltenen Eluate nach DC-Kontrolle mit dem Fließmittel DC-3 in sieben Subfraktionen einteilt werden. In Subfraktion II.5 konnten nach Beendigung der Sephadex-Trennung bereits Kristalle gefunden werden. Im Dünnschichtchromatogramm der Unterfraktion MB.D-II.5 fanden sich zwei Substanzflecke bei den  $R_f$ -Werten 0,56 und 0,88. Zur Trennung der beiden Substanzen wurde eine semipräparative HPLC durchgeführt, mit deren Hilfe beide Substanzen rein erhalten werden konnten. Die Verbindung mit dem  $R_f$ -Wert von 0,56 konnte als **Alloevodionol (3)** identifiziert werden. Die andere rein isolierte Verbindung ( $R_f$ -Wert 0,88) wurde als **Melibarbichromen (4)** identifiziert.

**Tabelle 50:** Subfraktionen der VLC-Fraktion **MB.D-II**

Eluate-Nr.	Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
14 - 26	MB.D-II-1	1,84	
27 - 33	MB.D-II-2	0,49	
34 - 47	MB.D-II-3	0,35	
48 - 57	MB.D-II-4	1,43	
58 - 65	MB.D-II-5	0,91	<b>3; 4</b>
66 - 80	MB.D-II-6	0,33	
81 - Ende	MB.D-II-7	0,48	
	Gesamt	6,31	

### Fraktion MB.D-III

Die Fraktion III (8,58 g) wurde in Methanol (100 %) gelöst und ebenfalls an einer Sephadexsäule mit Methanol aufgetrennt. Es resultierten insgesamt 13 Subfraktionen III-1 bis III-13. Nach DC-Kontrolle mittels Fließmittel DC-3 wurde aufgrund eines deutlichen Substanzflecks bei  $R_f = 0,78$  in der Subfraktion III.10 (0,54 g) beschlossen, diese Substanz mit Hilfe einer semipräparativen HPLC zu gewinnen. Nach erfolgter Aufreinigung und Einengung des Eluates resultierte eine hellbraune, ölige Substanz. Die von dieser Substanz aufgenommenen NMR-Spektren zeigten, dass es sich nicht um eine Substanz, sondern um ein Gemisch zweier isomerer Verbindungen, der **Melifolione A (6)** und **B (7)** handelte.

**Tabelle 51:** Subfraktionen der VLC-Fraktion **MB.D-III**

Eluate-Nr.	Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
1-12	MB.D-III-1	0,46	
13-19	MB.D-III-2	0,55	
20-29	MB.D-II-3	0,36	
30-35	MB.D-III-4	0,29	
38-46	MB.D-III-5	0,15	
50-60	MB.D-III-6	0,65	
61-63	MB.D-III-7	0,32	
64-76	MB.D-III-8	0,84	
77-84	MB.D-III-9	0,74	
85-123	MB.D-III-10	0,54	<b>6 + 7</b>
124-149	MB.D-III-11	0,75	
150-170	MB.D-III-12	0,84	
171-181	MB.D-III-13	0,86	
	Gesamt	6,86	

### Fraktion MB.D-IV

Die Fraktion IV (8,07 g) wurde in Methanol gelöst und wie bei den zuvor beschriebenen Fraktionen an Sephadex LH-20 aufgetrennt. Nach DC-Kontrolle mit Fließmittelsystem DC-3 konnten die Eluate in insgesamt 14 Subfraktionen (IV-1 – IV-14) eingeteilt werden. Bei der Auswertung der DC-Chromatogramme der gebildeten Fraktionen zeigte sich, dass die in Subfraktionen IV-8 und IV-10 eine gute Auftrennung der enthaltenen Substanzen im Fließmittelsystem DC-3 zeigten. Deshalb wurde die weitere Auftrennung an einer Kieselgelsäure durchgeführt. Für die Säulenchromatographie wurde das Fließmittel etwas angepasst und ein Gemisch aus 6 Teilen n-Hexan und 4 Teilen Methanol verwendet. Dies führte bei beiden Subfraktionen zu einer besseren Auftrennung.

Nach DC-Kontrolle konnte die Subfraktion IV.8 in vier weitere Subfraktionen IV.8-1 bis IV.8-4 aufgetrennt werden. Die Subfraktion IV.8-3 zeigte in der DC einen vielversprechenden Substanzfleck ( $R_f = 0,56$ ), der durch anschließende Reinigung mittels semipräparativer HPLC rein gewonnen werden konnte. Die Strukturaufklärung mittels NMR ergab, dass es sich um einen neuen Naturstoff handelte, für den wir den Namen **Melibarbinon A (1)** vorgeschlagen haben.

Die Subfraktion IV.10 konnte in insgesamt 4 weitere Fraktionen (IV.10-1 bis IV.10-4) aufgetrennt werden. Die Fraktion IV-10-4 zeigte in der DC mit dem, für die Trennung an der Kieselgelsäule verwendeten Fließmittelsystem zwei Substanzflecke bei  $R_f = 0,44$  und  $R_f = 0,83$ . Mittels semipräparativer HPLC (s. Kapitel) konnten die beiden Verbindungen getrennt werden. Die spektroskopische Untersuchung mit MS und NMR ergab, dass es sich ebenfalls um zwei bisher noch nicht in der Literatur beschriebene Verbindungen handelte. Für diese beiden Substanzen schlagen wir die Trivialnamen **Melibarbinon B (2)** und **Melibarbichromen B (5)** vor.

**Tabelle 52:** Subfraktionen der VLC-Fraktion MB.D-IV

Eluate-Nr.	Fraktion	Menge [g]
1-20	MB.D-IV-1	1,11
20-38	MB.D-IV-2	0,87
39-53	MB.D-IV-3	0,44
55-69	MB.D-IV-4	0,24
70-100	MB.D-IV-5	0,09
101-120	MB.D-IV-6	0,81
121-140	MB.D-IV-7	1,21
141-159	MB.D-IV-8	0,57
160-165	MB.D-IV-9	0,03
166-176	MB.D-IV-10	0,74
180-199	MB.D-IV-11	0,37
200-210	MB.D-IV-12	0,87
211-215	MB.D-IV-13	0,29
216-226	MB.D-IV-14	0,36
	Gesamt	7,995

**Tabelle 53:** Weitere Auftrennung von Fraktion MB.D-IV-8 mittels Kieselgelsäule

Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
MB.D-IV-8-1	0,085	
MB.D-IV-8-2	0,04	
MB.D-IV-8-3	0,061	<b>1</b>
MB.D-IV-8-4	0,225	

**Tabelle 54:** Weitere Auftrennung von Fraktion MB.D-IV-10 mittels Kieselgelsäule

Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
MB.D-IV-10-1	0,14	
MB.D-IV-10-2	0,0089	
MB.D-IV-10-3	0,32	
MB.D-IV-10-4	0,15	<b>2, 5</b>

### Fraktion MB. D-V

Die Fraktion V wurde – wie die anderen vorherigen Fraktionen nach erfolgter DC-Kontrolle – an einer Sephadexsäule in 11 weitere Subfraktionen aufgetrennt (V-1 bis V-11). Anschließend wurde mit den beiden Subfraktionen V-3 und V-4. weitergearbeitet. Die Subfraktion V-3 zeigte neben weiteren scheinbar nicht gut aufgetrennten Substanzen bei einem  $R_f$ -Wert von 0,76 einen klaren Substanzfleck, sodass diese Fraktion mittels semipräparativer HPLC weiter aufgereinigt wurde. Dies führte zur Isolierung und Identifizierung des Flavonoids **7-Isopentenyl-3,3'-dimethylquercetin (19)**.

Auch die Subfraktion V-4. zeigte in der DC einen deutlichen Substanzfleck bei  $R_f$ -Wert = 0,6, sodass ebenfalls eine semipräparative HPLC zur weiteren Aufreinigung durchgeführt wurde. Dabei konnte ein Gemisch aus den beiden Flavonoiden **5-Hydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon** und **5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon (9+10)** gewonnen werden. Eine weitere Trennung der beiden Substanzen gelang leider nicht.

**Tabelle 55:** Subfraktionen der VLC-Fraktion **MB.D-V**

Eluate-Nr.	Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
1-38	MB.D-V-1	0,952	
39-70	MB.D-V-2	1,342	
71-86	MB.D-V-3	0,128	<b>19</b>
87-94	MB.D-V-4	0,487	<b>Gemisch 9+10</b>
95-101	MB.D-V-5	0,198	
102-128	MB.D-V-6	0,434	
129-138	MB.D-V-7	0,021	
139-149	MB.D-V-8	0,316	
150-176	MB.D-V-9	0,188	
177-210	MB.D-V-10	0,194	
211-222	MB.D-V-11	0,085	
	Gesamt	4,345	

### Fraktion MB.D-VI

Auch diese Fraktion wurde säulenchromatographisch an Sephadex-LH 20 aufgetrennt. Nach DC-Kontrolle mit dem Fließmittelsystem DC-3 wurden sieben Subfraktionen VI-1 bis VI-7 gebildet. Aufgrund der guten Trennung im DC wurde Fraktion VI-5 an Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch aus n-Hexan:Ethylacetat:Methanol (6:4:1) weiter aufgetrennt. Nach DC-Kontrolle der Eluate mit demselben Fließmittel, resultierten vier Fraktionen. Die Fraktion VI.5-3 zeigte bei DC-Kontrolle einen Substanzfleck mit einem  $R_f$ -Wert von 0,55. Nach semipräparativer HPLC und nachfolgender Strukturaufklärung der Reinsubstanz, konnte gezeigt werden, dass es sich um das **Isopimpinellin (26)** handelt.

Ein Anteil der Subfraktion VI-6. wurde ebenfalls mit semipräparativer HPLC weiter aufgereinigt, was zur Isolierung des Flavonoids **5-Hydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon (9)** führte.

**Tabelle 56:** Subfraktionen der VLC-Fraktion **MB.D-VI**

Eluate-Nr.	Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
1-24	MB.D-VI-1	1,214	
29-48	MB.D-VI-2	0,967	
51-70	MB.D-VI-3	0,858	
71-84	MB.D-VI-4	1,191	
85-107	MB.D-VI-5	1,032	
108-133	MB.D-VI-6	1,245	<b>9</b>
134-142	MB.D-VI-7	1,994	
	Gesamt	8,501	

**Tabelle 57:** Weitere Auftrennung von Fraktion **MB.D-VI-5** mittels Kieselgelsäule

Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
MB.D-VI-5-1	0,242	
MB.D-VI-5-2	0,178	
MB.D-VI-5-3	0,137	<b>26</b>
MB.D-VI-5-4	0,351	

### Fraktion MB.D-VII

Nach erfolgter Auftrennung an einer Sephadex-Säule mit Methanol konnten insgesamt 15 Subfraktionen VII-1 bis VII-15 gebildet werden. Nach DC-Kontrolle (Fließmittelsystem DC-3) wurden die Subfraktionen VII-6 und VII-9 ausgewählt und säulenchromatographisch an Kieselgel (n-Hexan: Ethylacetat: Methanol (6:4:1)) weiter aufgetrennt. Sowohl aus der Fraktion VII.6 als auch VII.9 wurden dabei 6 weitere Unterfraktionen gebildet.

Die Fraktionen VII-6-4 und VII-6-6 zeigten jeweils einen Substanzfleck, deren Rf-Werte ähnlich waren (0,87 in VII-6-4 bzw. 0,82 in VII-6-6). Nach semipräparativer HPLC konnte aus Fraktion VII-6-4 das Flavonoid **5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxyflavon (12)** und aus Fraktion VII-6-6 das Flavonoid **5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon (15)** isoliert werden.

Nach semipräparativer HPLC wurde aus Fraktion VII-9-4 ein Gemisch der beiden Flavonoide **5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon (15)** und **5,4'-Dihydroxy-3,3',6,7,8-pentamethoxyflavon (16)** sowie das Alkaloid **Evolitrin (27)** in reiner Form isoliert.

Die semipräparative HPLC der Fraktion VII-10 führte zur Isolierung eines Gemisches aus **5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxyflavon (12)** und **5-Hydroxy-3,3',4',7,8-pentamethoxyflavon (13)**. Das Flavonoid **5,3'-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavon (Gossypetin-3,7,8,4'-tetramethylether) (17)** konnte rein isoliert werden. (s. Kapitel)

Die Aufreinigung der Fraktion VII-14 mit der semipräparativen HPLC führte zur Isolierung der Verbindung **Quercetin 3,3'-dimethylether (18)**.

**Tabelle 58:** Subfraktionen der VLC-Fraktion **MB.D-VII**

Eluate-Nr.	Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
1-8	MB.D-VII-1	0,361	
9-24	MB.D-VII-2	0,427	
25-33	MB.D-VII-3	0,913	
34-50	MB.D-VII-4	0,769	
51-62	MB.D-VII-5	0,535	
63-84	MB.D-VII-6	0,943	
85-90	MB.D-VII-7	0,681	

91-112	MB.D-VII-8	0,881	
113-121	MB.D-VII-9	1,27	
122-130	MB.D-VII-10	0,113	<b>Gemisch 12+13; 17</b>
131-135	MB.D-VII-11	0,122	
136-139	MB.D-VII-12	0,681	
140-146	MB.D-VII-13	0,437	
147-168	MB.D-VII-14	0,128	<b>18</b>
168-182	MB.D-VII-15	0,421	
	Gesamt	8,682	

**Tabelle 59:** Weitere Auftrennung von Fraktion **MB.D-VII-6** mittels Kieselgelsäule

<b>Fraktion</b>	<b>Menge [g]</b>	<b>Isolierte Verbindungen</b>
MB.D-VII-6.1	0,059	
MB.D-VII-6.2	0,276	
MB.D-VII-6.3	0,127	
MB.D-VII-6.4	0,036	<b>12</b>
MB.D-VII-6.5	0,021	
MB.D-VII-6.6	0,353	<b>15</b>

**Tabelle 60:** Weitere Auftrennung von Fraktion **MB.D-VII-9** mittels Kieselgelsäule

<b>Fraktion</b>	<b>Menge [g]</b>	<b>Isolierte Verbindungen</b>
MB.D-VII-9.1	0,24	
MB.D-VII-9.2	0,138	
MB.D-VII-9.3	0,165	
MB.D-VII-9.4	0,075	<b>Gemisch 15+16; 27</b>
MB.D-VII-9.5	0,391	
MB.D-VII-9.6	0,106	

### Fraktion MB.D-VIII

Nach Auftrennung an Sephadex LH-20 konnten nach DC-Kontrolle mit dem Fließmittelsystem DC-3 neun Unterfraktionen gebildet werden. Ein Anteil der Fraktion VIII-6 wurde direkt mittels semipräparativen HPLC aufgereinigt und es konnten insgesamt fünf Substanzen rein gewonnen werden. Diese wurden aufgrund ihrer NMR-Spektren als **Melibentin (11)**, **3,3',4',5,6,7,8-Heptamethoxyflavon (14)**, **Melisimplexin (20)**, **2',3'-Dehydromarmesin (23)** und **5-Methoxy-2',3'-Dehydromarmesin (25)** identifiziert. In der Fraktion MB.D-VIII-7 konnte nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC mit **Marmesin (24)**, ein weiteres Furanocumarin, isoliert werden.

**Tabelle 61:** Subfraktionen der VLC-Fraktion **MB.D-VIII**

Eluate-Nr.	Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
1-19	MB.D-VIII-1	1,241	
20-35	MB.D-VIII-2	0,632	
36-40	MB.D-VIII-3	0,281	
41-49	MB.D-VIII-4	0,219	
50-58	MB.D-VIII-5	0,106	
59-64	MB.D-VIII-6	0,931	<b>11, 14, 20, 23, 25</b>
65-71	MB.D-VIII-7	0,631	<b>24</b>
72-90	MB.D-VIII-8	0,451	
91-102	MB.D-VIII-9	0,464	
	Gesamt	4,96	

### Fraktion MB.D-IX

Die Auftrennung dieser Fraktion an einer Sephadexsäule mit Methanol resultierte in 8 Fraktionen. Ein Anteil der Fraktion IX.5 wurde direkt mittels semipräparativen HPLC aufgereinigt, welches die Isolierung und Identifizierung der Substanz Melifoliox B (**8**) ermöglichte.

**Tabelle 62:** Subfraktionen der VLC-Fraktion **MB.D-XI**

<b>Eluate-Nr.</b>	<b>Fraktion</b>	<b>Menge [g]</b>	<b>Isolierte Verbindungen</b>
1-34	MB.D-IX-1	0,06	
35-42	MB.D-IX-2	1,97	
43-47	MB.D-IX-3	1,18	
48-50	MB.D-IX-4	0,46	
51-58	MB.D-IX-5	0,53	<b>8</b>
59-74	MB.D-IX-6	0,06	
75-81	MB.D-IX-7	0,04	
82-93	MB.D-IX-8	0,25	
	Gesamt	4,57	

### Fraktion M (MB.M)

Um sich einen Überblick zu verschaffen, ob weitere Flavonoidglyka, die im Dichlormethanextrakt aufgrund ihrer Hydrophile möglicherweise nicht enthalten sind, in der Pflanze vorkommen, wurde der Methanolextrakt (110 g) untersucht. 65 g dieses Extraktes wurden an einer Sephadex LH-20-Säule mit Methanol als Fließmittel aufgetrennt. Es wurden 9 Fraktionen erhalten. Die Subfraktion MB.M-IV (0,46 g) wurde nach DC-Kontrolle anschließend mit der semipräparativen HPLC aufgetrennt. Dabei konnte ein Gemisch der beiden isomeren Flavonoidglykoside **trans- und cis-Tilirosid (21 + 22)** isoliert werden.

**Tabelle 63:** Subfraktionen des Methanolextrates

Eluate-Nr.	Fraktion	Menge [g]	Isolierte Verbindungen
1-65	MB.M-I	0,03	
66-125	MB.M-II	14,5	
125 - 150	MB.M-III	9,3	
151 - 165	MB.M-IV	0,46	<b>Gemisch 21 + 22</b>
166 - 198	MB.M-V	0,54	
199 - 261	MB.M-VI	15,5	
261 - 298	MB.M-VII	17,6	
299 - 350	MB.M-VIII	2,07	
351 - 395	MB.M-IX	4,575	
	Gesamt	64,575	

## Experimenteller Teil

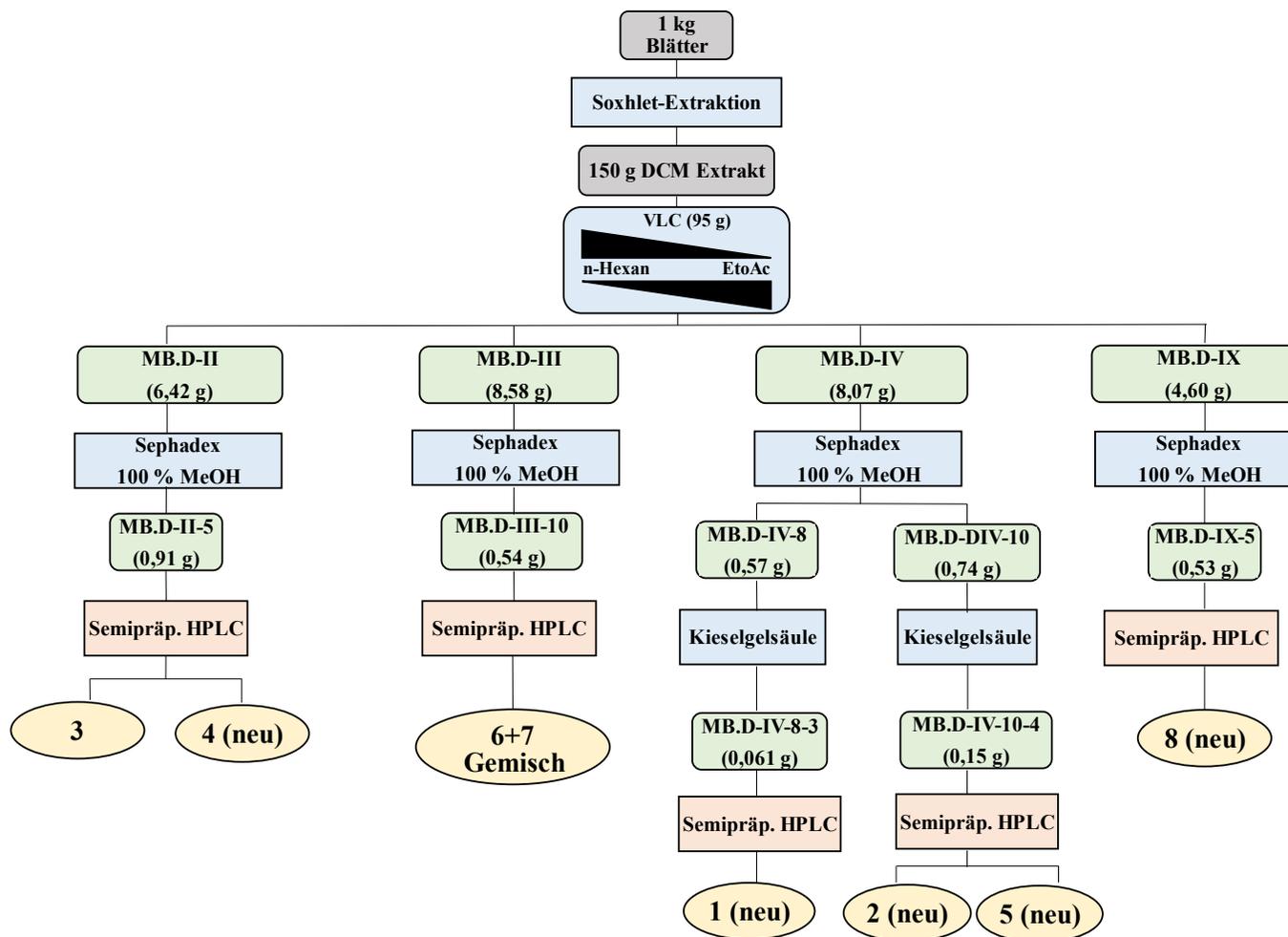


Abbildung 276: Isolationsschema der Acetophenone

Experimenteller Teil

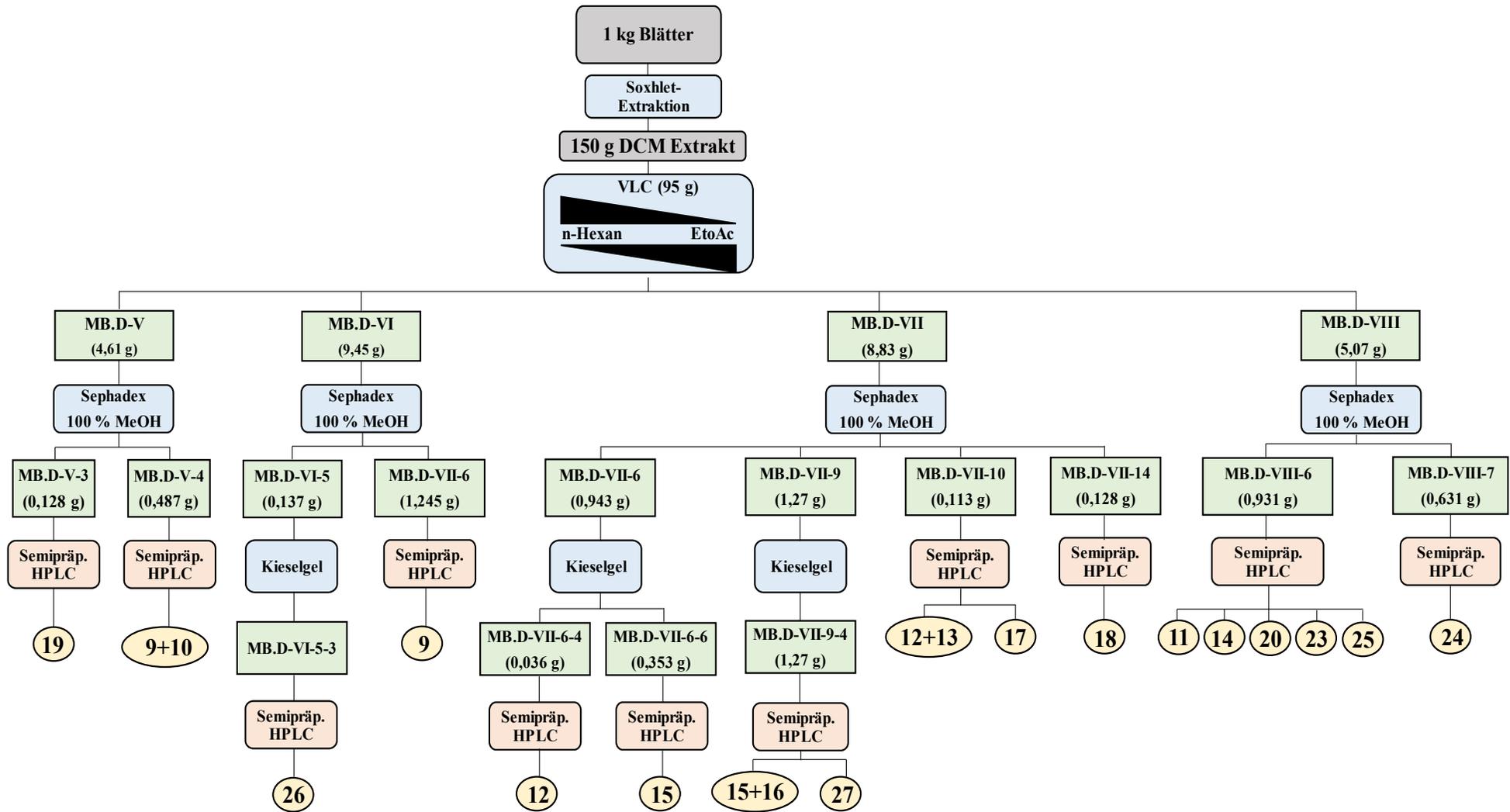


Abbildung 277: Isolationschema der Alkaloide, Flavonoide und Furanocumarine

6.6 Ausbeute und Ursprungsfraction der isolierten Verbindungen aus *M. barbiger*

Nr.	Verbindungen	Ursprungsfraction	Ausbeute
1	Melibarbinon A	MB.D-IV-8-3	2,3 mg
2	Melibarbinon B	MB.D-IV-10-4	3,2 mg
3	Alloevodionol	MB.D-II-5	23,0 mg
4	Melibarbichromen A	MB.D-II-5	2,2 mg
5	Melibarbichromen B	MB.D-IV-10-4	1,8 mg
6	Melifolione A	MB.D-III-10	3,1 mg
7	Melifolione B	MB.D-III-10	3,1 mg
8	Melifoliox B	MB.D-IX-5	3,4 mg
9	5-Hydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-3',4'-methylendioxyflavon	MB.D-VI-6	2,5 mg
10	5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylendioxyflavon	MB.D-V-4	im Gemisch mit 9
11	Melibentin	MB.D-VIII-6	6,5 mg
12	5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxyflavon	MB.D-VII-6-4	2,2 mg
13	5-Hydroxy-3,3',4',7,8-pentamethoxyflavon	MB.D-VII-10	im Gemisch mit 12
14	3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavon	MB.D-VIII-6	1,9 mg
15	5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon	MB.D-VII-6-6	1,7 mg
16	5,4'-Dihydroxy-3,3',6,7,8-pentamethoxyflavon	MB.D-VII-9-4	im Gemisch mit 15
17	5,3'-Dihydroxy-3,4',6,7-tetramethoxyflavon	MB.D-VII-10	1,3 mg
18	Quercetin 3,3'-dimethylether	MB.D-VII-14	1,45 mg
19	7-Isopentenyl-3,3'-dimethylquercetin	MB.D-V-3	1,3 mg
20	Melisimplexin	MB.D-VIII-6	1,5 mg
21	<i>trans</i> -Tilirosid	MB.M-IV	3,5 mg, im Gemisch mit 22
22	<i>cis</i> -Tilirosid	MB.M-IV	3,5 mg, im Gemisch mit 21
23	2',3' Dehydromarmesin	MB.D-VIII-6	1,8 mg
24	Marmesin	MB.D-VIII-7	2,1 mg
25	5-Methoxy-2',3'Dehydromarmesin	MB.D-VIII-6	1,2 mg
26	Isopimpinellin	MB.D-VI-5-3	1,6 mg
27	Evolitrin	MB.D-VII-9-4	1,2 mg

## 6.7 Untersuchungen zur Zytotoxizität

### 6.7.1 Zelllinien und Zellkulturen

Die humane Ovarialkarzinom Zelllinie A2780 wurde von der European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, UK) bezogen. Die Zellen der Linie A2780 werden bei 37 °C und befeuchteter Luft mit einem 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in RPMI 1640, welches 10% Hitze-inaktiviertes fetales Kalbsserum, 120 IU/mL Penicillin und 120 µg/mL Streptomycin enthält, kultiviert. Die Zellen wurden bis 80% Konfluenz gezüchtet bevor diese in weiteren Assays verwendet wurden.

### 6.7.2 Zytotoxizitäts-Assay

Die zytotoxischen Effekte der isolierten Verbindungen wurden fluoreszenzbasiert durch Messung des Schrumpfens von Zellkernen (und nachfolgend erhöhte durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Zellkern) indem die Zellen mit Hoechst-33342 behandelt wurden, analysiert. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte durch high content screening (HCS) des Array Scan XTI (Thermo Scientific, Wesel, Germany). Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Wells (Corning, Kaiserslautern, Germany) bei einer Dichte von 4000 c/w eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit den Verbindungen für 72h behandelt. Danach wurde das Medium entfernt und 50 µL der Zellkern-färbenden Lösung (1,78 µM Hoechst-33342 in PBS) hinzugefügt. Daraufhin wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert in einem luftbefeuchteten Inkubator bebrütet, bevor die Bildgebung stattfand.

### 6.7.3 MTT-Assay

Die Zellviabilität unter dem Einfluss von Verbindungen wurde mittels eines verbesserten MTT-Assays (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durchgeführt. [186] Um den Effekt der Verbindung **2** zu überprüfen, wurde zunächst eine Zelldichte von 8000 Zellen/Wells angestrebt, welche für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von Verbindung **2** inkubiert wurde. Nach Zugabe von MTT erfolgte die Messung. Die Formazan Präzipitate wurde in DMSO gelöst und die Absorption wurde bei 544 nm und 690 nm mit dem FLUOstar microplate reader gemessen.

#### **6.7.4 Caspase 3/7-Aktivierungs-Assay**

Die durch die Verbindungen induzierte Aktivierung der Caspasen 3/7 wurde mithilfe des CellEvent Caspase 3/7 green detection reagent (Thermo Scientific, Wesel, Germany) gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers analysiert. Die Zellen wurden in 96-Well-Titerplatten (Corning, Kaiserslautern, Germany) bei einer Dichte von 4000 c/w eingebracht. Die Zellen wurden dann mit den Verbindungen für 72 h behandelt. Danach wurde das Medium entfernt und 50 µL CellEvent Caspase 3/7 green detection reagent (2 µM in PBS mit zusätzlich 5% hitze-inaktiviertem FBS) hinzugefügt. Die Zellen wurden für 30 min 37 °C in einem befeuchteten Inkubator bebrütet. Dann erfolgte das bildgebende Verfahren mithilfe des high content screening (HCS) Systems vom Thermo Fisher Array Scan XTI bei einer zehnfachen Vergrößerung (Thermo Scientific). Der Caspase-Inhibitor QVD wurde in einer Konzentration von 20 µM, verdünnt im entsprechenden Medium, eingesetzt und 30 min vor der Zugabe der Verbindungen inkubiert.

#### **6.7.5 Datenanalyse und Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte**

Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden mithilfe der Software Prism® 7.0 (GraphPad, San Diego, Kalifornien, USA) berechnet. Aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden gepoolte Daten mit einer vierparametrischen Gleichung (Dosis-Wirkungskurve) analysiert. Die Säulendiagramme wurden mithilfe von Microsoft Excel® erstellt. Die Ergebnisse des Assays wurden hinsichtlich ihrer Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test und einem zusätzlichen Online-Tool bestimmt. Normalisierungen der zytotoxischen Effekte und die Effekte auf die Caspase 3/7-Aktivierung wurden wie folgt durchgeführt: Fluoreszenzwerte der Negativkontrolle wurden auf 0 % und die der Positivkontrolle (100 µM Cisplatin, 24 h Inkubation) auf 100 % gesetzt. [186]

## 7 Analytische Daten

### 7.1.1 Melibarbinon A (1)

Ursprungsfraction: MB.D-IV-8-3

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>

Molare Masse: 280 g/mol

HLPC: Rt = 26,88 min

UV: λ<sub>max</sub> = 214 nm und 292 nm

HRESIMS: 281.1384 [M+H]<sup>+</sup>

Optische Drehung: [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = -7.2° (c 0.2, MeOH)

NMR: Tabelle 1, S. 28

DC: s. Tabelle 46, S. 414

### 7.1.2 Melibarbinon B (2)

Ursprungsfraction: MB.D-IV-10-4

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>

Molare Masse: 264 g/mol

HLPC: Rt = 33,90 min

UV: λ<sub>max</sub> = 217 nm und 296 nm

HRESIMS: 265.1434 [M+H]<sup>+</sup>

NMR: s. Tabelle 2, S. 36

DC: s. Tabelle 46, S. 414

### 7.1.3 Alloevodionol (3)

Ursprungsfraction: MB.D-II-5

Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>

Molare Masse: 248 g/mol

HLPC: Rt (min)= 30,83 min

UV: λ<sub>max</sub>= 219 nm und 293 nm

HRESIMS: 249.1128 [M+H]<sup>+</sup>

NMR: s. Tabelle 3, S.45

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.4 Melibarbichromen A (4)

Ursprungsfraction: MB.D-II-5

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>

Molare Masse: 316 g/mol

HLPC: Rt = 34,54 min

UV: UV: λ<sub>max</sub>= 221 nm und 283 nm

HRESIMS: 317,1752[M+H]<sup>+</sup>

Optische Drehung: [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = -7,1° (c 0.2, MeOH)

NMR: s. Tabelle 4, S.54

DC: s. Tabelle 46, S. 414

### 7.1.5 Melibarbichromen B (5)

Ursprungsfraction: MB.D-IV-10-4

Summenformel:  $C_{15}H_{20}O_5$

Molare Masse: 280 g/mol

HLPC:  $R_t = 21,64$  min

UV:  $\lambda_{max} = 208$  nm und 281 nm

HRESIMS: 281,1385[M+H]<sup>+</sup>

Optische Drehung:  $[\alpha]_D^{20} = -9,9^\circ$  (c 0.2, MeOH)

NMR: s. Tabelle 5, S.66

DC: s. Tabelle 46, S. 414

### 7.1.6 Melifolione A und B (6 + 7)

Ursprungsfraction: MB.D-III-10

Summenformel:  $C_{18}H_{22}O_4$

Molare Masse: 302 g/mol

HLPC:  $R_t = 33,25$  min

UV:  $\lambda_{max} = 201$  nm, 221 nm und 283 nm

HRESIMS: 303.1591 [M+H]<sup>+</sup>

NMR: s. Tabelle 6, S.80 und Tabelle 8, S.82

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.7 Melifoliox B (8)

Ursprungsfraction: MB.D-IX-5

Summenformel:  $C_{18}H_{22}O_5$

Molare Masse: 318 g/mol

HLPC:  $R_t = 17,93$  min

UV:  $\lambda_{max} = 232$  nm und 292 nm

HRESIMS: 319.1542  $[M+H]^+$

NMR: s. Tabelle 9, S.102 und Tabelle 10, S.103

DC: s. Tabelle 46, S. 414

### 7.1.8 5-Hydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon (9)

Ursprungsfraction: MB.D-VI-6

Summenformel:  $C_{20}H_{18}O_9$

Molare Masse: 402 g/mol

HLPC:  $R_t = 32,46$  min

UV:  $\lambda_{max} = 256$  nm, 271 nm und 349 nm

HRESIMS: 403.1025  $[M+H]^+$

EI-MS: m/z (rel. Int.): 416  $[M^+]$  (55), 401  $[M-CH_3]$  (100), 197  $[A_1^+ - 2 \times CH_3]$  (33) ,

182  $[A_1^+ - 3 \times CH_3]$  (22), 149  $[B_2^{+o}]$  (46)

NMR: s. Tabelle 11, S.123

DC: s. Tabelle 46, S. 414

### 7.1.9 5-Hydroxy-3,7,8-trimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavon (10)

Ursprungsfraction: MB.D-VI-6

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>

Molare Masse: 372 g/mol

HLPC: Rt = 32,46 min

UV: λ<sub>max</sub>= 256 nm, 271 nm und 349 nm

HRESIMS: 373.0918 [M+H]<sup>+</sup>

NMR: s. Tabelle 13, S. 137

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.10 Melibentin (11)

Ursprungsfraction: MB.D-VIII-6

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>

Molare Masse: 416 g/mol

HLPC: Rt = 31,13 min

UV: λ<sub>max</sub>= 262 nm, 282 nm und 348 nm

HRESIMS: 417.1182 [M + H]<sup>+</sup>, 439.1001 [M + Na]<sup>+</sup>

EI-MS: m/z (rel. Int.): 416 [M<sup>+</sup>] (55), 401 [M-CH<sub>3</sub>] (100), 197 [A<sub>1</sub><sup>+</sup>-2 x CH<sub>3</sub>] (33), 182 [A<sub>1</sub><sup>+</sup>-3 x CH<sub>3</sub>] (22), 149 [B<sub>2</sub><sup>+</sup>] (46)

NMR: s. Tabelle 14, S.146

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.11 5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxyflavon (12)

Ursprungsfraction: MB.D-VII-6-4

Summenformel:  $C_{21}H_{22}O_9$

Molare Masse: 418 g/mol

HLPC:  $R_t = 32,37$  min

UV:  $\lambda_{max} = 260$  nm, 281 nm und 347 nm

HRESIMS: 419.1342  $[M + H]^+$  und 441.1153  $[M + Na]^+$

EI-MS: m/z (rel. Int.): 418  $[M]$  (90) , 403  $[M - CH_3]$  (100) , 165  $[B2^{+o} + CH_3]$  (21) , 149  $[B2^{+o}]$  (18)

NMR: s. Tabelle 15, S.159

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.12 5-Hydroxy-3,3',4',7,8-pentamethoxyflavon (13)

Ursprungsfraction: MB.D-VII-10

Summenformel:  $C_{20}H_{20}O_8$

Molare Masse: 388 g/mol

HLPC:  $R_t = 32,13$  min

UV:  $\lambda_{max} = 260$  nm, 281 nm und 347 nm

HRESIMS: 419.1342  $[M + H]^+$

NMR: s. Tabelle 16, S.168

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.13 3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavon (14)

Ursprungsfraction: MB.D-VIII-6

Summenformel:  $C_{21}H_{24}O_9$

Molare Masse: 432 g/mol

HLPC:  $R_t = 28,23$  min

UV:  $\lambda_{max} = 257$  nm, 271 nm und 345 nm

HRESIMS: 433.1497  $[M + H]^+$

EI-MS: m/z (rel. Int.): 432  $[M]$  (38), 417  $[M - CH_3]$  (100), 165  $[B_2^{+o} + CH_3]$  (28), 149  $[B_2^{+o}]$  (21)

NMR: s. Tabelle 17, S.179

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.14 5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon (15)

Ursprungsfraction: MB.D-VII-6-6

Summenformel:  $C_{20}H_{20}O_9$

Molare Masse: 404 g/mol

HLPC:  $R_t = 29,59$  min

UV:  $\lambda_{max} = 260$  nm, 280 nm und 355 nm

HRESIMS: 405.1193  $[M + H]^+$

EI-MS: m/z (rel. Int.): 404  $[M]$  (78), 389  $[M - CH_3]$  (100), 151  $[B_1^{+o}]$

NMR: s. Tabelle 18, S.194

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.15 5,4'-Dihydroxy-3,3',6,7,8-pentamethoxyflavon (16)

Ursprungsfraction: MB.D-VII-9-4

Summenformel: C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>

Molare Masse: 404 g/mol

HLPC: Rt = 29,59 min

UV: λ<sub>max</sub> = 260 nm, 280 nm und 355 nm

HRESIMS: 405.1187 [M + H]<sup>+</sup>

EI-MS: m/z (rel. Int.): 404 [M] (78), 389 [M-CH<sub>3</sub>] (100), 151 [B<sub>1</sub><sup>+o</sup>]

NMR: s. Tabelle 19, S.200

DC: s. Tabelle 46 S.414

### 7.1.16 Gossypetin-3,7,8,4'-tetramethylether (17)

Ursprungsfraction: MB.D-VII-10

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>

Molare Masse: 374 g/mol

HLPC: Rt = 28,01 min

UV: λ<sub>max</sub> = 258 nm, 275 nm und 356 nm

HRESIMS: 375.1072 [M + H]<sup>+</sup>

EI-MS: m/z (rel. Int.): 374 [M] (55), 359 [M-CH<sub>3</sub>] (100)

NMR: s. Tabelle 21, S.213

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.17 Quercetin 3,3'-dimethylether (18)

Ursprungsfraction: MB.D-VII-14

Summenformel:  $C_{17}H_{14}O_7$

Molare Masse: 330 g/mol

HLPC:  $R_t = 25,77$  min

UV:  $\lambda_{max} = 271$  nm und 353 nm

HRESIMS: 331.0811  $[M + H]^+$

NMR: s. Tabelle 23, S.224

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.18 7-Isopentenyl-3,3'-dimethylquercetin (19)

Ursprungsfraction: MB.D-V-3

Summenformel:  $C_{22}H_{22}O_7$

Molare Masse: 398 g/mol

HLPC:  $R_t = 35,80$  min

UV:  $\lambda_{max} = 254$  nm, 270 nm und 358 nm

HRESIMS: 399.1141  $[M+H]^+$

EI-MS: m/z (rel. Int.): 398  $[M]$  (56), 329  $[M-C_5H_9]$  (99), 315  $[M-C_5H_9-CH_3]$  (100),

299  $[M-OC_5H_9-CH_3]$  (32), 151  $[B_1^{+}]$  (34), 69  $[C_5H_9]$  (59)

NMR: s. Tabelle 24, S.230

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.19 Melisimplexin (20)

Ursprungsfraction: MB.D-VIII-6

Summenformel:  $C_{20}H_{18}O_8$

Molare Masse: 386 g/mol

HLPC:  $R_t = 30,09$  min

UV:  $\lambda_{max} = 254$  nm, 270 nm und 358 nm

HRESIMS: 387.1086  $[M+H]^+$ ,

NMR: s. Tabelle 26, S.240

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.20 trans-Tiliroxid und cis-Tiliroxid (21 + 22)

Ursprungsfraction: MB-M-VIII-6

Summenformel:  $C_{30}H_{26}O_{13}$

Molare Masse: 594 g/mol

HLPC:  $R_t = 22,23$  min

UV:  $\lambda_{max} = 260$  nm und 314 nm

HRESIMS: 595.1446  $[M+H]^+$

EI-MS: m/z (rel. Int.): 286 [Aglykon] (100), 147 [Zimtsäure] (50), 120 [Zimtsäure - O] (71)

NMR: s. Tabelle 27, S.249 und Tabelle 29, S.259

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.21 2',3'-Dehydromarmesin (23)

Ursprungsfraction: MB.D-VIII-6

Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

Molare Masse: 244 g/mol

HLPC: Rt = 19,97 min

UV: λ<sub>max</sub> = 214 nm, 243 nm und 296 nm

HRESIMS: 245.0809 [M+H]<sup>+</sup>

NMR: s. Tabelle 30 ,S.265

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.22 Marmesin (24)

Ursprungsfraction: MB.D-VIII-7

Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

Molare Masse: 246 g/mol

HLPC: Rt = 26,82 min

UV: λ<sub>max</sub> = 220 nm, 255 nm und 335 nm

HRESIMS: 247.0966 [M+H]<sup>+</sup>

NMR: s. Tabelle 31, S.273

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.23 5-Methoxy-2',3'-Dehydromarmesin (25)

Ursprungsfraction: MB.D-VIII-6

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>

Molare Masse: 246 g/mol

HLPC: Rt = 24,58 min

UV: λ<sub>max</sub> = 222 nm, 252 nm, 267 nm und 310 nm

HRESIMS: 275.0914 [M+H]<sup>+</sup>

NMR: s. Tabelle 32, S.282

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.24 Isopimpinellin (26)

Ursprungsfraction MB.D-VI-5-3

Summenformel: C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

Molare Masse: 246 g/mol

HLPC: Rt = 23,88 min

UV: λ<sub>max</sub> = 222 nm, 247 nm, 269 nm und 310 nm

HRESIMS: 247.0604 [M+H]<sup>+</sup>

NMR: s. Tabelle 33, S.291 und Tabelle 34, S.297

DC: s. Tabelle 46, S.414

### 7.1.25 Evolitrin (27)

Ursprungsfraction: MB.D-VII-9-4

Summenformel:  $C_{13}H_{11}NO_3$

Molare Masse: 229 g/mol

HLPC:  $R_t = 27,50$  min

UV:  $\lambda_{max} = 245$  nm und 309 nm

HRESIMS: 230.0815  $[M+H]^+$

NMR: s. Tabelle 35, S.307 und Tabelle 36, S.312

DC: s. Tabelle 46, S.414

## 8 Quellenverzeichnis

1. Appelhans MS, Wen J, Duretto M, Crayn D, Wagner WL. Historical biogeography of Melicope (Rutaceae) and its close relatives with a special emphasis on Pacific dispersals. *Jnl of Sytematics Evolution*. 2018; 56:576–99. doi: 10.1111/jse.12299.
2. Adewale Ahmed I, Hossain MS, Pei Cee L, Hisam Zamakshsharia N. A Review of the Ethnomedicinal, Phytochemical, and Anticancer Properties of Melicope Species. *Chem Biodivers*. 2023; 20:e202300952.
3. Paetzold C, Wood KR, Eaton DAR, Wagner WL, Appelhans MS. Phylogeny of Hawaiian Melicope (Rutaceae): RAD-seq Resolves Species Relationships and Reveals Ancient Introgression. *Front Plant Sci*. 2019; 10:1074. doi: 10.3389/fpls.2019.01074 PMID: 31608076.
4. Wagner WL, Herbst DR, Sohmer SH. Manual of the flowering plants of Hawaii: revised edition. *Manual of the Flowering Plants of Hawaii*. University of Hawaii Press; 1999.
5. Higa T, Scheuer PJ. Hawaiian plant studies. Part XVI. Coumarins and flavones from *Pelea barbiger*(gray) hillebrand (rutaceae). *J Chem Soc., Perkin Trans 1*. 1974:1350. doi: 10.1039/P19740001350.
6. Higa T, Scheuer PJ. Alkaloids from *Pelea barbiger*. *Phytochemistry*. 1974; 13:1269–72.
7. Goerig M, Esch JS am. Friedrich Wilhelm Adam Sertürner-dem Entdecker des Morphins zum 150. Todestag. *AINS-Anästhesiologie· Intensivmedizin· Notfallmedizin· Schmerztherapie*. 1991; 26:492–8.
8. Rice KC. The development of a practical total synthesis of natural and unnatural codeine, morphine and thebaine. *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. Springer; 1985. pp. 191–203.
9. Weinberg BA, Bealer BK. *The world of caffeine: the science and culture of the world's most popular drug*. Routledge; 2004.
10. Stewart GG. A history of the medicinal use of tobacco 1492–1860. *Medical History*. 1967; 11:228–68.
11. Kohnen-Johannsen KL, Kayser O. Tropane alkaloids: chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules*. 2019; 24:796.
12. Holmstedt B, Fredga A. Sundry episodes in the history of coca and cocaine. *J Ethnopharmacol*. 1981; 3:113–47.

13. López-Muñoz F, Bhatara VS, Alamo C, Cuenca E. Historical approach to reserpine discovery and its introduction in psychiatry. *Actas espanolas de psiquiatria*. 2004; 32:387–95.
14. Munoz JA. *Cardiotonic steroids*, UCSF. 1970.
15. Suffness M. Taxol: from discovery to therapeutic use. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Elsevier; 1993. pp. 305–14.
16. Armenian P, Vo KT, Barr-Walker J, Lynch KL. Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: a comprehensive review. *Neuropharmacology*. 2018; 134:121–32.
17. Lentz DL, Clark AM, Hufford CD, Meurer-Grimes B, Passreiter CM, Cordero J, et al. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1998; 63:253–63.
18. Passreiter CM, Suckow-Schnitker A-K, Kulawik A, Addae-Kyereme J, Wright CW, Wätjen W. Prenylated flavanone derivatives isolated from *Erythrina addisoniae* are potent inducers of apoptotic cell death. *Phytochemistry*. 2015; 117:237–44.
19. François G, Passreiter CM, Woerdenbag HJ, van Looveren M. Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Med*. 1996; 62:126–9.
20. Isman MB, Wan AJ, Passreiter CM. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Fitoterapia*. 2001; 72:65–8.
21. Passreiter CM, Carlo M de, Steigel A. Sesquiterpene lactone glycosides from *Arnica longifolia*. *Planta Med*. 1999; 65:153–6.
22. Woerdenbag HJ, Merfort I, Passreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, van Uden W, et al. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Med*. 1994; 60:434–7.
23. Lang G, Passreiter CM, Medinilla BE, Castillo J-J. Eudesmanolides and further terpenes from the leaves of *Eupatorium semialatum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2000; 55:511–5.
24. Lang G, Passreiter CM, Medinilla BE, Castillo J-J. Further sesquiterpene lactones from *Eupatorium semialatum*. *Pharmaceutical Biology*. 2001; 39:332–5.
25. Lang G, Passreiter CM, Wright CW, Filipowicz NH, Addae-Kyereme J, Medinilla BE, et al. Antiplasmodial activities of sesquiterpene lactones from *Eupatorium semialatum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2002; 57:282–6.

26. Passreiter CM, Suckow-Schnitker A-K, Kulawik A, Addae-Kyereme J, Wright CW, Wätjen W. Prenylated flavanone derivatives isolated from *Erythrina addisoniae* are potent inducers of apoptotic cell death. *Phytochemistry*. 2015; 117:237–44.
27. Hauschild W, Mutiso PBC, Passreiter CM. Prenylated pterocarpanes from *Erythrina melanacantha*. *Nat Prod Commun*. 2010; 5:1934578X1000500509.
28. Kuci A. Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus *Volutaria boranensis* (Cufod.) Wagenitz sowie Untersuchungen zur Zytotoxizität ausgewählter pflanzlicher Sekundärstoffe, Dissertation, Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, 2022. 2023.
29. Raj SP, Solomon PR, Thangaraj B. Rutaceae. Biodiesel from Flowering Plants. 2022:479–90.
30. Appelhans MS, Wagner WL, Wood KR. *Melicope balgooyi* Appelhans, W.L. Wagner & K.R. Wood, a new species and new record in *Melicope* section *Melicope* (Rutaceae) for the Austral Islands. *PhytoKeys*. 2014:77–86. doi: 10.3897/phytokeys.39.7691 PMID: 25197227.
31. Appelhans MS, Wen J, Wood KR, Allan GJ, Zimmer EA, Wagner WL. Molecular phylogenetic analysis of Hawaiian Rutaceae ( *Melicope* , *Platydesma* and *Zanthoxylum* ) and their different colonization patterns. *Bot J Linn Soc*. 2014; 174:425–48. doi: 10.1111/boj.12123.
32. Appelhans MS, Wood KR, Wagner WL. Reduction of the Hawaiian genus *Platydesma* into *Melicope* section *Pelea* (Rutaceae) and notes on the monophyly of the section. *PhytoKeys*. 2017:125–37. doi: 10.3897/phytokeys.91.21363 PMID: 29422771.
33. Mohamed Eliaser E, Hui Ho J, Mohd. Hashim N, Rukayadi Y, Lian Ee GC, Abdull Razis AF. Phytochemical constituents and biological activities of *melicope lunu-ankenda*. *Molecules*. 2018; 23:2708.
34. Simonsen HT, Adersen A, Bremner P, Heinrich M, Wagner Smitt U, Jaroszewski JW. Antifungal constituents of *Melicope borbonica*. *Phytother Res*. 2004; 18:542–5.
35. Rei-Sheu H, Chano-Yih D, Shang-Kwei W, Tai-Tsung C. Cytotoxic flavonoids from the leaves of *Melicope triphylla*. *Phytochemistry*. 1993; 35:271–2.
36. Kabir MF, Mohd Ali J, Abolmaesoomi M, Hashim OH. *Melicope ptelefolia* leaf extracts exhibit antioxidant activity and exert anti-proliferative effect with apoptosis induction on four different cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017; 17:1–18.
37. Higa T, Scheuer PJ. Hawaiian plant studies. Part XVI. Coumarins and flavones from *Pelea barbiger* (gray) hillebrand (rutaceae). *J Chem Soc., Perkin Trans 1*. 1974:1350–2.

38. IŞIK K. Rare and endemic species: why are they prone to extinction. *Turkish Journal of Botany*. 2011; 35:411–7. doi: 10.3906/bot-1012-90.
39. Primack RB. *Essentials of conservation biology*. 6th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer; 2014.
40. Baldwin BG, Sanderson MJ. Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance (Compositae). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:9402–6. doi: 10.1073/pnas.95.16.9402 PMID: 9689092.
41. Vandergast AG, Gillespie RG, Roderick GK. Influence of volcanic activity on the population genetic structure of Hawaiian Tetragnatha spiders: fragmentation, rapid population growth and the potential for accelerated evolution. *Mol Ecol*. 2004; 13:1729–43. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02179.x PMID: 15189199.
42. Helenurm K, Ganders FR. ADAPTIVE RADIATION AND GENETIC DIFFERENTIATION IN HAWAIIAN BIDENS. *Evolution*. 1985; 39:753–65. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00417.x PMID: 28561363.
43. Hartley TG, Stone BC. REDUCTION OF PELEA WITH NEW COMBINATIONS IN MELICOPE (RUTACEAE). *TAXON*. 1989; 38:119–23. doi: 10.2307/1220910.
44. Wood KR, Appelhans MS, Wagner WL. *Melicope stonei*, section *Pelea* (Rutaceae), a new species from Kaua'i, Hawaiian Islands: with notes on its distribution, ecology, conservation status, and phylogenetic placement. *PhytoKeys*. 2017:119–32. doi: 10.3897/phytokeys.83.13442 PMID: 29033653.
45. Fournau E, editor. *Heilmittel der organischen Chemie und ihre Herstellung*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag; 1927.
46. Parsons IC, Gray AI, Hartley TG, Waterman PG. Acetophenones and coumarins from stem bark and leaves of *Melicope stipitata*. *Phytochemistry*. 1994; 37:565–70. doi: 10.1016/0031-9422(94)85101-8.
47. Briggs LH, Locker RH. 486. Chemistry of New Zealand *Melicope* species. Part IV. Constituents of the bark of *Melicope simplex*. *J Chem Soc*. 1950:2376. doi: 10.1039/JR9500002376.
48. Chan JA, Shultis EA, Carr SA, DeBrosse CW, Eggleston DS, Francis TA, et al. Novel phloroglucinols from the plant *Melicope sessiliflora* (Rutaceae). *The Journal of Organic Chemistry*. 1989; 54:2098–103. doi: 10.1021/jo00270a018.
49. Chemical Abstracts. SciFinder® [updated 8 Sep 2024; cited 8 Sep 2024]. Available from: <https://sso.cas.org/>.

50. Xu J-F, Han C, Xu Q-Q, Wang X-B, Zhao H-J, Xue G-M, et al. Isolation, Chiral-Phase Resolution, and Determination of the Absolute Configurations of a Complete Series of Stereoisomers of a Rearranged Acetophenone with Three Stereocenters. *J Nat Prod.* 2019; 82:1399–404. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00003 PMID: 30998015.
51. Xu J-F, Han C, Xue G-M, Wang X-B, Luo J, Yang M-H, et al. Novel rearranged acetophenone derivatives possessing diverse architectures from the leaves of *Melicope ptelefolia*. *Tetrahedron.* 2019; 75:130784. doi: 10.1016/j.tet.2019.130784.
52. Xu J-F, Zhao H-J, Wang X-B, Li Z-R, Luo J, Yang M-H, et al. ( $\pm$ )-Melicolones A and B, Rearranged Prenylated Acetophenone Stereoisomers with an Unusual 9-Oxatricyclo[3.2.1.1<sup>3,8</sup>]nonane Core from the Leaves of *Melicope ptelefolia*. *Organic Letters.* 2015; 17:146–9. doi: 10.1021/ol5033738.
53. Simonsen HT. Four novel geminally dialkylated, non-aromatic acetophenone derivatives from *Melicope coodeana*. *Phytochemistry Letters.* 2012; 5:371–5. doi: 10.1016/j.phytol.2012.03.005.
54. Hughes GK, Lahey FN, Price, JR, Webb LJ. Alkaloids of the Australian rutaceae. *Nature.* 1948; 162:223–4.
55. Tanjung M, Saputri R, Wahjoedi R, Tjahjandarie T. 4-Methoxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-[(3-methylbut-2-en-1-yl)oxy]quinolin-2(1H)-one from *Melicope Moluccana* T.G. Hartley. *Molbank.* 2017; 2017:M939. doi: 10.3390/M939.
56. Nakashima K-I, Oyama M, Ito T, Akao Y, Witono JR, Darnaedi D, et al. Novel quinolinone alkaloids bearing a lignoid moiety and related constituents in the leaves of *Melicope denhamii*. *Tetrahedron.* 2012; 68:2421–8. doi: 10.1016/j.tet.2012.01.007.
57. Ichihara A, Oikawa H. Diels-Alder type natural products-structures and biosynthesis. *Curr. Org. Chem.* 1998; 2:365–94.
58. Srie Tjahjandarie T, Dewi Saputri R, Ayub Wahjoedi R, Tanjung M. Melimoluccanin, A new isoprenylated quinolone alkaloid from the leaves of *Melicope moluccana* T.G. Hartley. *Journal of Physics: Conference Series.* 2018; 1095:12042. doi: 10.1088/1742-6596/1095/1/012042.
59. Rasamison VE, Brodie PJ, Merino EF, Cassera MB, Ratsimbason MA, Rakotonandrasana S, et al. Furoquinoline alkaloids and methoxyflavones from the stem bark of *Melicope madagascariensis* (Baker) TG Hartley. *Nat Prod Bioprospect.* 2016; 6:261–5.

60. Chen J-J, Duh C-Y, Huang H-Y, Chen I-S. Furoquinoline alkaloids and cytotoxic constituents from the leaves of *Melicope semecarpifolia*. *Planta Med.* 2003; 69:542–6. doi: 10.1055/s-2003-40637.
61. Nakashima K-I, Oyama M, Ito T, Witono JR, Darnaedi D, Tanaka T, et al. Melicodenines A and B, novel Diels–Alder type adducts isolated from *Melicope denhamii*. *Tetrahedron Letters.* 2011; 52:4694–6. doi: 10.1016/j.tetlet.2011.07.013.
62. Komala I, Rahmani M, Sukari MA, Ismail HBM, Lian GEC, Rahmat A. Furoquinoline alkaloids from *Melicope bonwickii* (F.Muell.) T.Hartley. *Nat Prod Res.* 2006; 20:355–60. doi: 10.1080/14786410500462983.
63. George S, Venkataraman R, Baby S. Melicodenine I, a new quinolinone alkaloid from *Melicope denhamii* leaves. *Nat Prod Res.* 2017; 31:890–5. doi: 10.1080/14786419.2016.1253075 PMID: 27817202.
64. Saputri RD, Tanjung M, Tjahjandarie TS. Melixyloidin, A New Acridone Alkaloid from *Melicope xanthoxyloides* Leaves. *Natural Product Sciences.* 2021; 27:183–6.
65. Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Abreu OA, Molina E, Yordi EG. Coumarins—an important class of phytochemicals. *Phytochemicals-isolation, characterisation and role in human health.* 2015; 25:533–8.
66. Johns, SR, Lamberton JA, Price, JR, Sioumis AA. Identification of coumarins isolated from *Lepiniopsis ternatensis* (Apocynaceae), *Pterocaulon sphacelatum* (Compositae), and *Melicope melanophloia* (Rutaceae). *Australian Journal of Chemistry.* 1968; 21:3079–80.
67. Fritsch P, Schwarz T. *Dermatologie Venerologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
68. Sticher O, Heilmann J, Zündorf I. *Pharmakognosie phytopharmazie.* Springer; 2015.
69. Oyama M, Nakashima K-I, Ito T, Murata H, Iinuma M. New Furanocoumarins from the Fruits of *Melicope triphylla*. *HETEROCYCLES.* 2011; 83:1603. doi: 10.3987/COM-11-12228.
70. Ito C, Matsui T, Tokuda H, Tan HT, Itoigawa M. Cancer chemopreventive constituents from *Melicope lunu-ankenda*. *Phytochemistry Letters.* 2017; 20:172–6. doi: 10.1016/j.phytol.2017.04.028.
71. Latip J, Hartley TG, Waterman PG. Lignans and coumarins metabolites from *Melicope hayesii*. *Phytochemistry.* 1999; 51:107–10. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00720-1.

72. Saputri RD, Tjahjandarie TS, Tanjung M. Two novel coumarins bearing an acetophenone derivative from the leaves of *Melicope Quercifolia*. *Nat Prod Res.* 2019;1–6. doi: 10.1080/14786419.2019.1644634 PMID: 31328970.
73. Giannasi DE. Systematic aspects of flavonoid biosynthesis and evolution. *The Botanical Review.* 1978; 44:399–429. doi: 10.1007/BF02860845.
74. Briggs LH, Locker RH. 459. Flavonols from the bark of *Melicope ternata*. Part I. The isolation of four new flavonols, meliternatin, meliternin, ternatin, and wharangin. *J Chem Soc.* 1949:2157. doi: 10.1039/JR9490002157.
75. Ritchie E, Taylor WC, Vautin TK. The constituents of *Melicope broadbentiana* F. M. Bail. The structures of melibentin, melicopol, and methylmelicopol. *Aust J Chem.* 1965; 18:2021. doi: 10.1071/CH9652021.
76. Sultana N, Hartley TG, Waterman PG. Two novel prenylated flavones from the aerial parts of *Melicope micrococca*. *Phytochemistry.* 1999; 50:1249–53. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00673-6.
77. Hauschild W, Mutiso PBC, Passreiter CM. Prenylated pterocarpanes from *Erythrina melanacantha*. *Nat Prod Commun.* 2010; 5:1934578X1000500509.
78. Passreiter CM, Suckow-Schnitker A-K, Kulawik A, Addae-Kyereme J, Wright CW, Wätjen W. Prenylated flavanone derivatives isolated from *Erythrina addisoniae* are potent inducers of apoptotic cell death. *Phytochemistry.* 2015; 117:237–44. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.04.002 PMID: 26101145.
79. Bell HM, Bowles DB, Senese F. Additive NMR chemical shift parameters for deshielded methine protons. *Organic Magnetic Resonance.* 1981; 16:285–9.
80. Chexal KK, Fouweather C, Holker JSE, Simpson TJ, Young K. The biosynthesis of fungal metabolites. Part III. Structure of shamixanthone and tajixanthone, metabolites of *Aspergillus varicolor*. *J Chem Soc., Perkin Trans 1.* 1974:1584–93.
81. Yoon H, Eom S-L, Hyun J-Y, Jo G-H, Hwang D-S, Lee S-H, et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data on hydroxy/methoxy flavonoids and the effects of substituents on chemical shifts. *Bulletin of the Korean Chemical Society.* 2011; 32:2101–4.
82. Grande F, Parisi OI, Mordocco RA, Rocca C, Puoci F, Scrivano L, et al. Quercetin derivatives as novel antihypertensive agents: Synthesis and physiological characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016; 82:161–70. doi: 10.1016/j.ejps.2015.11.021.

83. Abraham RJ, Mobli M, Smith RJ. <sup>1</sup>H chemical shifts in NMR: Part 19. Carbonyl anisotropies and steric effects in aromatic aldehydes and ketones. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2003; 41:26–36.
84. Su C-R, Kuo P-C, Wang M-L, Liou M-J, Damu AG, Wu T-S. Acetophenone Derivatives from *Acronychia p edunculata*. *J Nat Prod*. 2003; 66:990–3.
85. Dale JA, Mosher HS. Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and. alpha.-methoxy-. alpha.-trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters. *J Am Chem Soc*. 1973; 95:512–9.
86. Li W, Rao L, Liu Y, He Q, Fan Y, You Y-X, et al. (±)-Meliviticines A and B: Rearranged prenylated acetophenone derivatives from *Melicope viticina* and their antimicrobial activity. *Bioorganic Chemistry*. 2019; 90:103099.
87. Lee Y-R, Li X, Lee S-W, Yong C-S, Hwang M-R, Lyoo W-S. Concise total synthesis of biologically interesting prenylated chalcone natural products: 4'-O-methylxanthohumol, xanthohumol E, and sericone. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2008; 29:1205–10.
88. Li S-G, Tian H-Y, Ye W-C, Jiang R-W. Benzopyrans and furoquinoline alkaloids from *Melicope pteleifolia*. *Biochem Syst Ecol*. 2011; 39:64–7.  
doi: 10.1016/j.bse.2011.01.005.
89. Nakashima K-I, Abe N, Chang F-R, Inoue M, Oyama M. Pteleifolols A-E, acetophenone di-C-glycosides and a benzopyran dimer from the leaves of *Melicope pteleifolia*. *J Nat Med*. 2017; 71:299–304. doi: 10.1007/s11418-016-1035-8 PMID: 27600933.
90. Kamperdick C, Van NH, van Sung T, Adam G. Benzopyrans from *Melicope pteleifolia* leaves. *Phytochemistry*. 1997; 45:1049–56. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00059-9.
91. Quader MA, El-Turbi JA, Armstrong JA, Gray AI, Waterman PG. Coumarins and their taxonomic value in the genus *Phebalium*. *Phytochemistry*. 1992; 31:3083–9.
92. Lee Y, Xia L. Concise Total Synthesis of Biologically Interesting Pyranochalcone Natural Products: Citrunobin, Boesenbergin A, Boesenbergin B, Xanthohumol C, and Glabrachromene. *Synthesis*. 2007:3240–6. doi: 10.1055/s-2007-990796.
93. Le K-T, Bandolik JJ, Kassack MU, Wood KR, Paetzold C, Appelhans MS, et al. New Acetophenones and Chromenes from the Leaves of *Melicope barbigeria* A. Gray. ; 2021.
94. Goh SH, Chung VC, Sha CK, Mak T. Monoterpenoid phloracetophenones from *Euodia latifolia*. *Phytochemistry*. 1990; 29:1704–6. doi: 10.1016/0031-9422(90)80154-9.

95. Combes G, Vassort P, Winternitz F. Structure de la rubranine, chalcone isolee de l'*Aniba rosaeodora* ducke. *Tetrahedron*. 1970; 26:5981–92. doi: 10.1016/0040-4020(70)80036-9.
96. Goh SH, Chung VC, Sha CK, Mak TC. Monoterpenoid phloroacetophenones from *Euodia latifolia*. *Phytochemistry*. 1990; 29:1704–6. doi. 10.1016/0031-9422(90)80154-9.
97. Schmidt, S., Jürgenliemk, G., Skaltsa, H., Heilmann, J. Bi-, tri-, and polycyclic acylphloroglucinols from *Hypericum empetrifolium*. *Journal of Natural Products*. 2012, 75 (10): 1697-1705. doi:10.1021/np300237n
98. Fobofou SAT, Franke K, Sanna G, Porzel A, Bullita E, La Colla P, et al. Isolation and anticancer, anthelmintic, and antiviral (HIV) activity of acylphloroglucinols, and regioselective synthesis of empetrifranzinans from *Hypericum roeperianum*. *Bioorg Med Chem*. 2015; 23:6327–34. doi: 10.1016/j.bmc.2015.08.028.
99. *The Flavonoids*. Boston, MA: Springer US; 1975.
100. Markham KR, Mabry TJ. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. *The Flavonoids*. Boston, MA: Springer US; 1975. pp. 45–77.
101. Higa M, Imamura M, Ogihara K, Suzuka T. Isolation of five new flavonoids from *Melicope triphylla*. *Chem Pharm Bull*. 2013; 61:384–9. doi: 10.1248/cpb.c12-00940 PMID: 23545999.
102. Jong T-T, Wu T-S. Highly oxygenated flavonoids from *Melicope triphylla*. *Phytochemistry*. 1989; 28:245–6. doi: 10.1016/0031-9422(89)85048-4.
103. Mabry T, Markham KR, Thomas MB. *The systematic identification of flavonoids*. Springer Science & Business Media; 2012.
104. Liu T, Liao H, Yuan K, Zhang Y. A New Flavone from the *Melicope Patulinervia* (Merr. & Chun) Huang. *Journal of Chemical Research*. 2012; 36:31–3. doi: 10.3184/174751912X13252506428852.
105. Chung LY, Yap KF, Goh SH, Mustafa MR, Imiyabir Z. Muscarinic receptor binding activity of polyoxygenated flavones from *Melicope subunifoliolata*. *Phytochemistry*. 2008; 69:1548–54. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.01.024 PMID: 18334259.
106. Hung Ho S, Wang J, Sim K, Ee GC, Imiyabir Z, Yap K, et al. Meliternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from *Melicope subunifoliolata*. *Phytochemistry*. 2003; 62:1121–4. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00632-5.
107. Calvert DJ, Cambie RC, Davis BR. <sup>13</sup>C NMR spectra of polymethoxy - and methylenedioxyflavonols. *Organic Magnetic Resonance*. 1979; 12:583 – 6.

108. Li S, Lo C-Y, Ho C-T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J Agric Food Chem.* 2006; 54:4176–85.  
doi: 10.1021/jf060234n PMID: 16756344.
109. Sy L-K, Brown GD. Three sesquiterpenes from *Artemisia annua*. *Phytochemistry.* 1998; 48:1207–11.
110. Sharaf M, Abu-Gabal NS, El-Ansari MA. Exudate flavonoids from *Ficus altissima*. *Biochem Syst Ecol.* 2000; 28:291–4.
111. Higa M, Ohshiro T, Ogihara K, Yogi S. Flavonoid constituents of *Melicope triphylla* MERR.II. *Yakugaku Zasshi.* 1990; 110:822–7. doi: 10.1248/yakushi1947.110.11\_822  
PMID: 2082012.
112. Cambie RC, Pan YJ, Bowden BF. Flavonoids of the barks of *Melicope simplex* and *Melicope ternata*. 1996.
113. Liu T, Liao H, Yuan K, Zhang Y. A New Flavone from the *Melicope Patulinervia* (Merr. & Chun) Huang. *Journal of Chemical Research.* 2012; 36:31–3.  
doi: 10.3184/174751912X13252506428852.
114. Fauvel M, Gleye J, Moulis C, Blasco F, Stanislas E. Alkaloids and flavonoids of *Melicope indica*. *Phytochemistry.* 1981; 20:2059–60. doi: 10.1016/0031-9422(81)84078-2.
115. Seshadri TR, Venkateswarlu V. Synthesis and study of 5 : 6 : 7 : 8-hydroxy-flavonols. 1946; 1946.
116. Tatum JH, Berry RE. Six new flavonoids from *Citrus*. *Phytochemistry.* 1972; 11:2283–8.
117. Simonsen HT, Adsersen A, Smitt UW, Strasberg D, Jaroszewski JW. Methoxyflavones from *Melicope borbonica* and *M. obscura* (Rutaceae). *Biochem Syst Ecol.* 2003; 31:327–30.
118. Da Silva TMS, Carvalho MG de, Braz-Filho R. Estudo espectroscópico em elucidación estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. *Química Nova.* 2009; 32:1119–28.
119. Horowitz RM. FLAVONOIDS OF CITRUS. II. ISOLATION OF A NEW FLAVONOL FROM LEMONS. *J Am Chem Soc.* 1957; 79:6561–2.
120. MACHIDA K, OSAWA K. On the flavonoid constituents from the peels of *Citrus hassaku* Hort. ex Tanaka. *Chemical and pharmaceutical bulletin.* 1989; 37:1092–4.
121. Sastry GP, Row LR. Chemical investigation of *citrus mitis* Blanco—III: isolation of two new flavanones. *Tetrahedron.* 1961; 15:111–4.

122. Lai C-S, Wu J-C, Ho C-T, Pan M-H. Disease chemopreventive effects and molecular mechanisms of hydroxylated polymethoxyflavones. *BioFactors*. 2015; 41:301–13.
123. Wollenweber E, Dörr M, Armbruster S. Flavonoid-Aglyka als Drüsenprodukte der Moosrose (*Rosa centifolia* cv. *muscosa*) und der Japanischen Weinbeere (*Rubus phoenicolasius*)/Flavonoid Aglycones as Glandular Products in *Rosa centifolia* cv. *muscosa* and in *Rubus phoenicolasius*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1993; 48:956–8.
124. Anaya-Eugenio GD, Blanco Carcache PJ, Ninh TN, Ren Y, Soejarto DD, Kinghorn AD. A pentamethoxylated flavone from *Glycosmis ovoidea* promotes apoptosis through the intrinsic pathway and inhibits migration of MCF-7 breast cancer cells. *Phytother Res*. 2021; 35:1634–45. doi: 10.1002/ptr.6930.
125. Oyama M, Nakashima K-I, Kamiya T, Haba M, Ito T, Murata H, et al. Flavonoids isolated from the leaves of *Melicope triphylla* and their extracellular-superoxide dismutase-inducing activity. *Phytochemistry Letters*. 2013; 6:215–8.
126. Lee E-J, Moon B-H, Park Y, Hong S-W, Lee S-H, Lee Y-G, et al. Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2008; 29:507–10.
127. Wollenweber E, Fischer R, Dörr M, Irvine K, Pereira C, Stevens JF. Chemodiversity of exudate flavonoids in *Cassinia* and *Ozothamnus* (Asteraceae, Gnaphalieae). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2008; 63:731–9.
128. Araújo MV, Queiroz AC, Silva JFM, Silva AE, Silva JKS, Silva GR, et al. Flavonoids induce cell death in *Leishmania amazonensis*: in vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. *Analyst*. 2019; 144:5232–44.
129. Shi Q, Chen K, Li L, Chang JJ, Autry C, Kozuka M, et al. Antitumor agents, 154. Cytotoxic and antimitotic flavonols from *Polanisia dodecandra*. *J Nat Prod*. 1995; 58:475–82. doi: 10.1021/np50118a001 PMID: 7623025.
130. Voirin B. UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4' -), di-(3' , 4' ) or tri-(3' , 4' , 5' )-substituted B rings. *Phytochemistry*. 1983; 22:2107 – 45.
131. Wang E, Bartley JP, Smith G, Bott RC. The crystal structures of the dimorphic forms of a new flavonoid from the Australian tree *Melicope elleryana*. *Australian Journal of Chemistry*. 2001; 54:739–41.

132. Al-Dabbas MM, Kitahara K, Suganuma T, Hashimoto F, Tadera K. Antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory compounds from aerial parts of *Varthemia iphionoides* Boiss. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006; 70:2178–84.
133. Chiappini I, Fardella G, Menghini A, Rossi C. Flavonoids from *Dittrichia viscosa*. *Planta Med.* 1982; 44:159–61.
134. Fraser AW, Lewis JR. Two flavonols from *Euodia glabra*. *Phytochemistry.* 1973; 12:1787–9. doi: 10.1016/0031-9422(73)80403-0.
135. Srivastava A, Verma KS, Gupta, SR. SYNTHESIS OF 8-PRENYL-5, 4'-DIHYDROXY-3, 7, 3'-TRIMETHOXYFLAVONE AND ITS ANALOGS. *ACTA CHIMICA HUNGARICA-MODELS IN CHEMISTRY.* 1984; 115:17–20.
136. Free AJ, Read RW, Ritchie E, Taylor WC. Some extractives of *Melicope octandra* (Rutaceae). *Australian Journal of Chemistry.* 1976; 29:695–7.
137. Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, Gottlieb HE, Nudelman A, Stoltz BM, et al. NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics.* 2010; 29:2176–9.
138. Hörhammer L, Stich L, Wagner H. Isolierung neuer Anthoxanthine aus Lindenblüten. *Naturwissenschaften.* 1959; 46:358.
139. Timmers M, Urban S. On-line (HPLC-NMR) and off-line phytochemical profiling of the australian plant, *Lasiopetalum macrophyllum*. *Nat Prod Commun.* 2011; 6:1934578X1100601114.
140. Budzianowski J, Skrzypczak L. Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers. *Phytochemistry.* 1995; 38:997–1001.
141. Luz RF, Vieira IJC, Braz-Filho R, Moreira VF. 13 C-NMR Data from Coumarins from Moraceae Family. *American Journal of Analytical Chemistry.* 2015; 6:851.
142. Diao YM, Gao YH, Peng XS, Zhang RF. Chemical constituents of *Evodia lepta*. *Chin. Tradit. Herbal Drugs.* 2006; 37:1309–11.
143. Nathabumroong S, Wisetsai A, Lekphrom R, Suebrasri T, Schevenels FT. A new polyphenolic isoprenylated acetophenone dimer from the stem bark of *Acronychia pedunculata* (L.) Miq. *Nat Prod Res.* 2023; 37:1098–105.
144. Wang S-I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SOME CONSTITUENTS OF A SPECIES OF *FICUS*. University of Illinois at Chicago, Health Sciences Center; 1973.

145. Kim JS, Kim JC, Shim SH, Lee EJ, Jin WY, Bae K, et al. Chemical constituents of the root of *Dystaenia takeshimana* and their anti-inflammatory activity. *Archives of Pharmacal Research*. 2006; 29:617–23.
146. Lee S, Shin D-S, Kim JS, Oh K-B, Kang SS. Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Archives of Pharmacal Research*. 2003; 26:449–52.
147. Chatterjee A, Mitra SS. On the constitution of the active principles isolated from the matured bark of *Aegle marmelos*, Correa. *J Am Chem Soc*. 1949; 71:606–9.
148. Quek A, Kassim NK, Lim PC, Tan DC, Mohammad Latif MA, Ismail A, et al.  $\alpha$ -Amylase and dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory effects of *Melicope latifolia* bark extracts and identification of bioactive constituents using in vitro and in silico approaches. *Pharmaceutical Biology*. 2021; 59:962–71.
149. Xu J, Sun X, Liu X, Peng M, Li S, Jin D-Q, et al. Phytochemical constituents from *Melicope pteleifolia* that promote neurite outgrowth in PC12 cells. *Journal of Functional Foods*. 2016; 23:565–72.
150. Hartley TG. A revision of the genus *Medicosma* (Rutaceae). *Australian journal of botany*. 1985; 33:27–64.
151. Du F-L, Du Q-S, Dai J, Tang P-D, Li Y-M, Long S-Y, et al. A comparative study for the organic byproducts from hydrothermal carbonizations of sugarcane bagasse and its bio-refined components cellulose and lignin. *PloS one*. 2018; 13:e0197188.
152. Xie X-L, Ye G-H, Xue J-J, Su T, Tang G-H, Li W, et al. A new prenylated coumarin and a new anthranilamide derivative from *Evodia lepta*. *Journal of Asian natural products research*. 2020; 22:413–7.
153. Scott KN. NMR parameters of biologically important aromatic acids I. Benzoic acid and derivatives. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. 1970; 2:361–76.
154. Waight ES, Razdan TK, Qadri B, Harkar S. Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*. 1987; 26:2063–9.
155. Elgamal MH, Elewa NH, Elkhaisy EA, Duddeck H. <sup>13</sup>C NMR Chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones. *Phytochemistry*. 1979; 18:139–43.
156. Ngunde Ngwendson J, Bedir E, Efange SM, Okunji CO, Iwu MM, Schuster BG, et al. Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects. *Pharmazie*. 2003; 58:587–9.

157. Widyawaruyanti A, Tanjung M, Permanasari AA, Saputri R, Tumewu L, Adianti M, et al. Alkaloid and benzopyran compounds of *Melicope latifolia* fruit exhibit anti-hepatitis C virus activities. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021; 21:1–9.
158. Nakashima K-I, Oyama M, Ito T, Akao Y, Witono JR, Darnaedi D, et al. Novel quinolinone alkaloids bearing a lignoid moiety and related constituents in the leaves of *Melicope denhamii*. *Tetrahedron*. 2012; 68:2421–8.
159. Latif Z, Hartley TG, Rice MJ, Waigh RD, Waterman PG. Isobutylamides and Coumarins from *Melicope melanophloia*. *Biochem Syst Ecol*. 1998; 26:467–8.
160. Parsons IC, Gray AI, Hartley TG, Waterman PG. Acetophenones and coumarins from stem bark and leaves of *Melicope stipitata*. *Phytochemistry*. 1994; 37:565–70.
161. Johns, SR, Lamberton JA, Price, JR, Sioumis AA. Identification of coumarins isolated from *Lepiniopsis ternatensis* (Apocynaceae), *Pterocaulon sphacelatum* (Compositae), and *Melicope melanophloia* (Rutaceae). *Australian Journal of Chemistry*. 1968; 21:3079–80.
162. Ngwendson JN, Bedir E, Efang SMN, Okunji CO, Iwu MM, Schuster BG, et al. Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects. *Pharmazie*. 2003; 58:587–9.
163. Pusset J, Lopez JL, Pais M, Al Neirabeyeh M, Veillon J-M. Isolation and 2D NMR studies of alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*1. *Planta Med*. 1991; 57:153–5.
164. Saputri RD, Tjahjandarie TS, Tanjung M. Alkaloid furokuinolin dan asam sinamat ter-O-geranilasi dari kulit batang *Melicope hookeri* TG Hartley. *J Sains Kes*. 2019; 2:1–7.
165. BATANG DK, Hartley TG, Saputri RD, Tjahjandarie TS, Tanjung M. ALKALOID FUROKUINOLIN DAN ASAM SINAMAT TER-O-GERANILASI. *J Sains Kes*. 2019; 2:1.
166. Hegnauer R. *Phytochemistry and plant taxonomy — an essay on the chemotaxonomy of higher plants*. *Phytochemistry*. 1986; 25:1519–35. doi: 10.1016/S0031-9422(00)81204-2.
167. Singh R. Chemotaxonomy: a tool for plant classification. *Journal of Medicinal Plants*. 2016; 4:90–3.
168. Mouly P, Gaydou EM, Auffray A. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998; 800:171–9. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01131-X.
169. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*. 2000; 157:1415–30.

170. ARENDS MJ, WYLLIE AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International review of experimental pathology*. 1991; 32:223–54.
171. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J-L, Mignotte B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Advances in mitochondrial medicine*. 2012:157–83.
172. Nair P, Lu M, Petersen S, Ashkenazi A. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods in enzymology*. Elsevier; 2014. pp. 99–128.
173. Yanumula A, Cusick JK. *Biochemistry, extrinsic pathway of apoptosis*. 2020.
174. Lossi L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochemical Journal*. 2022; 479:357–84.
175. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*. 2003; 15:725–31.
176. Höffeler F. Die Maschinerie der Apoptose: Chronik eines angekündigten Todes. *Biologie in unserer Zeit*. 2004; 34:16–23.
177. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis*. 2002; 7:313–9.
178. Sohn D. Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion: Modulation der Aktivierung von Initiator-Caspasen, Thesis/dissertation. 2007.
179. Walczak H. Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5:a008698. Epub 2013/05/01. doi: 10.1101/cshperspect.a008698 PMID: 23637280.
180. Ishikawa C, Senba M, Mori N. Anti-adult T-cell leukemia/lymphoma activity of cerdulatinib, a dual SYK/JAK kinase inhibitor. *International Journal of Oncology*. 2018; 53:1681–90.
181. Tayeh M, Nilwarangkoon S, Tanunyutthawongse C, Mahabusarakum W, Watanapokasin R. Apoptosis and antimigration induction in human skin cancer cells by rhodomyltone. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018; 15:5035–40.
182. Invitrogen. Chromatin Condensation/Dead Cell Apoptosis Kit with Hoechst 33342 and PI for Flow Cytometry [updated 22 Dec 2009; cited 3 Jan 2025]. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp13244.pdf>.
183. Hemphill CFP, Sureechatchaiyan P, Kassack MU, Orfali RS, Lin W, Daletos G, et al. OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. *The Journal of antibiotics*. 2017; 70:726–32.

- 184.** Liu S, Dai H, Makhloufi G, Heering C, Janiak C, Hartmann R, et al. Cytotoxic 14-membered macrolides from a mangrove-derived endophytic fungus, *Pestalotiopsis microspora*. *J Nat Prod.* 2016; 79:2332–40.
- 185.** Wang C, Engelke L, Bickel D, Hamacher A, Frank M, Proksch P, et al. The tetrahydroxanthone-dimer phomoxanthone A is a strong inducer of apoptosis in cisplatin-resistant solid cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2019; 27:115044.
- 186.** Le K-T, Bandolik JJ, Kassack MU, Wood KR, Paetzold C, Appelhans MS, et al. New Acetophenones and chromenes from the leaves of *Melicope barbiger* A. Gray. *Molecules.* 2021; 26:688.
- 187.** Kozaki S, Takenaka Y, Mizushima Y, Yamaura T, Tanahashi T. Three acetophenones from *Acronychia pedunculata*. *J Nat Med.* 2014; 68:421–6. doi: 10.1007/s11418-013-0803-y PMID: 24129772.
- 188.** Huang P-L, Won S-J, Day S-H, Lin C-N. A Cytotoxic Acetophenone with a Novel Skeleton, Isolated from *Cynanchum taiwanianum*. *HCA.* 1999; 82:1716–20. doi: 10.1002/(SICI)1522-2675(19991006)82:10%3C1716::AID-HLCA1716%3E3.0.CO;2-O.
- 189.** El Gaafary M, Ezzat SM, El Sayed AM, Sabry OM, Hafner S, Lang S, et al. Acovenoside A induces mitotic catastrophe followed by apoptosis in non-small-cell lung cancer cells. *J Nat Prod.* 2017; 80:3203–10.
- 190.** Jitsuno M, Yokosuka A, Hashimoto K, Amano O, Sakagami H, Mimaki Y. Chemical constituents of *Lycoris albiflora* and their cytotoxic activities. *Nat Prod Commun.* 2011; 6:1934578X1100600208.
- 191.** Sriphana U, Yenjai C, Koatthada M. Cytotoxicity of chemical constituents from the roots of *Knema globularia*. *Phytochemistry Letters.* 2016; 16:129–33.
- 192.** Kouloura E, Halabalaki M, Lallemand M-C, Nam S, Jove R, Litaudon M, et al. Cytotoxic prenylated acetophenone dimers from *Acronychia pedunculata*. *J Nat Prod.* 2012; 75:1270–6.
- 193.** Koch K, Schulz G, Döring W, Büchter C, Havermann S, Mutiso PC, et al. 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.* 2019; 71:1007–16.
- 194.** Wätjen W, Kulawik A, Suckow-Schnitker AK, Chovolou Y, Rohrig R, Ruhl S, et al. Pterocarpan phaseollin and neorautenol isolated from *Erythrina addisoniae* induce

- apoptotic cell death accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Toxicology*. 2007; 242:71–9.
- 195.** Wätjen W, Suckow-Schnitker AK, Rohrig R, Kulawik A, Addae-Kyereme J, Wright CW, et al. Prenylated flavonoid derivatives from the bark of *Erythrina addisoniae*. *J Nat Prod*. 2008; 71:735–8.
- 196.** Lichius JJ, Thoison O, Montagnac A, Païs M, Gueritte-Voegelein F, Sévenet T, et al. Antimitotic and cytotoxic flavonols from *Zieridium pseudobtusifolium* and *Acronychia porteri*. *J Nat Prod*. 1994; 57:1012–6.
- 197.** Lewin G, Maciuk A, Thoret S, Aubert G, Dubois J, Cresteil T. Semisynthesis of natural flavones inhibiting tubulin polymerization, from hesperidin. *J Nat Prod*. 2010; 73:702–6.
- 198.** Khaled M, Jiang Z-Z, Zhang L-Y. Deoxypodophyllotoxin: A promising therapeutic agent from herbal medicine. *J Ethnopharmacol*. 2013; 149:24–34.
- 199.** Roitman JN, James LF. Chemistry of toxic range plants. Highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*. *Phytochemistry*. 1985; 24:835–48.
- 200.** Bittner M, Silva M, Vargas J, Bohlmann F. Biologically active flavones from *Gutierrezia resinosa*. *Phytochemistry*. 1983; 22:1523–4.
- 201.** Hartwell JL, Abbot BJ. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*. Garattini, S., Goldin, A., Hawking, F., Kopin, I. J., Eds. 1969:117–209.
- 202.** Ahmadpourmir H, Attar H, Asili J, Soheili V, Taghizadeh SF, Shakeri A. Natural-derived acetophenones: chemistry and pharmacological activities. *Nat Prod Bioprospect*. 2024; 14:1–36.
- 203.** Hartley TG. On the taxonomy and biogeography of *Euodia* and *Melicope* (Rutaceae). ; 2000.
- 204.** Hartley TG, Stone BC. Reduction of *Pelea* with New Combinations in *Melicope* (Rutaceae). *TAXON*. 1989; 38:119–23. doi: 10.2307/1220910.
- 205.** Gleye J, Moulis C, Doazan MN. Chemical constituents of *Evodia* [*Euodia*] *madagascariensis*. 1983.
- 206.** Rondest J. *Plants of Madagascar III. The constituents of Evodia belahe*. 1968.
- 207.** Nur Kartinee Kassim, Nur Kartinee Kassim, Mawardi Rahmani MR, Amin Ismail AI, Aminah Abdullah AA, Khalid Hamid Musa, Khalid Hamid Musa. The measurement of antioxidant capacity of *Melicope glabra* by ORAC-FL and DPPH and its chemical constituents. 2012.

208. McKenzie AW, Price, JR. Alkaloids of the Australian Rutaceae: *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) Correa. Australian Journal of Scientific Research, Series A: Physical Sciences, vol. 5, p. 579. 1952; 5:579.
209. Ding X-Y, Wen J-R, Lin W-Y, Huang G-Y, Feng Q, Duan L, et al. Phloroglucinol derivatives, coumarins and an alkaloid from the roots of *Evodia lepta* Merr. *Phytochemistry*. 2023; 213:113774.
210. Wei H-L, Zhou S-X, Jiang Y, Song Y-L, Li J, Tu P-F. Chemical constituents from leaves of *Evodia lepta*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*. 2013; 38:1193–7.
211. Chen S, Jian Y, Liu Y, Zhang Z, Li X, Yu Q. Deep eutectic solvents promote in-situ hydrogenolysis of *Evodia lepta* residue in preparing small aromatic phenol ketones. *Fuel*. 2024; 366:131348. doi: 10.1016/j.fuel.2024.131348.
212. Yang C, Lai C, Pan J, Gao J, Shen B, Ru Y, et al. Maintaining calcium homeostasis as a strategy to alleviate nephrotoxicity caused by evodiamine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2024; 281:116563.
213. Na MW, Jeong SY, Ko Y-J, Kang D-M, Pang C, Ahn M-J, et al. Chemical Investigation of *Tetradium Ruticarpum* Fruits and Their Antibacterial Activity against *Helicobacter Pylori*. *ACS omega*. 2022; 7:23736–43.
214. Ng KM, But PP-H, Gray AI, Hartley TG, Kong Y-C, Waterman PG. The Biochemical of *Tetradium*, *Euodia* and *Melicope* and their significance in the Rutaceae. *Biochem Syst Ecol*. 1987; 15:587–93.
215. Vu V-T, Nguyen M-T, Khoi N-M, Xu X-J, Kong L-Y, Luo J-G. New lignans and acetophenone derivatives with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from the leaves of *Melicope patulinervia*. *Fitoterapia*. 2021; 148:104805.
216. Li B-Y, Zhang J-W, Zheng Y, Wang D, Wang C-F, Du S-S. Fumigant Contact and Repellent Actions of Essential Oils of Leaves, Fruits and Stems from *Melicope pteleifolia* Against Three Pests. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2023; 26:432–45.
217. Murphy S, Ritchie E, Taylor W. Constituents of *Melicope perspicuinervia* (Rutaceae). The Structures of Halfordinine and Melinervin, a New Flavone. *Australian Journal of Chemistry*. 1974; 27:187–94.
218. Simões CM, Amoros M, Girre L, Gleye J, Fauvel M-T. Antiviral activity of ternatin and meliternatin, 3-methoxyflavones from species of Rutaceae. *J Nat Prod*. 1990; 53:989–92.

219. Balgir BS, Mander LN, Mander ST. A Revision of the Structures proposed for the Melicope Extractives, Melicopol and Methylmelicopol. *Australian Journal of Chemistry*. 1973; 26:2459–72.
220. Brophy JJ, Goldsack RJ, Forster PI. Leaf essential oils of the Australian species of *Acronychia* (Rutaceae). *Journal of Essential Oil Research*. 2004; 16:597–607.
221. Muyard F, Bissoue AN, Bevalot F, Tillequin F, Cabalion P, Vaquette J. Acetophenones and other constituents from the roots of *Melicope erromangensis*. *Phytochemistry*. 1996; 42:1175–9.
222. Marchant YY, Turjman M, Flynn T, Balza F, Mitchell JC, Towers GN. Identification of psoralen, 8 - methoxypsoralen, isopimpinellin, and 5, 7 - dimethoxycoumarin in *Pelea anisata* H. Mann. *Contact dermatitis*. 1985; 12:196 – 9.
223. Su T-L, Lin F-W, Teng C-M, Chen K-T, Wu T-S. Antiplatelet aggregation principles from the stem and root bark of *Melicope triphylla*. *Phytother Res*. 1998; 12:S74-S76.
224. Nakashima K, Oyama M, Iinuma M. Chemical Constituents of *Melicope* Species (Rutaceae). *Gifu Yakka Daigaku Kiyo*. 2013; 62:38.
225. Nakashima K-I, Oyama M, Ito T, Murata H, Iinuma M. New furanocoumarins from the fruits of *Melicope triphylla*. *HETEROCYCLES*. 2011; 83:1603.
226. Rei-Sheu H, Chano-Yih D, Shang-Kwei W, Tai-Tsung C. Cytotoxic flavonoids from the leaves of *Melicope triphylla*. *Phytochemistry*. 1993; 35:271–2.
227. Higa M, Nakadomari E, Imamura M, Ogihara K, Suzuka T. Isolation of four new flavonoids from *Melicope triphylla*. *Chem Pharm Bull*. 2010; 58:1339–42.  
doi: 10.1248/cpb.58.1339 PMID: 20930401.
228. Higa M, Imamura M, Shimoji K, Ogihara K, Suzuka T. Isolation of six new flavonoids from *Melicope triphylla*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 2012; 60:1112–7.
229. Shaari K, Safri S, Abas F, Lajis NHJ, Israif DA. A geranylacetophenone from the leaves of *Melicope pteleifolia*. *Nat Prod Res*. 2006; 20:415–9.  
doi: 10.1080/14786410500045655.
230. Yao Q, Gao Y, Lai C, Wu C, Zhao C-L, Wu J-L, et al. The phytochemistry, pharmacology and applications of *Melicope pteleifolia*: A review. *J Ethnopharmacol*. 2020; 251:112546.
231. Nguyen NH, Ha TKQ, Choi S, Eum S, Lee CH, Bach TT, et al. Chemical constituents from *Melicope pteleifolia* leaves. *Phytochemistry*. 2016; 130:291–300.  
doi: 10.1016/j.phytochem.2016.06.011.

232. Chen KT, Lin L-C, Chou C-J, Chen C-F. A novel acetophenone di-C-glycoside from *Melicope pteleifolia* fruit. *The Chinese Pharmaceutical Journal*. 1994; 46:165–74.
233. Van NH, Kamperdick C, van Sung T, Adam G. Benzopyran dimers from *Melicope pteleifolia*. *Phytochemistry*. 1998; 48:1055–7.
234. Kamperdick C, Van NH, van Sung T, Adam G. Bisquinolinone alkaloids from *Melicope pteleifolia*. *Phytochemistry*. 1998; 50:177–81. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00500-7.
235. Zhu S, Gao Y, Wei Z, XU R. A new phenylated flavone from *Melicope pteleifolia*. *Chinese Herbal Medicines*. 2011:81–3.
236. Lee B-W, Park J-G, Ha TKQ, Pham HTT, An J-P, Noh J-R, et al. Constituents of the edible leaves of *Melicope pteleifolia* with potential analgesic activity. *J Nat Prod*. 2019; 82:2201–10.
237. Mester I. Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales.—In Waterman, PG, Grundon, MF (Eds.): *Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales*: London: Academic Press; 1983.
238. Kirby KD, Sutherland MD. Some naturally occurring dimethylchromenes. II. Alloevodione. *Australian Journal of Chemistry*. 1956; 9:411–5.
239. Smith G, Wang E, Bartley JP, Bott RC. Pachypodol (4, 5'-dihydroxy-3, 3', 7-trimethoxyflavone). *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*. 2001; 57:o973-o975.
240. Mohan PS, Ramesh M, Shanmugam P. Studies on the Indian Rutaceae. Chemical Investigation of *Limonia alata* and *Evodia lunu-ankenda*. *J Nat Prod*. 1985; 48:501.
241. Simonsen HT, Adersen A, Bremner P, Heinrich M, Wagner Smitt U, Jaroszewski JW. Antifungal constituents of *Melicope borbonica*. *Phytother Res*. 2004; 18:542–5. doi: 10.1002/ptr.1482.
242. Quek A, Mohd Zaini H, Kassim NK, Sulaiman F, Rukayadi Y, Ismail A, et al. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) and antibacterial properties of *Melicope glabra* bark extracts and isolated compounds. *PloS one*. 2021; 16:e0251534.
243. Lim PC, Ali Z, Khan IA, Khan SI, Kassim NK, Awang K, et al. Cytotoxic constituent of *Melicope latifolia* (DC.) TG Hartley. *Nat Prod Res*. 2022; 36:1416–24.
244. Valenciennes E, Smadja J, Conan JY. Coumarines Des Feuilles De *Euodia Borbonica* Var. *Borbonica* (Rutaceae). *RIVISTA ITALIANA EPPOS*. 1998; 9:716–23.
245. Valenciennes E, Smadja J, Conan JY. Screening for biological activity and chemical composition of *Euodia borbonica* var. *borbonica* (Rutaceae), a medicinal plant in Reunion Island. *J Ethnopharmacol*. 1999; 64:283–8.

- 246.** Adsersen A, Smitt UW, Simonsen HT, Christensen SB, Jaroszewski JW. Prenylated acetophenones from *Melicope obscura* and *Melicope obtusifolia* ssp. *obtusifolia* var. *arborea* and their distribution in Rutaceae. *Biochem Syst Ecol.* 2007; 35:447–53. doi: 10.1016/j.bse.2006.04.014.
- 247.** Ali NAM, Rahmani M, Shaari K, Ismail HBM, Sukari MA, Ali AM, et al. Chemical constituents of leaves and barks of *Melicope hookeri* TG Hartley. *Pertanika Journal Science & Technology.* 2006; 14:75–80.
- 248.** Saputri RD, Tjahjandarie TS, Tanjung M. Meliglabrin, a new flavonol derivative from the leaves of *Melicope glabra* (Blume) TG Hartley. *Natural Product Sciences.* 2018; 24:155–8.
- 249.** Simonsen HT, Larsen MD, Nielsen MW, Adsersen A, Olsen CE, Strasberg D, et al. Methyleneedioxy- and methoxyflavones from *Melicope coodeana* syn. *Euodia simplex*. *Phytochemistry.* 2002; 60:817–20.
- 250.** Widyawaruyanti A, Tumewu L, Hafid AF, Wahyuni TS, Permanasari AA, Adianti M, et al. Antiviral and molecular docking analysis of methoxyflavones isolated from *Melicope latifolia* leaves against HCV. *Journal of Research in Pharmacy.* 2023; 27.
- 251.** Kim JK, Choi E, Hong YH, Kim H, Jang Y-J, Lee JS, et al. Syk/NF- $\kappa$ B-targeted anti-inflammatory activity of *Melicope accedens* (Blume) TG Hartley methanol extract. *J Ethnopharmacol.* 2021; 271:113887.
- 252.** Li G-L, Zhu D-Y. Two chromenes from *Evodia lepta*. *Phytochemistry.* 1998; 48:1051–4.
- 253.** Baiseitova A, Shah AB, Kim JY, Ban YJ, Kim JH, Nafiah MA, et al. O-alkylated quercetins with selective acetylcholinesterase and  $\beta$ -secretase inhibitions from *Melicope glabra* leaves, and their flavonols profile by LC-ESI-Q-TOF/MS. *Journal of Functional Foods.* 2021; 84:104602.
- 254.** Engels F, Renirie BF, Hart BA 't, Labadie RP, Nijkamp FP. Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrorhiza kurroa*, on arachidonic acid metabolism. *FEBS letters.* 1992; 305:254–6.
- 255.** Miyazawa M, Shimamura H, Nakamura S, Kameoka H. Antimutagenic activity of (+)- $\beta$ -eudesmol and paeonol from *Dioscorea japonica*. *J Agric Food Chem.* 1996; 44:1647–50.
- 256.** Johnson AJ, Kumar R A, Rasheed SA, Chandrika SP, Chandrasekhar A, Baby S, et al. Antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of two major chromenes from *Melicope lunu-ankenda*. *J Ethnopharmacol.* 2010; 130:267–71. doi: 10.1016/j.jep.2010.05.003 PMID: 20457245.

257. Chen I-S, Chen H-F, Cheng M-J, Chang Y-L, Teng C-M, Tsutomu I, et al. Quinoline alkaloids and other constituents of *Melicope semecarpifolia* with antiplatelet aggregation activity. *J Nat Prod.* 2001; 64:1143–7. doi: 10.1021/np010122k.
258. Briggs LH, Cebalo T. A synthesis of melibentin. *Australian Journal of Chemistry.* 1964/04/01; 17:461–3. doi: 10.1071/CH9640461.
259. Giap TH, Thoa HT, Oanh VTK, Hang NTM, Dang NH, Thuc DN, et al. New acetophenone and cardanol derivatives from *Knema pachycarpa*. *Nat Prod Commun.* 2019; 14:1934578X19850046.
260. Ito C, Hosono M, Tokuda H, Wu T-S, Itoigawa M. Acetophenones from *Acronychia pedunculata* and their cancer chemopreventive activity. *Nat Prod Commun.* 2016; 11:1934578X1601100929.
261. Oyama M, Bastow KF, Tachibana Y, Shirataki Y, Yamaguchi S, Cragg GM, et al. Antitumor agents 225. Acrofoliones A and B, two novel cytotoxic acetophenone dimers from *Acronychia trifoliolata*. *The Chinese Pharmaceutical Journal.* 2003; 55:239–45.
262. Miyake K, Suzuki A, Morita C, Goto M, Newman DJ, O’Keefe BR, et al. Acetophenone monomers from *Acronychia trifoliolata*. *J Nat Prod.* 2016; 79:2883–9.
263. Niu Q-W, Chen N-H, Wu Z-N, Luo D, Li Y-Y, Zhang Y-B, et al. Isolation and identification of new prenylated acetophenone derivatives from *Acronychia oligophlebia*. *Nat Prod Res.* 2019; 33:2230–5.
264. Robertson LP, Lucantoni L, Duffy S, Avery VM, Carroll AR. Acrotrione: an oxidized xanthene from the roots of *Acronychia pubescens*. *J Nat Prod.* 2019; 82:1019–23.
265. Ito C, Matsui T, Ban Y, Wu T-S, Itoigawa M. Acetophenones Isolated from *Acronychia pedunculata* and their Anti-proliferative Activities. *Nat Prod Commun.* 2016; 11:1934578X1601100125.
266. Miyake K, Morita C, Suzuki A, Matsushita N, Saito Y, Goto M, et al. Prenylated acetophloroglucinol dimers from *Acronychia trifoliolata*: structure elucidation and total synthesis. *J Nat Prod.* 2019; 82:2852–8.
267. Waterman PG. Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance. *Biochem Syst Ecol.* 1975; 3:149–80.
268. Chen KS, Chang YL, Teng CM, Chen CF, Wu YC. Furoquinolines with antiplatelet aggregation activity from leaves of *Melicope confusa*. *Planta Med.* 2000; 66:80–1. doi: 10.1055/s-0029-1243116 PMID: 10705744.

- 269.** Nam K, Je K-H, Shin Y-J, Kang SS, Mar W. Inhibitory effects of furoquinoline alkaloids from *Melicope confusa* and *Dictamnus albus* against human phosphodiesterase 5 (hPDE5A) in vitro. *Archives of Pharmacal Research*. 2005; 28:675–9.
- 270.** Kang SS, Woo WS. Furoquinoline alkaloids from the leaves of *Melicope confusa*. *Archives of Pharmacal Research*. 1986; 9:11–3.
- 271.** Saputri RD, Retnowati R, Supratman U, Tjahjandarie TS, Tanjung M. Three novel quinolinone alkaloids from the leaves of *Melicope denhamii*. *Nat Prod Res*. 2023; 37:197–203.
- 272.** Epifano F, Fiorito S, Genovese S. Phytochemistry and pharmacognosy of the genus *Acronychia*. *Phytochemistry*. 2013; 95:12–8. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.07.013 PMID: 23920228.
- 273.** Skaltsounis AL, Tillequin F, Koch M, Sevenet T. Plantes de Nouvelle-Calédonie. LXXXIII. Alcaloïdes des Tiges Feuillées de *Melicope leptococca*. *J Nat Prod*. 1983; 46:732–5.
- 274.** Nguyen TH, Nguyen THT, Dang TPT, Nguyen PAT, Truong TBN, Phung NKP, et al. Three quinolinone alkaloid–phenylpropanoid adducts from *Melicope pteleifolia*. *Nat Prod Res*. 2022; 36:3858–64.
- 275.** McCormick JL, McKee TC, Cardellina JH, Boyd MR. HIV inhibitory natural products. 26. Quinoline alkaloids from *Euodia roxburghiana*. *J Nat Prod*. 1996; 59:469–71.
- 276.** Rasamison VE, Brodie PJ, Merino EF, Cassera MB, Ratsimbason MA, Rakotonandrasana S, et al. Furoquinoline alkaloids and methoxyflavones from the stem bark of *Melicope madagascariensis* (Baker) TG Hartley. *Nat Prod Bioprospect*. 2016; 6:261–5.
- 277.** Melimoluccanin, A new isoprenylated quinolone alkaloid from the leaves of *Melicope moluccana* TG Hartley. IOP Publishing; 2018.
- 278.** O'Donnell F, Ramachandran VN, Smyth TJP, Smyth WF, Brooks P. An investigation of bioactive phytochemicals in the leaves of *Melicope vitiflora* by electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2009; 634:115–20. doi: 10.1016/j.aca.2008.11.066 PMID: 19154819.
- 279.** Dreyer DL. Chemotaxonomy of the Rutaceae. VII. Alkaloids in *Evodia xanthoxyloides*. *J Org Chem*. 1970; 35:2420–2.
- 280.** Dreyer DL. Chemotaxonomy of the Rutaceae. VII. Alkaloids in *Evodia xanthoxyloides*. *J Org Chem*. 1970; 35:2420–2.

- 281.** Werny F, Scheuer PJ. Hawaiian plant studies—IX: The alkaloids of *Platydesma campanulata* mann. *Tetrahedron*. 1963; 19:1293–305.
- 282.** Anet FA, Gilham PT, Gow P, Hughes GK, Ritchie E. The Chemical Constituents of Australian *Flindersia* Species. III. The Alkaloids of *Flindersia collina* Bail. *Australian Journal of Chemistry*. 1952; 5:412–9.
- 283.** 寺阪正信. コクサギ *Orixa Japonica*, Thunb. 根皮のアルカロイド研究 (第三報). *Yakugaku Zasshi*. 1933; 53:1046 – 56.
- 284.** Rapoport H, Hiem HTG. Isolation of Evolitrine from *Cusparia macrocarpa*. *J Org Chem*. 1960; 25:2251.
- 285.** Cui B, Chai H, Dong Y, Horgen FD, Hansen B, Madulid DA, et al. Quinoline alkaloids from *Acronychia laurifolia*. *Phytochemistry*. 1999; 52:95–8.
- 286.** Bourgaud F, Hehn A, Lariat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*. 2006; 5:293–308.
- 287.** Junior CMS, Silva SMC, Sales EM, Da Silva Velozo E, Dos Santos, Emile Kelly Porto, Canuto GAB, et al. Coumarins from Rutaceae: Chemical diversity and biological activities. *Fitoterapia*. 2023; 168:105489.
- 288.** Sharifi-Rad J, Cruz-Martins N, López-Jornet P, Lopez EP-F, Harun N, Yeskaliyeva B, et al. Natural coumarins: exploring the pharmacological complexity and underlying molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021; 2021:6492346.
- 289.** Venkata Sairam K, M. Gurupadayya B, S. Chandan R, K. Nagesha D, Vishwanathan B. A review on chemical profile of coumarins and their therapeutic role in the treatment of cancer. *Current Drug Delivery*. 2016; 13:186–201.
- 290.** Bhattarai N, Kumbhar AA, Pokharel YR, Yadav PN. Anticancer potential of coumarin and its derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2021; 21:2996–3029.
- 291.** Dong L, Xu W-W, Li H, Bi K-H. In vitro and in vivo anticancer effects of marmesin in U937 human leukemia cells are mediated via mitochondrial-mediated apoptosis, cell cycle arrest, and inhibition of cancer cell migration Retraction in/10.3892/or. 2021.8065. *Oncology reports*. 2018; 39:597–602.
- 292.** Wang Q, Zhong S, Wu H, Wu Q. In vitro anti-cancer effect of marmesin by suppression of PI3K/Akt pathway in esophagus cancer cells. *Esophagus*. 2022; 19:163–74.
- 293.** Dong L, Xu W-W, Li H, Bi K-H. [Retracted] In vitro and in vivo anticancer effects of marmesin in U937 human leukemia cells are mediated via mitochondrial-mediated

- apoptosis, cell cycle arrest, and inhibition of cancer cell migration. *Oncology reports*. 2021; 45:1.
294. Patil JR, Jayaprakasha GK, Kim J, Murthy KNC, Chetti MB, Nam S-Y, et al. 5-Geranyloxy-7-methoxycoumarin inhibits colon cancer (SW480) cells growth by inducing apoptosis. *Planta Med*. 2013; 79:219–26.
295. Krishnaswamy NR. Flavonoids as chemotaxonomic markers-A review.
296. Swain T. Flavonoids as chemotaxonomic markers in plants. *Pigm. Plants*. 1981; 7:224–36.
297. Emerenciano VdP, Militão J, Campos CC, Romoff P, Kaplan MAC, Zambon M, et al. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem Syst Ecol*. 2001; 29:947–57.
298. Waterman PG, Hussain RA. Chemosystematics in the Rutaceae: a chemotaxonomic survey of flavonoids and monoterpenes in leaves of *Acmadenia* species. *Bot J Linn Soc*. 1983; 86:227–35.
299. Appelhans MS, Bayly MJ, Heslewood MM, Groppo M, Verboom GA, Forster PI, et al. A new subfamily classification of the Citrus family (Rutaceae) based on six nuclear and plastid markers. *TAXON*. 2021; 70:1035–61.
300. Zhang Y, Yang L-J, Jiang K, Tan C-H, Tan J-J, Yang P-M, et al. Glycosidic constituents from the roots and rhizomes of *Melicope pteleifolia*. *Carbohydr Res*. 2012; 361:114–9.
301. Rahman A, Mahardika I, Saputri RD, Tjahjandarie TS, Tanjung M. Isolasi, karakterisasi, dan uji aktivitas antioksidan senyawa turunan kuersetin dari kulit batang melicope quercifolia. *J Sains Kes*. 2020; 2:413–7.
302. Zuxing C, Jinxia H, Yan L, Yijun P, Zhanghuang X. Studies on the chemical constituent in the bark of *Melicope Simplex*. *Journal of Hubei University (natural Science)*. 1997; 19:250–3.
303. Rei-Sheu H, Chano-Yih D, Shang-Kwei W, Tai-Tsung C. Cytotoxic flavonoids from the leaves of *Melicope triphylla*. *Phytochemistry*. 1993; 35:271–2.
304. Harborne JB, Tomás-Barberán FA, Williams CA, Gil MI. A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*. 1986; 25:2811–6.
305. Youssef D, El-Bakatoushi R, Elframawy A, El-Sadek L, Badan GE. Molecular phylogenetic study of flavonoids in medicinal plants: a case study family Apiaceae. *Journal of Plant Research*. 2023; 136:305–22.
306. Stuessy TF, Crawford DJ. Flavonoids and phylogenetic reconstruction. *Plant systematics and evolution*. 1983; 143:83–107.

- 307.** Flodin P. The Sephadex story. *Polym Eng Sci.* 1998; 38:1220–8.  
doi: 10.1002/pen.10291.
- 308.** Targett NM, Kilcoyne JP, Green B. Vacuum liquid chromatography: an alternative to common chromatographic methods. *The Journal of Organic Chemistry.* 1979; 44:4962–4. doi: 10.1021/jo00394a045.
- 309.** Pelletier SW, Chokshi HP, Desai HK. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *J Nat Prod.* 1986; 49:892–900.
- 310.** Sargenti SR, Vichnewski W. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material. *Phytochem Anal.* 2000; 11:69–73.  
doi: 10.1002/(SICI)1099-1565(200003/04)11:2<69::AID-PCA499>3.0.CO;2-Y.
- 311.** Coll JC, Bowden BF. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J Nat Prod.* 1986; 49:934–6.  
doi: 10.1021/np50047a033.
- 312.** Ohtani I, Kusumi T, Kashman Y, Kakisawa H. High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J Am Chem Soc.* 1991; 113:4092–6.

## 9 Anhang

### 9.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Isolierung und Identifizierung sekundärer Inhaltsstoffe aus den Blättern von *Melicope barbiger* (A. Gray) sowie Untersuchungen zu deren Zytotoxizität“ 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 21.01.2025

Kim Thao Tran-Cong

## 9.2 Beiträge zur Forschung

Le, Kim-Thao, Jan J. Bandolik, Matthias U. Kassack, Kenneth R. Wood, Claudia Paetzold, Marc S. Appelhans, and Claus M. Passreiter. 2021. "New Acetophenones and Chromenes from the Leaves of *Melicope barbiger* A. Gray" *Molecules* 26, no. 3: 688.

<https://doi.org/10.3390/molecules26030688>

Die Beteiligung der Erstautorin beinhaltet Forschung, Untersuchung und Strukturaufklärung von sekundären Inhaltsstoffen, Verfassen sowie Editierung des Manuskriptes.

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank den Personen aussprechen, deren Mithilfe entscheidend zur Anfertigung dieser Dissertation beigetragen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Claus M. Paßreiter. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, dieses interessante Forschungsthema in seinem Arbeitskreis zu bearbeiten und hat somit den Grundstein für meine Arbeit gelegt. Seine hervorragende Betreuung und wohlwollende Unterstützung haben mich immer wieder aufs Neue ermutigt und motiviert. Ich danke für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, in denen er mich durch seine vielfältigen Ideen inspirierte. Ganz großen Dank auch für den respektvollen Austausch und die produktive Zusammenarbeit, sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene.

Ich danke dem ehemaligen Institutsleiter, Herrn Prof. Dr. Dres. h.c. Peter Proksch, ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Auch möchte ich mich für seine hilfsbereite und wertschätzende Begleitung als Mentor bedanken. Durch die Teilnahme an den Seminaren seiner Arbeitsgruppe durfte ich wertvolle Erfahrungen sammeln.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Kooperationspartner Herrn Dr. Marc Appelhans und Frau Dr. Claudia Pätzold von der Georg-August-Universität Göttingen-Abteilung Systematik, Biodiversität und Evolution der Pflanzen mit Herbarium und an Herrn Kenneth R. Wood vom National Tropical Botanical Garden in Kalaheo (Hawaii) für die Bestimmung und Bereitstellung des Pflanzenmaterials sowie für die konstruktive Beteiligung an unserer Publikation.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Kalscheuer bedanke ich mich dafür, dass er es mir als kommissarischer Leiter des Instituts ermöglichte, meine Arbeit in dem Institut abzuschließen und mir dabei unterstützend zur Seite stand.

Ferner gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Nicole Teusch, die mir als neue Leiterin des Instituts diese Möglichkeit weiterhin gewährte.

Mein außerordentlicher Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Horst Weber für seinen unermüdlichen Einsatz und seinen verständnisvollen Beistand. Besonders möchte ich mich für seine Beratung zum Verfassen der Kapitel zur Strukturaufklärung und Stereochemie der komplexen Verbindungen 6, 7 und 8 bedanken. Sein anregender Enthusiasmus motivierte mich insbesondere in der finalen Phase der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Matthias Kassack und Herrn Dr. Jan Bandolik vom Institut für Pharmazeutische Chemie der HHU danke ich für die Testung der zytotoxischen Aktivität meiner isolierten Substanzen und für die gute Zusammenarbeit an unserer Publikation. Für die Überprüfung der Darstellung der zytotoxischen Ergebnisse bin ich Herrn Dr. Jan Bandolik sowie Frau Dr. Alexandra Hamacher sehr dankbar.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. Peter Tommes und Herrn Ralf Bürgel aus der Abteilung Massenspektrometrie des CeMSA@HHU für die Aufnahme der massenspektroskopischen Daten von meinen isolierten Substanzen.

Des Weiteren danke ich Herrn Mohanad Aian und Frau Tanja Muth aus der NMR-Abteilung des CeMSA@HHU für die Durchführung der NMR-Messungen und die Bereitstellung der NMR-Daten.

Ein herzlicher Dank gilt auch Frau Eva Müller für ihre hilfreiche Unterstützung im Labor. Gerade zu Beginn der Arbeit hat sie mir mit ihren wertvollen Erfahrungen den Einstieg in die Laborarbeit erleichtert.

Frau Katja Friedrich, Frau Simone Miljanovic, Frau Simone Mönninghof-Pützer, Frau Linda Wiegand und Frau Claudia Eckelskemper spreche ich meinen Dank für ihre Hilfsbereitschaft und ihre einfühlsame Begleitung während meiner gesamten Promotionszeit aus.

Schließlich danke ich allen Kolleginnen und Kollegen aus den Arbeitskreisen von Prof. Dr. Dres. hc Proksch und Professor Dr. Kalscheuer. Der stete wissenschaftliche Austausch mit ihnen war für das Gelingen dieser Arbeit von großer Bedeutung. Insbesondere erwähnen möchte ich die Hilfsbereitschaft sowie den offenen und einfühlsamen Umgang miteinander. Aus dieser persönlichen Unterstützung sind wertvolle Freundschaften mit Dina, Flamenia, Hao und Haiqian entstanden, die ich nicht missen möchte.

Die gemeinsame Betreuung der Praktika zeichnete sich durch eine kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit aus.

Nochmals einen großen Dank an alle!

Meinem Vater Thanh und meinem Bruder Thang möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen. Sie standen mir mit ihrer unschätzbaren Liebe und ihrem aufrichtigen Vertrauen in mich während der gesamten Promotionszeit zur Seite.

## Danksagung

---

Auch ein großer Dank geht an meine Schwiegereltern sowie an meine beiden Schwäger. Ihr unermüdlicher Rückhalt stellte eine wertvolle Unterstützung dar.

Ich danke auch meinen langjährigen Freundinnen Truc-Giang und Sibylle, die mich mit ihrem Mitfiebern und Mitfreuen während der gesamten Zeit meiner Promotion begleiteten. Aus ihrem herzlichen Zuspruch und ihrem aufrichtigen Verständnis konnte ich stets neue Energie gewinnen.

Schließlich möchte ich ganz besonders meinem Mann Nam danken. Seine Liebe, Geduld und sein Verständnis bildeten die Quelle, aus der ich Kraft und Ruhe schöpfen konnte. Gerade in der Zeit meiner Promotion war er mein Anker.

Die Liebe und Warmherzigkeit meiner verstorbenen Mutter sind für mich immer präsent und stärkten mich während der gesamten Promotionszeit.

Liebe Mama, diese Arbeit möchte ich Dir widmen!