

Phytochemische und pharmakologische
Untersuchungen an
Amomum aculeatum Roxb.

Diplomarbeit
im Fachbereich Biologie
der Universität Konstanz

von
Stefan Mayr
aus Immenstadt

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter M. H. Kroneck
(Universität Konstanz)
2. Gutachter: Prof. Dr. Otto Sticher
(Eidgenössische Technische Hochschule Zürich)

Konstanz
2002

Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen, die Religion braucht er zum Handeln [...], weil wir mit unseren Willensentscheidungen nicht warten können, bis die Erkenntnisse vollständig und bis wir allwissend geworden sind.

Max Planck (1858 - 1947)

Vorwort

Gleich zu Beginn gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Peter Kroneck an der Universität Konstanz für sein spontanes Entgegenkommen sowie die motivierende Bereitschaft, meine externe Diplomarbeit zu betreuen und auch in schwierigen Situationen stets mit Interesse und Wohlwollen zu begleiten.

Ebenso bin ich Herrn Professor Otto Sticher an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) Zürich, welcher mich als Biologen in seine pharmazeutisch orientierte Arbeitsgruppe aufnahm, zu großem Dank verpflichtet, sowohl was die organisatorisch wie materiell hervorragenden Forschungsbedingungen als auch den stets liebenswürdigen Gedankenaustausch anbetrifft.

Ferner möchte ich unserem Oberassistenten Dr. Jörg Heilmann, den ich im Laufe der vergangenen Semester in jeder Hinsicht - fachlich wie menschlich - als den idealen Betreuer kennenlernen durfte, meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Dies bezieht nicht nur seine Funktion als begeisterter Dozent für das Fach Phytochemie mit ein, sondern auch die immer nach Kräften gewährte wissenschaftliche Unterstützung neben seiner treuen Freundschaft. Darüber hinaus verdanke ich ihm sowie einigen seiner ehemaligen Kollegen an der Universität Düsseldorf die Prüfung meiner Reinsubstanzen am Arachidonsäure-Metabolismus und auf antioxidative Aktivität.

Beim Anfertigen dieser Diplomarbeit erhielt ich daneben wertvolle Hilfe von verschiedenen Seiten. So führte mich Dr. Tulla Quadri-Spinelli ganz zu Anfang meines Gaststudiums in die Grundlagen der phytopharmazeutischen Analytik ein. Dr. Oliver Zerbe (Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, ETH Zürich, CH) stand mir bei Fragen bezüglich NMR-Spektren und Molekülstruktur mit Rat und Tat zur Seite. Die Zytotoxizitätsprüfung an KB-Zellen führte unser ehemaliger Laborant Michael Wasescha zuverlässig aus, wohingegen sich für die L6-Zellen sowie ausgewählte Protozoenspezies PD Dr. Reto Brun (Schweizerisches Tropeninstitut, Basel, CH) verantwortlich zeigte. Dr. Walter Amrein und seine Mitarbeiter nahmen die Massenspektren auf, Dr. Engelbert Zass (jeweils Institut für Organische Chemie, ETH Zürich, CH) wiederum half uns bei Strukturrecherchen. Die Sammlung und Identifizierung des Pflanzenmaterials wäre ohne Pius Piskaut und Dr. Topul Rali (beide an der Universität von Papua-Neuguinea, PNG) sowie Dr. Matthias Baltisberger (Geobotanisches Institut, ETH Zü-

rich, CH) neben Dr. Max van Balgooy (Rijksherbarium, Leiden, NL) nicht möglich gewesen. Professor Peter Rüedi (Institut für Organische Chemie, Universität Zürich, CH) gab entscheidende Hinweise zur Diskussion stereochemischer wie biosynthetischer Fragestellungen, Professor Herbert Budzikiewicz (Institut für Organische Chemie II, Universität zu Köln, D) wichtige Ratschläge für die massenspektrometrische Fragmentierung stark lipophiler Substanzen. Unser Informatikbetreuer Ivo Fähnle verwaltete vorbildlich die gruppeneigenen Computersysteme, der Institutsverwalter René Bemsel und seine Mitarbeiter garantierten zuverlässig die Chemikalien- wie Materialbeschaffung. Allen genannten Personen gilt an dieser Stelle für ihren Kooperationswillen und das gute Arbeitsklima ein herzliches Dankeschön, insbesondere auch Dr. Wolfgang Schühly und Jürg Gertsch für ihre liebenswürdige Diskussionsbereitschaft.

Schließlich bin ich noch der Studienstiftung des deutschen Volkes für die großzügige finanzielle Unterstützung während meines Auslandsaufenthaltes wie auch zuvor sehr verbunden, sowie Herrn Karl Janko aus Konstanz, ohne dessen wahrlich enzyklopädisches Wissen zu Forschungsprojekten im Bereich Naturstoffchemie meine Zweitausbildung an der ETH Zürich vielleicht nie zustande gekommen wäre.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, die mir das Studium von Beginn an unter besten Bedingungen wohlwollend ermöglicht haben und denen die vorliegende Arbeit gewidmet ist, meinen größten Dank aussprechen.

Zusammenfassung

Unter dem Gesichtspunkt der ethnopharmakologischen Indikation „Fieber“ beziehungsweise „Malaria“ zielte die vorliegende Studie darauf ab, aus dem Rhizom der papuanischen Arzneipflanze *Amomum aculeatum* die zugrundeliegenden Wirksubstanzen nach Reinisolierung strukturell wie pharmakologisch möglichst umfassend zu erschließen. Bemerkenswerte antibakterielle, antiprotozoäre sowie zytotoxische Aktivitäten der lipophilen Rohfraktion wiesen den Weg zu drei neuartigen Dioxadispirodienonen, welche als biologisch wirksame Hauptkomponenten im Petrolether-Rohextrakt enthalten waren. Diese sogenannten „Aculeatine“ repräsentieren strukturell bislang unbekannte Naturstoffe, wobei auch das Dispiro-Grundgerüst vor Publikation dieser Ergebnisse noch nicht beschrieben wurde.

Konkret stellen die Aculeatine A und B Epimere des 4-Hydroxy-2-tridecyl-1,7-dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-ons dar, bei Zuordnung der relativen Konfiguration *rel*-(2*R*,4*R*,6*R*) für Aculeatin A neben *rel*-(2*R*,4*R*,6*S*) für Aculeatin B. Die letztgenannte Verbindung wandelt sich unter Säurekatalyse in das energetisch bevorzugte Diastereomer Aculeatin A um. Aculeatin C als dritte Komponente dieser Strukturklasse zeigt bei gleicher relativer Konfiguration des Dispiro-Systems wie Aculeatin B den kompliziertesten Aufbau und ist systematisch als *rel*-(2*R*,4*R*,6*S*)-2-[4-(3-Dodecyl-2-heptyl-3-hydroxy-6-oxocyclohexa-1,4-dienyl)-2-oxobutyl]-4-hydroxy-1,7-dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-on zu benennen.

Um die angeführten Verbindungen zu separieren und in Reinform zu gewinnen, kamen verschiedene Methoden der Adsorptions-, Gel- wie Verteilungschromatographie zur Anwendung, während die Strukturaufklärung ¹H-, ¹³C-, Inverse-Gated-Decoupling-¹³C-, NOESY/ROESY-, INADEQUATE-, HSQC- und HMBC-NMR-Experimente sowie DEI-, DCI- und FAB-Massenspektrometrie als etablierte Verfahren umfaßte.

Die pharmakologischen Untersuchungen zu den Aculeatinen A - C ergaben primär eine hohe Zytotoxizität gegen KB-/L6-Zellen und Makrophagen neben beträchtlicher antiprotozoärer Wirkung auf die *Plasmodium-falciparum*-Stämme K1 und NF 54 ebenso wie gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma cruzi*.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	III
Zusammenfassung	V
I Einleitung und Problemstellung	1
II Theoretische Grundlagen	4
1 Papua-Neuguinea	4
1.1 Landesnatur	4
1.2 Ethnopharmakologische Untersuchungen	5
2 Die Familie der Zingiberaceae	6
2.1 Chemotaxonomische und pharmakognostische Kriterien	6
2.2 Biosynthese der Gingerole	7
2.3 Die Gattung <i>Amomum</i>	11
2.3.1 Gliederung und Verbreitung	11
2.3.2 Charakteristische Inhaltsstoffe	12
2.3.3 Systematik und Morphologie von <i>Amomum aculeatum</i> Roxb.	13
3 Stereochemie und physiologische Wirkung	14
4 Spiroketale	19
4.1 Allgemeiner Aufbau	19
4.2 Nomenklatur	20
4.3 Synthesen	21
4.4 Räumliche Struktur	23
4.4.1 Konfiguration	23
4.4.2 Konformation	25
4.5 Ökologische Bedeutung	28
III Angewandte Methodik	31
5 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	31
6 Chromatographische Trennung	33
6.1 Dünnschichtchromatographie	33

6.2	Säulenchromatographie	34
6.3	Fließmitteloptimierung	36
7	Strukturaufklärung	40
7.1	Allgemeine Einführung	40
7.2	Ultraviolettspektroskopie	41
7.3	Polarimetrie	43
7.4	Eindimensionale Kernresonanz-Spektroskopie	44
7.4.1	Allgemeine Grundlagen	44
7.4.2	¹ H-Kernresonanz-Spektren	47
7.4.3	¹³ C-Kernresonanz-Spektren	48
7.5	Zweidimensionale Kernresonanz-Spektroskopie	50
7.5.1	Allgemeine Grundlagen	50
7.5.2	Homonukleare Korrelation	51
7.5.3	Heteronukleare Korrelation	52
7.6	Massenspektrometrie	53
7.7	Röntgen-Kristallstrukturanalyse	55
8	Pharmakologische Aktivitätsprüfung	57
8.1	Bakterien und Pilze	57
8.2	Protozoen	60
8.3	Zytotoxizität	65
8.4	Arachidonsäure-Metabolismus	66
8.5	Antioxidative Wirkung	68
IV	Ergebnisse	72
9	Isolierung	72
9.1	Perkolation von Rhizom und Blättern	72
9.2	Auftrennung des Petrolether-Rohextraktes	73
9.3	Strukturaufklärung separierter Hauptkomponenten	75
9.3.1	Aculeatin A	75
9.3.2	Aculeatin B	88
9.3.3	Aculeatin C	97
10	Bioaktivität von Rohextrakt und Reinsubstanzen	104
10.1	Bakterien und Pilze	104

10.2	Protozoen	104
10.3	Zytotoxische Wirkung	108
10.4	Cyclooxygenase-1/-2 und 5-Lipoxygenase	109
10.5	Chemilumineszenz	109
V	Diskussion und Ausblick	112
11	Pflanzliche Inhaltsstoffe	112
11.1	Extraktion	112
11.2	Screening	113
11.3	Chromatographie	113
12	Struktur und Synthese	115
13	Pharmakologie und Arzneistoffentwicklung	122
VI	Experimenteller Teil	125
14	Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	125
15	Chromatographische Verfahren	126
15.1	Dünnschichtchromatographie	126
15.2	Säulenchromatographie	127
16	Spektrometrische und spektroskopische Methoden	128
16.1	Ultraviolettspektroskopie	128
16.2	Polarimetrie	128
16.3	Kernresonanz-Spektroskopie	129
16.4	Massenspektrometrie	129
17	Chemische Derivatisierung	130
18	Pharmakologische Untersuchungen	130
18.1	Antimikrobielle Aktivität	130
18.2	Zytotoxizität	133
18.3	Arachidonsäure-Metabolismus	135
18.4	Chemilumineszenz	136
19	Physikalische Daten der Aculeatine A - C	137
20	Taxonomische Übersicht	138
VII	Bibliographie	140

Anhang		150
A	Abbildungsnachweis	150
B	Abkürzungen und Symbole	150
C	Elektronische Datenverarbeitung	153

I Einleitung und Problemstellung

Die historisch von der Pharmakognosie, das heißt der Drogenkunde hergeleitete Disziplin „Naturstoffchemie“ befaßt sich - als deskriptives Teilgebiet der Biochemie - mit Isolierung, Strukturaufklärung, Synthese sowie den chemischen Eigenschaften biogener Substanzen. Diese entstammen überwiegend dem Sekundär-, im weiteren Sinne auch dem Primärstoffwechsel von Tieren, Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen. Während die Primärstoffe (Aminosäuren, Kohlenhydrate, Lipide, Nucleinsäuren) ubiquitär in der belebten Natur vorkommen, beschränken sich die Sekundärstoffe (Isoprenoide, aromatische Verbindungen, Alkaloide, Antibiotika) zumeist auf spezielle Organismen.

Von besonderer Bedeutung für die Naturstoffisolierung und -charakterisierung aus komplexen Gemischen war die Entwicklung außerordentlich leistungsfähiger chromatographischer Methoden neben physikalischer Verfahren wie in erster Linie der Kernresonanz-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Röntgen-Feinstrukturanalyse nach 1945. Ebenso erfolgte seit dieser Zeit eine engere Anbindung zu den vordergründig biologisch orientierten Fachgebieten der Molekulargenetik, Pharmakologie und Toxikologie, wobei Naturstoffe mittlerweile als unverzichtbare Werkzeuge zur Aufklärung zellulärer Wirkmechanismen dienen (vgl. Nuhn, 1997, S. 19-21).

Zur Auffindung neuartiger Leitstrukturen erweist sich die Ethnopharmakologie nach wie vor sehr erfolgreich, vor allem unter dem Gesichtspunkt, daß gegenwärtig über 40 % aller Medikamente von Naturstoffen abstammen. So hat die systematische Untersuchung von Arzneipflanzen der traditionellen Volksmedizin mit Betonung auf außereuropäischen Ländern unter anderem zur Entdeckung der Curare- und Rauwolfia-Alkaloide (aus südamerikanischen Pfeilgiften beziehungsweise der indischen Rauwolfia-Wurzel), des Forskolins (aus einer indischen Arzneipflanze), der als PAF-Antagonisten wirkenden Ginkgolide (aus dem chinesischen Ginkgobaum) oder in neuester Zeit dem gegen Chloroquin-resistente Malariaerreger wirkenden Qinghaosu (aus einer chinesischen Artemisia-Art) geführt (vgl. Nuhn, 1997, S.75).

Schließlich profitierte auch die Chemotaxonomie von ihrer engen Ausrichtung an die Sekundärstoffchemie, indem wesentliche Beiträge zur Aufklärung der Verwandtschaftsbeziehungen bei Tieren, Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen geleistet wurden.

Wie bereits erwähnt und aus Abbildung I unmittelbar hervorgeht, erfordert die Wirkstoffsuche bei Pflanzen ähnlich wie bei anderen Organismengruppen einen aufwendigen integrierten Ansatz quasi als Schnittmenge der Teildisziplinen Ethnobotanik, Naturstoffchemie und Molekularbiologie/Pharmakologie. In diesem Zusammenhang sucht man beim wirkungsorientierten Screening nach neuen Leitstoffen mit definierten biologisch-pharmakologischen Effekten. Dabei sind - schwerpunktmäßig bezüglich Arzneistoffresistenzen - die klassischen Testsysteme auf antibakterielle, antifungale, antiprotozoäre sowie karzinostatische Wirkung anzuführen. Als Meßgrößen kommen Enzymaktivitäten und zelluläre Systeme, zur Detektion Photometrie, Fluoreszenz, Radioaktivität und Chemilumineszenz in Frage.

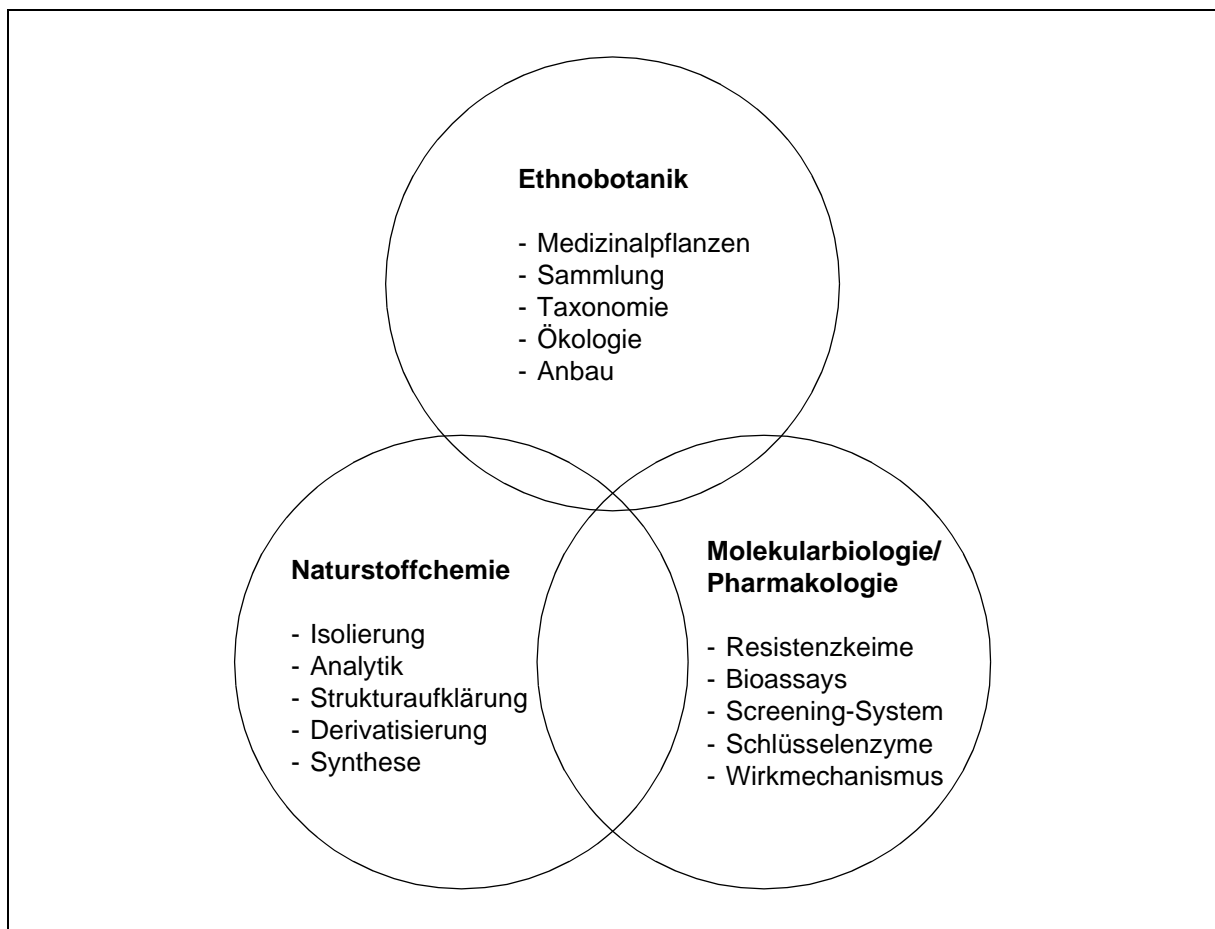


Abb. I. Integrierter Ansatz zur Wirkstoffsuche am Beispiel pharmakologisch aktiver Sekundärstoffe aus Pflanzen (verändert nach Fugmann et al., 1997, S. 578).

Vor diesem Hintergrund beschreibt die vorliegende Diplomarbeit einen möglichen Weg der Arzneistofffindung, ausgehend von ethnopharmakologischen Kenntnissen über geeignete In-vitro-Screeningsysteme für Rohextrakte und Reinsubstanzen zu definierten Molekularstrukturen mit qualitativ wie quantitativ abgegrenzten Wirkungsbereichen zu gelangen.

II Theoretische Grundlagen

1 Papua-Neuguinea

1.1 Landesnatur

Der seit 1975 unabhängige Staat Papua-Neuguinea in Ozeanien umfaßt bei 462 840 km² und etwa 3,7 Millionen Einwohnern im wesentlichen den östlichen Teil der Insel Neuguinea mit der Hauptstadt Port Moresby, den Bismarckarchipel, den Louisiade-Archipel sowie die beiden nördlichen Salomoninseln Buka und Bougainville (s. Abb. 1). Das steil aufragende Zentralgebirge, welches die Insel Neuguinea (85 % des Staatsgebietes) als geographische wie kulturelle Übergangszone von West nach Ost

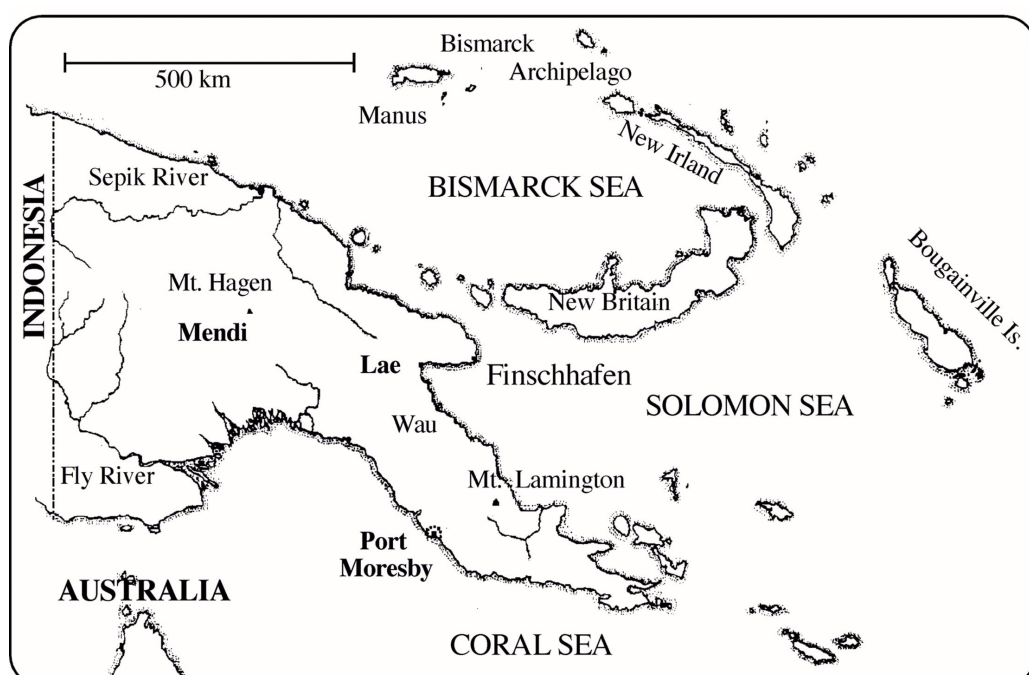


Abb. 1. Geographische Übersicht von Papua-Neuguinea.

durchzieht, besitzt ausgedehnte Hochtäler und weist mehrere Gipfel bis um 4 000 m über Meereshöhe auf. In der südöstlichen Inselspitze läuft das Zentralgebirge in ein Mittelgebirge aus. Beiderseits der Gebirgsketten schließen sich ausgedehnte, zum Teil versumpfte Senkungsgebiete an. Den Raum im Südwesten nimmt bis zu einer Breite von 450 km eine Schwemmlandebene ein, die von einer Ingressionsküste abgeschlossen wird.

Generell herrscht ein feuchtwarmes Tropenklima vor, wobei die jährlichen Niederschlagsmengen zwischen 1 000 mm in Port Moresby bis über 8 000 mm im südlichen Bismarckarchipel betragen können. Die durchschnittlichen Temperaturen der Küstenregion schwanken um 25 °C, können in den Hochgebirgen jedoch nachts deutlich unter 0 °C absinken.

Etwa 90 % der Bevölkerung, welche teilweise noch auf der neolithischen Kulturstufe der zweiten Einwanderungswelle vor rund 5 000 Jahren und außerhalb der Geldwirtschaft steht, leben im unwegsamen Bergland Neuguineas zu rund 1 000 in Stämmen organisierten, ehemals isolierten Ethnien. Dies erklärt die Existenz von über 770 Umgangssprachen neben der Amtssprache Englisch und der Hauptverkehrssprache Pidgin-Englisch. Trotz weitgehender Christianisierung konnten sich bei den Papua traditionelle religiöse Vorstellungen bis heute halten (vgl. Brockhaus-Enzyklopädie, 1991, S. 510 f.).

1.2 Ethnopharmakologische Untersuchungen

Generell zählt die Artenzahl der Spermatophyta von Papua-Neuguinea zu den höchsten aller Florengebiete weltweit, wobei der endemische Anteil der schätzungsweise 20 000 Spezies bis zu 90 % betragen soll (vgl. Kremnitz, 1988, S. 13). Für die in besonderer Vielfalt vorhandenen Orchidaceae - zum Vergleich existieren in Mitteleuropa nur um die 60 Vertreter - wurden bislang über 3 000 Arten beschrieben, aus dem Verwandtschaftskreis der Pteridophyta etwa 2 000 (vgl. Lipscomb et al., 1998).

Obwohl heutzutage in Papua-Neuguinea viele Krankenhäuser und für eine Großzahl der Dörfer Erste-Hilfe-Stationen existieren, welche bei den meisten Stammesangehörigen auch zunehmend Akzeptanz finden, spielen gleichzeitig überlieferte Heilungsmethoden mit erhältlichem Pflanzenmaterial vor Ort nach wie vor eine große Rol-

le. Dies beruht nicht zuletzt auf traditionellen Vorstellungen, wonach Krankheiten durch übernatürliche Gegebenheiten statt medizinische Ursachen bedingt sein sollen.

In den vergangenen Jahren wurden auf ethnobotanischen Exkursionen über 600 Pflanzenarten aus dem einheimischen Arzneischatz gesammelt, wobei oftmals nur sehr schwer zwischen ernsthafter therapeutischer Anwendung und bloßer Zauberei zu unterscheiden ist. Während das Gesundheitsministerium von Papua-Neuguinea dem pharmakognostischen Erfahrungswissen der Ureinwohner eher geringe wissenschaftliche Bedeutung zumißt, muß die Aufgabe entsprechender Forschungsprojekte unbedingt darin bestehen, den empirischen Kenntnissen der Medizinmänner in der Arzneistoffentwicklung den gebührenden Rang einzuräumen und die überliefernden Volksgruppen samt den Ökosystemen uneingeschränkt zu bewahren.

2 Die Familie der Zingiberaceae

2.1 Chemotaxonomische und pharmakognostische Kriterien

Die Familie der Zingiberaceae (Ingwergewächse) umfaßt etwa 1 400 Arten in 47 Genera mit mehr oder weniger fleischigen, großen Blütenständen und Blüten, welche beim Trocknen ihre charakteristischen Merkmale teilweise verlieren. Als Bewohner der Tropenwälder in der Alten und Neuen Welt liegt das Massenzentrum dieser Familie im tropischen Asien. Da die aromatischen Wurzelstöcke oder Samen vieler Spezies beliebte Gewürze und Arzneimittel darstellen, kam es im indomalaischen Gebiet über lange Zeiträume zur Selektion bestimmter Formen und kultigener Sippen, was Systematik und Nomenklatur außerordentlich erschwert, wenngleich die Zingiberaceae als die chemisch am besten bearbeitete Familie der Zingiberales gelten (vgl. Hegnauer, 1963, S. 453 f.). Viel Beachtung fanden diesbezüglich in den vergangenen 20 Jahren ätherische Öle, Zimtsäure-Derivate vom Typus der Ingwerscharfstoffe, Curcuminoide, flavonoide Verbindungen mit verwandten Polyphenolen und Stärke als hauptsächlichster Reservestoff der Samen und vegetativen Organe. Bezüglich des Mineralstoff-

wechsels kann man die Zingiberaceae als mäßige Akkumulatoren von Kieselsäure sowie Calciumoxalat bezeichnen. Neu bekannt für die Familie sind Chinone, Steroidsaponine mit ihren Geninen neben Di- und Triterpenen (vgl. Hegnauer, 1986, S. 780).

Zingiber officinale (Ingwer) als pharmakognostisch relevanteste Spezies der Zingiberaceae besitzt ein umfangreiches Wirkungsspektrum, woraus nur die analgetischen, antiemetischen, antimikrobiellen, antioxidativen, antiphlogistischen, antiviralen und stomachalen Effekte genannt seien. Dies dürfte größtenteils auf den enthaltenen Scharfstoffen beruhen, wobei biochemisch folgende Mechanismen postuliert werden:

- Hemmung von Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase und damit der Prostaglandin- wie Leukotrien-Biosynthese;
- Aktivierung der Prostacyclin-Biosynthese;
- Unterbrechung der Thromboxan-Biosynthese;
- antiserotonerge Aktivität;
- Inhibierung der LDL- und Linolensäureoxidation.

Darüber hinaus dient Ingwer fein gemahlen für Gewürzmischungen - insbesondere Currypulver - sowie zur Herstellung von Likören (vgl. Hänsel et al., 1999, S. 659-661).

Innerhalb der Zingiberaceae Papua-Neuguineas wird vor allem die in der vorliegenden Diplomarbeit analysierte Art *Amomum aculeatum* als traditionelle Medizinalpflanze angeführt. Unter Vorliegen der ethnopharmakologischen Indikation „Fieber“ beziehungsweise „Malaria“ oder „Influenza“ erhalten die Patienten eine Tasse Pflanzensaft, gewonnen durch Bearbeiten der Rinde mit einem harten Stock. Bei Bedarf wiederholt man diese Therapie täglich (vgl. Holdsworth und Mahana, 1983, S. 131; Woodley, 1991, S.134 f.).

2.2 Biosynthese der Gingerole

Im Pflanzenstoffwechsel kommen für die biosynthetische Bildung aromatischer Verbindungen grundsätzlich Intermediate sowohl des Kohlenhydrat- als auch des Fettsäure-Metabolismus in Frage. Während erstere über den Shikimisäureweg aromatische Aminosäuren neben Benzo-, Naphtho- und Anthrachinonen liefern, führen letztere über den Mevalonsäureweg zu aromatisierten Vertretern der Isoprenoide oder mittels Polyketidweg zu mono- und polycyclischen Aromaten (vgl. Nuhn, 1997, S. 38).

„Polyketide“ gilt dabei als Sammelbezeichnung für Naturstoffe, deren Biosynthese hypothetisch durch Vervielfachung des Ketens ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$) über Poly(β -oxocarbonsäuren) verläuft, in Analogie zur allgemeinen Summenformel für Kohlenhydrate $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Der Aufbau der Polyketid-Ketten erfolgt an Multienzymkomplexen (Polyketid-Synthasen) aus Acetyl- und Malonyl-CoA oder auch unter Verwendung von Propionyl- und/oder Butyryl-CoA bei der Untergruppe der Acetogenine. Je nach Anzahl der Carbonyl-Methylen-Bausteine klassifiziert man die entsprechenden Naturstoffe als Triketide, Tetraketide usw., wobei höhere Polyketide (ab vier Einheiten) noch am Enzym partiell reduziert oder durch Ester- beziehungsweise Aldol-Kondensation cyclisiert werden. Polyketide gelten als typische Sekundärmetabolite von Mikroorganismen sowie Pflanzen (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 507 f.).

Bei den Gingerolen handelt es sich um Derivate von Phenylethyl-*n*-alkyl-ketonen (Phenylalkanonen), die innerhalb der Zingiberaceae auftreten und zu den Polyketiden gerechnet werden, obgleich sie wie die Flavanoide als zusammengesetzte Phenylpropan-Derivate sowohl dem Kohlenhydrat- wie auch dem Fettsäure-Stoffwechsel entstammen. Die Biogenese (s. Abb. 2-1 auf S. 10) nimmt ihren Anfang bei L-Phenylalanin, woraus über 4-Cumarsäure Ferulasäure entsteht, die wiederum mit Malonyl-CoA zum Diketid **1** (β -Ketoester: $\text{R} = \text{S}-\text{CoA}$) kondensiert. Nach Hydrolyse von **1** ($\text{R} = \text{OH}$) und erneuter Kondensation mit Alkanoyl-CoA (homologe Reihe von Fettsäuren: Propan- bis *n*-Hexansäure, *n*-Octan-, *n*-Decan- oder *n*-Dodecansäure), welches über die Kettenlänge im terminalen [*n*]-Gingerol entscheidet ($n = 3, 4, 6, 8, 10, 12$), wird **2** (Dehydrogingerdion) in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten über **3** zum Endprodukt reduziert (vgl. Schröder, 1999, S. 766). Der Umsatz von Ferulasäure mit Malonyl-CoA - dieses liefert die Methylengruppe zwischen den Sauerstofffunktionstragenden C-Atomen der Gingerol-Seitenkette - und anschließend mit Alkanoyl-CoA unter zweimaliger Decarboxylierung stellt einen neuartigen Typus von „biologischer“ Claisen-Kondensation dar, bei dem Malonat seine beiden Carboxylgruppen sequentiell verliert (vgl. Denniff et al., 1980, S. 2641; Schneider, 1985a, S. 364). Innerhalb der Gingerole zeigt sich [6]-Gingerol mit (5*S*)-Konfiguration für die Scharfwirkung des Ingwer-Rhizoms verantwortlich. Trotz ähnlicher Geschmackseigenschaften fehlt beim Racemat (5*RS*) der typische Ingwergeruch (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 259). Bei längerer Lagerung von Ingwer kommt es temperaturabhängig unter Dehydratisierung leicht zur Bildung der homologen Reihe der [*n*]-Shogaole mit deutlich schärferem Geschmack,

während eine Retroaldolabspaltung von Alkanalen zu Zingeron ohne Scharfstoffeigenschaften führt und die Qualität von *Zingiberis rhizoma* stark mindert (vgl. Hänsel et al., 1999, S. 658; Teuscher, 1997, S. 185 f.).

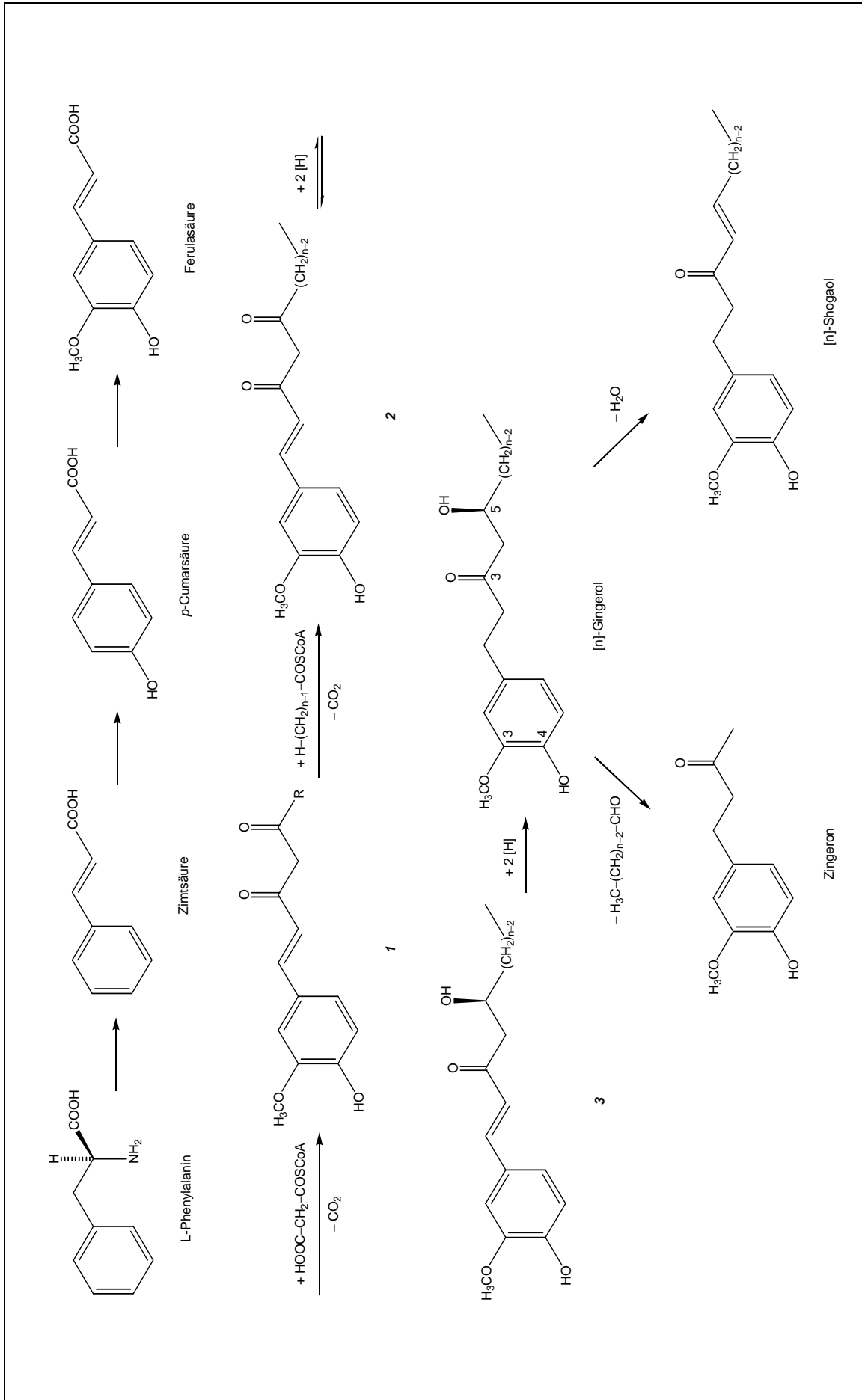


Abb. 2-1. Biosynthese der Gingerole und ihrer Derivate (verändert nach Denniff et al., 1980, S. 2640; Hänssel et al., 1999, S. 658).

2.3 Die Gattung *Amomum*

2.3.1 Gliederung und Verbreitung

In der Pharmaziegeschichte kennt man *Amomum* als hochgeschätzte Frucht- bzw. Samen-Droge der Antike (Bestandteil großer Antidote und kostbarer Salben), deren Stammpflanze unbekannt ist. Noch im 18. Jahrhundert kursierten über das *Amomum verum* der Apotheken viele Theorien. Doch gilt das historische *Amomum* (*Fructus* oder *Semen Amomi*) jetzt meist als das Englisch-Gewürz, der Piment von *Pimenta officinalis* (vgl. Tschirch, 1917, S. 1071). Von der vielseitigen Verwendung unter anderem als Magen- und Stärkungsmittel blieb seit dem 19. Jahrhundert nur noch der Gewürzcharakter übrig (vgl. Schneider, 1985b, S. 22).

Obwohl früher weit über 100 Spezies unter dem Gattungsnamen *Amomum* L. beschrieben waren, umfaßt nach dem derzeitigen Kenntnisstand das Genus *Amomum* Roxb. etwa 90 Arten, nachdem im 19. Jahrhundert die gegenwärtig gebräuchlichen Gattungen *Achasma*, *Aframomum*, *Elettaria*, *Geanthus* und *Zingiber* neben weiteren kleineren ausgegliedert wurden. Die Artengliederung erfolgt gemäß der chinesischen Flora in zwei Subgenera. So ordnet man die drogenliefernden Spezies *Amomum aromaticum*, *Amomum compactum*, *Amomum krervanh* und *Amomum villosum* der Untergattung *Lobulatae* (K. Schum.) zu, die Arten *Amomum maximum*, *Amomum subulatum* und *Amomum xanthioides* hingegen dem Subgenus *Integrae* (K. Schum.) (kombiniert nach Bruchhausen et al., 1992, S. 241 f. und Engler, 1930, S. 599 f.). Daneben existieren noch zytotaxonomische Studien zu malaiischen *Zingiberaceae*, welche für die Tribus *Alpineae* mit unter anderem der Gattung *Amomum* 12×2 Chromosomen (diploider Satz) ergeben, wohingegen die Tribus *Zingibereae* 11×2 Chromosomen (diploider Satz) aufweist (vgl. Beltran und Kiew, 1984, S. 541, 552).

Beheimatet ist die Gattung *Amomum* in Süd- oder Ostasien, vom Himalaya bis zum tropischen Nordaustralien sowie auf den dazwischenliegenden Inseln.

2.3.2 Charakteristische Inhaltsstoffe

Systematische phytochemische Untersuchungen innerhalb des Genus *Amomum* sind bislang unbekannt. Vor allem die Früchte beziehungsweise die Samen verschiedener Arten liefern ätherisches Öl, in Hauptbestandteilen acyclische, mono- und bicyclische Monoterpene und -alkohole wie Borneol, Campher, 1,8-Cineol, Linalool, α - und β -Pinen, Sabinen und Terpeneol (s. Abb. 2-2). Daneben kommen Sesquiterpene und deren entsprechende Alkohole vor, ferner - als eher ungewöhnliche Strukturtypen - Eicosenone und methylierte Flavonole in *Amomum koenigii* (vgl. Dong et al., 1999), ein Diterpen-Epidioxid in *Amomum krervanh* (vgl. Kamchonwongpaisan et al., 1995) sowie Indancarboxaldehyde in *Amomum medium* (vgl. Takido et al., 1978).

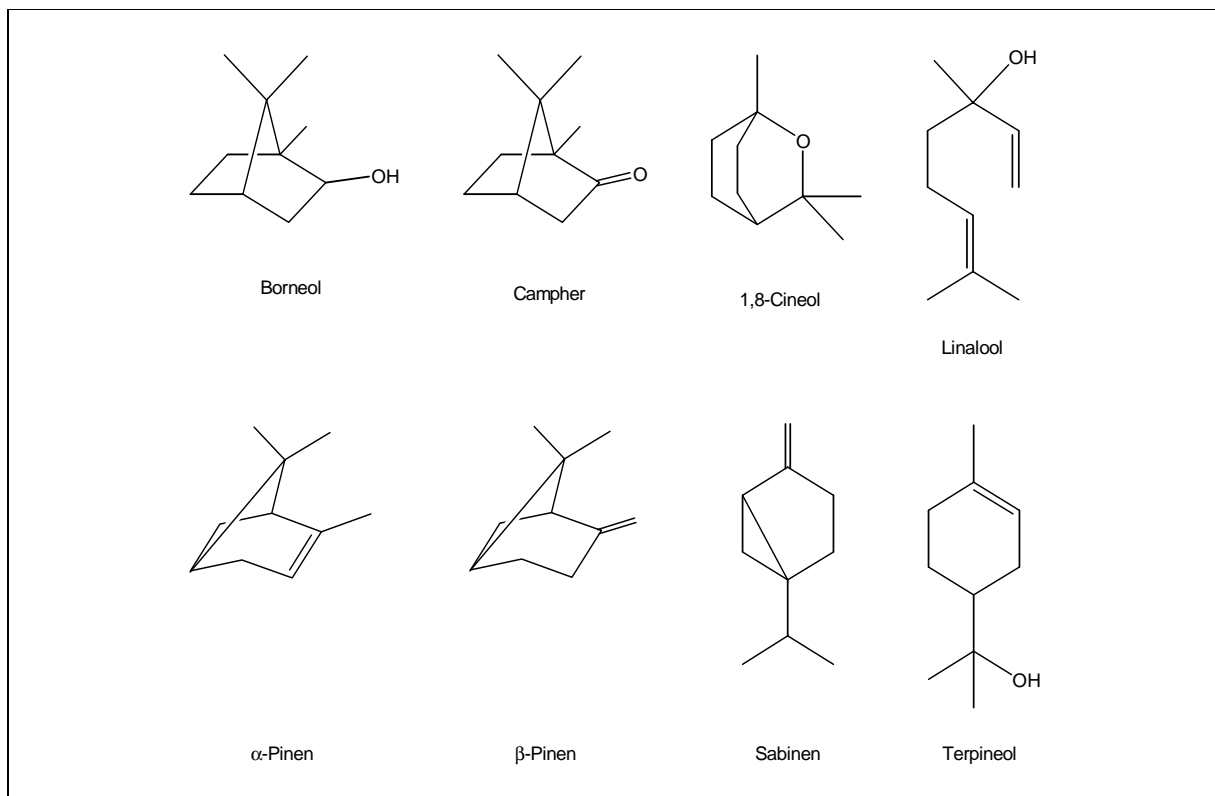


Abb. 2-2. Inhaltsstoffgruppen im ätherischen Öl von Pflanzen der Gattung *Amomum* (nach Bruchhausen et al., 1992, S. 242).

2.3.3 Systematik und Morphologie von *Amomum aculeatum* Roxb.

Unter Zugrundelegung des Systems nach K. Schumann (vgl. Engler, 1930, S. 557-600) ist *Amomum aculeatum* taxonomisch bei geringen Abänderungen (nach Bruchhausen et al., 1992, S. 241; Strasburger et al., 1991, S. 818) wie folgt einzuordnen:

Abteilung:	Spermatophyta
Unterabteilung:	Angiospermae (= Magnoliophytina)
Klasse:	Monocotyledoneae (= Liliopsida)
Unterklasse:	Liliidae
Überordnung:	Bromeliales (s. lat.)
Ordnung:	Zingiberales (= Scitamineae)
Familie:	Zingiberaceae
Unterfamilie:	Zingiberoideae
Tribus:	Alpinieae ¹
Gattung:	<i>Amomum</i>
Untergattung:²	<i>Lobulatae</i>
Art:	<i>Amomum aculeatum</i> Roxb.



Abb. 2-3. Habitus von *A. aculeatum*.

Darüber hinaus gab es Ansätze, diese Spezies in die Varietäten *Amomum aculeatum* Roxb. var. *gymnocarpa* Val. und *Amomum aculeatum* Roxb. var. *macrocarpa* Val. zu untergliedern (vgl. Lorentz, 1914, S. 926 f.), was jedoch unter anderem aufgrund der reproduzierbar praktisch nicht zu herbarisierenden Blütenphyllome mancher *Amomum*-Arten (vgl. Schumann, 1899, S. 260) keinen Eingang in die aktuelle Literatur fand. Als wichtigste morphologische Merkmale der auf den Andamanen und auf Java vielfach anzutreffenden Kulturpflanze *Amomum aculeatum* (griech. „ámomon“: indische Gewürzpflanze; lat: „aculeatus“: „stachelig“)

¹ „Zingibereae“ nach K. Schumann

² „Reihe“ nach K. Schumann

sind zu nennen (s. auch Abb. 2-3 auf S. 13): Reichbeblätterte, bis etwa 5 m Höhe erreichende Stauden mit langem, verzweigtem Rhizom; Früchte kapsel- oder beerenartig mit dickfleischigem, später lederigem Perikarp; Ovar meist behaart; Konnektivfortsatz dreilappig; Pedunculus kürzer als 10 cm; bis zu 42 cm lange und 9 cm breite, linear-lanzettliche Blätter mit bis zu 7 mm langer, stumpfer Ligula; Blütenstand eine 6,5 cm lang gestielte, kugelige oder eiförmige, etwa 6 cm große Ähre mit leicht verwitternden Brakteen.

3 Stereochemie und physiologische Wirkung

Alle physikalischen, chemischen, biopharmazeutischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Wirkstoffmolekülen sind durch die dreidimensionale Anordnung ihrer Atome, das heißt ihre Stereochemie, geprägt. Unterscheiden sich stereoisomere Substanzen nur dadurch, daß sie mit ihrem jeweiligen Spiegelbild nicht zur Deckung gebracht werden können, so spricht man von Enantiomerie, während alle anderen Fälle von Stereoisomerie unter den Begriff „Diastereomerie“ fallen, wobei in scharfer Dichotomie entweder das eine oder das andere vorliegt, jedoch niemals beides zugleich. Während Enantiomere nur Unterschiede in ihren vektoriellen Eigenschaften wie Verhalten gegenüber polarisiertem Licht, chiralen Reaktanden usw. aufweisen, können Diastereomere anhand verschiedener skalarer Merkmale wie Schmelz- und Siedepunkt, Umsatz mit nicht-chiralen Reagenzien usw. getrennt werden.

Voraussetzung für das Auftreten von Molekülen in zwei enantiomeren Formen ist die intramolekulare Abwesenheit von Symmetrieelementen 2. Art, konkret von Drehspiegelachse (S_n), Spiegelebene ($\sigma \cong S_1$) und Inversionszentrum ($i \cong S_2$); kurzum: innerhalb des jeweiligen Moleküls darf keine Drehspiegelachse (S_n) existieren, es muß somit chiral sein. Chiralität gilt als hinreichende und notwendige Bedingung für das Auftreten von Enantiomerie. Fehlen hingegen auch Symmetrieelemente 1. Art wie Drehachsen (C_n), so liegt Asymmetrie vor. Diastereomere können chiral oder achiral sein, Enantiomere sind per definitionem stets chiral. Je nach den intramolekular vorhandenen Chiralitätselementen differenziert man zwischen zentraler Chiralität (mit Chiralitätszentrum), axialer Chiralität (mit Chiralitätsachse), helicaler Chiralität (mit Chiralität

tätsachse und Schraubenwindungen) sowie planarer Chiralität (mit Chiralitätsebene). Asymmetrie, im klassischen Fall die Anwesenheit eines asymmetrisch substituierten Kohlenstoffatoms mit vier unterschiedlichen Liganden, ist also - im Gegensatz zur Chiralität - weder hinreichend (gleichartige Substitution bei *meso*-Verbindungen) noch notwendig (Chiralitätsachse/ -ebene) für das Phänomen der Enantiomerie (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 231-233).

Im Bereich therapeutisch relevanter Naturstoffe tritt zentrale Chiralität, und zwar meist an Kohlenstoffatomen, überwiegend am häufigsten auf, wohingegen man den anderen Chiralitätselementen eher selten begegnet. Neuerdings wird die helicale Chiralität als Spezialfall der axialen Chiralität und nicht mehr als eigenständiges Element behandelt. Zu den interessantesten Fällen von helicaler Chiralität bei *ortho*-kondensierten, zirkular anellierten aromatischen Systemen zählen die Elsinochrome und Hypocrelline als Perylenchinon-Pigmente aus Ascomyceten (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 200, 308) neben den strukturell verwandten Gymnochromen als Farbstoffen in Echinodermata (vgl. Nuhn, 1997, S. 27 f.). Die Antibiotikagruppe der Ansamycine aus Actinomyceten repräsentiert schließlich ein Beispiel für die äußerst selten anzutreffende planare Chiralität (vgl. Roth et al., 1998, S. 34, 58). Nähere Erläuterungen zur Bedeutung der axialen Chiralität im engeren Sinne erfolgen in Abschnitt 4.4.1.

Bei der stereochemischen Analyse von Molekülen muß für deren Konfiguration, das heißt die räumliche Anordnung von Atomen ohne Berücksichtigung der Rotationen um Einfachbindungen, die Unterteilung in „absolut“ und „relativ“ genau beachtet werden. Die absolute Konfiguration beschreibt dabei anhand der Stereodeskriptoren (*R*) und (*S*) die tatsächliche räumliche Position der Substituenten in einem chiralen Molekül und ordnet diese einem bestimmten Drehwert zu. Die relative Konfiguration hingegen kennzeichnet mittels *rel-(R)* und *rel-(S)* die dreidimensionale Stellung der Atome an einem Chiralitätszentrum unter Bezugnahme auf die Konfiguration jedes anderen Chiralitätszentrums im selben Molekül. Im Unterschied zur absoluten Konfiguration zeigt sie Invarianz gegenüber Spiegelung (vgl. Hauptmann und Mann, 1996, S. 74). Besonders die Festlegung der absoluten Konfiguration bereitet bei Naturstoffen mitunter große Probleme.

Was die Topizität von Liganden am tetragonalen C-Atom anbetrifft, so spricht man bei zwei untereinander identischen, aber durch zwei unterschiedliche Substituenten flankierten Liganden von Enantiotopie. Ein entsprechendes C-Atom mit zwei enan-

tiotopen Gruppen heißt prochiral mit den Stereodeskriptoren *pro-R* und *pro-S*. Zwei untereinander wiederum identische, aber durch zwei verschiedene Liganden flankierte Substituenten am tetraedrischen C-Atom, wovon der eine ein Chiralitätszentrum darstellt, werden als diastereotop bezeichnet. Bezüglich Topizität am trigonalen C-Atom wird für die beiden stereochemisch nicht äquivalenten Seiten (obere und untere Ansicht) am Prochiralitätszentrum der Begriff „enantiofacial“ mit den Stereodeskriptoren *Re* und *Si* gebraucht, der Begriff „diastereofacial“ statt dessen, falls einer der Liganden ein Asymmetriezentrum beinhaltet (vgl. Roth et al., 1998, S. 66, 72 f.). „Enantio-/diastereotop“ wie „enantio-/diastereofacial“ fallen unter den übergeordneten Begriff „Heterotopie“, wohingegen „Homotopie“ für topologisch äquivalente Liganden mit identischen Umgebungen steht (vgl. Hauptmann und Mann, 1996, S. 103).

Ist bei der Herstellung chiraler Verbindungen im Edukt bereits ein Asymmetriezentrum vorhanden, so vermag dieses bei Überführen einer vicinalen prochiralen Gruppe in ein weiteres Chiralitätszentrum die Bildung eines bestimmten Diastereomers zu bevorzugen. In diesem Fall besagt die Cram'sche Regel, daß bei einer solchen asymmetrischen Induktion in erster Linie das Diastereomer entsteht, dessen Liganden gegenüber dem angreifenden Nucleophil die geringste sterische Hinderung aufweisen (vgl. Roth et al., 1998, S. 74 f.).

Moleküle mit n verschiedenen asymmetrisch substituierten Atomen können maximal 2^n Konfigurationsisomere und 2^{n-1} diastereomere Enantiomerenpaare bilden, beim Vorliegen von *meso*-Formen (vgl. S. 15) entsprechend weniger. Diastereomere mit unterschiedlicher Konfiguration an einem von zwei oder mehreren Chiralitätszentren nennt man Epimere, ihre Umwandlung ineinander Epimerisierung (vgl. Hauptmann und Mann, 1996, S. 78). Racemisierungen als Überführung eines Enantiomers in das äquimolare Gemisch der beiden optischen Antipoden laufen bevorzugt über Carbanionen oder Carbeniumionen als Zwischenprodukte, die - Carbanionen nur in Form mesomerer Grenzstrukturen - als trigonal-planares Angriffszentrum dienen. Derartige Umwandlungen stellen bei Wirkstoffisolierungen ein nicht zu unterschätzendes Problem dar, vor allem unter Anwesenheit katalysierend wirkender Säuren oder Basen. So treten Naturstoffe mit mehreren Asymmetriezentren in der Regel als reine Enantiomere auf; bei Abweichungen davon müssen Artefakte in Betracht gezogen werden.

Drei Asymmetriezentren liegen beispielsweise im Biotin (Vitamin B₇), α -Tocopherol (Vitamin E) und im Alkaloid Muscarin vor. Bei Biotin und Muscarin korreliert die biolo-

gische Aktivität eng mit der Konfiguration, während das aus der Vollsynthese hervor-
gehende Gemisch aller acht möglichen Stereoisomere von α -Tocopherol immerhin

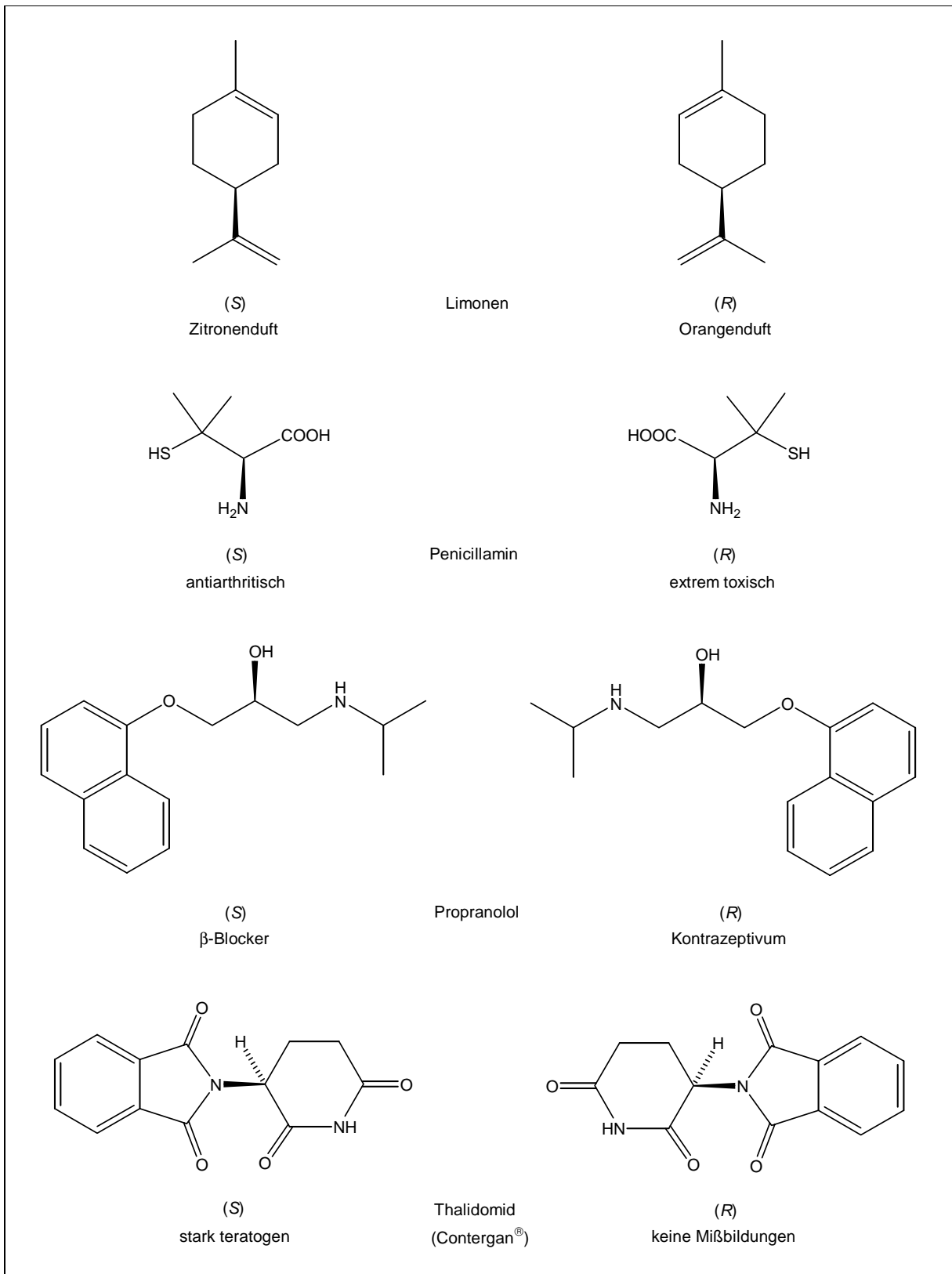


Abb. 3-1. Unterschiedliche physiologische Wirkungen von Enantiomeren (nach Christen und Vögtle, 1990, S. 399 f.).

chemikalien, letztere hingegen als Pheromone bezeichnet werden (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 582). Diese artspezifischen Signale müssen über eine molekulare Konstruktion mit hohem Informationsgehalt verfügen, wofür sich eine stereochemische Verschlüsselung geradezu idealerweise anbietet, da die notwendige Flüchtigkeit der Substanzen das mögliche Molekulargewicht nach oben begrenzt. Als konkretes Beispiel sei an dieser Stelle Disparlur (s. Abb. 3-2 auf S. 18) genannt, eines der wenigen Epoxide unter den Pheromonen. Während das rechtsdrehende (7*R*,8*S*)-Enantiomer als weiblicher Sexuallockstoff der gefürchteten Forstschädlinge Schwammspinner (*Lymantria dispar*) und Nonnenfalter (*Lymantria monacha*) fungiert, hemmt die vom weiblichen Nonnenfalter produzierte linksdrehende (7*S*,8*R*)-Form den Anflug männlicher Schwammspinner (vgl. Nuhn, 1997, S. 499).

Zusammenfassend basiert die Biochemie aller irdischen Organismen auf chiralen Molekülen, wobei meist nur ein Stereoisomer auftritt. Durch den homochiralen Charakter der Grundbausteine wie beispielsweise L-Aminosäuren und D-Zucker sind die Moleküle somit aufeinander abgestimmt, wobei Asymmetrie als generelles Prinzip zur sicheren Informationsvermittlung in hoher Dichte auf kleinstem Raum und daher mit minimalem Energieaufwand dient (vgl. Roth et al., 1998, S. 23, 231).

4 Spiroketale

4.1 Allgemeiner Aufbau

Im Jahr 1900 führte Adolf von Baeyer (1835 - 1917) die Bezeichnung „Spirocyclan“ (lat. „spira“: „kreisförmige Windung“) für diejenigen bicyclischen Kohlenwasserstoffe ein, bei denen beide Ringe ein gemeinsames quaternäres Kohlenstoffatom enthalten (vgl. Krapcho, 1974, S. 383). Tatsächlich erfordert die sp^3 -Hybridisierung des zentralen Spiroatoms eine senkrechte Orientierung der Ringe zueinander, mit m und $n \geq 2$ (s. Abb. 4-1 a auf S. 20).

Spiroketale speziell stellen eine weitverbreitete Klasse von Naturstoffen mit charakteristischem Strukturmerkmal dar: Durch intramolekularen Ringschluß wird aus einem Dihydroxyketon eine bicyclische Verbindung gebildet, in der die beiden Ringe das ehemalige Carbonyl-C-Atom gemeinsam besitzen (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 603). Dieses sogenannte Spirozentrum weist für jeden Ring Kovalenzen mit einem Kohlenstoff- und einem Sauerstoffatom in α -Position auf (s. Abb. 4-1 b).

4.2 Nomenklatur

Bei heterocyclischen Spiranen wie Spiroketalen führt man die Heteroatome durch „a-Terme“ in den Kohlenwasserstoff ein und beziffert diese noch vor eventuell vorhandenen Substituenten so niedrig wie möglich (s. Abb. 4-1 b). Mit der Numerierung wird im kleineren terminalen Ring neben dem Spiroatom mit 1 begonnen. Bei identischer Ringgröße hat die heterocyclische Komponente dabei Vorrang gegenüber einem Carbocycclus. Für Einfach- und Mehrfachspirane (x-Spirane) werden die Namen aus x-spiro-Präfixen mit der Anzahl der restlichen Atome in den einzelnen Abschnitten (in eckiger Klammer) und dem Zahlwort für die Gesamt-Atom-Zahl (Abschnittszahlen + Spiroatome) kombiniert (vgl. Fresenius und Görlitzer, 1998, S. 47 f., 96).

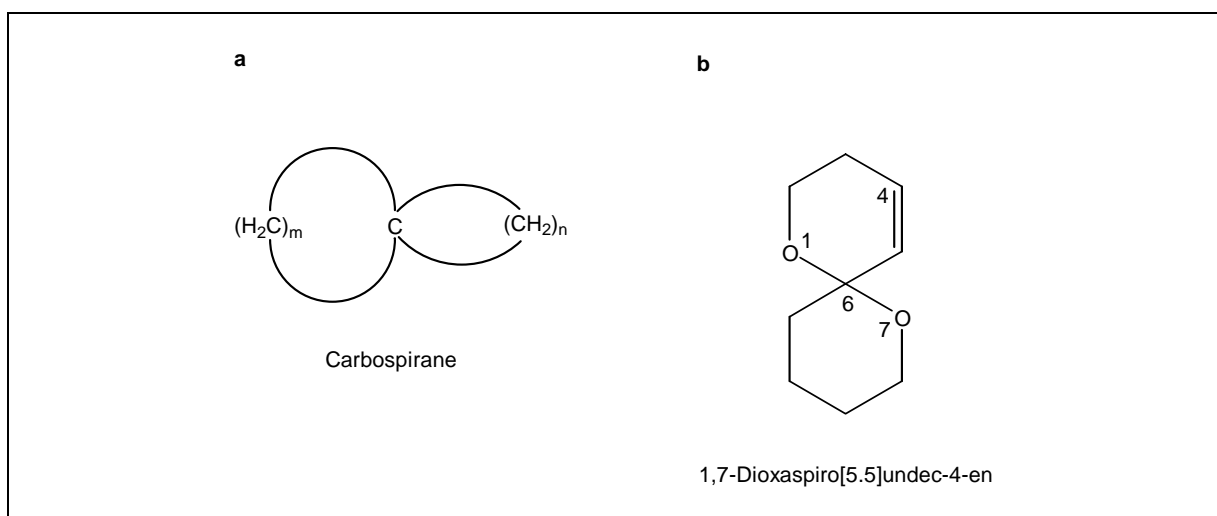


Abb. 4-1. Struktur von Spiro-Verbindungen. - a) Spiran-Kohlenwasserstoffe (verändert u. a. nach Krapcho, 1974, S. 383); b) Spiroketal.

4.3 Synthesen

Wie in Abschnitt 4.1 bereits angeführt, geht die Synthese jedes Spiroketal von einem Dihydroxyketon aus. Die zugrundeliegende Ketalisierung verläuft mechanistisch über zwei wesentliche Schritte spezifisch säurekatalysiert (s. Abb. 4-2): Zunächst bildet sich unter Addition einer der Hydroxygruppen an die zentrale Ketogruppe ein Halbketal, wobei die Protonierung des Carbonyl-C-Atoms zum Carbeniumion **1** den nucleophilen Angriff des alkoholischen Sauerstoffatoms mit Bildung des intermediären Oxoniumions **2** erleichtert. Nach Abspaltung von OH^- und erneutem nucleophilen Angriff der noch freien Hydroxygruppe innerhalb des Carbeniumions **3** entsteht schließlich über **4** das vorliegende Spiroketal. Naturgemäß reagieren Ketone bei der Ketalisierung infolge sterischer Hinderung durch die beiden Substituenten des Carbonyl-C-Atoms und dessen schwächerer Polarisierung langsamer als Aldehyde bei der entsprechenden Acetalisierung (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 645). Zudem ergibt sich aus dem vorliegenden Mechanismus, daß der im Zuge von Ketalisierung beziehungsweise Acetalisierung freigesetzte Sauerstoff des Wassermoleküls von der Carbonylgruppe stammt, die beiden Etherbrücken hingegen von den alkoholischen Sauerstoffatomen.

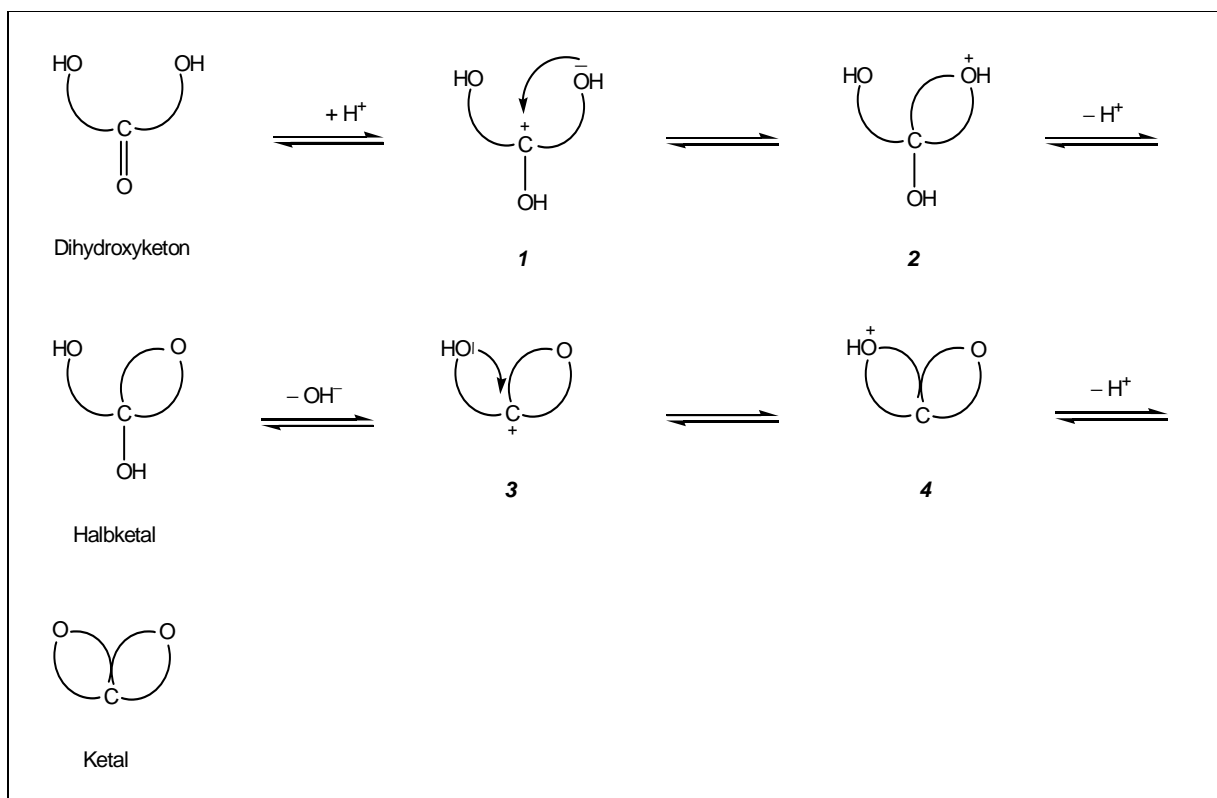


Abb. 4-2. Mechanismus der säurekatalysierten Spiroketalisierung (verändert nach Christen und Vögtle, 1992, S. 645).

Obwohl mittlerweile mehrere Strategien zur gezielten Synthese von Spiroketalen existieren, stellt die säurekatalysierte Cyclisierung von Dihydroxyketonen sowie deren Äquivalenten den wichtigsten ringbildenden Prozeß dar. Die intramolekulare Ketalisierung läuft hierbei thermodynamisch so bevorzugt ab, daß sich ein Entfernen des freigesetzten Wassers aus dem Reaktionsgleichgewicht beispielsweise mittels Molekularsieb häufig erübrigt. In den meisten Fällen dient die Carbonylgruppe als primärer Angriffspunkt, um die Cyclisierung einzuleiten, wobei man von einer C_α - C_{spiro} -Strategie spricht (vgl. Perron und Albizati, 1989, S. 1632 f.). Darauf folgt häufig eine abschließende Epimerisierung von stereogenen Zentren in C_α -Position (vgl. Vaillancourt et al., 1992, S. 538).

Beispielsweise repräsentiert das 1,7-Dioxaspiro[5.5]undec-4-en-Ringsystem (s. Abb. 4-1 b auf S. 20) ein wichtiges Strukturmerkmal unter anderem der therapeutisch höchst relevanten Avermectine und Milbemycine aus der Gruppe der Makrolid-Antibiotika (vgl. auch Abschnitt 4.5). Bedingt durch die leicht praktizierbare säurekatalysierte Hydratisierung dient es zudem als wichtiger Vorläufer der Verbindung 1,7-Dioxaspiro[5.5]undecan-4-ol, mit Hydrolyse und Cyclisierung von Allenolether-Intermediaten

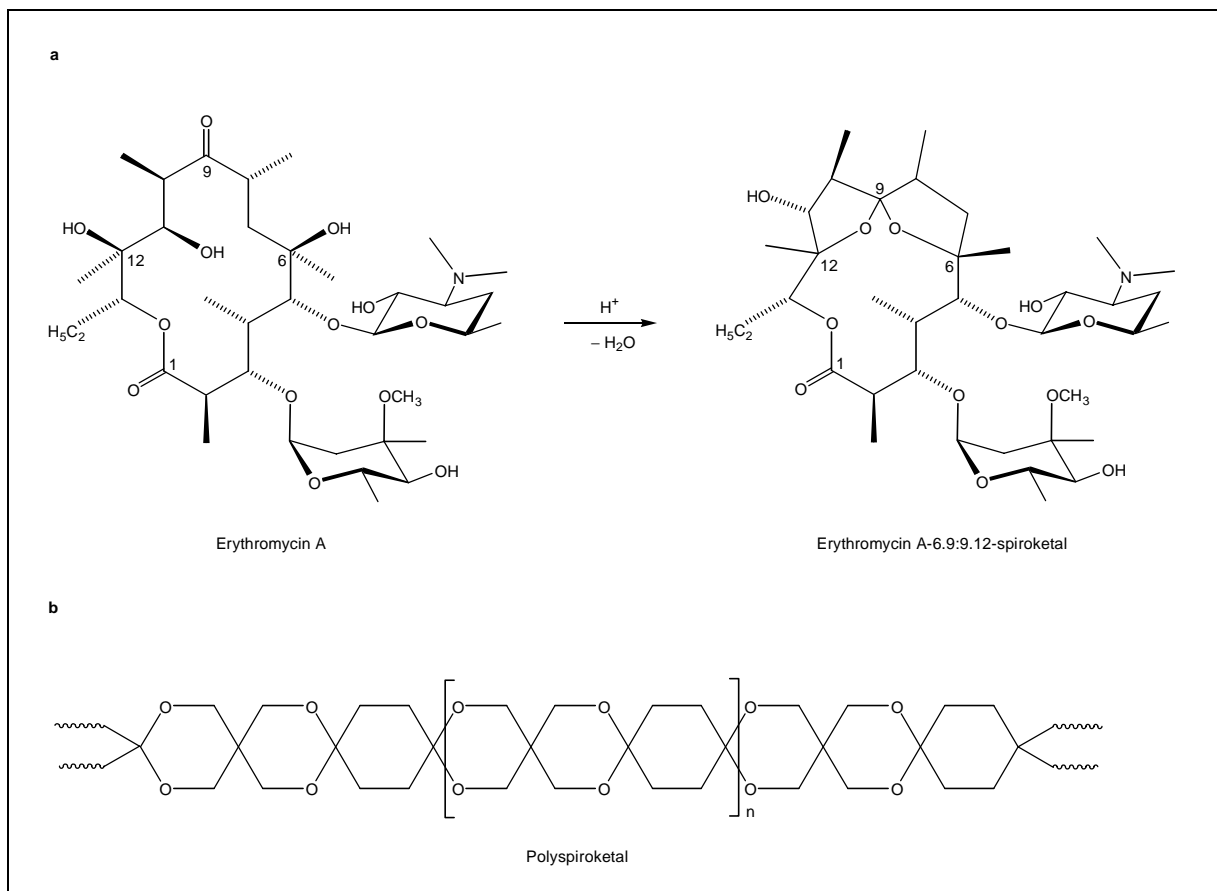


Abb. 4-3. Reaktivität von Spiroketalen. - a) Antibiotika-Inaktivierung (nach Brandis et al., 1994, S. 335); b) Polymer-Synthese (nach Bikales, 1968, S. 108).

als wichtigen Syntheseschritten für das Ausgangs-Ringsystem (vgl. Kocienski und Whitby, 1991, S. 1029).

Die Instabilität von Dihydroxyketonen bezüglich spontaner Spiroketalisierung (vgl. S. 22) verursacht mitunter Stabilitätsprobleme bei Naturstoffen wie dem Makrolid Erythromycin A, dessen Säurelabilität die orale Anwendung als spezifisches Antibiotikum vor allem bei schweren Atemwegsinfektionen stark beeinträchtigt (s. Abb. 4-3 a auf S. 22). In diesem speziellen Fall greift primär die Hydroxygruppe von C-6 an der Carbonylgruppe (C-9) unter Bildung eines Halbketals an, was dann über weitere Reaktion mit der Hydroxygruppe von C-12 unter Wasserabspaltung zum Ketal führt. Ein besseres pharmakokinetisches Verhalten weisen halbsynthetische Erythromycin-Derivate auf, bei denen die 6-Hydroxygruppe verethert ist (\rightarrow Clarithromycin) oder die 9-Ketogruppe als Oxim vorliegt (\rightarrow Roxithromycin) (vgl. Nuhn, 1997, S. 721 f.).

Interessanterweise spielen Spiroketale auch bei der Entwicklung neuer Werkstoffe eine nicht zu unterschätzende Rolle. So sind Spiropolymere im Gegensatz zu linearen Vertretern wie Polyethylen oder Polystyrol infolge ihrer Doppelstrang-Natur wesentlich resistenter gegenüber Degradationsprozessen durch Spaltung einzelner Bindungen. Das in Abbildung 4-3 b auf Seite 22 gezeigte Polyspiroketal (n : Polymerisationsgrad) fällt als weiße, kristalline und unbrennbare Festsubstanz an, welche sich in organischen Lösungsmitteln mit Ausnahme von 2-Hexafluorpropanol nicht löst. Zersetzung erfolgt erst bei 440 °C und damit etwa 150 K über dem Mittelwert für verwandte lineare Polyether. Nach Zusatz von Cyclohexanon lassen sich auch Polyspiroketale mit geringerem Molekulargewicht und besserer Löslichkeit synthetisieren (vgl. Bikales, 1968, S. 97, 108). Manche heterocyclischen Spiropyrane sind aufgrund ihrer Photochromie auch für reprographische Systeme in Betracht gezogen worden (vgl. Falbe und Regitz, 1992, S. 4250).

4.4 Räumliche Struktur

4.4.1 Konfiguration

Der Aufbau von Spiro-Verbindungen (vgl. Abschnitt 4.1) bedingt zusätzliche Möglichkeiten der Stereoisomerie, die sich gegebenenfalls im Auftreten optischer Aktivität äu-

bern können. So weisen symmetrische, hetero-disubstituierte Carbospirane neben unsubstituierten, diametral zum Spirozentrum heterocyclischen Spiranen eine Chiralitätsachse auf, welche darüber hinaus für verschiedene weitere Verbindungsklassen charakteristisch ist (s. Abb. 4-4): Neben Adamantanen sind hier Alkyldicycloalkane, Allene und Biphenyle zu nennen. Während nur Einfachspiro- und ungeradzahlige Polyspiro-Verbindungen (wie Trispirane) unter den obigen Voraussetzungen axiale Chiralität im engeren Sinne (vgl. Kapitel 3) zeigen, geradzahlige jedoch *E/Z*-Isomerie, verhält es sich bei Allenen genau umgekehrt, das heißt die Anzahl kumulierter Doppelbindungen muß für das Vorliegen von Enantiomerie gerade sein (2, 4, 6 usw.), damit die Substituenten in aufeinander senkrecht stehenden Ebenen zu liegen kommen (vgl. Roth et al., 1998, S. 56). Nematinsäure, eine Fettsäure aus Mikroorganismen, gehört zu den wenigen Kumulenen unter den Naturstoffen, deren optische Aktivität ausschließlich auf dem Allen-System beruht (vgl. Christen und Vögtle, 1990, S. 48 f.). Bei Biphenyl-Derivaten wiederum gilt die Einschränkung, daß die koaxialen Ringe in verschiedenen Ebenen liegen und die Rotationsbarriere um die Einfachbindung infolge raumerfüllender Substituenten ausreichend groß ist. Diese Art der Stereoisomerie „eingefrorener Konformationen“ bezeichnet man als Atropisomerie. Als konkretes Beispiel soll das Biaryl Gossypol, ein dimeres Sesquiterpen (Hauptpigment des Baumwollsa-

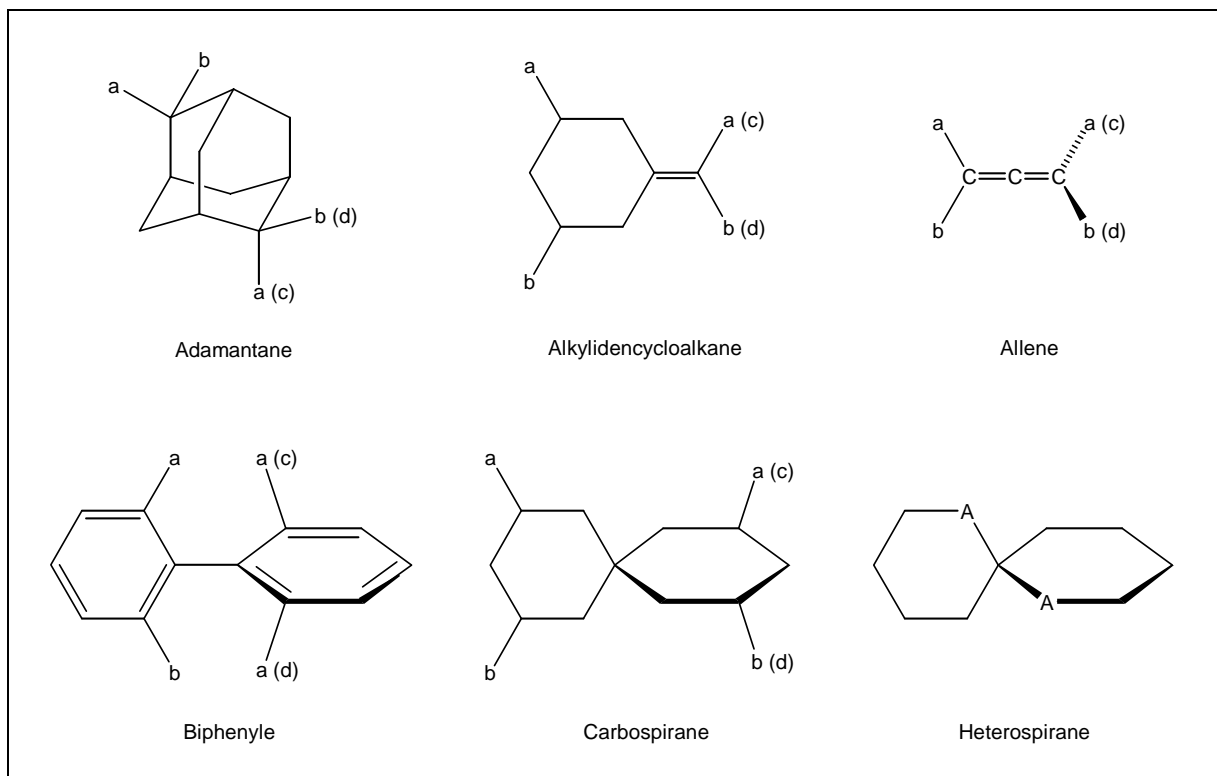


Abb. 4-4. Verbindungsklassen mit Chiralitätsachse (gemäß Hauptmann und Mann, 1996, S. 64 f.).

mens) dienen (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 270). In Abschnitt 4.5 wird ein unsubstituiertes Heterospiran mit axialer Chiralität vorgestellt.

Die Stereodeskriptoren (*aR*) oder (*aS*) bei dieser Form der Enantiomerie ohne Asymmetriezentrum werden für das fragliche Molekül längs seiner Chiralitätsachse in enger Anlehnung an die CIP-Nomenklatur für zentrale Chiralität festgelegt. Entsprechend der Priorität zunächst für die beiden dem Betrachter näheren Liganden *a* und *b* und danach für die entfernteren Liganden *a'* und *b'* bestimmt man die Sequenz gemäß der Zuordnung $a > b > a'$ (vgl. Hauptmann und Mann, 1996, S. 63).

4.4.2 Konformation

Der stereochemische Begriff „Konformation“ bezeichnet Atomanordnungen in Molekülen bekannter Konstitution und Konfiguration (vgl. Kapitel 3), die räumlich durch Drehung um Einfachbindungen hervorgehen, wobei ein bestimmtes Konfigurationsisomer theoretisch in unendlich vielen Konformationsisomeren (Rotameren) existieren kann. Von „Konformeren“ spricht man dagegen nur bei real existierenden, energieminierten Konformationen, welche sich unter Standardbedingungen - abgesehen von Atropisomeren (vgl. Abschnitt 4.4.1) - meist nicht voneinander trennen lassen (vgl. Roth et al., 1998, S. 155 f.).

Aussagen über die Konformation von Wirkstoffen bilden auch die Basis für das Pharmakophor-Konzept, wonach die minimale Partialstruktur eines Moleküls - Anzahl und zeitabhängige Position chemischer Gruppen - als Träger von dessen Wirkeigenschaften gerade noch ausreicht, um den meßbaren biologischen Effekt hervorzurufen (vgl. Roth et al., 1998, S. 263).

Im Zusammenhang mit Spiro-Verbindungen sollen diesbezüglich konformere Aspekte gesättigter Ringsysteme näher betrachtet werden (s. Abb. 4-5 auf S. 26). Neben Deformation des Bindungswinkels (klassische Spannung/Baeyer-Spannung) relativ zum Hybridisierungsbedingten Idealbetrag trägt noch die ekliptische Stellung von Wasserstoffatomen am Ring (Pitzer-Spannung) zu dessen sterischer Spannung bei. Entsprechende Verzerrungen der Ringgeometrie ermöglichen für die betreffenden Moleküle eine Absenkung ihrer potentiellen Energie mit Vergrößerung der Stabilität. Während der Cyclopropanring gezwungenermaßen eben unter hoher Baeyer- und Pitzer-Spannung auftritt, erscheint der Cyclobutanring um ca. 25° aus der Ebene gefaltet mit

geringer Energiebarriere für Ringinversion. Der Cyclopentanring liegt bevorzugt in der Briefumschlag-Form mit rascher Fluktuation der Spitze zwischen allen fünf Kohlenstoffpositionen vor. Der Cyclohexanring besitzt von allen alicyclischen Ringsystemen vor allem in der Naturstoffchemie die größte Bedeutung. Dabei repräsentieren Wannen- und Twistform (letztere in Abb. 4-5 nicht gezeigt) lokale, die beiden Sesselformen absolute Energieminima für Baeyer- wie Pitzer-Spannung. Beim Ringumklappvorgang (Ringinversion) fällt besonders der Positionswechsel der Substituenten von axial (ax) nach äquatorial (eq) und umgekehrt ins Auge. Liegt an dem jeweiligen Kohlenstoffatom (hier C-1) ein Asymmetriezentrum vor, so ändert sich dessen Konfiguration im Zuge dieser konformerer Übergänge nicht, da hierfür mindestens eine Bindung - Carbenium- oder Carbanion als Zwischenzustand vorausgesetzt - kurzzeitig gelöst werden müsste (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 92-95, 100-102). Nach generellen Regeln für Cyclohexan-Derivate ordnen sich große Substituenten - in Abhängigkeit von weiteren elektronischen Effekten - bevorzugt äquatorial an. Die axiale Stellung hingegen begünstigt ein Umklappen des Sessels mit Positionswechsel der Substituenten, deren Reaktivität dadurch entscheidend beeinflusst wird (vgl. Roth et al., 1998, S. 159).

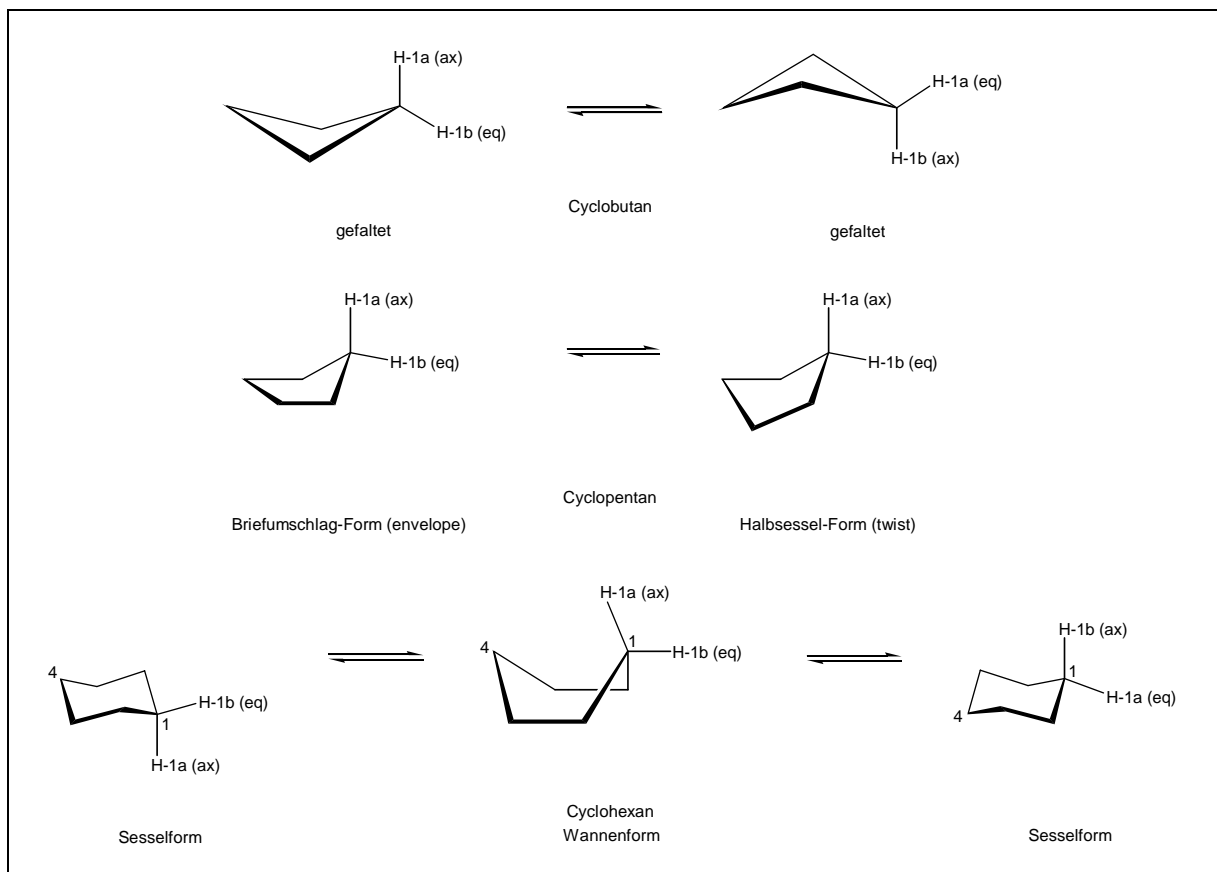


Abb. 4-5. Konformationen gesättigter Ringsysteme (gemäß Hauptmann und Mann, 1996, S. 121-124; Roth et al., 1998, S. 158).

1,7-Dioxaspiro[5.5]undecane dienen als wichtiges Modellobjekt für Konformationsstudien an Spiro-Verbindungen allgemein. Für den Spiro-Typus [5.5] und voraussichtlich auch für [4.5] sowie [4.4] wird die Konformation primär von drei Faktoren bestimmt:

- sterische Einflüsse (1);
- anomere und verwandte Effekte (2);
- intramolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen und Chelat-Effekte (3).

Faktor 1, wonach sperrige Substituenten eher in äquatoriale Ringpositionen drängen (vgl. S. 26), nimmt erwartungsgemäß vor allem in carbocyclischen Systemen den ersten Rang ein. Dennoch existieren Verbindungen, bei denen der anomere Effekt als eigentlich schwächeres Kriterium Alkyl-Substituenten in axialen Stellungen stabilisiert. Die Ursache dieser Erscheinung wird in stabilisierenden elektronischen Wechselwirkungen gesehen, indem ein Elektronenpaar am Ringsauerstoff antiperiplanar zur axialen C-Alkylgruppe orientiert werden kann (vgl. Christen und Vögtle, 1990, S. 96). An

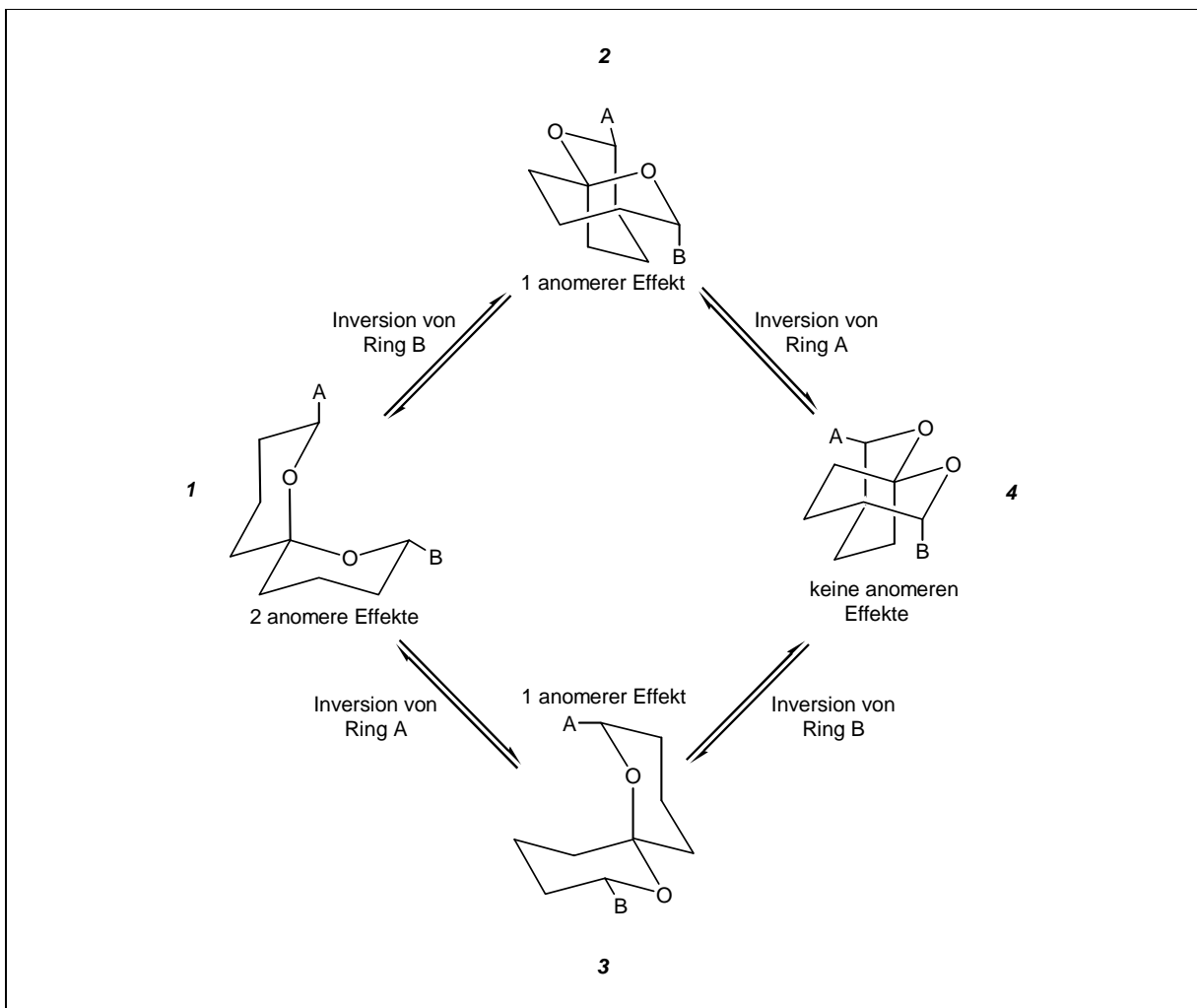


Abb. 4-6. Sesselkonformationen von 1,7-Dioxaspiro[5.5]undecan und entsprechender Derivate (nach Perron und Albizati, 1989, S. 1625).

dritter Stelle beeinflussen Wasserstoffbrücken-Bindungen im Molekül maßgeblich die konformere Stabilität sowie das Ausbeuteverhältnis an Stereoisomeren bei thermodynamischen Spiroketalisierungen. Die Wechselwirkung tritt hierbei vornehmlich zwischen axialen Hydroxygruppen und einer 1,3-diaxialen Spiro-C-O-Bindung auf. Unter gegenseitiger Verstärkung der Faktoren 1 und 2 beziehungsweise Maximierung anomerer Effekte bei simultaner Minimierung 1,3-diaxialer Interaktionen lassen sich Konformationen biogener Spiroketale in der Mehrheit zuverlässig voraussagen (vgl. Vaillancourt et al., 1992, S. 536 f.).

Für den Fall von Spiro[5.5]-Systemen beobachtet man sowohl in gesättigten wie ungesättigten Ringsystemen allgemein eine bisaxiale Orientierung der Spiro-C-O-Bindungen. Detailliert existieren bei unsymmetrischer Substitution von 1,7-Dioxaspiro[5.5]undecanen und voneinander unabhängiger Inversion beider Ringe die möglichen Sesselkonformere **1-4**, wie Abbildung 4-6 auf Seite 27 zeigt. Dabei ließ sich mittels ^{13}C -NMR allgemein anerkannt belegen, daß **1** über die Maximierung eines thermodynamischen anomeren Effektes das stabilste Konformer darstellt (vgl. Perron und Albizati, 1989, S. 1625 f.).

4.5 Ökologische Bedeutung

Eine große Anzahl von Mikroorganismen, Pflanzen, Pilzen und Insekten produziert Spiroketale als sekundäre Naturstoffe. Nachdem bereits in den Jahren um 1940 Steroidsapogenine als erste große Spiroketal-Gruppe biogenen Ursprungs beschrieben worden waren, setzte das allgemeine Interesse an dieser Substanzklasse erst ab etwa 1970 mit der Strukturaufklärung des ionophoren Polyether-Antibiotikums Monensin A im Zuge der gleichzeitig entstehenden Wirt/Gast-Chemie ein. In rascher Folge entdeckte man dann auch die biochemisch-pharmakologische Relevanz vieler Spiroketale, wie beispielsweise des Dinoflagellaten-Toxins Okadainsäure, verantwortlich für die gastrointestinale Form der Muschelvergiftung, sowie der Avermectine und Milbemycine als akarizide Makrolid-Antibiotika bei geringer Toxizität für Säugetiere (vgl. auch Abschnitt 4.3) (vgl. Vaillancourt et al., 1992, S. 675).

Strukturell besonders anspruchsvoll und theoretisch - vor allem hinsichtlich Konformationsmodellen - schwierig zugänglich sind tricyclische Systeme wie Salinomycin

(s. Abb. 4-7 a), neben Narasin eines der äußerst selten in der Natur anzutreffenden Trioxadispiroketale (vgl. Perron und Albizati, 1989, S. 1619 f., 1630, 1632). Dieses ionophore Polyether-Antibiotikum komplexiert in erster Linie monovalente Kationen (Na^+) und wird gegen Kokzidiose in der Geflügelhaltung eingesetzt (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 567).

Besonderes wissenschaftliches wie ökologisches Interesse wendet man denjenigen Spiroketalen zu, welche Insekten einzeln oder im Gemisch zur innerartlichen Kommunikation als Pheromone einsetzen. Darunter fallen auch die einzig bekannten biogenen Vertreter dieser Stoffgruppe mit siebengliedrigen Ringen. An konkreten Beispielen zeigt Abbildung 4-7 b Chalcogran, das Aggregationspheromon von Borkenkäfern der Gattung *Pityogenes*, wobei nur das zusammen mit dem (2*S*,5*S*)-Epimer abgegebene

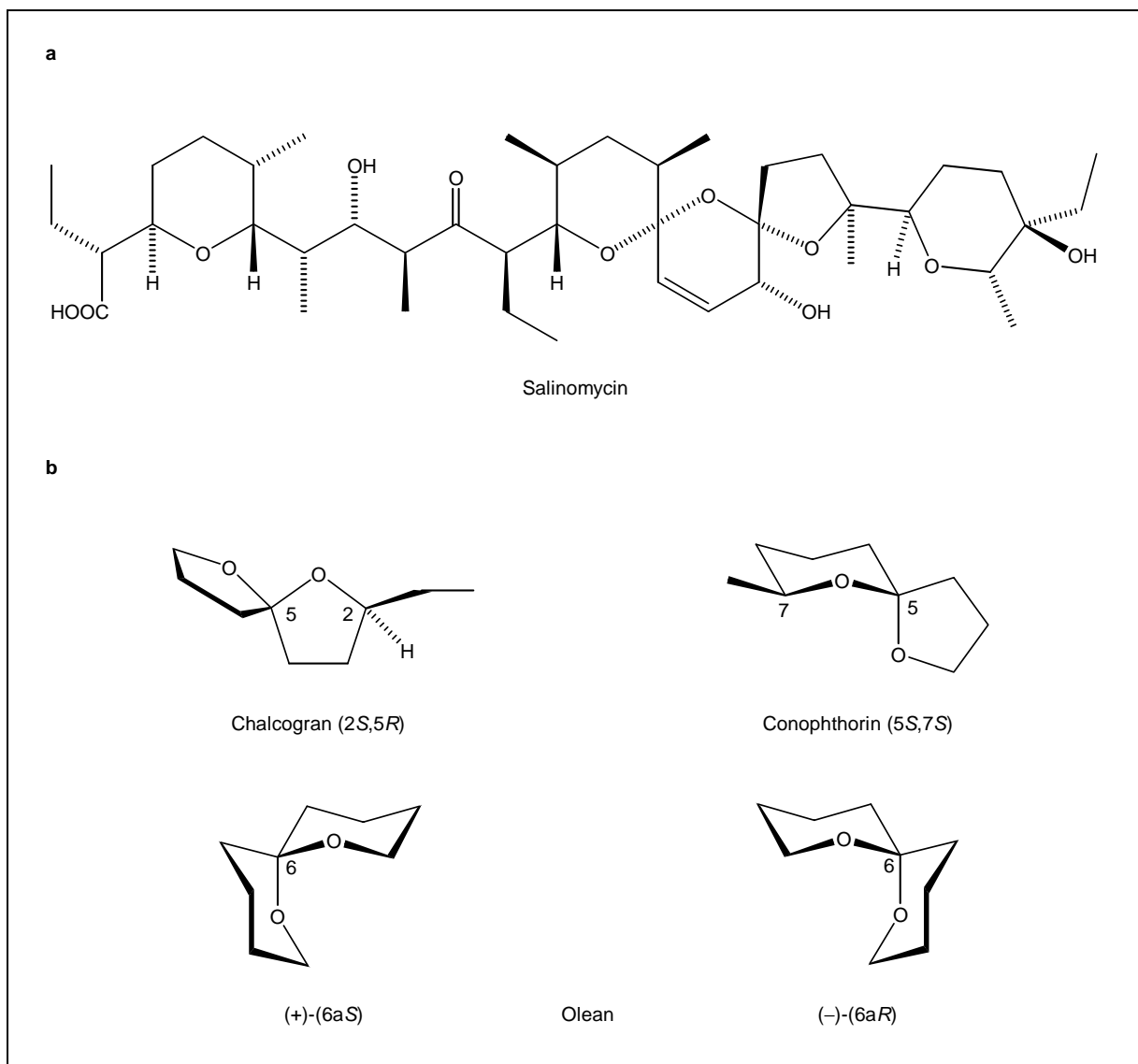


Abb. 4-7. Spiroketale mit biochemisch-ökologischer Relevanz (gemäß Fugmann et al., 1997, S. 122, 148, 449, 567). - a) Antibiotikum; b) Pheromone .

(2*S*,5*R*)-Isomer anlockende Wirkung besitzt. Conophthorin wiederum wurde in den Stachelapparaten von Wespen der Gattungen *Dolichovespula* und *Paravespula* sowie auch bei Borkenkäfern der Gattungen *Conophthorus*, *Cryphalus* und *Leperisinus* gefunden. In *Conophthorus*-Arten dient das (5*S*,7*S*)-Isomere zur Abschreckung von Artgenossen, um lokale Überpopulationen zu vermeiden. Schließlich verdient noch das von der weiblichen Olivenfliege *Dacus oleae* und anderen Fruchtfliegen dieser Gattung abgegebene Sexualpheromon Olean große Aufmerksamkeit, welches infolge seiner absolut symmetrischen Substitution am Spiroatom mit nur zwei verschiedenen Liganden - im Gegensatz zu Disparlur (s. Abb. 3-2 auf S. 18) - rein axiale Chiralität im engeren Sinne aufweist (vgl. auch Abschnitt 4.4.1) und zudem durch zwei anomere Effekte stabilisiert wird (s. Abb. 4-6 auf S. 27). Dabei lockt das linksdrehende (6*aR*)-Enantiomer die Männchen an, das rechtsdrehende (6*aS*)-Enantiomer statt dessen die Weibchen, ein schönes Beispiel für die gegen Ende von Kapitel 3 diskutierte homochirale Asymmetrie als Garant für maximalen Informationsgehalt (hier: Art- und Geschlechtsspezifität) in kleinstmöglichen Strukturen (hier: M_r 156,22) (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 122 f., 148, 449).

Zusammenfassend ist noch anzuführen, daß die überwiegende Mehrzahl der biogenen Spiroketale folgenden drei Strukturtypen angehört: 1,7-Dioxaspiro[5.5]undecan (→ Avermectine, Insektenpheromone, Milbemycine, Okadainsäure, Steroidsapogenine); 1,6-Dioxaspiro[4.5]undecan (→ Insektenpheromone, Monensin A); 1,6-Dioxaspiro[4.4]nonan (→ Chalcogran, Insektenpheromone) (vgl. Vaillancourt et al., 1992, S. 534 f.).

III Angewandte Methodik

5 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Ganze oder geschnittene Drogen können in der Regel nicht direkt der phytochemischen Analyse zugeführt werden, sondern müssen zur effektiven Extraktion in einer bestimmten Korngröße vorliegen. Besonders fetthaltige oder weiche Materialien führen dabei häufig zu größeren Problemen, die mit Hilfe spezieller Mühlentypen (z. B. Kryomühlen) meist recht gut zu beheben sind. Mahlvorgänge zur Homogenisierung des Probenmaterials sind in der Regel zeitaufwendig und belasten die Probe thermisch wie mechanisch, so daß die Körnung stets nur so fein wie nötig gewählt werden sollte, bei maximaler Füllung der Mahlgefäße bis zu etwa 20 % ihres Nennvolumens. Um den Abrieb zu minimieren, muß immer Garniturmaterial ausreichender Härte zum Einsatz kommen. Während hochoberflächlich laufende Schlagmühlen eine starke örtliche Erwärmung des Drogenmaterials begünstigen, sorgt in Ultrazentrifugalmühlen der Zyklonmodus



Abb. 5. *A. aculeatum*: Luftgetrocknetes Rhizom mit Blättern.

für eine ausreichende Kühlung der eingesetzten Proben. Allerdings kann bei verholzten Pflanzenteilen wie Rhizomen (s. Abb. 5) der starke Luftzug in Kombination mit der Reibungshitze eventuell zu einem Schmelbrand führen, weshalb harte Drogenteile der Mühle immer erst nach ausreichender Zerkleinerung zugeführt werden dürfen. Zur Einstellung des gewünschten Korngrößenbereichs dient abschließend ein integrierter Siebeinsatz, wobei für Naturstoffextraktionen eine mittlere Körnung von 0,3-4,0 mm üblicherweise genügt (vgl. Stahl und Schild, 1981, S. 6).

Um aus pharmakognostischem Ausgangsmaterial niedermolekulare Inhaltsstoffe zu gewinnen, trennt man diese durch fraktionierte Extraktion mit einer eluotropen Lösungsmittelreihe, das heißt in Richtung steigender Elutionswirkung geordnet, von polymeren Trägersubstanzen (Cellulose, Lignin usw.) ab. Dabei fördern geringe Korngröße und Wärme maßgeblich die zeitbestimmenden Diffusionsvorgänge, während eine erschöpfende Extraktion den ständigen Austausch von gesättigtem gegen frisches Lösungsmittel voraussetzt. Von Sonderfällen abgesehen muß konkret zwischen folgenden vier Arbeitstechniken differenziert werden:

- Mazeration (1);
- Digestion (2);
- Perkolation (3);
- Soxhlet-Extraktion (4).

Mazeration und Perkolation laufen unter Raumtemperatur ab, Digestion und Soxhlet-Extraktion hingegen bei 40-50 °C. Andererseits spielen sich 1 und 2 jeweils in stehendem, 3 und 4 aber in fließendem Lösungsmittel ab. Für phytochemische Untersuchungen stellt die Perkolation mit ihren Vorzügen, das heißt erschöpfender Extraktion unter Schonung der Inhaltsstoffe bei Raumtemperatur und apparativ einfacher Durchführung, im allgemeinen die Methode der Wahl dar. Zu diesem Zweck wird das - zwecks Äquilibrierung der Durchflußrate - mit Seesand ausgiebig gemischte und in Lösungsmittel vorgequollene Drogenpulver langsam bei einer Abtropfgeschwindigkeit von 3-5 mL pro Minute (für > 500 g Arzneidroge) so vollständig wie möglich unter TLC-Kontrolle (vgl. Abschnitt 6.1) extrahiert. Bei mehrtägigem Prozedere wird über Nacht der Auslauf verschlossen und die Droge somit mazeriert (vgl. Stahl und Schild, 1981, S. 12-14). Ferner ist zu beachten, daß sich eine 100 %ige Extraktion prinzipiell aufgrund ständig neu entstehender Konzentrationsgleichgewichte ausschließt und das Perkolationsverfahren somit nur bis zu einem bestimmten Grad ökonomisch fortgeführt werden kann und soll.

Die Thermolabilität zahlreicher Naturstoffe erfordert das Einengen von Extrakten unter schonenden Bedingungen und zugleich geringem Zeitbedarf. Als Apparatur der Wahl hat sich der sogenannte Vakuum-Rotationsverdampfer bestens bewährt, da durch ständiges Drehen des maximal halbvollen Kolbens der dünne Extraktfilm an der Gefäßinnenwand ein rasches Verdampfen des Lösungsmittels ohne lokale Überhitzung ermöglicht (vgl. Stahl und Schild, 1981, S. 16).

6 Chromatographische Trennung

6.1 Dünnschichtchromatographie

Bei diesem physikalisch-chemischen Trennverfahren befindet sich die dünne, aus feinkörnigem Material bestehende stationäre Phase auf einer Trägerplatte aus Glas oder Metall. Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt im geringen apparativen Aufwand und Zeitbedarf neben minimalem Verbrauch an Untersuchungsmaterial. Die zur Dünnschichtchromatographie geeignete Anordnung umfaßt zunächst die gelöste Probe in punkt- oder strichförmiger Auftragung mit 1-2 cm Abstand vom unteren Rand. Nach Einstellen der Platte oder Folie in eine dichtschießende Kammer mit geeignetem Fließmittel wandert dieses über Kapillarkräfte in der Sorptionsschicht nach oben, wobei die Separation der im Startfleck enthaltenen Komponenten entsprechend ihren chromatographischen Eigenschaften erfolgt. Das sehr polare Trennmittel Kieselgel wird am häufigsten für die stationäre Phase verwendet und ermöglicht die Separation nicht zu polarer Substanzen unter den Bedingungen der Verteilungschromatographie. Saure organische Verbindungen benötigen hierbei den Zusatz von Essigsäure im Elutionsmittel, basische Komponenten von Ammoniakwasser. Für die mobile Phase kommen nur analysenreine Lösungsmittel - nach geeigneter Optimierung (vgl. Abschnitt 6.3) - in Form möglichst einfacher Gemische mit idealerweise nicht mehr als drei Bestandteilen in Frage. Als Faustregel gilt: Die Auftrennung stark polarer Substanzen erfolgt in polaren Fließmitteln, für weniger polare Substanzen in eher unpolaren Fließmitteln. Im Falle polarer Sorptionsmittel trennt ein gegebenes Fließmittel zwei Substanzen in der Weise, daß die weniger polare Komponente von beiden weiter wandert, im Falle apolarer Sorptionsmittel (Umkehrphasen-Chromatographie) gerade entgegengesetzt. Bei Kammersättigung liegt ein Blatt Filterpapier nach Durchtränken mit Fließmittel der hinteren Kammerinnenwand an, was bei gleicher Laufstrecke verglichen mit Kammern ohne Filterpapiereinlage zu verringerten R_f -Werten führt. Diese substanzspezifische Größe bezeichnet den Quotienten (≤ 1) aus den Abständen jeweils vom Startpunkt zur Fleckenmitte und vom Startpunkt zur Fließmittelfront, stellt aber nur einen begrenzt reproduzierbaren Richtwert dar. Letztlich vergleichbar sind nur die R_f -

Werte von Test- und Referenzsubstanzen für ein und dasselbe Dünnschichtchromatogramm. Nach Entwickeln in einer Richtung oder auch in zwei Dimensionen mit intermediärem Trocknen der DC-Schicht werden die getrennten Substanzen anhand ihrer Eigenfärbung (VIS), ihrer Eigenabsorption bei 254 nm (kurzwelliges UV-Licht), ihrer Fluoreszenz bei 366 nm (langwelliges UV-Licht) oder durch ihre Färbung nach Besprühen mit Universalreagenzien (z. B. Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz) detektiert (vgl. Stahl und Schild, 1981, S. 34, 37-39, 41, 44 f.; Wagner et al., 1983, S. 305).

In der Naturstoffchemie zieht man Dünnschichtchromatogramme vor allem zu analytischen Zwecken wie Fließ- und Extraktionsmittelloptimierung und zur Kontrolle von Perkolaten sowie Unterfraktionen bei Trennprozessen heran, anwendbar für Substanzmengen von 1-10 µg. Dabei läßt sich die störende Fleckenverbreiterung am wirksamsten durch möglichst geringes Auftragevolumen, enge Kapillaren und Lösung der Komponenten in apolaren, flüchtigen Fließmitteln vermeiden.

Die präparative Dünnschichtchromatographie basiert auf dem Trennprotokoll des analytischen Ansatzes und dient zur raschen Isolierung kleiner Substanzmengen im Milligramm- bis Gramm-Bereich. Zur strichförmigen Probenauftragung in der Größenordnung von einigen 100 µL setzt man am besten automatisierte Applikatoren ein; bei der Entwicklung ist besonders auf vollständige Kammersättigung und möglichst große Differenzen in den R_f -Werten zu achten (vgl. Geckeler und Eckstein, 1987, S. 136-138, 140-142, 148-151).

6.2 Säulenchromatographie

Phytochemisch zieht man die Säulenchromatographie als Trenn- und Reinigungsverfahren im kleinen wie großen Maßstab am häufigsten heran. Die stationäre Phase befindet sich in einem nach unten verjüngten Glasrohr eingeschlossen, wobei für Vortrennungen kürzere, dickere Säulen bevorzugt werden, für Feintrennungen dagegen längere und schmalere Röhren. Die mobile Phase transportiert das zu trennende Substanzgemisch bei unterschiedlich starker Retention der Einzelkomponenten durch die Säule. Als Trennprinzipien kommen Adsorptions-, Gel-, Ionenaustausch- und Verteilungschromatographie in Frage unter Beachtung der Faustregel, daß ein Teil Substanzgemisch die hundert- bis fünfhundertfache Menge an stationärer Phase und die

fünfhundert- bis fünftausendfache Menge an mobiler Phase benötigt. Optimale Trennungen mit Hilfe der Säulenchromatographie setzen stationäre Phasen in möglichst kleiner und gleichmäßiger Körnung sowie niedrige Fließgeschwindigkeiten bei geringer Viskosität des Elutionsmittels (→ rasche Einstellung von Diffusionsgleichgewichten) voraus. Die Trennsäule ist so zu dimensionieren, daß über der luftblasenfrei vorliegenden stationären Phase noch mindestens 5-10 cm freier Raum verbleibt, um nach Einfüllen einer dünnen Seesand-Schicht eine optimale Proben- wie Elutionsmittelaufgabe zu gewährleisten. Die Tropfgeschwindigkeit für das Eluat sollte dabei 1 Tropfen pro Sekunde nicht überschreiten; zum Auffangen in Portionen von 5-15 mL verwendet man zweckmäßigerweise einen automatisierten Fraktionssammler. Für die Detektion bereits vorliegender oder weiter aufzureinigender Isolate erweist sich die analytische Dünnschichtchromatographie (vgl. Abschnitt 6.1) am geeignetsten (vgl. Geckeler und Eckstein, 1987, S. 177, 183; Stahl und Schild, 1981, S. 28-30).

Als apparativ wenig aufwendige, preiswerte und darum weitverbreitete Methode gilt die Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie mit Trennung unter hydrostatischem Druck, welche kurz auch als „Offene Säule“ (OCC) bezeichnet wird. Während HPLC-Säulen Trennstufenzahlen von 10 000 bis 40 000 erreichen, liegen die Werte für OCC nur bei einigen hundert. Trotzdem lassen sich für letztere Methode durch Optimierung des Sorptionsmittel-/Elutionsmittel-Systems (vgl. Abschnitt 6.3) in den meisten Fällen ausreichend hohe Auflösungen erzielen, um größere Mengen an Substanzgemisch ökonomisch zu separieren. Zum Füllen des Trennrohres muß die stationäre Phase unbedingt als gießfähige Suspension vorliegen. Im Falle der Adsorptionschromatographie an Kieselgel werden Partikelgrößen von 100-200 µm benötigt. Mit komprimierbaren Säulenfüllmaterialien für die Gelchromatographie muß immer unter Normaldruck gearbeitet werden, so auch mit dem derivatisierten Dextrangel Sephadex LH-20, ein mit Epichlorhydrin vernetztes Polysaccharid. Hierbei hängt die Affinität der gelösten Substanzen zur solvatisierten Matrix sehr stark von der Zusammensetzung des Fließmittels ab. Je nach Wahl lassen sich die adsorptiven Eigenschaften unterdrücken (→ Trennung nach Teilchengröße) oder gezielt zur Separation von Substanzen mit ähnlichen Molekulargewichten (→ Adsorptions- oder Verteilungschromatographie) nutzen. In letzterer Weise wirkt ein Gemisch aus Cyclohexan : Dichlormethan/Trichlormethan : Methanol (7 : 4 : 1), wobei der Anteil chlorierter Lösungsmittel 33 % (v/v) nicht überschreiten darf. Dextrangele eignen sich besonders gut zur Trennung und Aufreinigung

zersetzlicher Naturstoffe, da diese Matrix im Gegensatz zu porösen Gläsern keine denaturierenden Eigenschaften besitzt (vgl. Geckeler und Eckstein, 1987, S. 125, 130, 181, 184).

Zur Grobtrennung von Rohextrakten in der Naturstoffchemie setzt man häufig die Vakuum-Flüssigkeitschromatographie (VLC) als elegante Variante ein. Das an möglichst kleine Mengen der stationären Phase voradsorbierte Substanzgemisch wird hierbei mittels mäßigem Unterdruck am Säulenauslauf (→ Wasserstrahlpumpe) durch das trocken gepackte Füllmaterial gesaugt, wobei die mobile Phase in Form eines Stufengradienten längs der elutropen Reihe von *n*-Hexan beispielsweise über Dichlormethan und Essigsäureethylester bis hin zu Methanol eingesetzt wird. Infolgedessen und nicht zuletzt aufgrund des kompakter vorliegenden Säulenbettes (→ kürzere, dickere Säulen; vgl. S. 34) bei hoher Beladung fällt die Trennleistung im Vergleich zur OCC wesentlich geringer aus, obgleich die stationäre Phase - meistens Kieselgel - in feinerer Körnung von etwa 30-70 µm vorliegt (vgl. Cannell, 1998, S. 129 f.).

Generell sollte für Naturstoffisolierungen der Grundsatz gelten, optimale Ausbeute und Reinheit interessierender Komponenten mit kleinstem technischem wie zeitlichem Aufwand zu realisieren, das heißt, kostspielige Trennmethode (z. B. HPLC) nur im Bedarfsfall und bei entsprechender Eignung einzusetzen.

6.3 Fließmitteloptimierung

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, basiert der Erfolg jeder chromatographischen Trennung wesentlich auf der bestmöglichen gegenseitigen Ausrichtung von Sorptions- und Fließmittel. Das „PRISMA“-Optimierungssystem für die Dünnschichtchromatographie besteht aus folgenden drei Hauptteilen (vgl. Nyiredy et al., 1985a, S. 337):

- Auswahl der stationären Phase und geeigneter Lösungsmittel (1);
- Optimierung der mobilen Phase (2);
- Auswahl des Entwicklungsmodus (linear/zirkular); Übertragung gewonnener Erkenntnisse von der Dünnschicht- zur Säulenchromatographie (3).

Punkt 3 stellt dabei den problematischsten Faktor dar, da TLC-Ergebnisse nur für trocken gepackte Säulen oder für reine Fließmittel auf OCC übertragen werden kön-

nen, hingegen nicht für Fließmittelgemische mit komplizierten Gradienten längs der Entwicklungszone. Auch Selektivitätsunterschiede infolge von Bindemitteln bei DC-Platten sind einzukalkulieren (vgl. Geckeler und Eckstein, 1987, S. 164).

Punkt 2 geht von der Einteilung gebräuchlicher Lösungsmittel in Selektivitätsgruppen (s. Tab. 6 auf S. 39) aus, unter Berücksichtigung der jeweiligen Eigenschaften als Protonenakzeptor, Protonendonator und/oder Dipol. Innerhalb einer Selektivitätsgruppe herrschen trotz unterschiedlicher Lösungsmittelstärken S_i ähnliche chromatographische Merkmale vor, wobei sich die Lösungsmittelstärke S_T einer Mehrkomponentenphase mit dem Volumenbruch ψ_i pro Lösungsmittel wie folgt berechnet:

$$S_T = \sum_{i=1}^n S_i \psi_i$$

S_i beziehungsweise S_T bestimmen dabei maßgeblich Retentionszeit und somit R_f -Wert für aufzutrennende Komponenten.

Bei „PRISMA“ handelt es um ein geometrisches Modell zur Beschreibung aller beliebigen quaternären (\rightarrow Innenraum), ternären (\rightarrow Seitenflächen) und binären (\rightarrow Kanten) Lösungsmittelgemische unter vertikaler Auftragung der Lösungsmittelstärken (\rightarrow Kantenhöhe) (s. Abb. 6 a auf S. 38) und horizontaler Darstellung der Fließmittel-Selektivität (\rightarrow Mischungspunkte im gleichseitigen Dreieck) (s. Abb. 6 b auf S. 38). Zur Entfernung des oberen, irregulären Teils schneidet man das Prisma auf der Höhe der kürzesten Kante, in diesem Fall für die Lösungsmittelstärken $S_T(2) = S_T(3)$, parallel zur Grundfläche ab, indem gemäß obiger Gleichung $S_T(1)$ durch Zumischen benötigter Volumenanteile von *n*-Hexan auf das Niveau der beiden anderen, unverdünnten Elutionsmittel ($S_T(2/3) = S_{2/3}$) gesenkt wird. So muß beispielsweise zur Halbierung von $S_T(1)$ der Anteil an *n*-Hexan, eines weitgehend inerten Lösungsmittels von vernachlässigbarer Stärke ($S = 0,1$), 50 % (v/v) betragen.

Zu Beginn der „PRISMA“-Optimierung prüft man konkret mindestens zwei der in Tabelle 6 auf Seite 39 genannten Lösungsmittel pro Gruppe in unverdünnter Form auf ihre Eignung zur Separation vorliegender Fraktionen, wobei Wasser sowie Essigsäure als Modifikatoren für stark polare Komponenten nur verdünnt zum Einsatz kommen. Die Beurteilung der Trenneigenschaften hat im R_f -Bereich von 0,2-0,8 zu erfolgen, unter eventueller Korrektur durch *n*-Hexan, womit die jeweiligen Elutionsmittel unbegrenzt mischbar sein müssen. Auf DC-Folien (10 cm \times 10 cm) können diese Unter-

suchungen rasch und ökonomisch mit je 10 mL Fließmittelgemisch durchgeführt werden. Nach Auswahl der drei am besten geeigneten Elutionsmittel gemäß maximaler Anzahl an getrennten Substanzen bei größtmöglichen ΔR_f -Werten konstruiert man durch Angleichen der Lösungsmittelstärken - in Orientierung an der schwächsten Komponente - den regulären Teil des Prismas (vgl. S. 37). Für die Ermittlung der besten Lösungsmittel-Kombination wird die Dreiecksfläche primär anhand der Eck- und Mittelpunktskoordinaten (811, 181, 118, 433) abgetastet. Sofern nötig, läßt sich auch die Lösungsmittelstärke der Gesamtmischung unter Beibehaltung der gewählten Selektivität mit *n*-Hexan erniedrigen (vgl. Nyiredy et al., 1985a, S. 242-244). Sollte bei besonders schwierigen Trennproblemen für unpolare Gemische das genannte Prozedere nicht

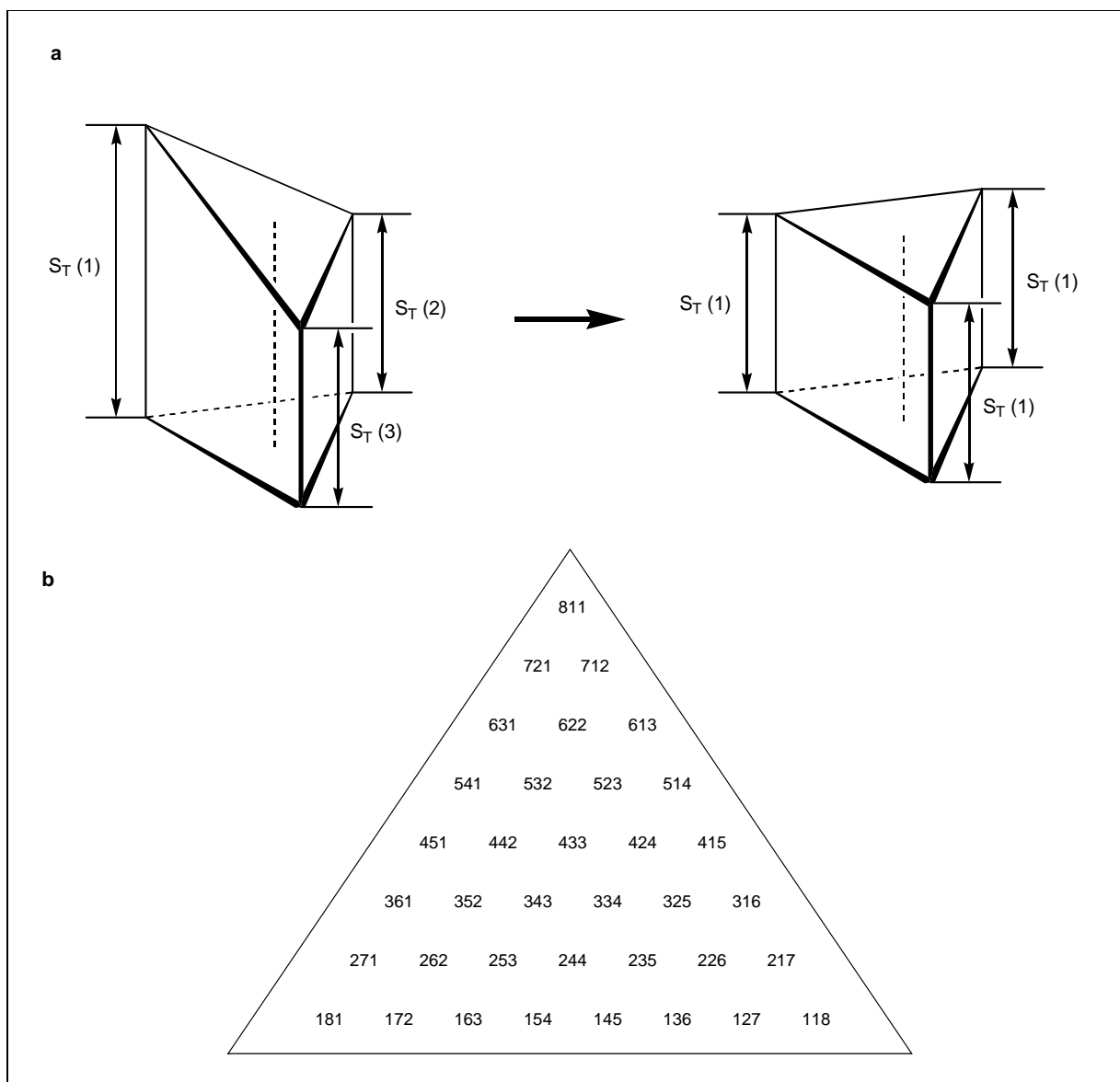


Abb. 6. Das „PRISMA“-Modell (verändert nach Nyiredy et al., 1985a, S. 242 f.). - a) Angleichung der Lösungsmittelstärken; b) Kombination der mobilen Phase.

Tab. 6. Gebräuchliche Lösungsmittel zur TLC-Optimierung (gemäß Nyiredy et al., 1985a, S. 243).

Gruppe	Lösungsmittel	Lösungsmittelstärke (S _i)
I	<i>n</i> -Hexan	0,1
	<i>n</i> -Butylether	2,1
	Isopropylether	2,4
	Methyl- <i>tert</i> -butylether	2,7
	Diethylether	2,8
II	<i>n</i> -Butanol	3,9
	Isopropylalkohol ^a	3,9
	<i>n</i> -Propanol	4,0
	Ethanol	4,3
	Methanol	5,1
III	Tetrahydrofuran	4,0
	Pyridin	5,3
	Methoxyethanol	5,5
	Dimethylformamid	6,4
IV	Essigsäure ^b	6,0
	Formamid	9,6
V	Dichlormethan	3,1
	Ethylenchlorid	3,5
VI	Essigsäureethylester	4,4
	Methylethylketon	4,7
	Dioxan	4,8
	Aceton	5,1
	Acetonitril	5,8
VII	Toluol	2,4
	Benzol	2,7
	Nitrobenzol	4,4
VIII	Trichlormethan	4,1
	Nitromethan	6,0
	Wasser	10,2

^a nicht „Isopropanol“, da ein Alkan „Isopropan“ nicht existiert!
^b Zusatz als Modifikator zu 0,5 % (v/v)

zum Erfolg führen, so konstruiert man ein neues reguläres Prisma mit weiteren geeigneten Fließmitteln, prüft andere Kombinationskoordinaten oder reduziert die Zahl der Elutionskomponenten auf zwei. Im Falle entsprechender Probleme mit polaren Gemischen setzt man wiederum zuerst weitere geeignete Fließmittel ein, weicht anschlie-

ßend in den irregulären Teil des Prismas aus, prüft andere Selektivitätspunkte oder verringert die Zahl der in Frage kommenden Fließmittel auf zwei (vgl. Nyiredy et al., 1988, S. 338-340).

Zusammenfassend ermöglicht das „PRISMA“-Modell - mittels eines gezielten Auswahlverfahrens - die rasche Evaluierung mobiler Phasen, um unbekannte Substanzgemische dünn- wie säulenchromatographisch mit verhältnismäßig geringem zeitlichem Aufwand zu separieren.

7 Strukturaufklärung

7.1 Allgemeine Einführung

Wie bereits in Teil I erwähnt, basieren die gewaltigen Fortschritte in der Naturstoffchemie seit 1950 vordergründig auf der Entwicklung hochleistungsfähiger spektrometrischer und spektroskopischer Verfahren. Nahm die Strukturaufklärung komplizierter Moleküle wie beispielsweise Strychnin vor dieser Entwicklungsphase häufig ein ganzes Forscherleben in Anspruch, so können heutzutage neu isolierte Naturstoffe im Milligramm-Bereich und darunter meist unter Umgehung aufwendiger, substanzverbrauchender chemischer Degradationsverfahren sehr rasch aufgeklärt werden (vgl. Nuhn, 1997, S. 21). Die zugrundeliegende Methodik kombinierter Meßverfahren zur Minimierung von Fehlinterpretationen läßt sich in drei Segmente gliedern:

- Bestimmung der Molekularformel (1);
- Konstruktion der zweidimensionalen (planaren) Struktur (2);
- Erschließen der vollständigen, dreidimensionalen Struktur mit relativer/absoluter Konfiguration (3).

Für Schritt 1 zeigt die Ultraviolett-spektroskopie (vgl. Abschnitt 7.2) vorhandene beziehungsweise fehlende chromophore Gruppen an, während aus dem ¹H-NMR-Spektrum die Anzahl der H-Atome eines Signals, die Umgebung dieser H-Atome (→ funktionelle Gruppen) anhand der chemischen Verschiebung sowie die Anzahl benachbarter H-

Atome über die Spin-Spin-Aufspaltung hervorgehen (vgl. Abschnitt 7.4.2). Das ^{13}C -NMR-Spektrum unter Einschluß von Spezialverfahren hingegen gibt Aufschluß über die Anzahl verschiedenartig gebundener C-Atome sowie entsprechender Kovalenzen zu H-Atomen (vgl. Abschnitt 7.4.3). Zusätzliche Informationen über das Kohlenstoffgerüst liefern auch die Doppelbindungsäquivalente, von denen jedes einer Doppelbindung oder einem Ring entspricht. Die Massenspektrometrie (vgl. Abschnitt 7.6) schließlich steuert die Molekülmassenzahl bei, manchmal auch die Elementaranalyse oder mindestens die maximale Zahl der C-, S-, Cl-, Br- und anderer Atome im Molekül; zudem lassen sich über die Massenzahlen der ionisierten Molekülfragmente stets auch bestimmte Strukturelemente erkennen (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 359).

Schritt 2 stützt sich auf besondere Verfahren der zweidimensionalen, homo- und heteronuklearen NMR-Spektroskopie (vgl. Abschnitt 7.5). Neben der Unterscheidung zwischen vicinalen und geminalen H-Atomen tragen hier Wechselwirkungen zwischen H-Atomen in Spinsystemen, C-H-Atom-Kopplungen über eine Bindung bis zu drei Kovalenzen sowie C-C-Atom-Kopplungen dazu bei, die Struktur des Molekülgerüsts zu erschließen.

Bezüglich Schritt 3 kommen ebenso zweidimensionale NMR-Spektren zum Einsatz, wobei dieses Mal die Konnektivität von H-Atomen durch den Raum entscheidende Aussagen über die relative Konfiguration ermöglicht. Die Auswertung von Verschiebungsdifferenzen an H-Atomen nach Derivatisierung des Isolates mit chiralen Reagenzien erlaubt gemeinsam mit der Polarimetrie (vgl. Abschnitt 7.3) Rückschlüsse auf die absolute Konfiguration, häufig unter Absicherung durch stereochemisch kontrollierte Totalsynthesen. Erfolgreiche Kristallisation des Naturstoffs nach eventueller Derivatisierung ebnet den Weg zur Röntgenstrukturanalyse (vgl. Abschnitt 7.7) als zuverlässigster wie vollständigster Methode der Strukturaufklärung.

7.2 Ultraviolettspektroskopie

Unter Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich versteht man die Messung der Absorptionsstärke für Strahlung entsprechender Wellenlänge beim Durchdringen von Substanzproben. Der molare Extinktionskoeffizient als Kenngröße für das jeweilige Molekül berechnet sich nach dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz aus

der Extinktion E_λ , der molaren Probenkonzentration c und der Küvetten-Schichtdicke d gemäß folgender Gleichung, wobei der lineare Zusammenhang nur für verdünnte Lösungen gegeben ist ($E_\lambda \leq 0,7$):

$$\varepsilon_\lambda = \frac{E_\lambda}{cd}$$

Strukturelemente, die durch Anregung von π -Elektronen zur Absorption von UV- oder sogar sichtbarem Licht führen, bezeichnet man als Chromophore, unter denen Doppelbindungen neben aromatischen Ringen die wichtigste Position einnehmen. Atome oder Atomgruppen mit direkter Bindung an den Chromophor beeinflussen die Lage der Absorptionsbanden mehr oder weniger stark. So bewirken besonders Heteroatome (N, S, S, Cl) eine auxochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums in den längerwelligeren Spektralbereich. Dabei hat sich gezeigt, daß die Effekte von Nachbaratomen auf den Basis-Chromophor additiv sind und das restliche Molekülskelett die Position der Absorptionsbanden nicht beeinflusst. Bei Kenntnis der Inkrementen solcher Substituenten, das heißt des Betrags für $\Delta\lambda_{\max} > 0$, kann man die Konstitution des Chromophors einer unbekanntem Verbindung aus dem UV-Spektrum erschließen. Enthält ein Molekül mehrere, voneinander isolierte Chromophore, so setzt sich die Absorptionskurve additiv aus den Spektren der einzelnen Chromophore zusammen (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 312-315).

Zu analytischen Zwecken werden UV/VIS-Absorptionsspektren gewöhnlich in optisch reinen Lösungsmitteln bei $c \approx 10^{-n}$ M für $\varepsilon_{\max} = 10^n \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ aufgezeichnet, wobei der Spektralbereich von 180 nm bis 400 nm Küvetten aus Quarzglas erfordert. Die beste Durchlässigkeit bis in den Vakuum-UV-Bereich besitzen perfluorierte Alkane, gefolgt von *n*-Hexan und Wasser bis etwa 200 nm, Methanol bis etwa 210 nm und letztlich Di-/Trichlormethan bis etwa 240 nm (vgl. Hesse et al., 1995, S. 7 f.). Bei leichtflüchtigen Lösungsmitteln müssen die Küvetten für konstante Substanzkonzentrationen über die Dauer der Meßzeit verschlossen werden.

Neben der schon erwähnten Strukturbestimmung vor allem an ungesättigten Aliphaten, Aromaten sowie Carbonylverbindungen dient die UV-Spektroskopie zur Reinheitsanalyse, zur Konzentrationsbestimmung einzelner Komponenten in Mischungen und über Vergleichsspektren zur Substanzcharakterisierung (vgl. Geckeler und Eckstein, 1987, S. 351, 353, 356, 358).

7.3 Polarimetrie

Zu den chiroptischen Methoden, das heißt spektroskopischen Meßverfahren auf der Basis der Chiralität untersuchter Substanzen, gehört grundlegend die Bestimmung des optischen Drehwertes, kurz „Polarimetrie“ genannt. Monochromatisches Licht, üblicherweise die sogenannte gelbe D-Linie des Natriums bei 589 nm, dient nach linearer Polarisierung zur Messung des Drehwinkels α_{λ}^T , welcher ein positives Vorzeichen für rechtsdrehende (\rightarrow im Uhrzeigersinn bei Blick gegen den Polarisatorstrahl), ein negatives entsprechend für linksdrehende Verbindungen erhält. Linear polarisiertes Licht setzt sich zusammen aus zwei zirkular polarisierten Lichtstrahlen gleicher Amplitude, Frequenz und Geschwindigkeit, jedoch mit einander entgegengesetztem Drehsinn. Wird die Geschwindigkeit beziehungsweise der Brechungsindex einer der zwei Strahlen beispielsweise beim Durchqueren eines optisch aktiven Mediums verändert (\rightarrow zirkulare Doppelbrechung), so dreht sich resultierend die Schwingungsebene des linear polarisierten Austrittslichtes. Der interessierende Drehwinkel α_{λ}^T hängt sowohl von der Stereochemie der Substanz und deren Konzentration c_m in Lösung als auch von der Länge l des Polarimeterrohres, der Wellenlänge λ des monochromatischen Lichts, von der Temperatur T sowie vom Lösungsmittel ab. Bei reinen Flüssigkeiten, Lösungen und bei Dämpfen beruht die natürliche optische Aktivität auf der Chiralität des einzelnen Moleküls (vgl. Kapitel 3), während Kristalle (z. B. Quarz) häufig nur in Festform optische Drehung zeigen, manchmal aber auch gleichzeitig in Lösung (z. B. Campher) (vgl. Falbe und Regitz, 1991, S. 3125 f.). An Chiralitätszentren reicht prinzipiell der H/D-Isotopeneffekt für meßbare Drehwerte aus, obwohl chirale Verbindungen mit $\alpha_{\lambda}^T = 0^\circ$ existieren, wie Glycerolipide, bei denen sich die an C-1 und C-3 veresterten Fettsäuren nur um wenige Methylengruppen unterscheiden (vgl. Hesse et al., 1995, S. 23 f.). Den spezifischen Drehwert $[\alpha]_{\lambda}^T$ einer Substanz als charakteristische Stoffkonstante berechnet man nach folgender Gleichung:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha_{\lambda}^T}{lc_m}$$

Mit der Standardlänge des Polarimeterrohres von 1 dm und Angabe von c_m in g cm^{-3} , wodurch sich der häufig erscheinende Faktor 100 im Dividenten für c_m in $\text{g} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$

(= % (v/w)) erübrigt, lautet die korrekte Einheit für $[\alpha]_{\lambda}^T$: Grad $\text{cm}^3 \text{g}^{-1} \text{dm}^{-1}$. Gewarnt sei vor der auch in Publikationen weitverbreiteten Unsitte, abgesehen von der physikalisch schlichtweg falschen Einheit „Grad“ für $[\alpha]_{\lambda}^T$ die entsprechende Angabe ganz wegzulassen. Ersetzt man nämlich „1 dm“ im Divisor durch „10 cm“, so ergibt sich für die gekürzte Einheit „Grad $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ “ von $[\alpha]_{\lambda}^T$ ein im Verhältnis zur Ausgangseinheit um den Faktor 10 geringerer numerischer Wert, was dem Leser bei dimensionsloser Angabe aber verborgen bleibt (vgl. Roth et al., 1998, S. 179-181).

7.4 Eindimensionale Kernresonanz-Spektroskopie

7.4.1 Allgemeine Grundlagen

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) mit überragender Bedeutung für die Konstitutionsbestimmung wie Identifizierung von Verbindungen beruht auf magnetischen Eigenschaften bestimmter Atomkerne, liefert aber im Vergleich zur Röntgen-Kristallstrukturanalyse (vgl. Abschnitt 7.7) ein weniger exaktes Bild. Als Gründe hierfür ist vordergründig die Messung in Lösung bei Umgebungstemperatur anzuführen, was eine statistische Verteilung der molekularen Konformationseigenschaften bewirkt (vgl. Roth et al., 1998, S. 187 f.).

Nur Atomkerne mit ungerader Massenzahl (z. B. ^1H , ^{13}C) oder ungerader Ordnungszahl bei geradzahlgiger Atommasse (z. B. ^2H , ^{14}N) besitzen ein magnetisches Moment. Während ^1H sowie ^{19}F praktisch als Reinelemente vorliegen und sich damit einfach NMR-spektroskopisch vermessen lassen, kann die kernmagnetische Resonanz der anderen Kerne infolge ihres geringen natürlichen Vorkommens lediglich durch die Puls-Fourier-Transform-(PFT)-Technik anstelle der Continuous-Wave-(CW)-Methode erschlossen werden.

Das effektive Magnetfeld H , in dem sich die Kerne befinden, variiert von Position zu Position, da die zahlreichen Elektronen aufgrund ihrer Ladung und Bewegung ebenfalls Magnetfelder erzeugen, die das angelegte äußere Feld H_0 verringern oder vergrößern. Funktionelle Gruppen führen zu charakteristischen chemischen Verschiebungen mit herausragender Bedeutung für die Strukturaufklärung organischer Verbindungen. Die Stärke der Abschirmung wird durch die experimentell nicht faßbare Abschirmkon-

stante σ gemäß folgender Gleichung beschrieben, wobei man die Verschiebung der Resonanzlinien relativ zu einer Standardsubstanz als „chemische“ Verschiebung δ (in ppm) bezeichnet, deren Skala bei der ^1H -Resonanz rund 10 ppm, für die ^{13}C -Resonanz dagegen etwa 200 ppm umfaßt:

$$H = H_0 (1 - \sigma)$$

Sphärisch-symmetrische Bahnen von Elektronen um den Kern schirmen das äußere Magnetfeld ab, wodurch das Absorptionssignal ins Gebiet höherer Feldstärken und niedrigerer Frequenzen fällt (\rightarrow diamagnetische Abschirmung, Hochfeld-Verschiebung). Unsymmetrische Bahnen von Elektronen um den Kern, beispielsweise über elektronegative Nachbaratome, entschirmen hingegen das äußere Magnetfeld, wodurch die Absorption in einem Gebiet geringerer Feldstärken und höherer Frequenzen (\rightarrow paramagnetische Abschirmung, Tiefeld-Verschiebung) erfolgt. Bahnen von delokalisierten Elektronen in einem Molekül, beispielsweise in aromatischen Ringen oder Dreifachbindungen, führen zu einem Ringstromeffekt, so daß die Resonanzlinien von Kernen in der Ebene des π -Systems und außerhalb des Ringes tiefeldverschoben erscheinen, bei Stellung im Ring, darüber oder darunter jedoch hochfeldverschoben.

Alle durch ein gemeinsames Elektronensystem direkt miteinander verbundenen Kerne mit magnetischem Moment zeigen skalare Spin-Spin-Kopplung, das heißt, eine Gruppe von n äquivalenten Kernen bewirkt für die Nachbarkerne eine Aufspaltung in $n + 1$ Feinstrukturpeaks, deren Intensitäten sich wie die Zahlen im Pascalschen Dreieck verhalten. Völlige Symmetrie tritt nur bei großem Abstand zwischen den verschiedenen Multipletts auf, andernfalls wird deren Erscheinungsbild unsymmetrisch bei gegenseitiger Größenzunahme der Feinstrukturpeaks. Für die Art der Aufspaltung sind also stets die Nachbarkerne verantwortlich, wohingegen die chemische Verschiebung eines bestimmten Kerns von seiner eigenen Natur abhängt. Den Abstand der einzelnen Feinstrukturpeaks bezeichnet man als Kopplungskonstante J (in Hz), die - vom äußeren Magnetfeld unabhängig - leicht entscheiden läßt, ob zwei benachbarte Peaks aus der Aufspaltung eines einzelnen Signals hervorgegangen sind oder zwei nicht-äquivalenten Kernen entsprechen. Spin-Spin-Kopplung setzt verschiedene Kerne mit differenzierter chemischer Verschiebung voraus, so daß beispielsweise die untereinander äquivalenten Protonen von Methyl- und Methylengruppen keine Aufspaltung

zeigen, außer sie sind diastereotop (vgl. unten). Bei mehreren Einfachbindungen zwischen den Kernen nimmt J ab, für Doppel- oder Dreifachbindungen zu. Für zwei beziehungsweise drei vermittelnde Bindungen spricht man von geminaler (2J) beziehungsweise vicinaler (3J) Kopplung. Um Multipletts in komplizierten NMR-Spektren zu identifizieren, zieht man häufig die Technik der Doppelresonanz (Spin-Entkopplung) heran, das heißt, die Probe wird mit einer zweiten Radiofrequenz im Bereich der Absorption einer bestimmten Kernsorte bestrahlt, wodurch deren Kopplung mit den Signalen der Nachbarkerne verschwindet.

Nicht unmittelbar aneinander gebundene, aber räumlich benachbarte Kerne erfahren im Zuge von Doppelresonanz-Experimenten meßbare Intensitätsänderungen, bedingt durch den Nuclear Overhauser Effect (NOE). Da es sich hierbei um eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung mit indirekter Proportionalität zur sechsten Potenz des Abstandes handelt, hängt die Intensitätsänderung der Signale stark von der Entfernung entsprechender Kerne ab; für Protonen beispielsweise ist oberhalb von 300 pm kein Effekt mehr zu erwarten (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 322 f., 328, 330, 333, 336).

Bezüglich der Stereochemie unterscheidet man für zwei Gruppen eines Moleküls die Fälle „homotop“, „enantiotop“ und „diastereotop“ (vgl. Kapitel 3). Da enantiotope Gruppen durch Drehspiegelung (S_n) ineinander überführt werden, treten sie ausschließlich bei achiralen Molekülen auf. Chirale Verbindungen aber können diastereotope Gruppen und im Falle von Drehachsen (C_n) homotope Gruppen besitzen. Letztere sind chemisch äquivalent und ergeben pro Kernsorte stets nur ein einziges Signal. Enantiotope Gruppen führen im achiralen oder racemischen Medium zu isochronen Peaks, das heißt Signalen mit identischen δ -Werten; im chiralen Medium kann Anisochronie beobachtet werden. Diastereotope Gruppen sind chemisch nicht äquivalent und allenfalls zufällig isochron (vgl. Hesse et al., 1995, S. 73, 75, 89).

In den meisten NMR-Spektrometern wird das statische Magnetfeld durch spezielle Spulen verändert und die Radiofrequenz auf einen festen Wert eingestellt. Die in spezielle Meßröhrchen abgefüllte Probe versetzt man in Rotation (30-50 rpm), um entstehende Feldgradienten sowie dadurch bedingte Linienverbreiterungen auszumitteln. Vor Meßbeginn muß die Lösung von Schwebeteilchen befreit sein und in speziellen Fällen (z. B. Relaxationsmessungen) entgast werden, da Sauerstoff wie andere paramagnetische Substanzen eine Bandenverbreiterung bewirkt (vgl. Geckeler und Eckstein, 1987, S. 372-374, 376 f., 381-383).

7.4.2 ^1H -NMR-Spektren

Das Proton stellt für die Strukturaufklärung aufgrund seiner großen natürlichen Häufigkeit (99,985 %) und seines hohen magnetischen Moments mit Abstand die wichtigste Kernsorte dar. Für analytische Zwecke bereitet man eine konzentrierte, aber nicht viskose Lösung der Probensubstanz in einem protonenfreien, deuterierten Solvens, üblicherweise CDCl_3 . Im Falle von Signalüberlagerung wird das Lösungsmittel und damit dessen Einfluß auf die chemische Verschiebung variiert. So bietet sich als Alternative besonders C_6D_6 mit seiner hohen magnetischen Anisotropie an.

Zur Referenzierung beziehungsweise Festlegung des Nullpunkts dient Tetramethylsilan (TMS), welches mit seinen zwölf äquivalenten Protonen infolge der geringen Elektronegativität von Si im starken Hochfeld absorbiert. Bequemer, aber dafür ungenauer gestaltet sich die Verwendung der Restsignale von undeuterierten Lösungsmittelspuren (z. B. CHCl_3) als Bezugspunkt. Je nach Anforderung an die spektrale Dispersion und das Signal-Rausch-Verhältnis kommen NMR-Spektrometer mit 300, 500 oder gar 750 MHz zum Einsatz, wobei Multipletts durch ein stärkeres Feld nicht besser aufgelöst werden können, sondern vielmehr in der Linienbreite stark zunehmen. Für Probenkonzentrationen von unterhalb 40 mg mL^{-1} zieht man heutzutage die PFT-Technik (vgl. Abschnitt 7.4.1) heran, mit deren Hilfe ^1H -NMR-Spektren für $\leq 1 \text{ mg}$ Substanz erhältlich sind. Bei Verwendung von Mikrozellen mit etwa $100 \mu\text{L}$ Volumen und speziellen Meßköpfen für ein möglichst hohes Feld H_0 - in der Praxis wächst die Empfindlichkeit proportional zu $H_0^{3/2}$ - lassen sich Mengen im Mikrogramm-Bereich routinemäßig, im Nanogramm-Bereich mittels Langzeitaufnahmen messen.

Die Fläche unter einem ^1H -NMR-Signal ist direkt proportional zur Anzahl absorbierender Protonen und ermöglicht somit die Bestimmung der relativen Zahl von Kernen bei Reinsubstanzen sowie der relativen Mengen von Molekülen einer Mischung. Im Verlauf der Integration kann der kleinstdurchführbare Schritt von nicht weniger als einem Proton herrühren; die Summe aller Schritte ergibt somit die gesamte Protonenzahl (vgl. Geckeler und Eckstein, 1987, S. 380).

Als quantitatives Maß für ^1H - ^1H -Kopplungen dient die Kopplungskonstante nJ (vgl. Abschnitt 7.4.1), wobei n die Anzahl der Bindungen bezeichnet. Im Fall von starren Gerüsten (z. B. Ringen) hängt J auch vom Torsionswinkel (Diederwinkel) zwischen den Spin-Spin-gekoppelten Protonen ab und erlaubt damit Rückschlüsse auf die geome-

trische Anordnung. Bei Raumtemperatur erfolgt die Rotation um Einfachbindungen zwar so schnell, daß das NMR-Spektrum nur die durchschnittliche, zeitlich gemittelte Lage der Protonen erfaßt, während tiefere Temperaturen die Unterscheidung einzelner Konformere gestatten (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 51, 322, 333, 343). Die Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstante 3J vom Diederwinkel kann man der sogenannten Karplus-Kurve entnehmen. Zur Beobachtung der Kopplung von OH-Protonen mit vicinalen CH-Protonen werden hochreine, wasser- und säurefreie Alkohole benötigt, wie bevorzugt [D6]-DMSO mit hinreichend langsamem Protonenaustausch bei Raumtemperatur.

Gezielte Deuterierungen, das heißt der Austausch acider Protonen gegen Deuteronen beim Schütteln mit D_2O , vereinfachen die Interpretation von 1H -NMR-Spektren wesentlich. Generell ist bei der Zuordnung von X-H-Signalen (X = N, O oder S) deren starke Abhängigkeit von Probenkonzentration, Meßtemperatur und Lösungsmittel zu berücksichtigen.

Die Verwendung von chiralen Lösungsmitteln wie (1*R*)- oder (1*S*)-2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol liefert in günstigen Fällen durch Ausbildung diastereomerer Solvatationskomplexe Hinweise auf die absolute Konfiguration. Grundsätzlich können auch enantiotopie Protonen eines achiralen Moleküls in diesem Fall anisochron werden, während homotope Protonen stets chemisch äquivalent sind (vgl. Abschnitt 7.4.1) (vgl. Hesse et al., 1995, S. 100-102, 106, 108 f., 121, 126 f.). Mißt man die 1H -Resonanzsignale eines Alkohols oder Amins jeweils nach Veresterung mit (+)-(2*R*)- und (-)-(2*S*)- α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylethansäure (Moshers Reagenz) - meist in Form der Säurechloride eingesetzt -, so erlauben die Differenzen $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ aller 1H -Verschiebungen Aussagen über die absolute Konfiguration am betrachteten Atom.

7.4.3 ^{13}C -NMR-Spektren

Die geringe Häufigkeit (1,100 %) des Nuklids ^{13}C bedingt, daß die Kopplung zweier benachbarter ^{13}C -Kerne in der Routine- ^{13}C -NMR-Spektroskopie nicht sichtbar ist, sondern nur bei entsprechend angereicherten Verbindungen oder mittels der INADEQUATE-Technik auftritt (vgl. Abschnitt 7.5.1).

Als Faustregel für ^{13}C -Messungen mit der PFT-Methode (vgl. Abschnitt 7.4.1) gilt, daß pro erwartetes ^{13}C -Signal mindestens 5 mg der Verbindung in 1 mL Lösungsvolu-

men vorhanden sein sollten, wobei CDCl_3 das gebräuchlichste Lösungsmittel darstellt. Dabei dient die entsprechende Deuterium-Resonanz als „Locksignal“ zur Stabilisierung des Feldstärke-Frequenz-Verhältnisses im Spektrometer. Für die Referenzierung zieht man die ^{13}C -Signale des Lösungsmittels mit bekannter chemischer Verschiebung heran.

Bei Messung der ^{13}C -Resonanzsignale einer organischen Verbindung macht sich in der Regel eine Spin-Spin-Kopplung mit ^1H -Kernen bemerkbar, wodurch die Signalintensitäten auf mehrere Linien verteilt erscheinen, was in ^1H -NMR-Spektren jedoch durch den geringen ^{13}C -Gehalt kaum in Erscheinung tritt. Diesen Nachteil bei der Aufnahme von ^{13}C -NMR-Spektren umgeht man mit der heteronuklearen ^1H -Breitband-Entkopplung, so daß jedes einzelne C-Atom für die exakte Bestimmung als scharfes Singulett erscheint und sich ^{13}C - mit ^1H -NMR-Spektren zur Konstitutionsaufklärung in idealer Weise ergänzen (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 346, 348). Bezüglich des Zeitbedarfs für die Spektren-Aufnahme muß berücksichtigt werden, daß sich das Signal-Rausch-Verhältnis mit der Quadratwurzel aus der Anzahl akkumulierter Überläufe verbessert.

Ganz entscheidend hängt die chemische Verschiebung eines ^{13}C -Kerns von dessen Hybridisierung ab, wobei die Absorption von sp^3 über sp zu sp^2 ins Tieffeld wandert. Dies entspricht der ^1H -Resonanz von gesättigten, acetylenischen und olefinischen Protonen. Der Ringstromeffekt spielt für aromatische C-Atome im ^{13}C -NMR-Spektrum keine Rolle.

Im Gegensatz zu ^1H -NMR-Spektren sind die entsprechenden ^{13}C -Signale nicht direkt integrierbar, da sich die Intensität eines Signals proportional zum effektiven Besetzungsunterschied der beteiligten Energiezustände verhält und damit entscheidend von den Relaxationszeiten abhängt. Diesem Problem kann mit der Verwendung von paramagnetischen Relaxationsreagenzien wie Chrom- und Eisenacetylacetonaten zu etwa 0,05-molaren Lösungen abgeholfen werden, welche einen neuen, dominierenden Relaxationsprozeß einleiten, Kern-Overhauser-Effekte weitgehend ausschalten und sich nach der Messung problemlos mittels Adsorption an Aluminiumoxid oder Kieselgel abtrennen lassen. Als weitere Möglichkeit kommt das ^{13}C -Inverse-Gated-Decoupling-Verfahren zur Sprache, in dessen Verlauf der ^1H -Breitband-Entkoppler nur für die Dauer von Beobachtungspuls und Datenaufnahme eingeschaltet bleibt, so daß die $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Kopplung aufgehoben wird, sich in der kurzen Zeit kein NOE (vgl. Abschnitt 7.4.1) auf-

bauen kann und die Intensitäten der ^{13}C -Resonanzsignale somit nicht verfälscht werden (vgl. Friebolin, 1999, S. 135 f.).

Das DEPT-(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)-Verfahren liefert die infolge der ^1H -Breitbandentkopplung verlorengegangenen Informationen über die Multiplizität der C-Atome im ^{13}C -NMR-Spektrum und gehört deshalb für den Praktiker zu den wichtigsten Spezialmethoden. Konkret genügen im Routinebetrieb Aufnahmen von Teilspektren mit den Impulswinkeln 90° und 135° zur Selektion von Signalen gemäß deren Multiplizität. Zusätzlich führt der über $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungen verlaufende Polarisationstransfer zur Verstärkung der Übergänge am wenig sensitiven ^{13}C -Kern. Die CH-Gruppen erscheinen dabei als Signale positiver Amplitude im DEPT-(90)-Teilspektrum, während man aus dem DEPT-(135)-Teilspektrum positive Signale für CH- wie CH_3 -Gruppen erhält, negative hingegen für CH_2 -Gruppen. Ein Vergleich ermöglicht somit die gewünschte Signalzuordnung für Methyl-, Methylen- und Methin-C-Atome. Dagegen zeigen quartäre Kohlenstoffatome in DEPT-Spektren üblicherweise keine Resonanzabsorption, können aber, falls $^1J(\text{C,H})$ sehr stark vom Standardwert (120-160 Hz) abweicht, als CH- oder CH_2 -Gruppe im DEPT-(135)-Spektrum fehlinterpretiert werden (vgl. Friebolin, 1999, S. 219, 223; Hesse et al., 1995, S. 142-144, 145 f., 154, 169, 172, 174).

7.5 Zweidimensionale Kernresonanz-Spektroskopie

7.5.1 Allgemeine Grundlagen

Mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Experimente, welche zwei Fourier-Transformationen in je einer Zeitdimension beinhalten, lassen sich chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten sowie unterschiedliche chemische Verschiebungen von Kernen derselben Art ($^1\text{H} \dots ^1\text{H}$; $^{13}\text{C} \dots ^{13}\text{C}$: homonuklear) oder verschiedener Sorten ($^1\text{H} \dots ^{13}\text{C}$: heteronuklear) auf zwei orthogonalen Achsen und damit überlappungsfrei darstellen. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwischen J-aufgelösten 2D-Spektren, für die Kopplungskonstanten gegen chemische Verschiebungen aufgetragen werden, und korrelierten 2D-Spektren mit chemischen Verschiebungen auf beiden Achsen (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 348; Hesse et al., 1995, S. 136).

7.5.2 Homonukleare Korrelation

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-(Correlated Spectroscopy)-Spektren bilden heutzutage eine wesentliche Grundlage für die Strukturaufklärung organischer Verbindungen, da sie innerhalb weniger Minuten wertvolle Informationen über skalar miteinander koppelnde Protonen liefern, wobei zunächst die dem Betrag nach großen geminalen und vicinalen Wechselwirkungen erfaßt werden (vgl. Abschnitt 7.4.1) (vgl. Hesse et al., 1995, S. 137). Im Gegensatz zum $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY-Experiment (vgl. unten) beobachtet man nur Korrelationen zwischen denjenigen Kernen, die im eindimensionalen ^1H -Spektrum eine aufgelöste Kopplung zeigen. Bei der meßtechnischen Modifikation des DQF-(Double Quantum Filtered)- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experimentes erscheinen nahezu alle Peaks in Absorption statt in Dispersion, was zu schärferen Kreuzsignalen führt.

Das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY-(Total Correlation Spectroscopy)-Experiment liefert - mit δ -(^1H)-Werten auf beiden Frequenzachsen - über selektives Anregen eines einzelnen Protons die Signallagen weiterer Protonen eines gemeinsamen Spinsystems. Da durch Variieren der Spin-Lock-Zeit die Reichweite der Wechselwirkungen beeinflussbar ist, zeigen sich für eine kurze Mischzeit von 15 ms ausschließlich Kreuzpeaks zwischen geminal und vicinal koppelnden Protonen (vgl. $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY), während bei 100 ms alle Protonen des Spinsystems erscheinen. Dies spielt eine große Rolle bei der Interpretation von NMR-Spektren für Oligosaccharide und Peptide, Substanzklassen mit vielen überlagerten Multipletts. So erkennt man bei Peptiden beispielsweise, welche Protonen zu den individuellen Aminosäuren gehören (vgl. Friebolin, 1999, S. 225, 273 f.).

Im Gegensatz zu $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY und verwandten Methoden, bei denen die Signalkorrelation auf der Konnektivität über Bindungen beruht, nutzt man bei NOESY-(Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy)- und ROESY-(Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)-Aufnahmen den Kern-Overhauser-Effekt (NOE) (vgl. Abschnitt 7.4.1), das heißt die Konnektivität durch den Raum. Kreuzsignale im 2D-Spektrum zeigen dann die räumliche Nachbarschaft von Kernen an, was sich als besonders wertvoll zur Ermittlung von Molekülkonformationen in Lösung erweist. Grundsätzlich gilt, daß bei NOESY-Experimenten der NOE für kleine Moleküle positiv und für große Moleküle negativ ausfällt, während mittelgroße Moleküle im Bereich des Vorzeichenwechsels nur einen geringen oder gar keinen NOE aufweisen. Zudem sind die Signalphasen der Kreuzpeaks abhängig vom Vorzeichen des

NOE. Das Problem des Nulldurchgangs wird elegant beim schon erwähnten ROESY-Experiment umgangen, dessen Kreuzpeaks ebenfalls auf Orbital-Wechselwirkungen der ^1H -Kerne für Abstände von < 500 pm beruhen (vgl. Hesse et al., 1995, S. 141).

^{13}C - ^{13}C -Kopplungen ermöglichen die Konstruktion des vorliegenden C-Skeletts einer unbekanntem Verbindung, lassen sich aber aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit von etwa 0,01 %, eine Molekülsorte mit zwei anisochronen ^{13}C -Kernen anzutreffen, - vor allem bei kleinen Kopplungskonstanten - nur als Hauptsignal mit intensitätsschwachen Satelliten betrachten (vgl. Abschnitt 7.4.3). Die INADEQUATE- (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment)-Technik bietet diesbezüglich die Möglichkeit, das Hauptsignal zu unterdrücken und mittels einer speziellen Pulssequenz Doppelquanten-Übergänge anzuregen. Zur Übersicht beziehungsweise getrennten Darstellung der Spinsysteme benachbarter ^{13}C -Kerne empfiehlt sich das zweidimensionale INADEQUATE-Spektrum, bei dem die δ -Werte der gemessenen C-Kerne auf der F_2 -Achse und die Doppelquantenfrequenzen auf der F_1 -Achse erscheinen (vgl. Hesse et al., 1995, S. 179 f.). Durch Zugabe von Chrom(III)-acetylacetonat auf eine Endkonzentration in der Probenlösung von etwa 5 mM kann die Relaxationszeit um den Faktor 20 verkürzt, die Pulsrate entsprechend erhöht werden, was insgesamt gesehen die Meßzeit stark verringert. Große Probleme verursacht mitunter die benötigte Probenkonzentration im Bereich von etwa 0,4 M, was für isolierte Naturstoffe mit hohem Molekulargewicht mangels ausreichender Verfügbarkeit häufig nicht zu erzielen ist.

7.5.3 Heteronukleare Korrelation

Kopplungen zwischen verschiedenartigen Kernen mit magnetischem Moment machen sich in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren durch zusätzliche Aufspaltungen bemerkbar. Zu den wichtigsten zweidimensionalen, korrelierten NMR-Experimenten, welche auf der Existenz der skalaren Heterokopplungen beruhen, gehören die $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-(Heteronuclear Single Quantum Coherence)- sowie die $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-(Heteronuclear Multiple Bond Correlation)-Technik.

Beim $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Verfahren werden in der Präparationsphase die empfindlichen ^1H -Kerne angeregt und deren Resonanzsignale während der Detektionszeit t_2 aufgenommen. Die entstehenden NMR-Spektren zeigen auf der F_1 -Achse die δ -Werte für die

Protonen, auf der F_2 -Achse diejenigen für die ^{13}C -Kerne, das heißt also die Korrelationen zwischen direkt gebundenen Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen. Der große Nachteil dieses Verfahrens liegt in der hohen Störanfälligkeit gegenüber kleinen Abweichungen von den exakt einzustellenden 90° - wie 180° -Impulswinkeln (vgl. Friebolin, 1999, S. 106, 108, 265).

Diesbezüglich weniger problematisch verhält sich die erwähnte $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-Methode, bei der die unerwünschten Hauptsignale, konkret die Resonanzsignale derjenigen Protonen, welche an ^{12}C -Kerne gebunden sind, durch Phasenzyklen unterdrückt werden. Wiederum erscheinen die Verschiebungen von ^1H - beziehungsweise ^{13}C -Kernen auf der F_2 - beziehungsweise F_1 -Frequenzachse gegeneinander aufgetragen, wobei im Unterschied zum $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Verfahren $^2J(\text{C,H})$ - und $^3J(\text{C,H})$ -Kopplungen auftreten, deren Ausmaß über die Intensität der Kreuzpeaks entscheidet. Das Spinsystem bestimmt jeweils, welchem dieser beiden Kopplungen die größere Konstante zukommt. Außerdem hängt der Betrag für $^3J(\text{C,H})$ analog zu $^3J(\text{H,H})$ vom Diederwinkel innerhalb des Molekülgerüsts ab (vgl. Abschnitt 7.4.2) (vgl. Friebolin, 1999, 265).

7.6 Massenspektrometrie

Die Fragmentierung organischer Moleküle bei der Massenspektrometrie erfolgt durch Beschuß mit energiereichen Elektronen (≥ 70 eV) unter anschließender Fokussierung der gebildeten Ionen mittels elektrischen und magnetischen Feldern, so daß Teilchen mit einheitlichem Masse/Ladungs-Verhältnis m/z an derselben Stelle des Detektors auftreten. Aus den organischen Molekülen entstehen zunächst Radikationen, die sich umlagern oder häufig unter Bildung stabilerer Partikel (z. B. Carbeniumionen) zerfallen, welche dann - ausreichende Lebensdauer vorausgesetzt - als Molekülionen-Peak registriert werden. Im Falle der Ladung 1, was meist zutrifft, kann man m/z gleich der Ionenmasse setzen. Radikale werden nicht erfaßt; ihre Existenz ergibt sich aber aus der Subtraktion der Massenzahlen verschiedener Peaks. Um intramolekulare Fragmentierungen gegenüber intermolekularen Reaktionen zu begünstigen, findet die Massenspektrometrie im Hochvakuum statt, wobei prinzipiell zwischen zwei Arten von Einführungssystemen zu unterscheiden ist: Direkt-Einlaß (D)³ neben Gas-Einlaß. Mit

³ Präfix vor der Abkürzung für die Ionisierungsmethode (z. B. DEI)

konstanter Halbwertsbreite der Peaks im Laufe der Aufzeichnung bestehen Massenspektren selbst aus Linienspektren positiver Ionen, deren relative Intensitäten gegen die m/z -Werte aufgetragen werden, unter Zuordnung der relativen Intensität von 100 % für den größten Peak. Der minimale Probenbedarf für die Massenspektrometrie liegt im Mikrogramm-, die Erfassungsgrenze bei Kopplung an Gaschromatographen im Nanogramm- bis Pikogramm-Bereich.

Da die meisten Elemente in organischen Verbindungen als Isotopengemische vorliegen - nur ^{19}F , ^{31}P und ^{127}I sind isotopenrein -, ergibt das Molekülion nie ein einziges Signal im Massenspektrum, wodurch in vielen Fällen neben der Molekülmassenbestimmung auch eine Elementaranalyse möglich ist, vor allem über hochauflösende Verfahren. In diesem Zusammenhang ist zu unterscheiden zwischen dem relativen Molekulargewicht M_R , gemittelt aus dem Gewicht der natürlich vorkommenden Isotope und ihren Häufigkeiten, und dem exakten Molekulargewicht M_E , welches nur das häufigste Isotop berücksichtigt. Tritt keine Umlagerung ein, so ergeben Moleküle mit geradzahlgiger Masse Fragmentationen mit ungeradzahlgem m/z , bei Umlagerung folgen hingegen geradzahlige Fragmentationen Molekülen mit ungeradzahlgiger Masse. Um 1 verringerte Massenzahlen sprechen für die fragmentierungsbedingte Verschiebung eines H-Atoms. Nach der „Stickstoffregel“ ist die Molmasse des Molekülions geradzahlgig, wenn die Substanz keine N-Atome oder dieselben in gerader Anzahl enthält. Eine ungerade Anzahl von Stickstoffatomen bedingt hingegen eine ungerade Anzahl von Masseneinheiten in der Molekülmasse (vgl. Geckeler und Eckstein, 1987, S. 397-399, 403 f., 406). Grundsätzlich muß beachtet werden, daß die Fragmentierung einer Verbindung nicht allein von bestimmten funktionellen Gruppen, sondern vielmehr von der gesamten Molekülkonstitution gesteuert wird (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 350, 352, 356). Auch die chemischen Reaktionen im Massenspektrometer stehen unter stereochemischen Einflüssen (vgl. Kapitel 3), insbesondere bei ungesättigten und cyclischen Isomeren. So erlauben beispielsweise Massenspektren des Antiarrhythmikums Spartein und seiner Metaboliten Aussagen zur vorliegenden Ringgeometrie (vgl. Roth et al., 1998, S. 191 f.).

In jedem Fall muß die Probe vor der massenspektrometrischen Auftrennung ionisiert vorliegen, wobei die Thermolabilität vor allem vieler organischer Verbindungen dem klassischen Verfahren der Elektronenstoß-Ionisation (EI) Grenzen setzt. Dabei werden über beschleunigte Elektronen Ionen vom Typ M^{+} sowie Fragment-Ionen mit

Strukturinformation bei weitgehend korrekten Intensitäten der Isotopensignale und ohne Zusatzsignale im M_R -Bereich bis ca. 3 500 erzeugt, während Substanzen mit mehreren polaren Gruppen infolge Pyrolyse beim Verdampfen nicht meßbar sind. Darüber hinaus zeigen verschiedene Verbindungsklassen unter EI-Bedingungen kein oder ein zu intensitätsschwaches Molekülion.

Beim Verfahren der Chemischen Ionisation (CI) wird primär ein Reaktandgas (z. B. Edelgase, Kohlenwasserstoffe, NH_3) ionisiert, welches dann im M_R -Bereich bis etwa 3 500 für NH_4^+ zu den Ionen-Typen $[M + \text{H}]^+$, $[M + \text{NH}_4]^+$ neben M^{++} mit Reaktandgas-Clustern als möglichen Zusatzsignalen führt. Die Fragmentierung wird unterdrückt, dafür erscheinen aber intensivere Ionen im M -Bereich ohne korrekte Intensitäten der Isotopensignale. Sehr polare Substanzen können wiederum nicht erfaßt werden.

Für schwer oder nicht verdampfbare Proben bietet sich unter anderem das sogenannte Fast-Atom Bombardement (FAB) als geeignete Methode an, gekennzeichnet durch den Beschuß interessierender Substanzen mit neutralen Atomen (z. B. Ar) hoher kinetischer Energie in einer Glycerin- oder 3-Nitrobenzylalkohol-Matrix. Der Zusatz von NaCl oder KCl erleichtert über entstehende Alkalimetallionen die Bestimmung des relativen Molekulargewichtes für unbekannte Verbindungen. Im M_R -Bereich bis ca. 3 500 treten dabei Ionen vom Typ $[M + \text{H}]^+$ und $[M + \text{Na}]^+$ neben Clustern wie $[2 M + \text{H}]^+$ auf, wobei thermische Zersetzung im Gegensatz zu EI und CI sehr selten vorkommt. Mittels FAB lassen sich auch polare Substanzen messen, welche jedoch in der Matrix gut löslich sein müssen. Fragmentationen werden kaum beobachtet.

Grundsätzlich besitzt jede Ionisierungsmethode ihre speziellen Eigenschaften bezüglich Geschwindigkeit, Probenmenge, Selektivität und Vorbereitung. Dabei nimmt die Elektronenstoß-Ionisation immer noch erstrangige Bedeutung ein (vgl. Hesse et al., 1995, S. 219-221, 258 f., 263-265).

7.7 Röntgen-Kristallstrukturanalyse

Diffraction von Röntgenstrahlung der technisch üblichen Wellenlänge von 1,542 Å gestattet eine Aussage über die relative räumliche Position der Atome eines Moleküls und eignet sich damit zur direkten Beobachtung von Strukturen. Die Wechselwirkung erfolgt auf der Ebene der Elektronen eines Objektes, so daß sich die Streuungsintensität

proportional zur Ordnungszahl verhält und für meßbare Effekte möglichst viele Strukturelemente in gleichmäßiger Orientierung vorliegen müssen, was am einfachsten in Kristallen verwirklicht wird. Als Grundeinheit eines Kristalls gilt dabei seine Elementarzelle, welche auch mehrere Moleküle enthalten kann und woraus bei wiederholter Translation in allen drei Raumrichtungen das charakteristische Kristallgitter entsteht. Kristallographisch symmetrisch heißt die Elementarzelle dann, wenn die Symmetrieachsen mehrerer Moleküle, die auch die Elementarzelle definieren, zusammenfallen.

Die Kristallqualität stellt eine unabdingbare Voraussetzung für jede Röntgenstrukturanalyse dar. So ergeben zu kleine Einzelkristalle nur schwache Streu-Reflex-Intensitäten, zu große hingegen verursachen Meßfehler infolge von Absorption. Eine erfolgreiche Kristallzüchtung setzt dabei viel Erfahrung und Geschick voraus, wobei grundsätzlich das langsame Abkühlen einer übersättigten Lösung über den Bereich des besten Kristallwachstums hinweg in die Zone der besten Keimbildung führt. Deshalb liefert eine leichte Temperaturerhöhung und anschließende Temperaturkonstanz nach Auftreten der ersten Kristalle im allgemeinen die besten Resultate.

Schwierigkeiten bei der Berechnung der Elektronendichten folgen daraus, daß Röntgenstrahlung nicht fokussierbar ist und somit die Intensitäten der Röntgenreflexe nur die Beträge (Quadrate) der Strukturamplituden liefern, nicht aber die Phasen der der jeweiligen Struktur zugrundeliegenden Sinusfunktionen. Man spricht in diesem Zusammenhang vom Phasenproblem der Kristallographie. Diesbezüglich kann mit der üblichen Röntgenstrukturanalyse nur die relative Konfiguration chiraler Verbindungen erschlossen werden; absolute Konfigurationen ergeben sich lediglich indirekt durch Vergleich mit einem weiteren asymmetrischen Strukturelement bekannter absoluter Orientierung (vgl. Kapitel 3). Grundsätzlich erleichtert die Anwesenheit von Atomen höherer Ordnungszahl wie K, Br, Rb, I in der Elementarzelle wesentlich die Strukturbestimmung, da schon ein einziges Schweratom die Vorzeichen der Strukturamplituden überwiegend beeinflussen kann. Als Faustregel für die von West entwickelte „Schweratom-Methode“ gilt, daß bei einer Anzahl von 20-30 C- oder ähnlich schweren Atomen (N, O) pro Molekül ein Br- oder vier Cl-Atome vorhanden beziehungsweise eingeführt werden sollen, während ein I-Atom für etwa 40 C-Atome ausreicht (vgl. Christen und Vögtle, 1994, S. 88, 96 f., 101, 103, 106, 108).

Die auf dem Prinzip der anormalen Röntgenbeugung beruhende Bijvoet-Methode zählt auch heute noch zu den sichersten Verfahren für die Festlegung der - vor allem in der Pharmazeutischen Chemie höchst relevanten - absoluten Konfiguration einer Substanz (vgl. Kapitel 3). Dabei wählt man die Wellenlänge der Röntgenstrahlung etwas kürzer als die Absorptionskante eines Elementes im untersuchten Einkristall, so daß die inneren Elektronen von Schweratomen durch Resonanz ihrer natürlichen Oszillation mit der über die Röntgenenergie induzierten Vibration eine Anomalie erzeugen. Wurde zuvor die Position der Schweratome mit Hilfe des Standardverfahrens zur Röntgenstrukturanalyse fixiert (vgl. S. 56), erlauben die durch Resonanzeffekte verursachten minimalen Änderungen der Streuungsintensitäten einen Rückschluß auf die Phase und damit auf die tatsächlichen räumlichen Verhältnisse im Molekül (vgl. Roth et al., 1998, S. 186 f.) .

8 Pharmakologische Aktivitätsprüfung

8.1 Bakterien und Pilze

Bei der Chemotherapie von Infektionskrankheiten differenziert man grundsätzlich zwischen anthelminthischen, antibakteriellen, antimykotischen, antiprotozoären, antiviralen und antineoplastischen Wirkstoffen. Antiinfektiöse Chemotherapeutika sollen dabei die pathogenen Organismen schädigen, nicht aber den Wirt. Im Falle der Erregerhemmung spricht man von Bakterio-, Fungi- oder Virustase, bei abtötendem Effekt dagegen von Bakteri-, Fungi- oder Viruzidie. Gegen Bakterien- wie Pilzinfektionen kommen in der Regel Antibiotika zum Einsatz, das heißt niedermolekulare Sekundärmetabolite von Mikroorganismen oder deren halbsynthetische Derivate. Die steigende Anzahl teilweise sogar multiresistenter Keime (z. B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*) infolge hohem chemotherapeutischem Selektionsdruck - vor allem in Krankenhäusern - verstärkt im Zusammenspiel mit neuartigen Indikationen (z. B. *Helicobacter pylori* bei Magengeschwüren, *Chlamydia pneumoniae* bei Atherosklerose) den drin-

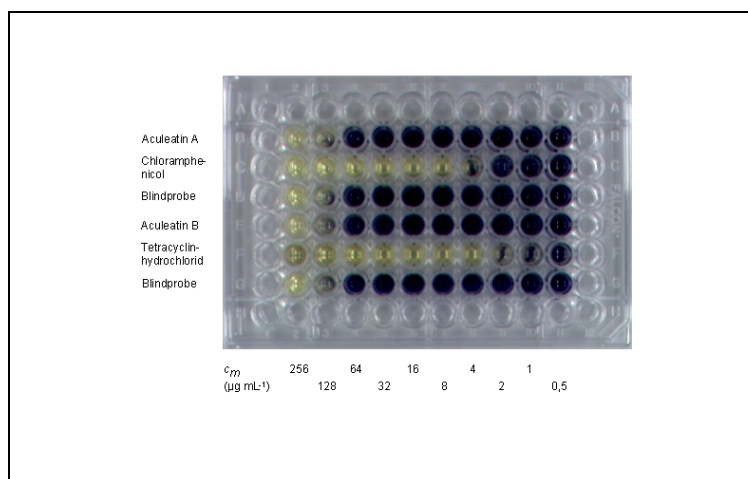
genden Bedarf an besser wirksamen Präparaten. Bis Anfang 1996 wurden rund 9 000 Antibiotika mikrobiellen Ursprungs neben weiteren 4 000 antibiotisch wirkenden Substanzen aus Tieren, Pflanzen, Algen, Flechten und marinen Organismen beschrieben, so daß der Naturstoffchemie beziehungsweise der Pharmazeutischen Biologie - wie auch in Teil I ausführlich dargestellt - zweifellos eine bedeutende Schlüsselrolle bei der Auffindung neuartiger Leitstrukturen zukommt (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 46; Pühler et al., 1999, S. 91).

Zur gezielten Identifizierung derartiger Wirkstoffe bedient man sich zuverlässiger und leistungsfähiger Screening-Techniken. Rohextrakte oftmals komplizierter Zusammensetzung müssen dabei im Vorfeld möglichst effektiv separiert werden, am besten mittels analytischer 2D-Dünnschichtchromatographie (vgl. Abschnitt 6.1). Die interessierende Aktivität kann man anschließend durch die sogenannte TLC-Bioautographie-Overlay-Technik ebenso rasch wie effizient detektieren und im Verlauf der weiteren Isolierung qualitativ verfolgen. Für diese Methode wird eines der beiden parallel unter gleichen Bedingungen entwickelten TL-Chromatogramme mit Agar, welcher den jeweiligen Keim in Suspension enthält, direkt überschichtet. Nach Bebrüten entstandene Hemmzonen zeigen über das Vergleichschromatogramm die Position aktiver Substanzen an, wobei der Keimrasen zur besseren Visualisierung mit der Lösung eines Tetrazoliumsalzes besprüht wird. Infolge ausbleibender Metabolisierung durch mikrobielle Dehydrogenasen erscheinen eventuelle Hemmzonen hell auf farbigem Hintergrund, wobei die dickeren Zellwände von Pilzen längere Inkubationszeiten bedingen. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz ist bei entsprechenden Stämmen das unwirksame Antibiotikum dem Nährmedium zuzusetzen (vgl. Cannell, 1998, S. 233, 240 f.).

Zur Prüfung von Unterfraktionen mit nur noch wenigen Komponenten kommen weitere Spezialverfahren in Frage, welche einschließlich der beschriebenen TLC-Overlay-Technik dem Prinzip des „Agardiffusionstests“ beigezählt werden können. Idealerweise überschichtet man dabei eine vorhandene Agarschicht mit einer zweiten Lage von genau definiertem und gut verteiltem Inokulum (→ Zwei-Schichten-Agar), was ein exakteres Ablesen der Hemmzonen gestattet. Die Substanzlösung kann dann entweder in Form getränkter Filterpapierscheibchen auf den Agar gelegt (→ Blättchentest) oder in zuvor ausgestanzte Löcher gefüllt werden (→ Lochplattentest). Beim Zylindertest schließlich liegt die Probenlösung in Zylindern aus inertem Material vor, welche dem Agar dicht aufsitzen, oder die Zylinder enthalten lebende, von anderen Plattenkulturen

ausgestanzte Mikroorganismen. Naturgemäß variieren die abzulesenden Hemmhofdurchmesser sehr stark in Abhängigkeit von der Hydrophilie und den Diffusionseigenschaften der Testkomponenten, so daß quantitative Auswertungen eines internen Standards bedürfen (vgl. Süßmuth et al., 1999, S. 173, 182-185).

Für quantitative Messungen - vor allem von Reinsubstanzen - zieht man daher besser den Verdünnungstest heran, wobei der jeweilige Keim als Suspension in Flüssigmedium der interessierenden Komponente in abgestuften Konzentrationen (Verdünnungsfaktor: meist 0,5) ausge-



setzt wird. Die niedrigste Konzentration, welche das Anwachsen des Inokulums innerhalb von (18 ± 2) h verhindert, heißt minimale inhibitorische Konzentration (MIC), während man bei $< 0,1$ % vermehrungsfähigem Inokulum von minimaler bakterizider Konzentration

Abb. 8-1. MIC-Test für Aculeatin A und B an *E. coli*.

(MBC) spricht (vgl. Süßmuth et al., 1999, S. 179). Eine Reduktion des Inokulums im selben Zeitraum um 50 % kennzeichnet die inhibitorische Konzentration (IC_{50}). Für die in der vorliegenden Arbeit zur Diskussion stehende MIC und IC_{50} , wobei erstere standardisiert zur Wirkprüfung von Antibiotika dient, erfolgen alle Messungen in Mikrotiterplatten mit metabolischer Visualisierung über ein Tetrazoliumsalz (s. Abb. 8-1).

An Gram-positiven Testbakterien - allesamt Wildtypen - kamen dabei die sensitiven, wenig pathogenen Indikatorstämme *Bacillus cereus* und *Micrococcus luteus* mit besonderer Eignung für die TLC-Overlay-Technik sowie die berüchtigten Hospitalismuskkeime *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* zum Einsatz. Während *S. aureus* als klassischer Verursacher von Abszessen, Sepsis und toxischem Schocksyndrom gilt, ruft *S. epidermidis* Endokarditiden sowie septische Krankheitssymptome nach Implantationen hervor. Beide Erreger zeichnen sich durch multiple Antibiotikaresistenzen aus, wobei die äußerst gefährlichen Oxacillin-resistenten *S.-aureus*-Stämme meist nur noch auf die Glykopeptid-Antibiotika Teicoplanin und Vancomycin ansprechen. Als Gram-negative und damit für die Resistenzinduktion besonders anfällige Testbakterien wurden *Escherichia coli*, ein klassisches Enterobakterium, neben dem

ubiquitären Boden- und Wasserkeim *Pseudomonas aeruginosa* ausgewählt. Während *E. coli* den häufigsten bakteriellen Erreger von Harnwegsinfektionen bei vordergründig oral-fäkaler Übertragung mit Toxinbildung darstellt, verursacht der opportunistische Keim *P. aeruginosa* mit hoher natürlicher Resistenz sehr schwer therapierbare Wundinfektionen bis hin zu Pneumonien. In diesem Zusammenhang repräsentiert das Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin (Kanamycin-Typ) eines der wenigen geeigneten Pharmaka, vor allem für infizierte Brandverletzungen. Aus dem Pilzreich diene *Candida albicans*, der wichtigste fakultativ pathogene Vertreter dieser Hefepilz-Gattung, zur Prüfung auf antimykotische Aktivität. *C. albicans* gilt als typischer Erreger von dermalen und teilweise auch organinvasiven Pilzmykosen hauptsächlich bei Immundefekten (vgl. Pschyrembel, 1998, S. 159, 250 f., 470, 1018, 1310, 1495).

Als antibakterielle Referenzsubstanzen dienen typische Breitspektrum-Antibiotika, im konkreten Fall das Aminosäure-Derivat Chloramphenicol (s. Abb. 8-2 auf S. 61) neben dem Acetogenin Tetracyclin, welche beide die prokaryontische Protein-Biosynthese hemmen. Die antimykotisch wirkende Referenzsubstanz 5-Fluorcytosin blockiert nach intrazellulärer Metabolisierung zu 5-Fluoruracil die DNA-Synthese, während das Imidazol-Derivat Miconazol die für humanpathogene Pilze essentielle Ergosterin-Synthese hemmt (vgl. Forth et al., 1992, S. 618, 683, 685 f.).

8.2 Protozoen

Bei Protozoen handelt es sich um einzellige, bewegliche, eukaryontische Organismen, die systematisch dem Tierreich zugeordnet werden und von denen einige Spezies in tropischen wie subtropischen Ländern als weit verbreitete Endoparasiten schwere Krankheitssymptome auslösen können. Der parasitische Aufenthalt üblicherweise in bestimmten Insektenarten und im Menschen ist charakteristisch für den Lebenszyklus pathogener Protozoen. Durch Wirtswechsel über Insektenstich erfolgt die Infektion bidirektional mit Aufteilung des Entwicklungszyklus zwischen Mensch und Insekt, wobei der Einbezug entsprechender Organsysteme spezifisch vom Erreger abhängt. Neben Bekämpfung der Vektoren mittels Insektiziden konzentriert man sich gegenwärtig auf die Entwicklung wirksamerer und besser verträglicherer Pharmaka (vgl. Abschnitt 8.1) für die gezielte Chemotherapie bei Mensch und Tier (vgl. Forth et al., 1992, S. 697).

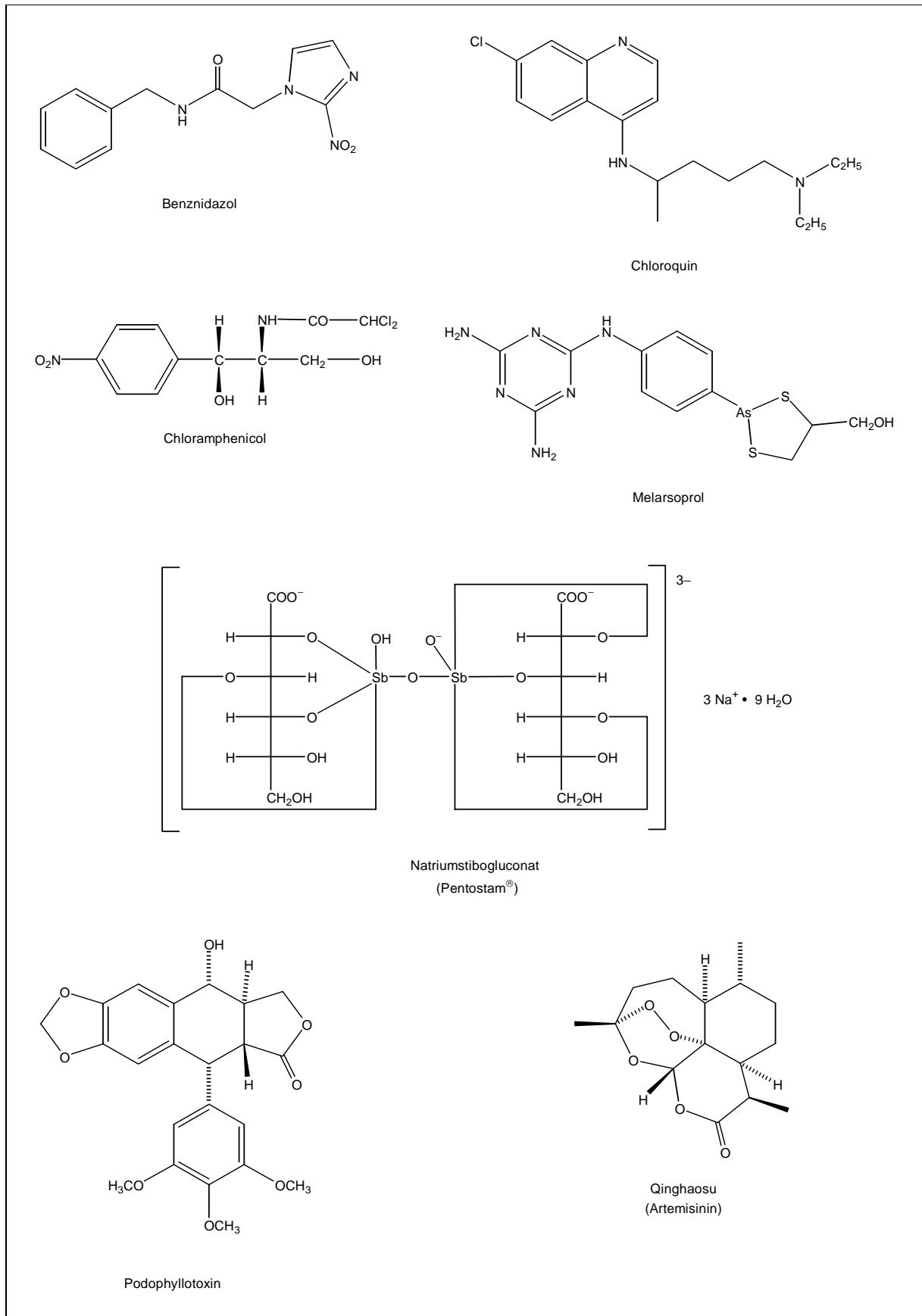


Abb. 8-2. Antimikrobielle und zytotoxische Chemotherapeutika (nach Bruchhausen et al., 1993a, S. 425, 886; Bruchhausen et al., 1993b, S. 853; Fugmann et al., 1997, S. 128, 504, 537; List und Hörhammer, 1977, S. 669).

Die wichtigsten humanpathogenen Protozoen gehören im wesentlichen zum Stamm „Flagellata“ (Gattungen *Leishmania*, *Trypanosoma*) sowie zum Stamm „Sporozoa“ (Gattungen *Plasmodium*, *Toxoplasma*). Flagellaten der genannten Genera werden morphologisch je nach Zellgestalt, Geißellänge und Position des Kinetoplasten in amastigote, promastigote, epimastigote und trypomastigote Formen eingeteilt. Sporozoen zeigen typischerweise einen Wechsel von ungeschlechtlicher und geschlechtlicher Vermehrung, wobei die Sporozoiten als Endprodukte des sexuellen Entwicklungszyklus zur Infektion des Menschen führen (vgl. Brandis et al., 1994, S. 645 f., 654). Im Schweizerischen Tropeninstitut (Basel, CH) erfolgt das Screening von Rohextrakten und Reinsubstanzen auf antiprotozoäre Aktivität mittels der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Verdünnungsmethode, allerdings infolge der schwierigen In-vitro-Kultivierbarkeit vieler Protozoenarten unter wesentlich größerem technischem Aufwand (vgl. auch Abschnitt 18.1).

Leishmania donovani verursacht die viszerale Form (Synonym: Kala-Azar) der Leishmaniasen, eine subakute bis chronische Allgemeininfektion mit Verbreitung vor allem in Asien, Afrika und Südamerika. Nach dem Stich von Mückenweibchen der Gattung *Phlebotomus* gelangen die Erreger in das Monozyten-Makrophagen-System, wo sie sich vermehren und langandauernde Fieberschübe, Leukopenie und Kachexie hervorrufen. Unbehandelt verläuft die Krankheit fast immer in 6-24 Monaten tödlich; bei rechtzeitiger Behandlung besteht eine gute Prognose. Die Chemotherapie stützt sich im wesentlichen auf das alt eingeführte Antimon(V)-präparat Pentostam[®] (s. Abb. 8-2 auf S. 61), welches im Falle schwerer Nebenwirkungen wie einer irreversiblen Leberparenchymschädigung durch das Polyen-Antibiotikum Amphotericin B und das Dibenzamidin-Derivat Pentamidin ersetzt werden muß (vgl. Bruchhausen et al., 1993c, S. 59; Forth et al., 1992, S. 703, 705; Pschyrembel, 1998, S. 906 f.).

Plasmodium falciparum gilt als Auslöser der Malaria tropica, der schwersten Malariaform mit akuter Lebensgefahr. Nach dem Stich von Mückenweibchen der Gattung *Anopheles* gelangen die Sporozoiten über die Blutbahn in die Leber, wo es zur präerythrozytären Schizogonie kommt. Die durch den Zerfall der Teilungsformen (Schizonten) freiwerdenden Merozoiten befallen direkt die Erythrozyten und zerstören diese unter anderem über den Abbau des Proteinanteils im Hämoglobin. Eine pathophysiologische Besonderheit von *P. falciparum* zeichnet sich dabei verantwortlich für dessen Gefährlichkeit, indem der pH-Wert befallener Erythrozyten um etwa 0,4 Einheiten

gesenkt wird, so daß über die Konformationsänderung bestimmter Membranproteine kleine Höcker an der Oberfläche entstehen. Diese wiederum führen zur Adhärenz roter Blutkörperchen an die Oberfläche von Gefäßendothelien, besonders im zentralen Nervensystem, wodurch die sogenannte zerebrale Malaria eine sehr schlechte Prognose besitzt. Trotz intensiver Bekämpfungsmaßnahmen zeigt die Malaria heutzutage weltweite Verbreitung in den Tropen und teilweise auch in den Subtropen unterhalb von 2 000 m Höhe. Infolge zunehmender Resistenz der Plasmodien gegen Medikamente und der Anopheles-Mücken gegen Insektizide verschlechtert sich die Situation in vielen Endemiegebieten rasch, wobei zur Zeit mehrere Millionen Todesopfer pro Jahr zu beklagen sind. Von den vielen handelsüblichen Chemotherapeutika seien an dieser Stelle nur das 4-Aminochinolin-Derivat Chloroquin und das Sesquiterpen-Epidioxid Qinghaosu (Artemisinin) (s. Abb. 8-2 auf S. 61) angeführt. Ersteres stellt ein hochwirksames Blutschizontenmittel dar, welches nach Anreicherung in den Parasiten-Lysosomen deren pH-Wert erhöht und somit die sauren Proteasen zur Gewinnung essentieller Aminosäuren aus dem Globin-Abbau inaktiviert. Letzteres - häufig herangezogen bei vorliegender Chloroquin-Resistenz - schädigt bereits in nanomolaren Konzentrationen in vitro die Membran des Parasiten über Bildung von Singulett-Sauerstoff, stört den Nucleinsäure-Stoffwechsel und greift als Gametozid in das sexuell differenzierte Stadium von *P. falciparum* ein. Auch bei der unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck ablaufenden In-Vitro-Kultivierung fällt die besondere Empfindlichkeit des Erregers gegenüber aktivierten O₂-Spezies ins Auge (→ Schutzeffekt von zugesetztem Glutathion), was nicht zuletzt für Patienten mit genetisch bedingtem Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel in endemischen Malariagebieten über erythrozytäre Peroxid-Anhäufung einen Selektionsvorteil bedeutet (vgl. Brandis et al., 1994, S. 658 f.; Bruchhausen et al., 1993a, S. 887; Fugmann et al., 1997, S. 537; Pschyrembel, 1998, S. 975 f.; Voet und Voet, 1994, S. 126, 584 f.).

Die ostafrikanische Form der Schlafkrankheit wird von *Trypanosoma brucei rhodesiense* hervorgerufen, übertragen durch Stechfliegen der Gattung Glossina (Tsetsefliegen), wobei der Vektor die Erregervirulenz maßgeblich modifiziert. Während hohes Fieber und akute Myokarditis das klinische Erscheinungsbild der 1. Phase prägen, tritt in der 2. Phase unter Umständen schon nach wenigen Wochen ein Befall des Zentralnervensystems mit Erregernachweis im Liquor cerebrospinalis und narkoleptischen Zuständen auf. Der Tod erfolgt nach kurzem Verlauf über 3-9 Monate hinweg meist

durch Herzversagen, bei ausbleibender Behandlung mit hoher Wahrscheinlichkeit. Die Chemotherapie im ersten Stadium basiert unter anderem auf dem auch gegen *L. donovani* wirksamen Dibenzamidin-Derivat Pentamidin, dessen trypanozide Wirkung auf einer Störung der Nucleinsäure-Synthese beruht. Nach Befall der Cerebrospinalflüssigkeit in Phase 2 kommt hingegen das Dithiaarsolan-Derivat Melarsoprol (s. Abb. 8-2 auf S. 61) zur Anwendung, welches spezifisch die Pyruvatkinase des Erregers hemmt, von Säugetierzellen jedoch nach Entgiftung zum fünfwertigen Abbauprodukt rasch ausgeschieden wird. Der Einsatz dieser potentiell hochtoxischen Substanz verstärkt häufig die infektionsbedingten Schäden und kann in seltenen Fällen eine fatale hämorrhagische Encephalopathie hervorrufen, so daß Arsenpräparate nur von besonders erfahrenen Spezialisten für Tropenmedizin eingesetzt werden dürfen. Im Falle von Unverträglichkeit oder Resistenz steht noch das Nitrofurant-Derivat Nitrofurazon zur Verfügung, welches aber selbst neurotoxische Eigenschaften aufweist (vgl. Brandis et al., 1994, S. 649; Bruchhausen et al., 1993b, S. 853; Forth et al., 1992, S. 702; Pschyrembel, 1998, S. 1129, 1606).

Trypanosoma cruzi ruft die über den Kot von geflügelten, blutsaugenden Raubwanzen der Gattungen Panstrongylus, Rhodnius und Triatoma übertragene Chagas-Krankheit (amerikanische Trypanosomiasis) in Mittel- und Südamerika hervor. Dieser Blut- und Zellparasit befällt insbesondere Herzmuskelzellen, Monozyten und Makrophagen und bedingt Veränderungen an den vegetativen Neuronen. Symptomatisch zeichnen sich Infektionen durch Fieber, akute Myokarditis oder Meningoencephalitis aus, wobei der Tod oftmals plötzlich infolge von Herzinsuffizienz eintritt, in Endemiegebieten auch nach klinisch stummem Verlauf. Die Prognose wird bei Kindern als ungünstig beurteilt, im Erwachsenenalter als schwankend je nach Virulenz des Erregers sowie Konstitution des Patienten. Zur Chemotherapie dient in erster Linie das Nitroimidazol-Derivat Benznidazol (s. Abb. 8-2 auf S. 61), welches durch Hemmung von RNA- und Proteinsynthese neben DNA-Schädigung sowohl die trypomastigoten Blutformen als auch die amastigoten Gewebeformen von *T. cruzi* im akuten Stadium bekämpft. Bei Resistenz muß auf das Nitrofurant-Derivat Nifurtimox ausgewichen werden, das jedoch zu denselben Nebenwirkungen (vor allem Polyneuropathien) führen kann (vgl. Brandis et al., 1994, S. 649 f.; Bruchhausen et al., 1993a, S. 425 f.; Forth et al., 1992, S. 703; Pschyrembel, 1998, S. 262, 1128, 1606).

8.3 Zytotoxizität

Unter der Chemotherapie von Tumoren versteht man die Gabe zytotoxischer Substanzen zur Behandlung von Krebszellen im gesamten Organismus oder von verbliebenen Resten derselben nach chirurgischer Exstirpation beziehungsweise Bestrahlung. Diese Zellgifte greifen spezifisch in Teilungsvorgänge ein und erfassen somit neoplastische Strukturen neben gesundem Gewebe mit hohen Teilungsraten (z. B. Haarwurzeln, Schleimhäute). Durch die geschickte Kombination von Wirkstoffen mit unterschiedlichen Angriffspunkten (→ Polychemotherapie) lassen sich bessere Heilungschancen bei gleichzeitig verringerten Nebenwirkungen erzielen.

Mit Bezugnahme auf die Naturstoffchemie sucht man intensiv nach biogenen Zytoplastika, um neuartige Leitstrukturen für die Krebstherapie zu erschließen. Der Klassifizierung dieser Verbindungen liegt dabei folgende Einteilung nach Wirkmechanismen zugrunde:

- Alkylantien (Bsp.: Cyclophosphamide);
- Antibiotika (Bsp.: Anthracycline, Bleomycine, Mitomycin C, Neocarzinostatine);
- Antimetabolite (Bsp.: Methotrexat als Folsäure-Antagonist);
- Mitosehemmstoffe (Bsp.: Colchicin, Podophyllotoxin, Taxol, Vinblastin).

Bei den Antibiotika handelt es sich hierbei allesamt um mikrobielle Stoffwechselprodukte (vgl. Abschnitt 8.1), während die Mitosehemmstoffe aus Pflanzen stammen.

Die besondere Problematik bei der Erforschung neuer Krebsmedikamente wird nicht zuletzt daraus ersichtlich, daß von über 32 000 - unter der Regie des National Cancer Institute (NCI) der USA - gesammelten Pflanzenarten im Zeitraum von 1956-1982 lediglich 2 591 biologisch aktiv waren. Schließlich erreichten dann nur noch 15 isolierte Reinsubstanzen die klinische Testphase, von denen letztlich Camptothecin sowie Taxol (1993 als Arzneistoff zugelassen) übrigblieben (vgl. Nuhn, 1997, S. 75; Pühler et al., 1999, S. 91, 128).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Prüfung von Rohextrakten und Reinsubstanzen auf zytotoxische Aktivität erfolgte mittels der bewährten Verdünnungsmethode (vgl. Abschnitt 8.1), wobei der Test an Peritonealmakrophagen der Maus als Parallelkontrolle zum eigentlichen *Leishmania-donovani*-Ansatz diente (vgl. Abschnitt 18.2). Bei den neoplastischen KB-Zellen von *Homo sapiens* handelt es sich um äußerst widerstandsfähige HeLa-Zellen-Abkömmlinge, bei den L6-Zellen um Skelettmyo-

blasten von *Rattus norvegicus*. Die Wahl dieser Zelllinie ermöglicht aufschlußreiche Aktivitätsvergleiche, da Myoblasten nicht-entartete Skelettmuskel-Vorläuferzellen darstellen, welche mittels des „Fibroblast Growth Factor (FGF)“ bis zu zwei Jahre undifferenziert in Kultur gehalten werden können (vgl. Alberts et al., 1990, S. 1175 f.). Das zur Referenzierung eingesetzte Lignan Podophyllotoxin (s. Abb. 8-2 auf S. 61) stammt aus den Wurzeln von *Podophyllum peltatum* (Wilde Limone) und wirkt über die Bindung an Tubulin als Mitosehemmstoff, wohingegen die Derivate des 4-*epi*-Podophyllotoxins über Enzymhemmung bei Topoisomerase II zu DNA-Strangbrüchen führen (vgl. Forth et al., 1992, S. 740; Nuhn, 1997, S. 598).

8.4 Arachidonsäure-Metabolismus

Die vierfach ungesättigte 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (Arachidonsäure) ist als Bestandteil von Phospholipiden in nahezu allen Zellmembranen enthalten und gilt für den Menschen als wichtigste essentielle Fettsäure, deren enzymatische Oxidation zu einer Vielzahl biochemisch bedeutender Verbindungen führt, der sogenannten Eicosanoide. Diese wirken in Form von Mediatoren auf Blut und Kreislauf sowie in der Funktion als Second messenger hydrophiler Hormone über auto- beziehungsweise parakrine Mechanismen, wobei der schnelle Abbau innerhalb von Sekunden bis Minuten eine begrenzte Reichweite gewährleistet (→ Lokalhormone). Abhängig von der Gewebeart wird die bei jeglicher Zellmembranschädigung freigesetzte Arachidonsäure durch differenzierte Enzyme metabolisiert. Im Verlauf dieser Arachidonsäure-Kaskade muß dabei zwischen den Produkten des Cyclooxygenase- und Lipoxxygenaseweges unterschieden werden (s. Abb. 8-3 auf S. 67). Konkret handelt es sich in beiden Fällen primär um eine Dioxygenase-Reaktion, die zu instabilen Endoperoxiden beziehungsweise Hydroperoxyfettsäuren führt, aus denen in vivo ein ganzes Spektrum von Verbindungen entsteht.

Im Cyclooxygenase-Weg treten unter anderem die Prostaglandine auf, welche in nahezu allen Organen des Menschen zumindest spurenweise vorhanden sind und auch in Korallen und höheren Pflanzen nachgewiesen wurden. Anregung der glatten Muskulatur (z. B. Uteruskontraktion), Zytoprotektion der Magenschleimhaut neben Oestrus-Synchronisation im veterinärmedizinischen Bereich kennzeichnen die vielfäl-

tigen physiologischen Wirkungen der Prostaglandine. Strukturanaloga mit verbesserter chemischer wie metabolischer Stabilität spielen diesbezüglich eine große therapeutische Rolle. Die Thromboxane fördern die Aggregation der Blutplättchen und wirken darüber hinaus als starke Vaso- und Bronchokonstriktoren, was eine Beteiligung an der Pathogenese von Asthma nahelegt. Mit starken gefäßerweiternden Effekten bereits im nanomolaren Bereich sowie Hemmung der Plättchenaggregation erweisen sich die Prostacycline als Gegenspieler der soeben angeführten Thromboxane. Ferner handelt es sich dabei um Zytoprotektiva beispielsweise für die Magenwand bei Gastritis oder für Gewebe bei Organtransplantationen, worauf die ulcerogene Wirkung nicht-steroidaler Antiphlogistika wie des Indolessigsäure-Derivates Indometacin beruht. Diesbezüglich weiß man inzwischen, daß die Cyclooxygenase (COX) in mindestens zwei Isoformen existiert: einer konstitutionellen COX-1, verantwortlich für Zytoprotektion, und einer durch Entzündungsprozesse induzierbaren COX-2. Im Gegensatz zur generellen COX-Hemmung über die schon erwähnte Referenzsubstanz Indometacin muß beim Naturstoff-Screening auf spezifische COX-2-Inhibition hin selektiert werden (vgl. Forth et al., 1992, S. 217, 219; Nuhn, 1997, S. 486-491; Pühler et al., 1999, S. 45, 500, 632; Pschyrembel, 1998, S. 104, 397).

Der Lipoxygenase-Weg startet im Unterschied zur Cyclooxygenase-abhängigen Endoperoxid-Bildung mit Hydroperoxyfettsäuren durch Anlagerung nur eines Sauerstoffmoleküls, dessen Angriff je nach Regioselektivität in 5-, 12- oder 15-Stellung erfol-

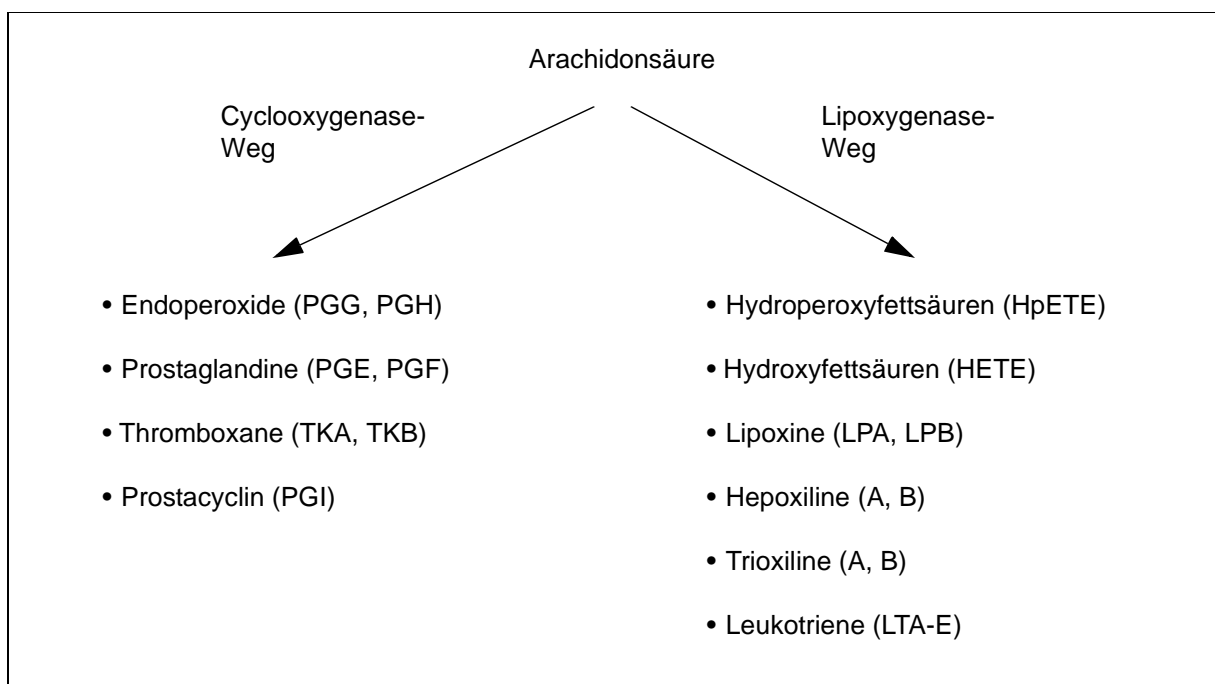


Abb. 8-3. Hauptzweige des Arachidonsäure-Metabolismus (verändert nach Nuhn, 1997, S. 487).

gen kann. Über Peroxidase-Aktivität entstehen die entsprechenden ungesättigten Hydroxyfettsäuren. Den Lipoxinen kommt eine Schlüsselfunktion im Entzündungs-geschehen, bei allergischen Reaktionen, der Arterienerweiterung und bei Stimulation der Hyperoxid-Freisetzung aus menschlichen Leukozyten zu. Hepoxiline werden als Me-diatoren mit Beteiligung an der Insulinwirkung in den Langerhansschen Inseln gebildet. Trioxiline entstehen als Trihydroxy-Derivate aus den Hepoxilinen. Die Leukotriene schließlich erweisen sich im Gemisch identisch mit der sogenannten „Slow Reacting Substance of Anaphylaxis“ (SRS-A), welche allergische Reaktionen, Anaphylaxie so-wie Asthmaanfälle auslösen kann, und zwar mit bis zu 1 000fach stärkerer Wirkung im Vergleich zu Histamin oder den Prostaglandinen (vgl. S. 66 f.). Zudem beanspruchen Leukotriene eine Schlüsselrolle bei inflammatorischen Prozessen durch Aktivierung der Leukozyten-Aggregation, der Freisetzung oxidierender Enzyme und der Erzeu-gung von Hyperoxid-Radikalen. Während klassische Antiphlogistika zur Repression der Prostaglandin-Biosynthese entweder auf Steroid-Basis die Arachidonsäure-Bil-dung hemmen oder bei nichtsteroidaler Zusammensetzung die Cyclooxygenase inhi-bieren, sucht die aktuelle Arzneistoffforschung nach neuartigen Leitstrukturen die 5-Lipoxygenase betreffend zur kausalen Therapie chronischer Erkrankungen wie Asthma, Polyarthritits und Rheuma. Für Enzymtests wird häufig die Referenzsubstanz Nor-dihydroguajaretsäure aus der Stoffgruppe der Lignane herangezogen, welche tech-nisch als Antioxidans für Fette dient (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 442; Nuhn, 1997, S. 493, 495; Pühler et al., 1999, S. 345 f., 353 f.).

8.5 Antioxidative Wirkung

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies (s. Abb. 8-4 auf S. 69) zählen Radikale wie das Hy-peroxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$) und das Hydroxyl-Radikal ($\bullet OH$), letzteres mit besonders ausge-prägten zytotoxischen Effekten. Aufgrund ihrer chemischen Aggressivität ebenfalls pathogenetisch relevant sind aber auch die nichtradikalischen Spezies Wasserstoff-peroxid (H_2O_2) - inklusive Alkoxy ($R-O\bullet$)- und Peroxyradikalen ($R-O-O\bullet$) - sowie Sin-gulettisauerstoff ($^1\Delta_g-O_2$). Schließlich verdient noch das Hypochlorit-Anion (OCl^-) Er-wähnung, welches zwar streng genommen nicht mehr zu den aktivierten Sauerstoffor-men gehört, aber biologisch aus solchen hervorgeht. Zur nicht-enzymatischen Ent-

schärfung von angeregtem Sauerstoff dienen die klassischen biogenen Radikalfänger wie einerseits β -Carotin (Provitamin A) und α -Tocopherol (Vitamin E) im lipophilen Bereich, andererseits L-Ascorbinsäure (Vitamin C) für die hydrophile Phase. Daneben werden als Antioxidantien noch synthetische Stoffe eingesetzt, wie beispielsweise butyliertes Hydroxyanisol (BHA).

Im Organismus entsteht Hyperoxid⁴ zum einen als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmung, verstärkt durch gewisse Xenobiotika und zytostatische Antibiotika, sowie über Xanthinoxidase in postischämischem Gewebe, zum anderen in Monozyten (\rightarrow Blut), Makrophagen (\rightarrow Gewebe) und polymorphkernigen Granulozyten mittels einer membranständigen NADPH-Oxidase. Diese phagozytäre $O_2^{\bullet -}$ -Bildung steigt nach Aktivierung um mehr als das Zehnfache an („oxidative burst“), wobei neben opsonierten Mikroorganismen auch Leukotriene (vgl. Abschnitt 8.4), bakterielle chemotaktische Peptide wie Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (FMLP) sowie der Tumorpromotor Phorbolmyristylacetat (PMA) als bislang potentester Stimulator in Frage kommen. Peroxid stammt als Nebenprodukt aus Reaktionen der Monoamin- und Uratoxidase oder wird indirekt spontan über Disproportionierung aus $O_2^{\bullet -}$ gebildet, bevorzugt bei $pH < 7$. Das Hydroxyl-Radikal stellt ein sehr starkes Oxidationsmittel dar, welches prak-

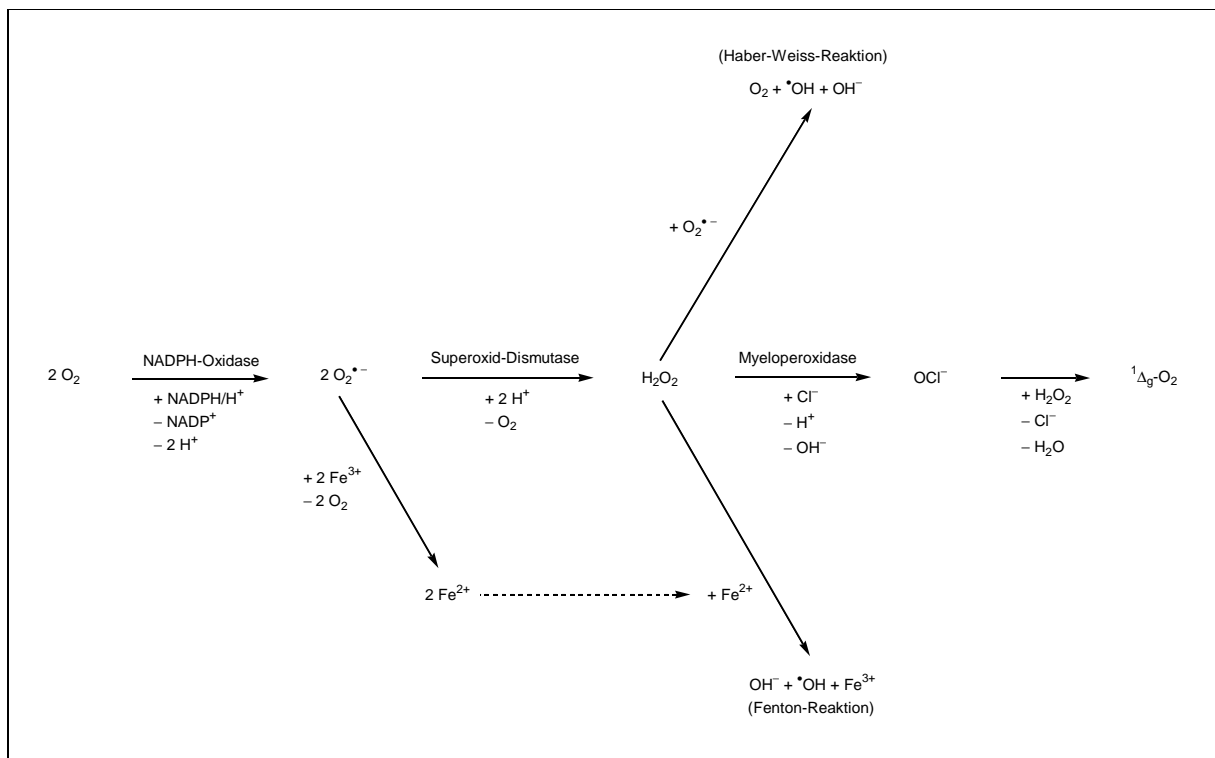


Abb. 8-4. Entstehung von aktiviertem Sauerstoff (ergänzt nach Forth et al., 1992, S. 43).

⁴ früher auch: „Superoxid“ (vgl. Holleman, 1985, S. 454)

tisch alle biologischen Strukturen extrem schnell angreift und - aus H_2O_2 über die Fenton-Reaktion entstanden - die besondere Gefährlichkeit von freien, das heißt nicht komplex gebundenen Übergangsmetallionen wie vor allem Fe^{2+} und Cu^{2+} für Aerobier erklärt. Diesbezüglich spielt die Haber-Weiss-Reaktion mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 als Edukten nur eine untergeordnete Rolle. Hypochlorit wiederum entsteht durch Umsetzung von H_2O_2 mit Cl^- katalytisch über die Myeloperoxidase in polymorphkernigen Granulozyten, was das Peroxid betreffend als Giftungsreaktion zu werten ist, zumal OCl^- in nicht-enzymatischen Folgeschritten Cl^\bullet freisetzen kann oder auch mit beliebigen Aminen zu reaktionsfähigen Chloraminen weiterreagiert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß OCl^- in polymorphkernigen Granulozyten mit abundant gebildetem H_2O_2 zu dem hochaktiven Singulett-Sauerstoff umgesetzt wird, der ferner als Nebenprodukt der Prostaglandin-Biosynthese (vgl. Abschnitt 8.4) anfällt.

Die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf Lipide läßt sich im wesentlichen als Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit nachfolgenden Membranschäden beschreiben, während die Oxidation von Cystein, Histidin, Methionin oder Tryptophan in Proteinen zu deren Aktivitätsverlust führt. Der Angriff von Nucleinsäuren erfolgt auf der Basis ihrer Nucleobasen, deren Oxidation Dimerisierungen und Strangbrüche bedingt mit den Folgeerscheinungen „Mutagenese“ beziehungsweise „Kancerogenese“ (vgl. Nuhn, 1997, S. 40).

Vor diesem Hintergrund wird verständlich, daß Leben in einer Sauerstoffatmosphäre wirksame Abwehrsysteme zur Entschärfung reaktiver O_2 -Derivate benötigt. So setzen die Superoxid-Dismutasen⁵ (SOD), phylogenetisch alte Metalloproteine auf der Basis von Mn-, Fe- oder Cu-Komplexen, $\text{O}_2^{\bullet-}$ diffusionslimitiert zu H_2O_2 und O_2 um, treten aber - pharmakodynamisch betrachtet - im Interstitium nur spurenweise auf. Das Hämoprotein Katalase dagegen beseitigt in erster Linie peroxisomales H_2O_2 durch Entgiftung zu O_2 und H_2O mittels Zweielektronenübergang. Die Glutathionperoxidasen mit Selenocystein-Rest im aktiven Zentrum entschärfen ebenso H_2O_2 zu Wasser, und zwar intrazellulär wie membranassoziiert unter Oxidation von Glutathion zum Disulfid. Dessen Regeneration erfolgt über eine entsprechende Reduktase, wobei ein NADPH/ H^+ -regenerierendes System (z. B. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) die Redox-äquivalente liefert (→ Gendefekt in Malariagebieten; vgl. Abschnitt 8.2). Spezifische

⁵ im chemischen Sinne handelt es sich bei der katalysierten Reaktion um eine „Disproportionierung“ mit Divergenz der Oxidationszahlen, welche bei einer „Dismutierung“ definitionsgemäß unterbleibt (vgl. Holleman, 1985, S. 515)

Entgiftungsreaktionen für das Hydroxyl-Radikal und Hypochlorit sind bislang unbekannt.

Bei pathophysiologischer Betrachtung wirkt die Radikalbildung von Phagozyten eindeutig im Dienste der Infektabwehr, wobei $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 und $\bullet OH$ neben OCl^- als proximale Toxine beziehungsweise „toxischer Cocktail“ im Vordergrund stehen. Neben den jeweiligen Keimen wird aber auch das Wirtsgewebe geschädigt, vor allem hinsichtlich des vermehrten Auftretens von Hyperoxid im SOD-armen Extrazellulärraum. Für die kurative Schlüsselrolle dieser Enzymklasse bei Entgleisung des Radikalstoffwechsels sprechen gute Therapieerfolge bezüglich rheumatoider Arthritis nach intraartikulärer Injektion. Inwieweit klassische Tumorpromotoren wie PMA ihre onkogene Wirkung über die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies ausüben, muß noch genauer untersucht werden (vgl. Forth et al., 1992, S. 42 f., 329-333; Pühler et al., 1999, S. 345).

Vor diesem Hintergrund ergibt sich in jedem Fall klar die Notwendigkeit, auch Naturstoffe verstärkt in die Erforschung neuartiger Leitstrukturen einzubeziehen, um den fatalen Folgen von übermäßigem oxidativem Streß primär auf der Ebene der Radikalbildung entgegenzuwirken. In der vorliegenden Arbeit wurden die isolierten Reinsubstanzen ausschließlich im zellulären Ansatz an polymorphkernigen Granulozyten des Menschen untersucht (vgl. Abschnitt 18.4), unter Bezugnahme auf das Flavon Quercetin, welches als Antioxidans sowie Schutzmittel gegen UV-Strahlung Verwendung findet (vgl. Fugmann et al., 1997, S. 539).

IV Ergebnisse

9 Isolierung

9.1 Perkolation von Rhizom und Blättern

Nach einigen Voruntersuchungen zur Stufenextraktion des pulverisierten Rhizoms von *Amomum aculeatum* zu etwa 1 g mit Petrolether, Dichlormethan, Essigsäureethylester, Methanol, Methanol : Wasser (7 : 3) und Wasser ließen sich die geeignetsten Extraktionsmittel eindeutig auswählen. Mit Hilfe der zweidimensionalen, analytischen Dünnschichtchromatographie gelang es, die ergiebigste Perkolationsfolge für maximale Ausbeute und Differenzierung der Rohextrakte gemäß folgender eluotroper Reihe festzulegen: Petrolether → Dichlormethan → Methanol → Methanol : Wasser (7 : 3) → Wasser. Das zur Verfügung stehende, luftgetrocknete Pflanzenmaterial (Rhizom und Blätter) wurde demzufolge bis auf die Herbarbelege vollständig zu mittlerer Körnung gemahlen und zum Schutz der Inhaltsstoffe sofort in der genannten Sequenz perkoliert, wobei das Rhizompulver (659 g) komplett, von dem insgesamt anfallenden Blattpulver (etwa 2,2 kg) jedoch nur ein kleiner Teil für den Vergleichsextrakt (1,1 g) zum Einsatz kam. Die Analyse des Pte-Rohextraktes auf antimikrobielle Aktivität an *Bacillus cereus* im TLC-Bioautographie-Overlay-Assay zeigte eindeutig drei klar separierte Komponenten mit bakterizider Wirkung an. Entsprechende Voruntersuchungen von Dr. Tulla Quadri-Spinelli an Dichlormethan- und *n*-Butanol-Rohextrakten ergaben zudem bemerkenswerte antiplasmodiale sowie zytotoxische Effekte ausschließlich für die lipophile Phase (vgl. Quadri-Spinelli, 2000, S. 76-79), so daß der Pte-Rohextrakt den Ausgangspunkt für weitere phytochemische wie pharmakologische Untersuchungen bildete (vgl. Kapitel 14; Abschnitte 10.2, 10.3, 18.1).

9.2 Auftrennung des Petrolether-Rohextraktes

Das fortgesetzte, schonende Einengen des Petrolether-Perkolates an Rotationsverdampfern führte schließlich zu einem tiefbraunroten Rückstand von honigartiger Konsistenz und aromatischem Geruch mit insgesamt 11,1 g Ausbeute. Zur Prüfung auf möglichst erschöpfende Extraktion, Lokalisierung bioaktiver Substanzen anhand ihrer R_f -Werte und Kontrolle anfallender Unterfraktionen diente die schon im vorhergehenden Abschnitt erwähnte 1D/2D-TLC mit VIS-, UV- und Vanillin-Schwefelsäure-Detektion, wobei für die erste beziehungsweise zweite Dimension Fließmittel aus Dcm : MeOH (9 : 1) beziehungsweise EtOAc : Hx (1 : 1) empirisch ausgewählt wurden.

Nach Grobtrennung des Pte-Rohextraktes zu vier gleich großen Portionen über VLC ließen sich die drei gesuchten Hauptkomponenten in zwei benachbarten Fraktionen lokalisieren, und zwar die ersten beiden für Dcm : EtOAc (6 : 4), die dritte hingegen für Dcm : EtOAc (4 : 6) (s. Abb. 9-1 auf S. 74). Im Anschluß an die weitere Separation der 6 : 4 -Fraktion mittels Adsorptionschromatographie an Kieselgel in Offener Säule und nachfolgender Endreinigung über eine Fließmittel-favorisierte Verteilungschromatographie an Sephadex LH-20 fielen die ersten beiden Reinsubstanzen in hoher Ausbeute an. Die Aufarbeitung der 4 : 6 -Fraktion zum Rohprodukt basierte einerseits auf Adsorptionschromatographie an Kieselgel in Offener Säule, andererseits auf präparativer Dünnschichtchromatographie. Zur Endreinigung der dritten Komponente kam wiederum Sephadex LH-20 zum Einsatz, diesmal aber in einer Fließmittel-favorisierten Gelchromatographie. Während sich die mobile Phase für die zuletzt genannte Kieselgelsäule als selektiv (exklusive Hx) binäres Gemisch mit Hilfe des „PRISMA“-Optimierungssystems ergab, wurde die Zusammensetzung aller übrigen Elutionsmittel empirisch ermittelt. Parallelversuche, die 4 : 6 -Fraktion mittels HPLC an LiChrosorb® Si 60 über Tcm : EtOH (9,5 : 0,5) aufzutrennen, verliefen nur unbefriedigend hinsichtlich Reinheit und Ausbeute, so daß in diesem Fall OCC neben TLC präparativ die Methoden der Wahl darstellten (vgl. Heilmann et al., 2000a, S. 2943 f.). Vergleichschromatogramme mit dem Pte-Rohextrakt aus den Blättern zeigten deutlich, daß dieselben Hauptkomponenten quantitativ in ähnlichen Verhältnissen wie im Rhizom vorliegen, wenngleich die großen Chlorophyllmengen im R_f -Bereich der ersten Substanz deren Reinigung maßgeblich erschweren.

Für die ersten beiden Reinsubstanzen mußte die gesamte zugrundeliegende VLC-Fraktion sukzessive aufgearbeitet werden, bei der dritten Komponente waren entsprechend 75 % (w/w) nötig, um jeweils mindestens über 100 mg zu verfügen und damit die benötigten Konzentrationsverhältnisse für spezielle NMR-Messungen - im konkre-

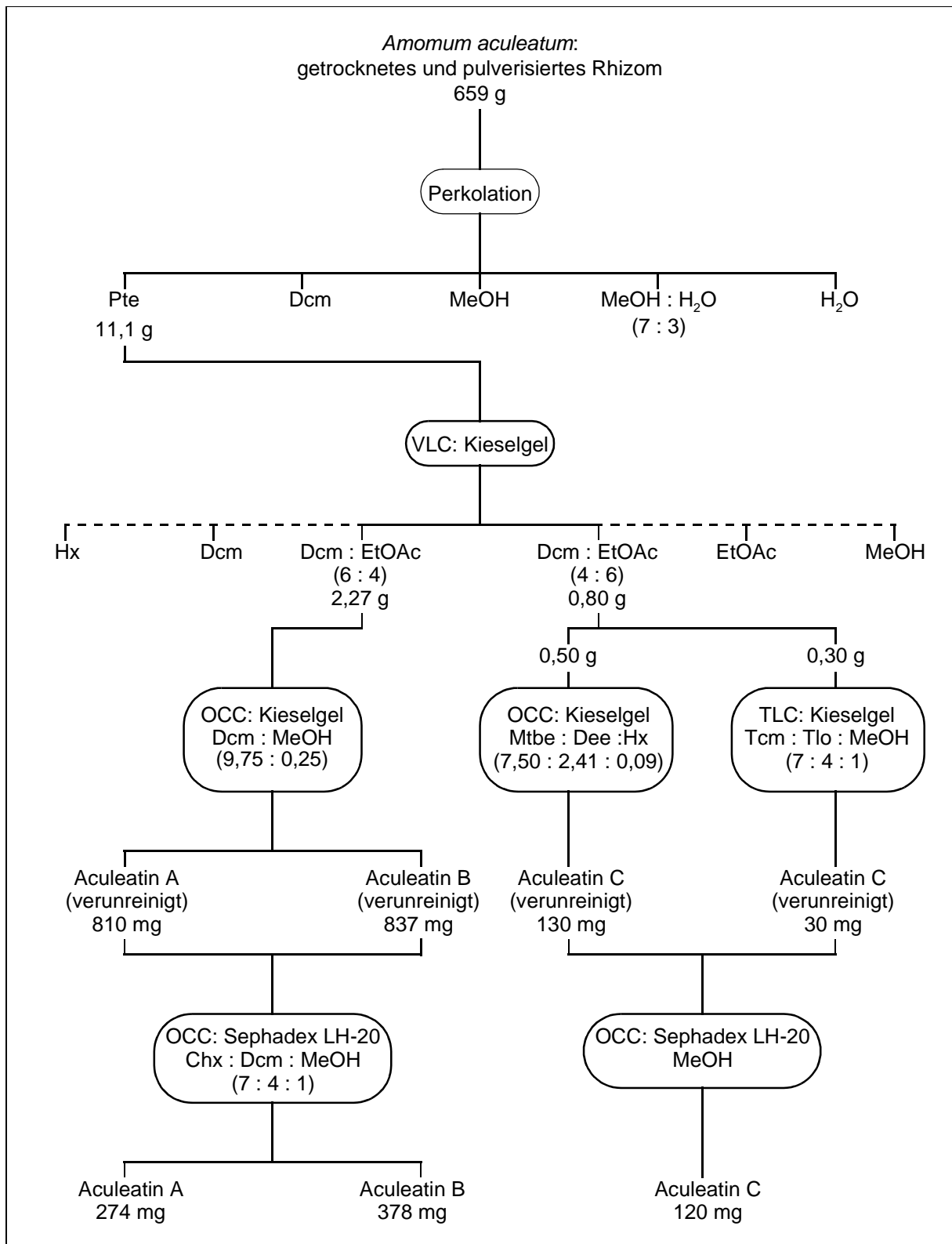


Abb. 9-1. Isolierungsschema für die Aculeatine A - C.

ten Fall das ^{13}C , ^{13}C -INADEQUATE-Experiment - erreichen zu können (vgl. Abschnitte 9.3, 15.1, 15.2, 18.1).

Mit Bezugnahme auf das spezifische Epitheton im Artnamen der Arzneipflanze *Amomum aculeatum* erhielten die drei bioaktiven Hauptkomponenten die Bezeichnung „Aculeatine“, geordnet zu A - C in der Reihenfolge ihrer Isolierung. Gemäß umfangreichen Literaturrecherchen war dieses Stichwort noch nicht vergeben, im Gegensatz zu den bereits bekannten „Aculeacinen A - G“, cyclischen Peptid-Antibiotika aus *Aspergillus aculeatus* (vgl. Buckingham, 1994, S. 74 f.).

9.3 Strukturaufklärung separierter Hauptkomponenten

9.3.1 Aculeatin A

Die erste Reinkomponente (s. Abb. 9-2) fällt unter Standardbedingungen als blaßgelbes, geruchloses und in weiten Bereichen der elutropen Reihe - von *n*-Hexan bis zu wasserfreien Alkoholen - leicht lösliches Öl an. Bei 230 nm zeigt diese stark lipophile Verbindung einen symmetrischen UV-Absorptionspeak mit hohem ϵ_λ , im Polarimeter mäßige optische Aktivität (vgl. Kapitel 19). Die systematische Benennung erfolgt gemäß den internationalen Nomenklaturregeln für substituierte Heterospirane sowie nach dem Hantzsch-Widman-System, wobei die drei cyclischen Teilstrukturen als Dienon- (C-8 bis C-13), Oxolan- (C-6 bis C-8, C-14, C-15) und Oxanring (C-1 bis C-6)

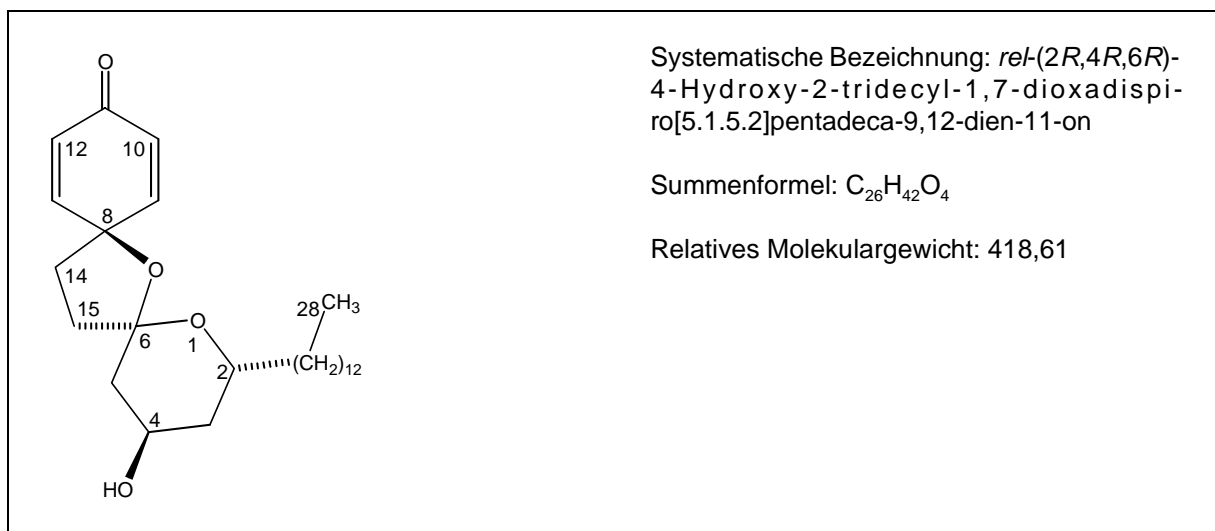


Abb. 9-2. Substanzcharakterisierung für Aculeatin A.

Tab. 9-1. ^1H - (500 MHz)- und ^{13}C - (125 MHz)-NMR-Daten für Aculeatin A in CDCl_3 . δ in ppm, J in Hz. Numerierung gemäß Nomenklatur.

Atom Nr.	Multiplizität	δ (^1H)	δ (^{13}C)	HMBC-Korrelationen
2	CH	4,10 (<i>m</i>)	65,3 (<i>d</i>)	H-3b, H-4, H-5b, H ₂ -16
3	CH ₂	1,79 (<i>ddd</i> , $J = 2,1; 5,1; 13,7$); 1,42 (<i>m</i> [*])	37,9 (<i>t</i>)	H-4, H-5b, H-14b, H ₂ -16
4	CH	4,12 (<i>m</i>)	64,8 (<i>d</i>)	H-3a, H-5b, H-14b
5	CH ₂	2,00 (<i>m</i> [*]); 1,93 (<i>m</i>)	39,0 (<i>t</i>)	H-3a, H-4, H ₂ -14, H-15a
6	C		109,0 (<i>s</i>)	H-2, H-5b, H ₂ -14, H ₂ -15
8	C		79,7 (<i>s</i>)	H-9, H-10, H-12, H-13, H-14a, H ₂ -15
9	CH	6,76 (<i>dd</i> , $J = 2,9; 10$)	148,7 (<i>d</i>)	H-13, H ₂ -14, H ₂ -15
10	CH	6,11 (<i>dd</i> , $J = 2; 10$)	127,0 (<i>d</i>)	H-12, H-13
11	C		185,3 (<i>s</i>)	H-9, H-13
12	CH	6,14 (<i>dd</i> , $J = 2; 10$)	127,2 (<i>d</i>)	H-9, H-10
13	CH	6,85 (<i>dd</i> , $J = 2,9; 10$)	150,9 (<i>d</i>)	H-9, H ₂ -14, H-15a
14	CH ₂	2,37 (<i>m</i> [*]); 2,00 (<i>m</i> [*])	34,1 (<i>t</i>)	H-5b, H-9, H-13, H-15b
15	CH ₂	2,37 (<i>m</i> [*]); 2,22 (<i>m</i> [*])	39,0 (<i>t</i>)	H-3a, H-4, H ₂ -14
16	CH ₂	1,50 (<i>m</i> [*])	35,8 (<i>t</i>)	H-2, H-3b, H-17b, H ₂ -18
17	CH ₂	1,49 (<i>m</i> [*]); 1,35 (<i>m</i> [*])	25,6 (<i>t</i>)	H-2, H-3b, H ₂ -16
18	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H-17a, H ₂ -19, H ₂ -20
19	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H-17a, H ₂ -18, H ₂ -20
20-22	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H ₂ -18, H ₂ -19, H ₂ -23
23	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H ₂ -21, H ₂ -22, H ₂ -24
24	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H ₂ -23, H ₂ -25, H ₂ -26
25	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,3 (<i>t</i>)	H ₂ -24, H ₂ -26, H ₂ -27
26	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	31,9 (<i>t</i>)	H ₂ -27, H ₃ -28
27	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	22,6 (<i>t</i>)	H ₂ -26, H ₃ -28
28	CH ₃	0,88 (<i>t</i> , $J = 6,9$)	14,1 (<i>q</i>)	

* Kopplungskonstanten infolge Signalüberlappung nicht zuzuordnen

vorliegen (vgl. Fresenius und Görlitzer, 1998, S. 86 f.). Da für das Molekül bislang nur die relative Konfiguration bekannt ist, muß das Präfix „*rel*“ vorangestellt werden. Konventionsgemäß erhält das Chiralitätszentrum mit dem niedrigsten Lokanten (C-2) den Stereodeskriptor *R*, wobei sich die Konfigurationen der übrigen Zentren (C-4, C-6) anhand der NMR-Daten relativ dazu ergeben (vgl. Kruse, 1997, S. 184). Mehrere ^1H -Kerne am selben C-Atom werden nach abnehmenden δ -Werten geordnet (a, b usw.).

Im ^1H -NMR-Spektrum (s. Abb. 9-7 auf S. 81) wiesen die vier Protonen bei 6,85 ppm und 6,76 ppm (beide *dd*, $J = 10$ Hz; 2,9 Hz) sowie bei 6,14 ppm und 6,11 ppm (beide *dd*, $J = 10$ Hz; 2,0 Hz) auf eine Dienon-Struktur hin (s. Tab. 9-1). Die in CDCl_3 partiell überlappenden Protonen-Signale von H-2 und H-4 konnten durch Wechsel des Lö-

sungsmittels zu C_6D_6 vollständig separiert werden. Für das ^{13}C -NMR-Spektrum (s. Abb. 9-8 auf S. 82) bestätigten die Resonanzen des quartären C-11 bei 185,3 ppm und der vier olefinischen Atome C-13, C-9, C-12 und C-10 bei 150,9 ppm, 148,7 ppm, 127,2 ppm und 127,0 ppm die Anwesenheit einer Dienon-Gruppierung (vgl. McKinley et al., 1997, S. 4876). Ein H/D-Austausch am aciden OH-Proton bestätigte die Position dieses Substituenten am C-Gerüst. Die Anzahl der C-Atome des Alkyl-Substituenten konnte mittels Inverse-Gated-Decoupling- ^{13}C erschlossen werden, so daß in Kombination mit DEPT-(90)- und DEPT-(135)-Experimenten die Multiplizitäten sämtlicher C-Atome im Molekül wie folgt lauten: $3 \times C$, $6 \times CH$, $16 \times CH_2$, $1 \times CH_3$.

Homo- wie heteronukleare Korrelationen, das heißt zunächst $^1H, ^1H$ -COSY- (s. Abb. 9-9 auf S. 83), $^1H, ^1H$ -TOCSY-, $^1H, ^{13}C$ -HSQC- (s. Abb. 9-12 auf S. 86) und $^1H, ^{13}C$ -HMBC- (s. Abb. 9-13 auf S. 86) Experimente, erlaubten die vollständige wechselseitige Zuordnung sämtlicher 1H - und ^{13}C -Kerne. So koppelte das Spiroatom C-8 (79,7 ppm) mit den olefinischen Protonen des Dienon-Systems und mit H-14a (2,37 ppm), während das Spiroatom C-6 (109,0 ppm) Konnektivitäten zu H₂-15 (2,37/2,22 ppm) und H-5b (1,93 ppm) neben H-2 (4,10 ppm) aufwies. Entscheidende HMBC-Wechselwirkungen erschienen ferner für C-2 (65,3 ppm) und H-3b (1,42 ppm) zusammen mit H₂-16 (beide 1,50 ppm), für C-4 (64,8 ppm) und H₂-3 (1,79/1,42 ppm) sowie C-17 (25,6 ppm) und H₂-16. Die relative Konfiguration an den drei vorhandenen Chiralitätszentren folgte aus der stereochemischen Auswertung einer NOESY-Aufzeichnung (s. Abb. 9-10 auf S. 84), wobei die aussagekräftigen NOEs für H-4 \leftrightarrow H₂-15, H-4 \leftrightarrow H₂-16 und H₂-15 \leftrightarrow H₂-16 auftraten, für H-2 \leftrightarrow H-4 dagegen nicht, so daß H-4 und die Alkylkette von C-2 dieselbe relative Orientierung am Oxanring einnehmen müssen (s. Abb. 9-3 auf S. 79 mit vereinfachender Darstellung des Alkylrestes in Form einer Methylgruppe). Ein $^{13}C, ^{13}C$ -INADEQUATE-Experiment (s. Abb. 9-11 auf S. 85) schließlich sicherte in Kombination mit den übrigen NMR-Daten den Aufbau des C-Skeletts ab.

Während der Oxolanring aufgrund seiner sterisch weitestgehend fixierten Position - vor allem an der planaren Dienon-Gruppierung - konformationsmäßig nur als „abgeflachter Briefumschlag“ auftreten kann, ist beim räumlich flexiblen Oxanring prinzipiell ein Umklappen zwischen zwei Sesselkonformationen über intermediäre Twist- und Wannenformen denkbar. Alle vorhandenen NMR-Kopplungen sprachen aber eindeutig nur für das linke Sesselkonformer in Abbildung 9-4 auf Seite 79 mit äquatorialer Stellung der Hydroxygruppe, zumal weder in $CDCl_3$ noch in C_6D_6 stark tieffeldverschobene

Wasserstoffbrücken-Protonen (> 10 ppm) zu erkennen waren, der Hydroxy- ^1H -Kern vielmehr nur eine NOESY-Kopplung mit H-4 zeigte (vgl. Friebolin, 1999, S. 50 f.). Aussagen zur Konformation des Oxanringes über den Einfluß des Diederwinkels auf die vicinale Kopplungskonstante 3J zwischen H-4 und H₂-3 oder H₂-5 (\rightarrow Karplus-Kurve) konnten für die Aculeatine A - C nicht getroffen werden, da die entsprechenden Werte für H₂-3 und H₂-5 infolge Signalüberlappung nicht exakt zuzuordnen waren. Vom Oxolanring aus gesehen erscheint die C_{spiro}-O-Bindung des Oxanringes in axialer, die C_{spiro}-O-Bindung des Oxolanringes bei Blickrichtung vom Oxanring aus hingegen in äquatorialer Orientierung, so daß zumindest ein anomerer Effekt zu vermerken ist (s. Abb. 9-5 a/b auf S. 79). „Axial“ bezeichnet dabei stets den steileren, „äquatorial“ entsprechend den flacheren Verlauf der C_{spiro}-O- beziehungsweise C_{spiro}-C_α-Bindung im Oxan- oder Oxolanring. Eine energieminierte Gesamtdarstellung der 3D-Struktur für Aculeatin A zeigt Abbildung 9-6 auf Seite 80.

Im Rahmen massenspektrometrischer Untersuchungen ergab das DEI-Spektrum für Aculeatin A ein Pseudomolekülion $[M - \text{H}_2\text{O}]^+$ bei m/z 400, das FAB-Spektrum (s. Abb. 9-14 auf S. 88) ein Signal für $[M + \text{Na}]^+$ bei m/z 441, jeweils unter Bezug auf M_E 418 (vgl. Heilmann et al., 2000a, 2939-2942).

Zwecks Bestimmung der absoluten Konfiguration über anomale Röntgenbeugung wurde die exocyclische Hydroxygruppe von Aculeatin A mit 4-Brombenzoesäurechlorid in Pyridin verestert, um das H⁺-labile Ketal vor freigesetzter Salzsäure zu schützen. Nach quantitativer Umsetzung trennte man das entstandene Substanzgemisch mittels OCC an Kieselgel auf. Bei der nachfolgenden Vergleichsanalyse der Einzelfractionen in Dünnschichtchromatogrammen ergab sich für den Reaktionsansatz mit Aculeatin A die Anwesenheit von 4-Brombenzoesäure, dessen dimeren Anhydrids sowie von 4-Brombenzoesäurechlorid als Verunreinigungen neben dem gewünschten Ester (Ausbeute: etwa 60 %). Das gereinigte Produkt diente nach Identitätsüberprüfung durch ^1H -NMR-Spektroskopie als Lösung in Dcm : MeOH -Mischungen wechselnder Zusammensetzung zu Kristallisationsversuchen mit reduzierter Verdunstungsrate bei Raumtemperatur sowie unter Kühlung. Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnten die gewünschten Derivat-Kristalle bislang nicht erhalten werden (vgl. Abschnitte 16.1 bis 16.4; Kapitel 17).

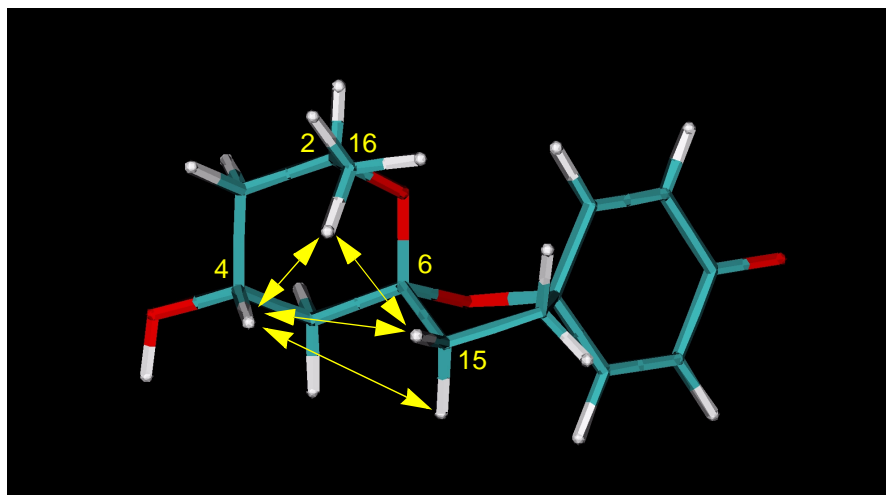
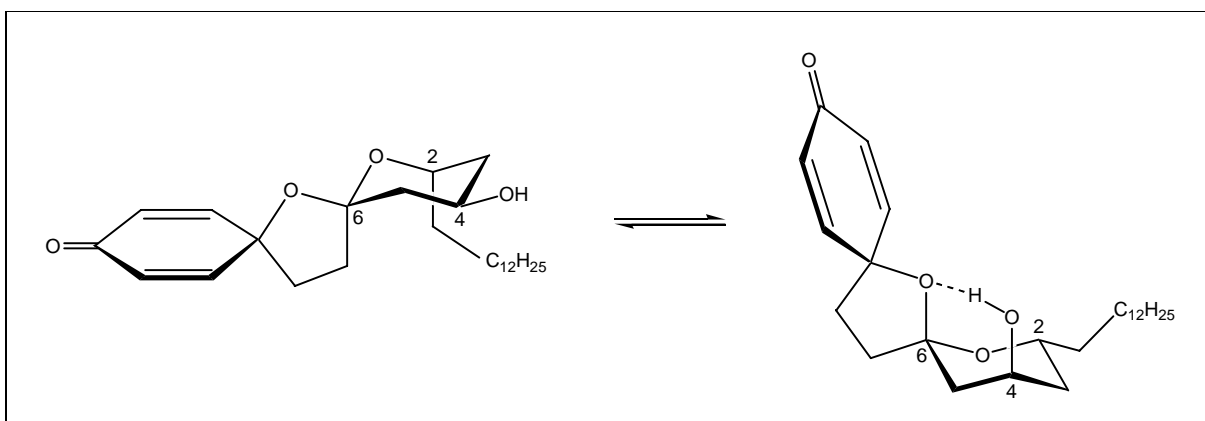
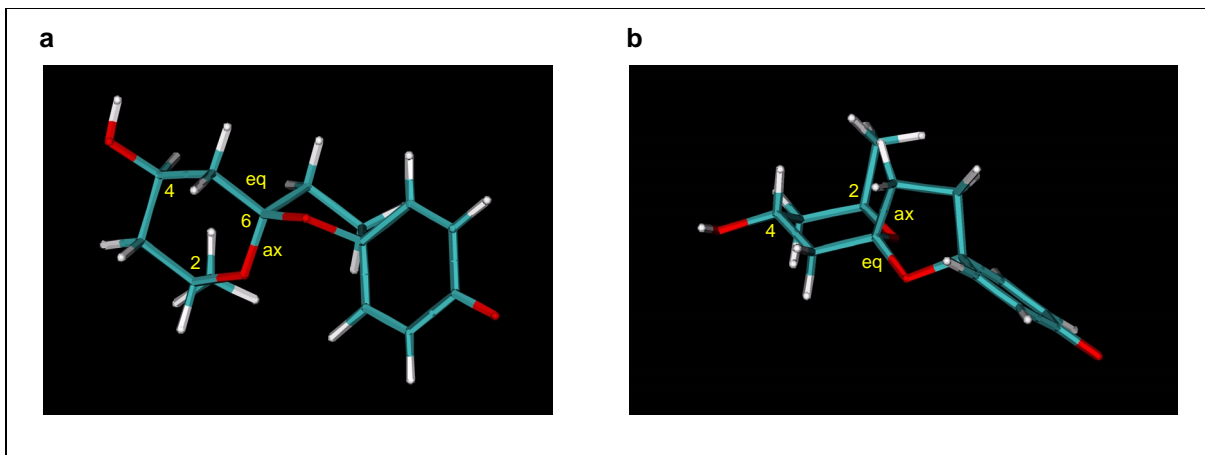


Abb. 9-3. Relevante NOE-Korrelationen bei Aculeatin A.

Abb. 9-4. Sesselkonformere von Aculeatin A [*rel*-(2*R*,4*R*,6*R*)].Abb. 9-5. Relative Orientierung der C_{spiro}-O-Bindungen bei Aculeatin A. - a) am Oxanring; b) am Oxolanring.

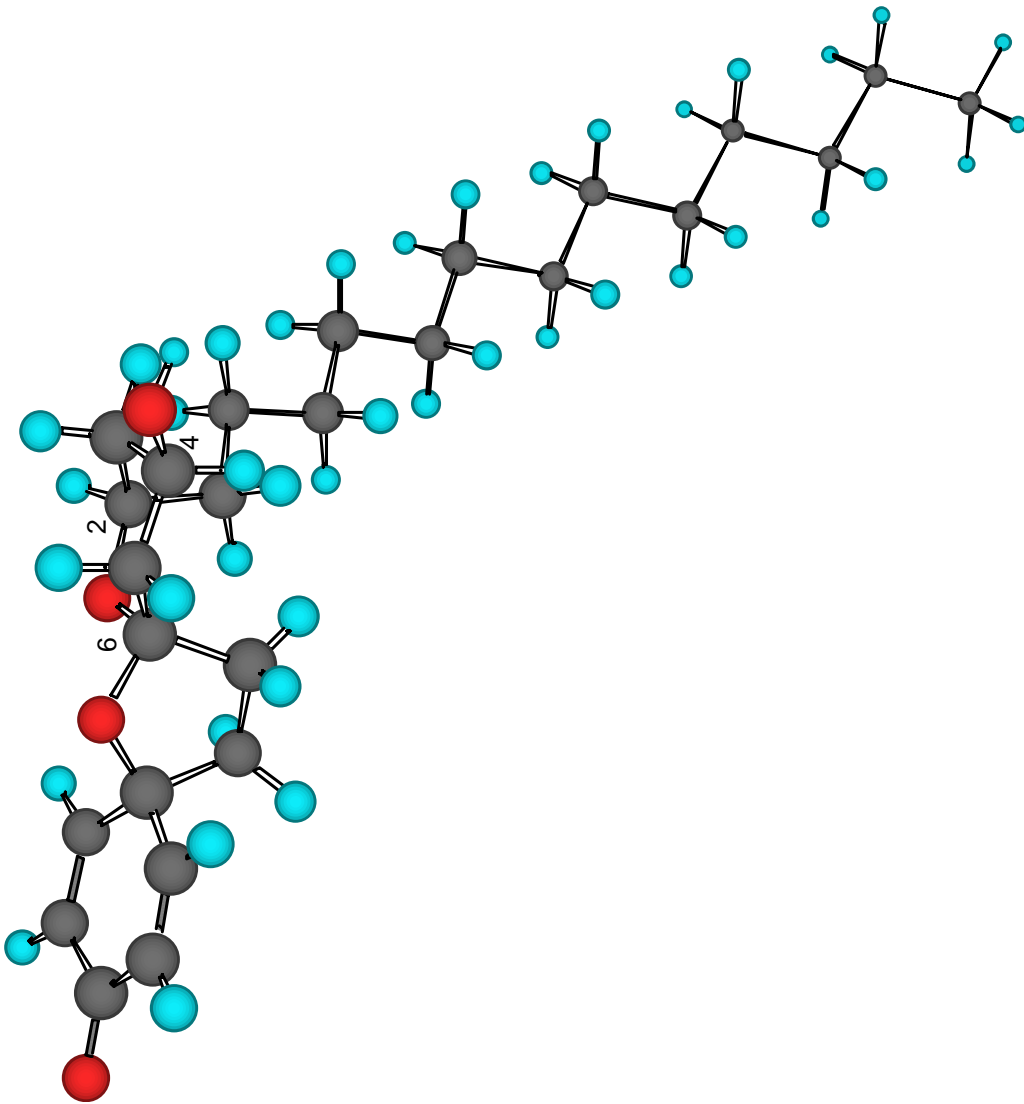


Abb. 9-6. Energieminimierte Raumstruktur von Aculeatin A [*rel*-(2*R*,4*R*,6*R*)].

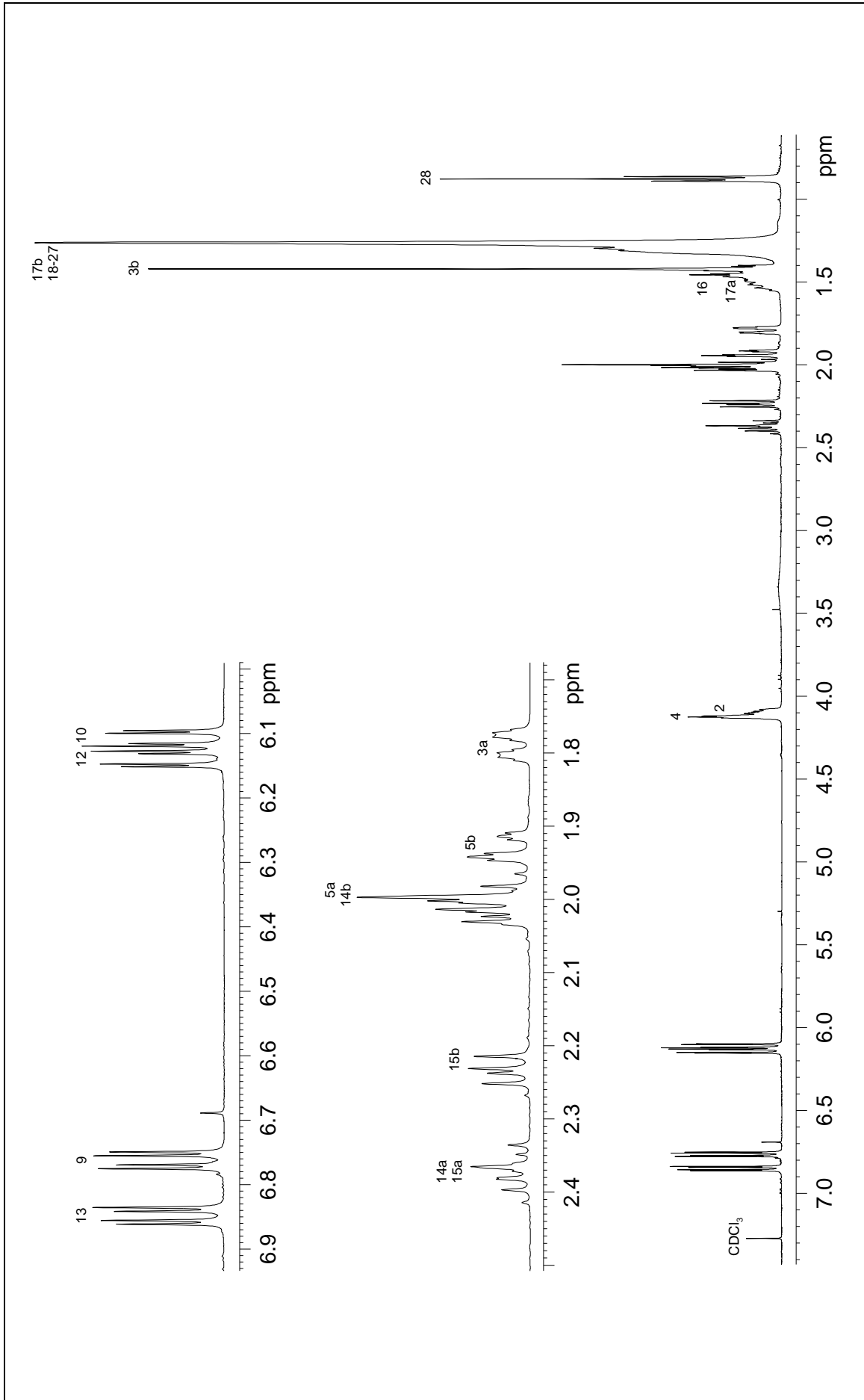


Abb. 9-7. ¹H-NMR-Spektrum von Aculeatin A (500 MHz, CDCl₃).

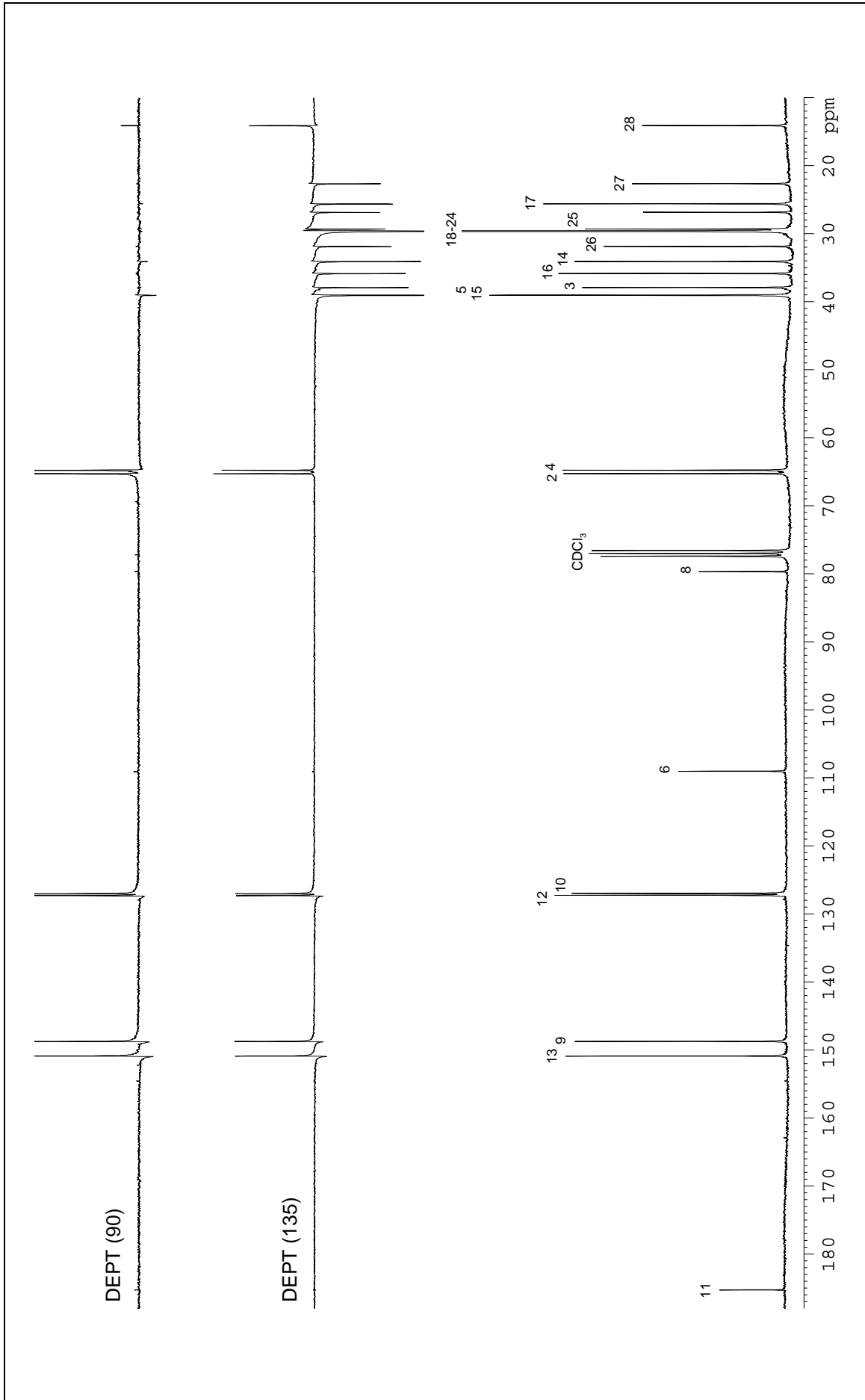


Abb. 9-8. ^{13}C -, DEPT-(90)- und DEPT-(135)-NMR-Spektren von Aculeatin A (125 MHz, CDCl_3).

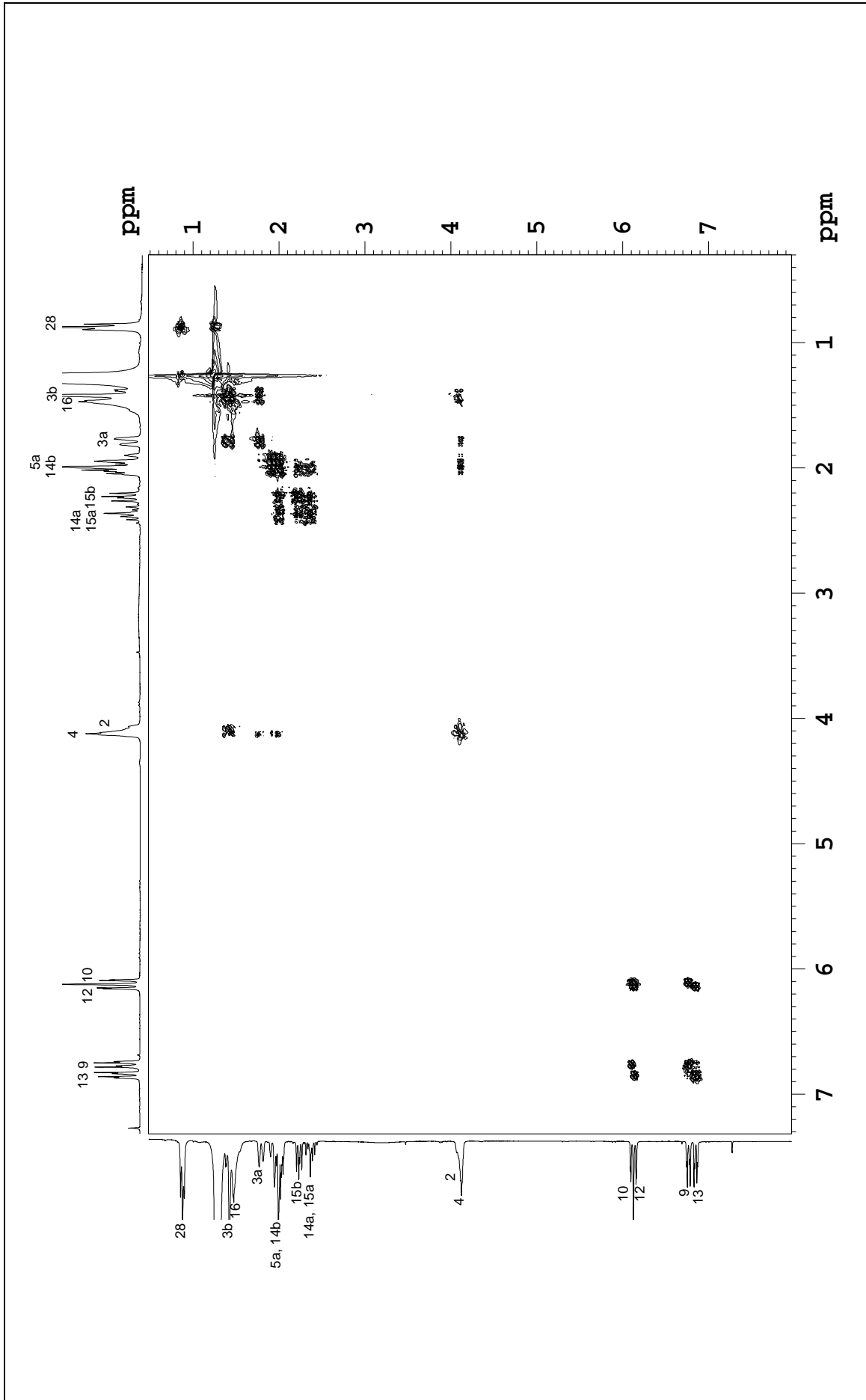


Abb. 9-9. ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von Aculeatin A (300 MHz, CDCl_3).

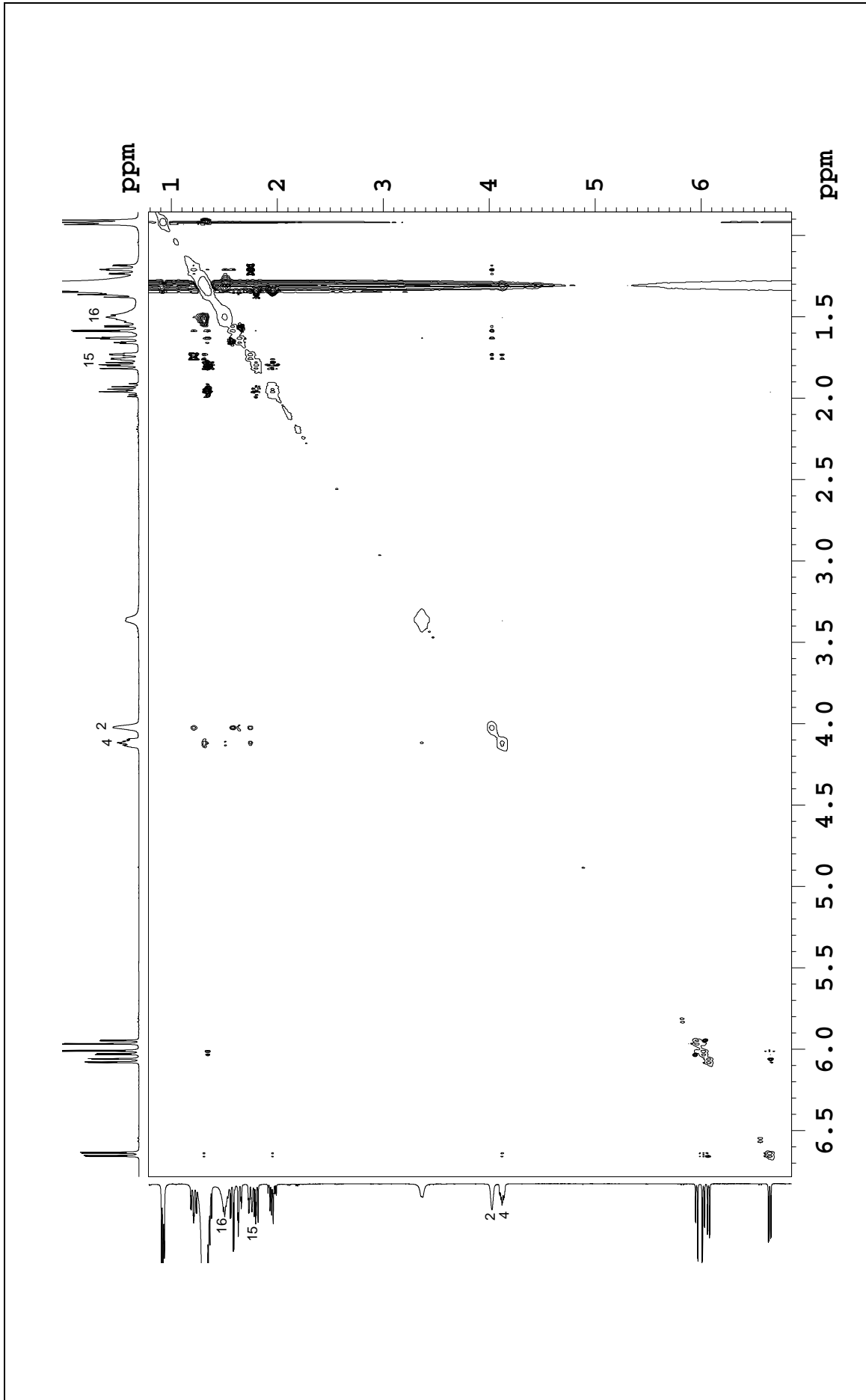


Abb. 9-10. NOESY-Spektrum von Aculeatin A (500 MHz, C₆D₆).

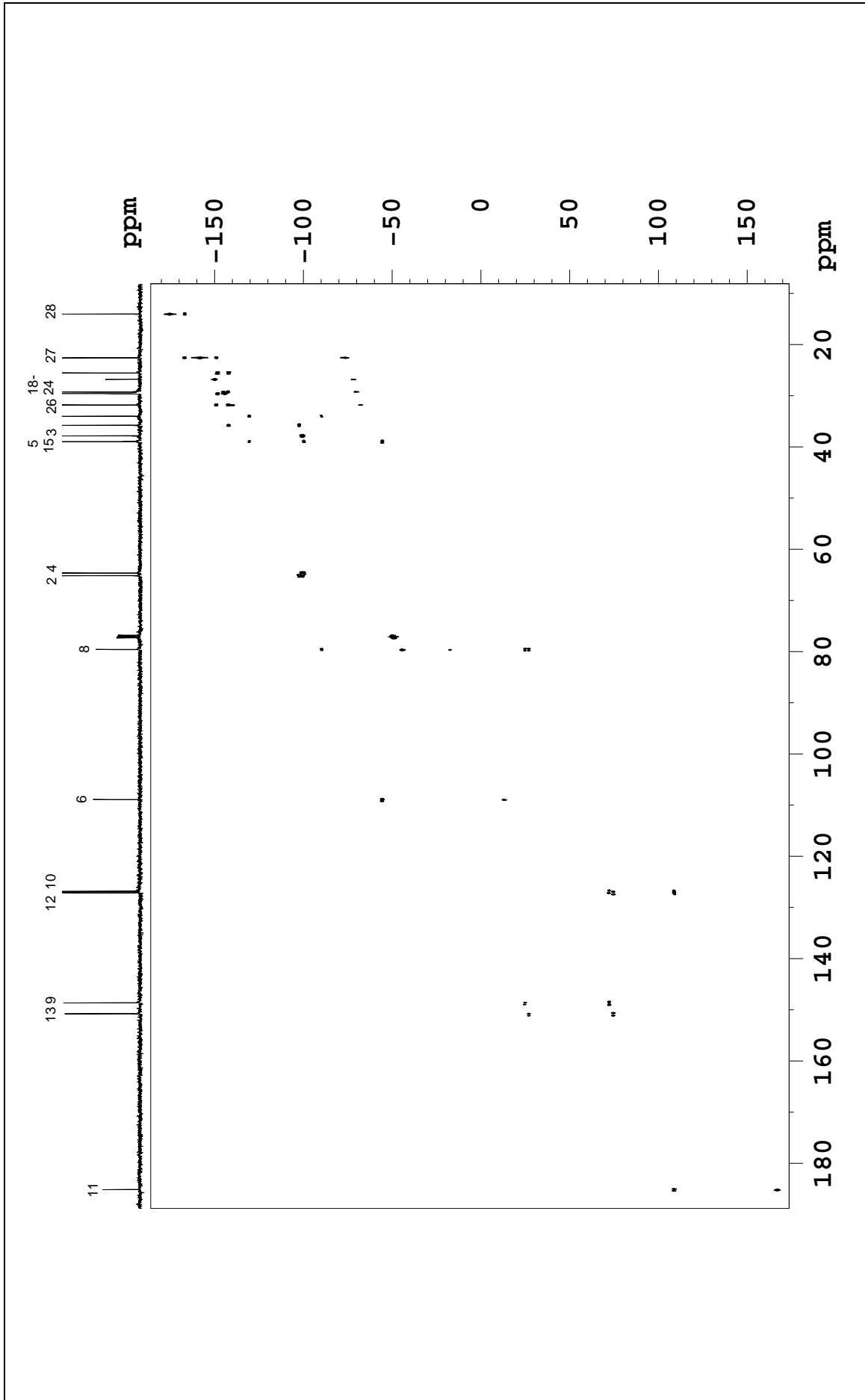


Abb. 9-11. ^{13}C , ^{13}C -INADEQUATE-Spektrum von Aculeatin A (125 MHz, CDCl_3).

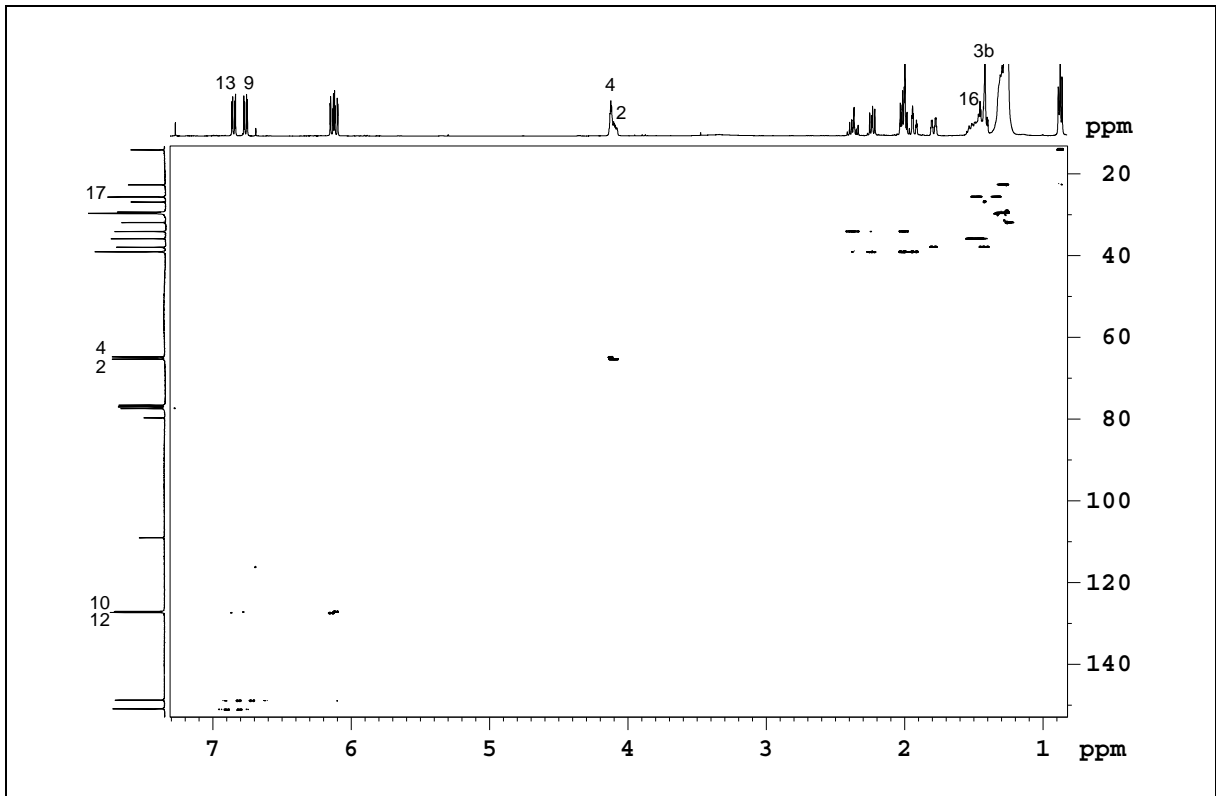


Abb. 9-12. ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektrum von Aculeatin A (500 MHz, CDCl_3).

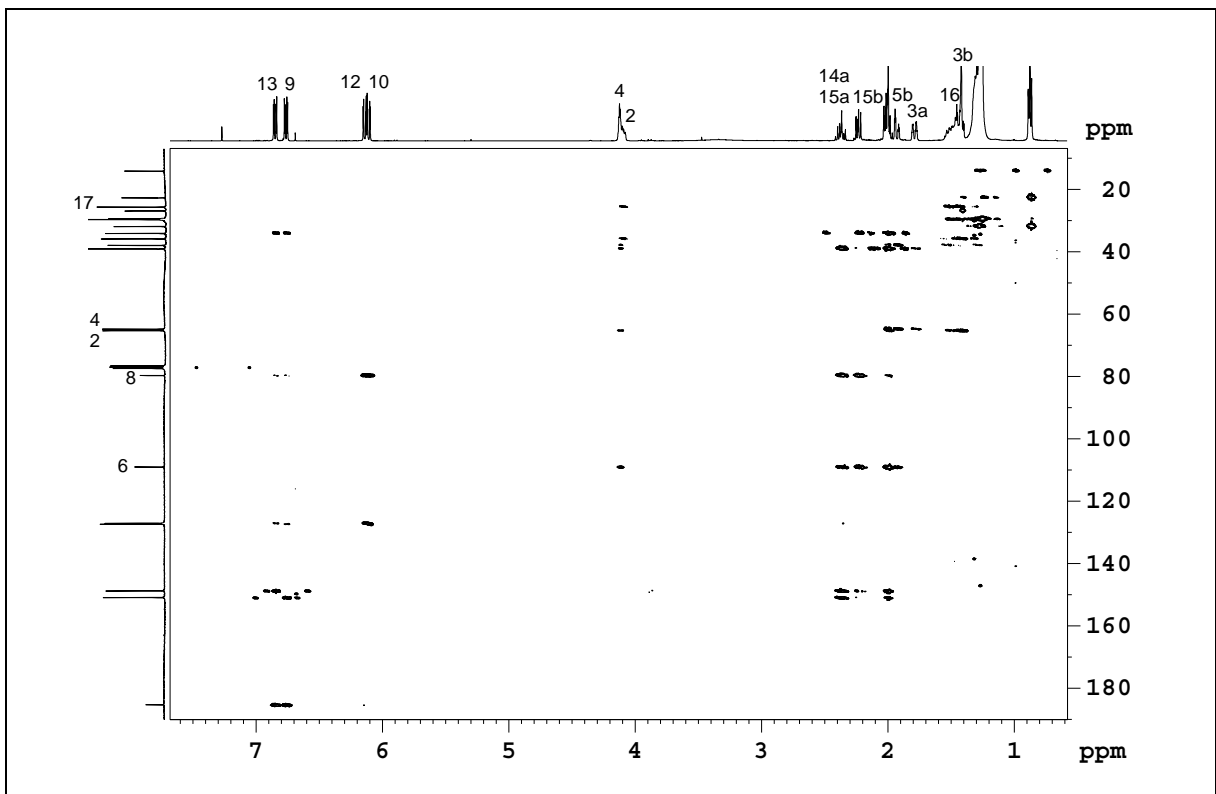


Abb. 9-13. ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum von Aculeatin A (500 MHz, CDCl_3).

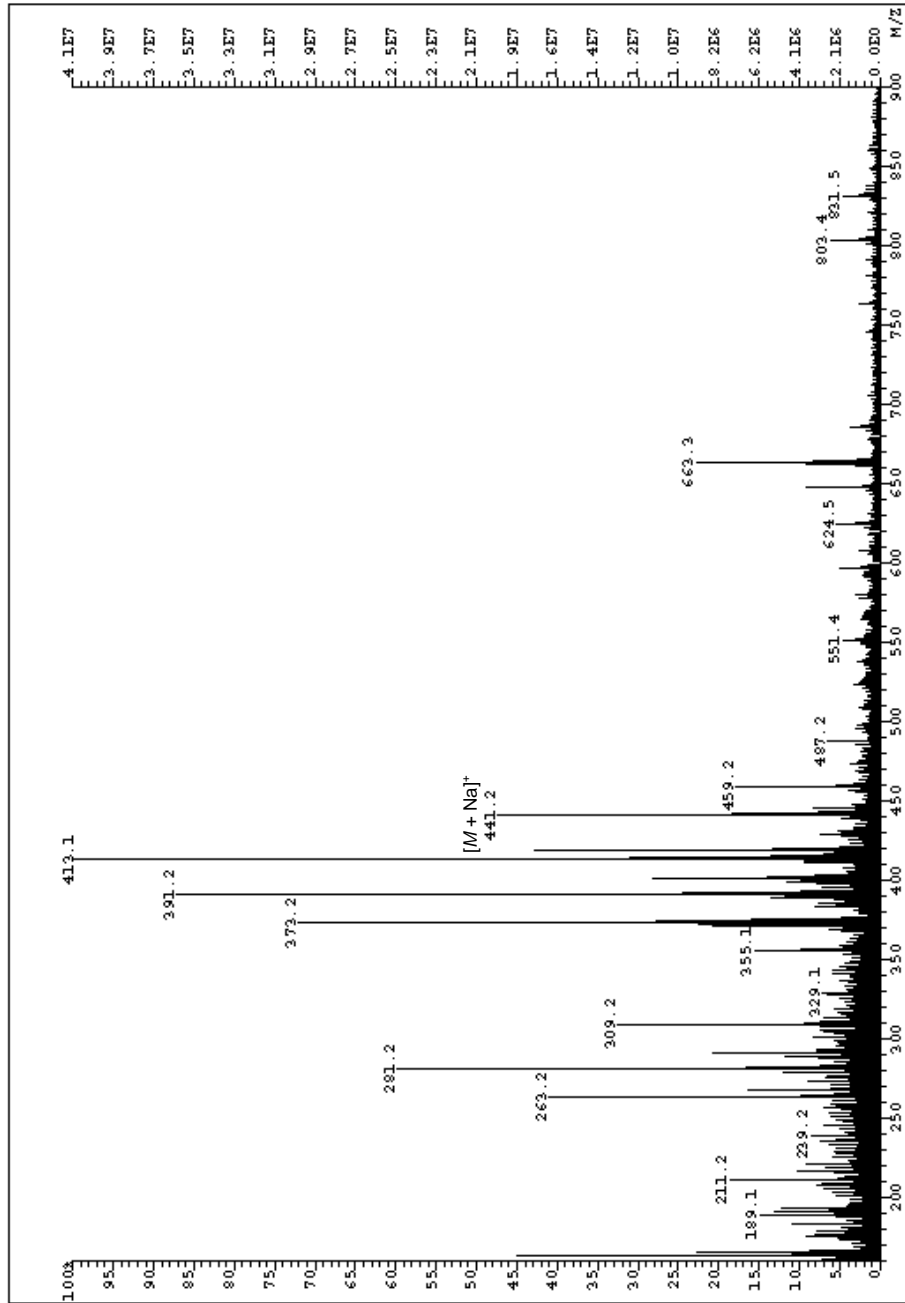


Abb. 9-14. FAB-Massenspektrum für Aculeatin A (Matrix: 3-NOBA).

9.3.2 Aculeatin B

Die zweite Reinsubstanz (s. Abb. 9-15) tritt unter Standardbedingungen als gelbes, geruchloses und in weiten Bereichen lipophiler wie hydrophiler Solventien leicht lösliches Öl auf. Wiederum zeigt sich ein symmetrischer UV-Absorptionspeak bei 230 nm mit fast identischem ϵ_λ wie Aculeatin A, wohingegen die ausgeprägte optische Aktivität im Bereich von D-Glucose liegt (vgl. Kapitel 19). Für die systematische Benennung von Aculeatin B, dessen Untergliederung in cyclische Teilstrukturen sowie die Ableitung der relativen Konfiguration an C-2, C-4 und C-6 gelten dieselben Kriterien wie für Aculeatin A (vgl. Abschnitt 9.3.1). Der einzige Unterschied zwischen beiden Komponenten liegt in der Stereochemie der Spiroketal-Einheit, so daß die Aculeatine A und B C-6-Epimere darstellen. Nur in aciden Lösungsmitteln wie CDCl_3 ließ sich die spontane Epimerisierung von Aculeatin B im Verlauf einiger Tage zu einer etwa äquimolaren Mischung aus beiden Diastereomeren beobachten, hingegen nicht in C_6D_6 .

Für die ^1H - und ^{13}C -Spektren, inklusive der DEPT-(90)- und DEPT-(135)-Experimente, lagen fast alle Resonanzsignale bei den Werten von Aculeatin A (s. Abb. 9-20, 9-21 auf S. 93, 94). Geringe Shift-Differenzen wiesen lediglich H-2 (+ 0,24 ppm), H-4 (− 0,23 ppm) und H-15a (− 0,32 ppm) auf, neben einer markanten Tieffeldverschiebung von C-2 (− 4,6 ppm) (s. Tab. 9-2 auf S. 89).

Auswertungen der ^1H , ^1H -COSY-, ^1H , ^1H -TOCSY-, ^1H , ^{13}C -HSQC- und ^1H , ^{13}C -HMBC-Aufzeichnungen ergaben dieselben Korrelationen wie für Aculeatin A, was das Vorlie-

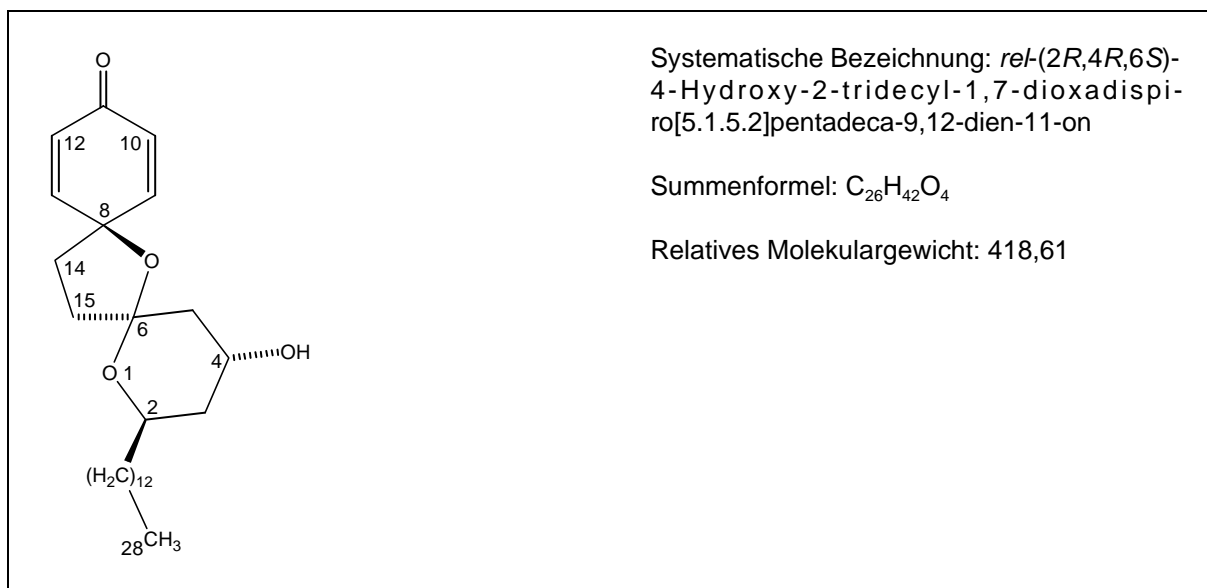


Abb. 9-15. Substanzcharakterisierung für Aculeatin B.

Tab. 9-2. ^1H - (500 MHz)- und ^{13}C - (125 MHz)-NMR-Daten für Aculeatin B in CDCl_3 . δ in ppm, J in Hz. Numerierung gemäß Nomenklatur.

Atom Nr.	Multiplizität	δ (^1H)	δ (^{13}C)	HMBC-Korrelationen
2	CH	3,86 (<i>m</i>)	69,4 (<i>d</i>)	H-3b, H-4, H-5b, H ₂ -16
3	CH ₂	1,62 (<i>m</i>); 1,55 (<i>m</i>)	37,8 (<i>t</i>)	H-4, H-5b, H-14b, H ₂ -16
4	CH	4,35 (<i>m</i>)	65,0 (<i>d</i>)	H-3a, H-5b, H-14b
5	CH ₂	2,08 (<i>m</i>); 1,88 (<i>m</i>)	40,5 (<i>t</i>)	H-3a, H-4, H ₂ -14, H-15a
6	C		108,5 (<i>s</i>)	H-2, H-5b, H ₂ -14, H ₂ -15
8	C		77,5 (<i>s</i>)	H-9, H-10, H-12, H-13, H-14a, H ₂ -15
9	CH	6,78 (<i>dd</i> , $J = 2,9; 10$)	149,3 (<i>d</i>)	H-13, H ₂ -14, H ₂ -15
10	CH	6,11 (<i>dd</i> , $J = 2; 10$)	127,0 (<i>d</i>)	H-12, H-13
11	C		185,7 (<i>s</i>)	H-9, H-13
12	CH	6,13 (<i>dd</i> , $J = 2; 10$)	127,0 (<i>d</i>)	H-9, H-10
13	CH	6,99 (<i>dd</i> , $J = 2,9; 10$)	152,4 (<i>d</i>)	H-9, H ₂ -14, H-15a
14	CH ₂	2,30 (<i>m</i>); 2,04 (<i>m</i>)	35,2 (<i>t</i>)	H-5b, H-9, H-13, H-15b
15	CH ₂	2,69 (<i>ddd</i> , $J = 1,2; 6,2; 12,1$); 1,92 (<i>m</i>)	35,3 (<i>t</i>)	H-3a, H-4, H ₂ -14
16	CH ₂	1,59 (<i>m</i>); 1,42 (<i>m</i> [*])	35,7 (<i>t</i>)	H-2, H-3b, H-17b, H ₂ -18
17	CH ₂	1,48 (<i>m</i> [*]); 1,35 (<i>m</i> [*])	25,9 (<i>t</i>)	H-2, H-3b, H ₂ -16
18	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H-17a, H ₂ -19, H ₂ -20
19	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H-17a, H ₂ -18, H ₂ -20
20-22	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H ₂ -18, H ₂ -19, H ₂ -23
23	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H ₂ -21, H ₂ -22, H ₂ -24
24	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H ₂ -23, H ₂ -25, H ₂ -26
25	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,3 (<i>t</i>)	H ₂ -24, H ₂ -26, H ₂ -27
26	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	31,9 (<i>t</i>)	H ₂ -27, H ₃ -28
27	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	22,7 (<i>t</i>)	H ₂ -26, H ₃ -28
28	CH ₃	0,87 (<i>t</i> , $J = 6,9$)	14,1 (<i>q</i>)	

* Kopplungskonstanten infolge Signalüberlappung nicht zuzuordnen

gen von Diastereomeren bestätigte. Die entscheidenden Differenzen zwischen beiden Molekülen folgten schließlich aus NOESY- (s. Abb. 9-22 auf S. 95) und ROESY-Experimenten, wonach ein relevanter NOE nur für H-2 \leftrightarrow H-15a existiert, für H-2 \leftrightarrow H-4 hingegen nicht, so daß auch hier die Hydroxygruppe an C-4 und die Alkylkette an C-2 relativ zum Oxanring verschiedenartige Orientierungen einnehmen. Wie bei Aculeatin A sind die räumlichen Konnektivitäten um der Übersichtlichkeit willen wiederum am 3D-Modell mit stark verkürztem Alkylrest ($-\text{CH}_3$) dargestellt. Entsprechende Überlegungen zur sterischen Variabilität des Oxanringes führten auch hier - in Analogie mit Aculeatin A - zu zwei möglichen Sesselkonformeren (s. Abb. 9-17 auf S. 91), von denen sich abermals nur die Anordnung links des Doppelpfeils mit axialer Stellung der Hydroxy-

gruppe in NMR-Messungen bestätigte. Im Zuge der Epimerisierung fand somit ein Positionswechsel der Substituenten an C-2 und C-4 von axial nach äquatorial und umgekehrt statt, freilich ohne Änderung der relativen Konfigurationen an diesen Zentren. Die C_{spiro}-O-Bindungen von Oxan- wie Oxolanring zeigen bei wechselseitiger Blickrichtung zweimal äquatoriale Orientierung (vgl. S. 78), so daß nach der klassischen Definition kein anomerer Effekt vorliegt (s. Abb. 9-18 auf S. 91). Abbildung 9-19 auf Seite 92 verdeutlicht die dreidimensionale, energieminierte Gesamtdarstellung für Aculeatin B. Nach umfangreichen Recherchen in Datenbanken der American Chemical Society stellte sich klar heraus, daß die Aculeatine A - C bereits auf der Ebene des 1,7-Dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-on-Grundgerüsts vollkommen neuartige Strukturtypen darstellen, für die noch nie eine Isolierung oder Synthese beschrieben worden war.

Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben in der DEI-Aufnahme (s. Abb. 9-23 auf S. 96) das Pseudomolekülion $[M + H]^+$ bei m/z 419 unter Bezug auf M_E 418 und somit ein mit Aculeatin A identisches relatives Molekulargewicht (vgl. Heilmann et al., 2000a, 2940-2942).

Auch Aculeatin B wurde zur Messung der anomalen Röntgenbeugung mit 4-Brombenzoesäurechlorid in Pyridin verestert, wobei die dünnschichtchromatographische Analyse der OCC-Fractionen neben dem gewünschten Derivat (Ausbeute: etwa 40 %) noch 4-Brombenzoesäure, dessen dimeres Anhydrid, das Ausgangsreagenz sowie den Aculeatin-A-Ester als Bestandteile des Reaktionsgemisches anzeigte. Leider führten die anschließenden Kristallisationsversuche noch zu keinen brauchbaren Kristallen (vgl. Abschnitte 16.1 bis 16.4; Kapitel 17).

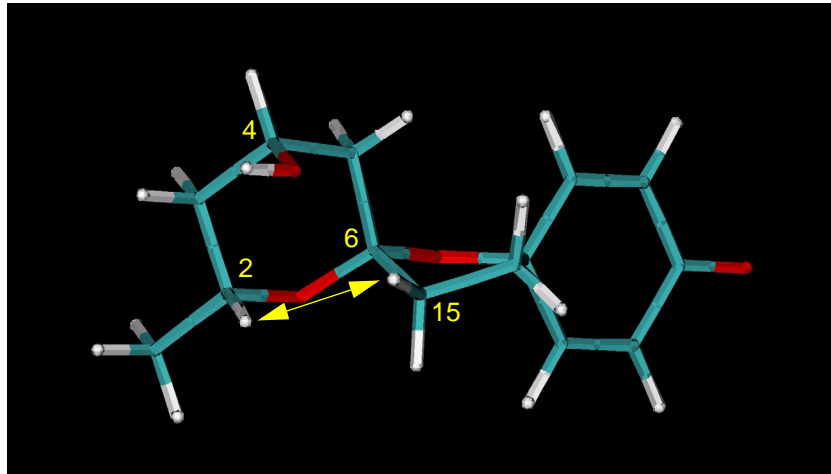
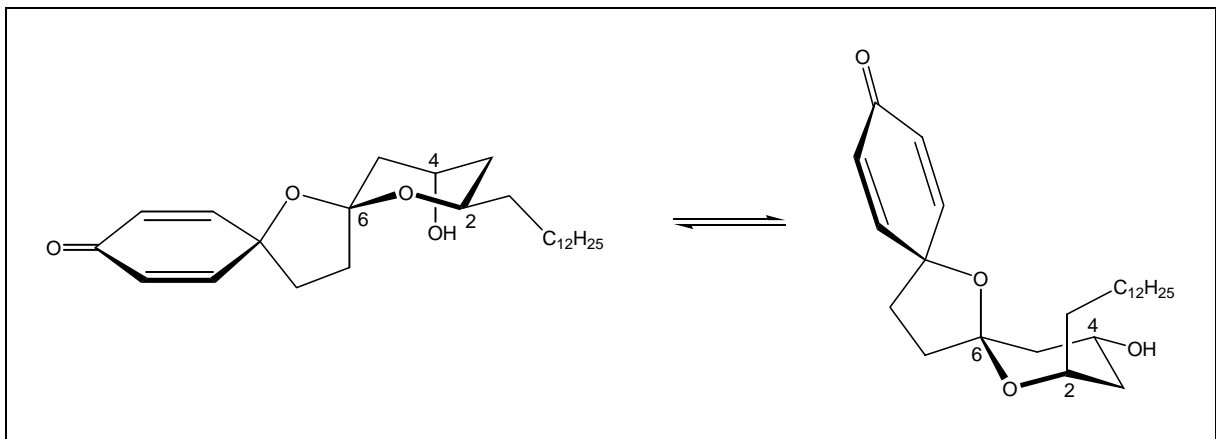
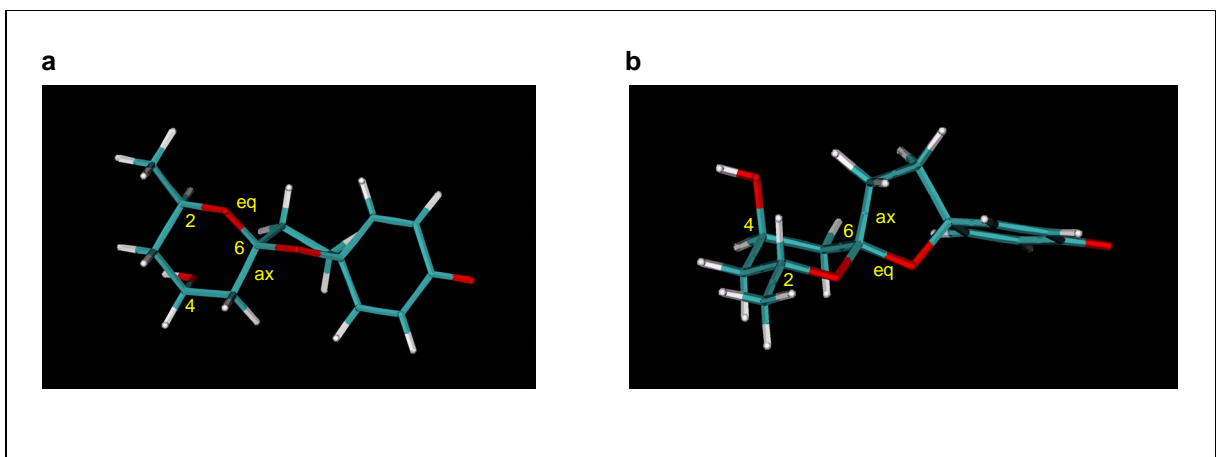


Abb. 9-16. Relevante NOE-Korrelation bei Aculeatin B.

Abb. 9-17. Sesselkonformere von Aculeatin B [*rel*-(2*R*,4*R*,6*S*)].Abb. 9-18. Relative Orientierung der C_{spiro}-O-Bindungen bei Aculeatin B. - a) am Oxanring; b) am Oxolanring.

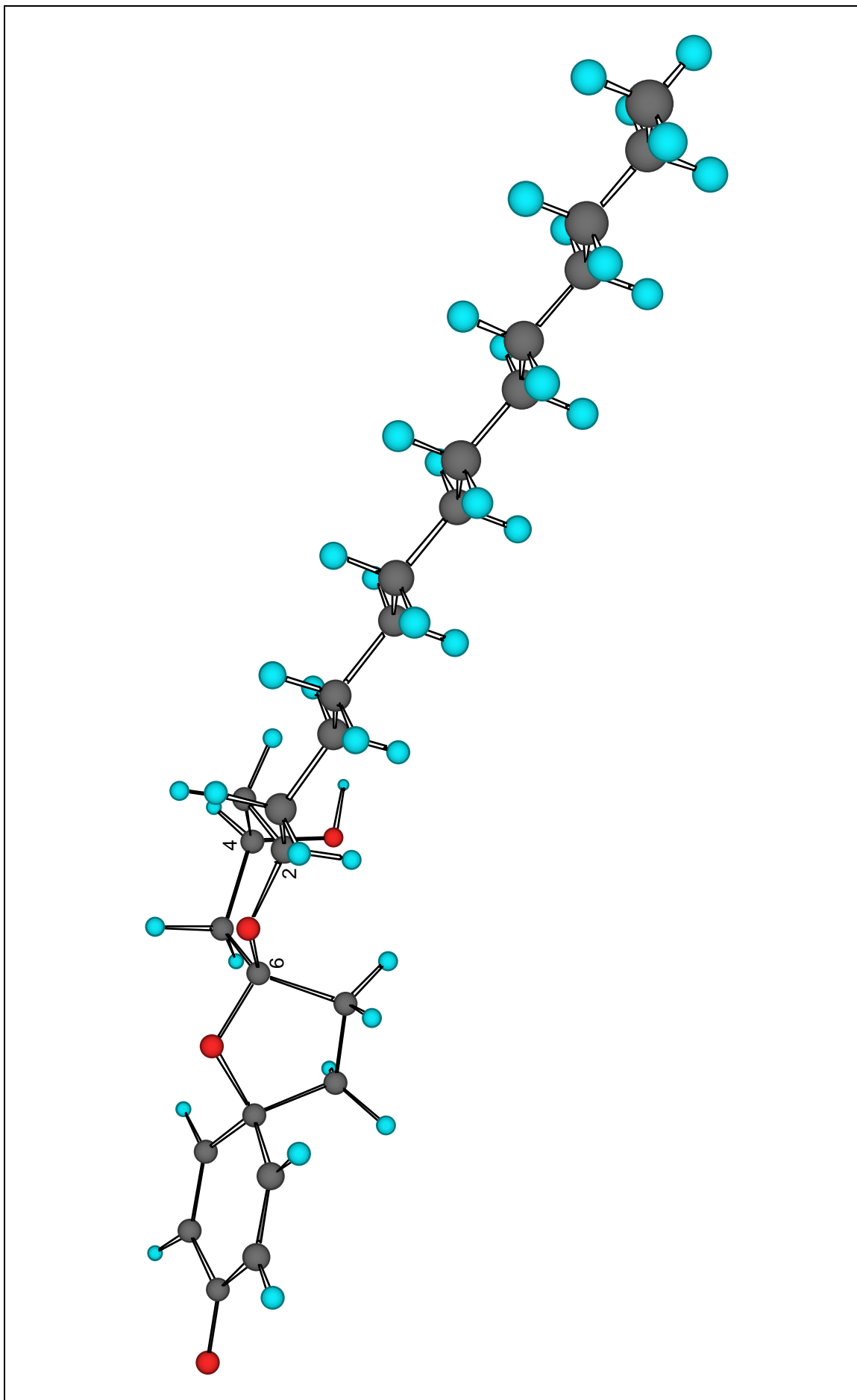
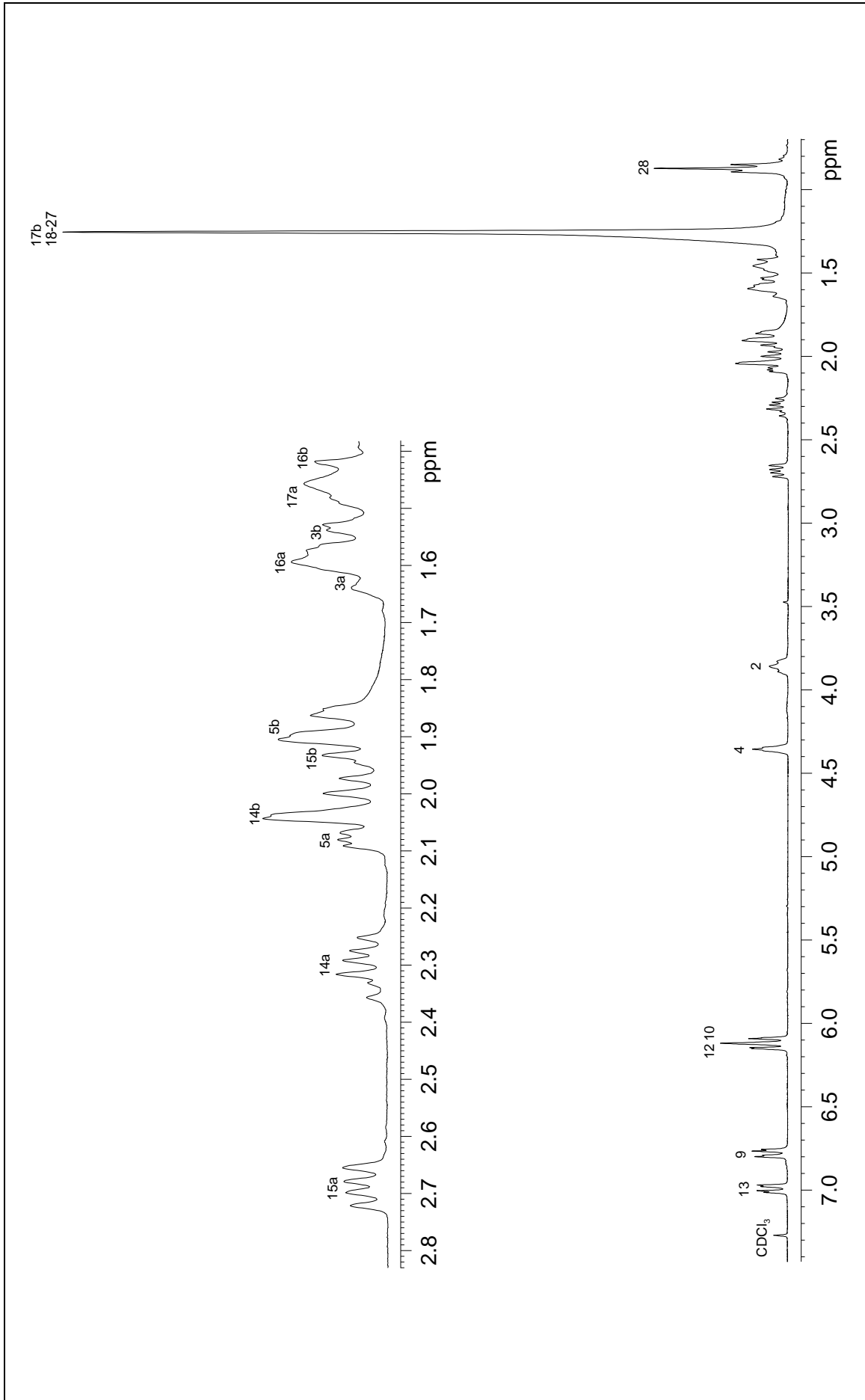


Abb. 9-19. Energie minimierte Raumstruktur von Aculeatin B [*ref*-(2*R*,4*R*,6*S*)].

Abb. 9-20. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Aculeatin B (300 MHz, CDCl_3).

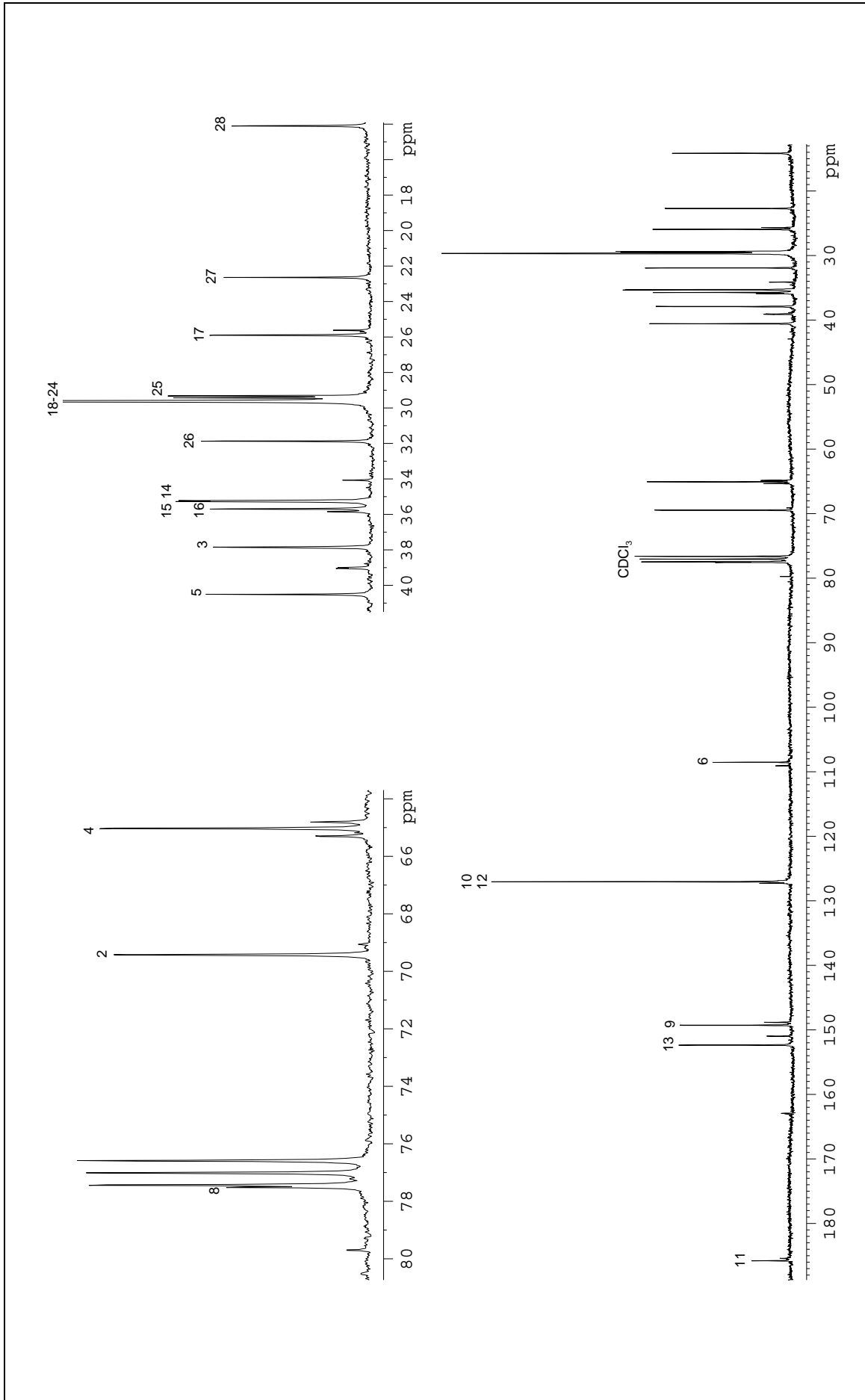


Abb. 9-21. $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Aculeatin B (75 MHz, CDCl_3).

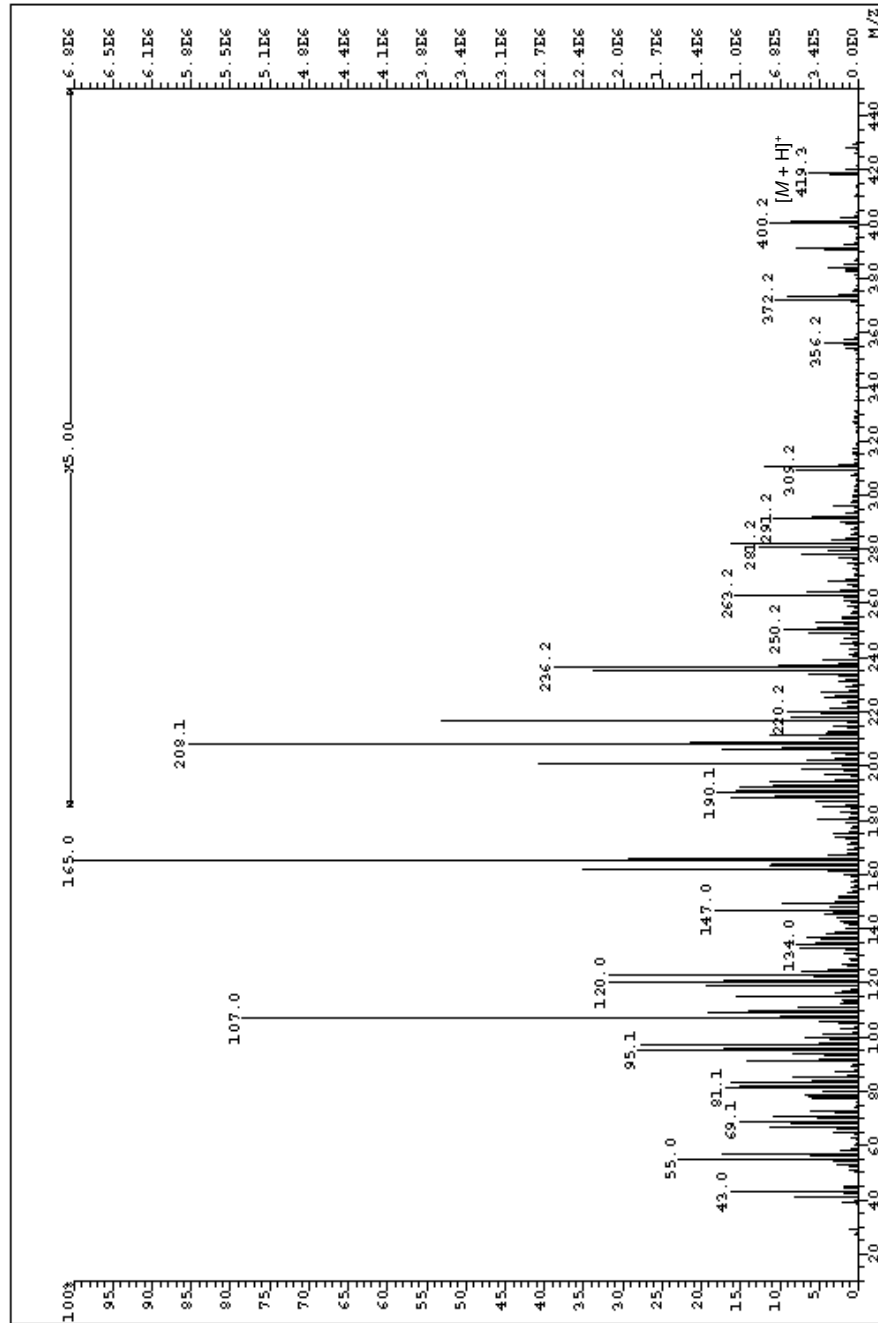


Abb. 9-23. DEI-Massenspektrum für Aculeatin B.

9.3.3 Aculeatin C

Die dritte und strukturell komplizierteste Reinsubstanz läßt sich unter Standardbedingungen in Form eines blaßgelben, geruchlosen, in lipophilen wie hydrophilen Solventien gleichermaßen gut löslichen Öles isolieren. Das UV-Absorptionsmaximum liegt in diesem Fall bei 227 nm mit ϵ_λ im Bereich von Aculeatin A/B; die optische Aktivität fällt nur gering aus (vgl. Kapitel 19). Für die systematische Benennung von Aculeatin C, die strukturelle Untergliederung seines Dispiro-Systems sowie die Festlegung der relativen Konfiguration gelten die unter Abschnitt 9.3.1 genannten Richtlinien, wenngleich hier ein zusätzlicher Dienonring (C-20 bis C-25) mit einem vierten, NMR-meßtechnisch bislang nicht zugänglichen Stereozentrum an C-22 vorhanden ist. Bis auf den Alkylrest an C-2 stimmt die Dioxadispirodienon-Einheit konstitutiv wie konfiguratativ exakt mit derjenigen von Aculeatin B (vgl. Abschnitt 9.3.2) überein. Im Gegensatz zu der unter Säureausschluß recht befriedigenden Stabilität der Aculeatine A und B zersetzte sich das

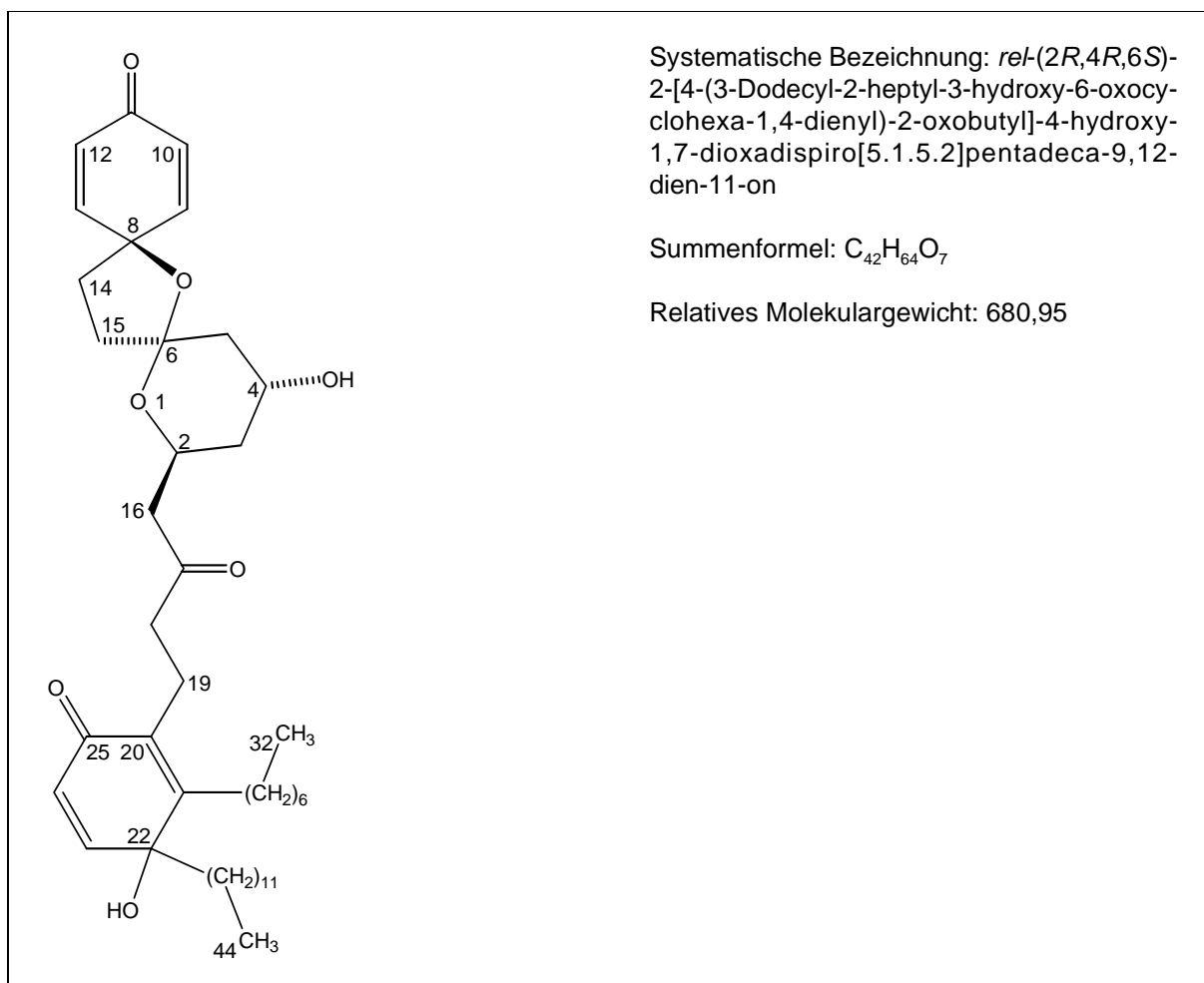


Abb. 9-24. Substanzcharakterisierung für Aculeatin C [*rel*-(2*R*,4*R*,6*S*)].

Aculeatin C - im TL-Chromatogramm durch Fragmente ersichtlich - wenige Tage nach der Isolierung trotz Kühlung und N₂-Begasung zu einer weißen, wachsartigen Masse.

Die Signale im ¹H-NMR-Spektrum (s. Abb. 9.25 auf S. 100) zeigten erwartungsgemäß gute Übereinstimmung mit den Resonanzabsorptionen von Aculeatin B. Für die terminalen CH₃-Gruppen (C-32, C-44) bei 0,88 ppm ergab die Integration insgesamt sechs Protonen, während die beiden ¹H-Kerne der zusätzlichen Dienon-Einheit bei 6,81 ppm (H-23) beziehungsweise 6,20 ppm (H-24) lagen (beide *d*, *J* = 10 Hz) (s. Tab. 9-3 auf S. 99). Neben den charakteristischen Peaks für das 1,7-Dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-on-Skelett erschien im ¹³C-NMR-Spektrum (s. Abb. 9-26 auf S. 101) eine weitere Carbonyl-Resonanz (C-25) bei 185,2 ppm. Darüber hinaus sprachen die beiden quartären C-Atome (C-21, C-20) bei 150,4 ppm und 126,8 ppm, die beiden olefinischen C-Atome (C-23, C-24) bei 150,4 ppm und 128,5 ppm sowie das Singulett von C-22 bei 69,2 ppm für die Anwesenheit einer zweiten, substituierten Cyclohexadienon-Gruppierung. Der δ -Wert von C-17 bei 210,6 ppm bezeichnete eine weitere Ketogruppe außerhalb der Dienonringe, das aufgespaltene Signal der terminalen CH₃-Gruppen im ¹³C-Inverse-Gated-Decoupling-Experiment hingegen die Existenz zweier Alkylketten (vgl. Heilmann et al., 2000a, 2941 f.).

Zweidimensionale NMR-Spektren, konkret ¹H,¹H-COSY-, ¹H,¹³C-HSQC- und ¹H,¹³C-HMBC- (s. Abb. 9-27 auf S. 102) Aufnahmen, erlaubten die Kombination aller Teilstrukturen zum Gesamtmolekül sowie die wechselseitige Zuordnung aller ¹H- und ¹³C-Signale. Wichtige HMBC-Korrelationen lagen zwischen H₂-26 (2,06 ppm) und C-21 (150,4 ppm) sowie H₂-16 (2,55 ppm) und C-17 (210,6 ppm) neben C-2 (67,8 ppm) vor, wichtige HSQC-Korrelationen für H₂-19 (2,50 ppm) und C-20 (126,8 ppm) sowie H₂-33 (1,48/1,38 ppm) und C-22 (69,2 ppm). Die ausschlaggebenden NOESY- und ROESY-Konnektivitäten des Dispirans stimmten exakt mit den Kreuzpeaks bei Aculeatin B überein. Ein ¹³C,¹³C-INADEQUATE-Experiment sicherte letztendlich in Kombination mit den übrigen NMR-Daten den Aufbau des C-Grundgerüsts ab. Sämtliche Überlegungen bezüglich Aculeatin B (vgl. Abschnitt 9.3.2) zur Konfiguration wie Konformation des Oxanringes gelten ohne Einschränkung auch für Aculeatin C, so daß an dieser Stelle - auch aus Gründen der Übersicht - auf eine 3D-Formel verzichtet werden kann.

Das DEI-Massenspektrum ergab ein Pseudomolekülion [*M* - H₂O]⁺ bei *m/z* 662 (s. Abb. 9-28 auf S. 103), die DCI-MS-Aufnahme ein Pseudomolekülion [*M* - H]⁺ bei *m/z* 679, jeweils bezogen auf M_E 680.

Tab. 9-3. ^1H -(500 MHz)- und ^{13}C -(125 MHz)-NMR-Daten für Aculeatin C in CDCl_3 . δ in ppm, J in Hz. Numerierung gemäß Nomenklatur.

Atom Nr.	Multiplizität	δ (^1H)	δ (^{13}C)	HMBC-Korrelationen
2	CH	4,03 (<i>m</i>)	67,8 (<i>d</i>)	H ₂ -16
3	CH ₂	1,48 (<i>m</i> [*])	38,4 (<i>t</i>)	H ₂ -16
4	CH	4,26 (<i>m</i>)	70,1 (<i>d</i>)	H-5a
5	CH ₂	2,09 (<i>m</i> [*]); 1,82 (<i>dd</i> , $J = 2,1; 14,2$)	44,6 (<i>t</i>)	
6	C		108,4 (<i>s</i>)	H ₂ -5, H-15b
8	C		78,1 (<i>s</i>)	H-12
9	CH	6,75 (<i>dd</i> , $J = 2,9; 9,9$)	149,4 (<i>d</i>)	H-13, H-14a
10	CH	6,11 (<i>dd</i> , $J = 2; 9,9$)	126,8 (<i>d</i>)	
11	C		185,7 (<i>s</i>)	H-9
12	CH	6,14 (<i>dd</i> , $J = 2; 10$)	127,1 (<i>d</i>)	
13	CH	7,10 (<i>dd</i> , $J = 2,9; 10$)	152,4 (<i>d</i>)	
14	CH ₂	2,27 (<i>m</i>); 1,98 (<i>m</i>)	38,6 (<i>t</i>)	
15	CH ₂	2,45 (<i>m</i>); 2,06 (<i>m</i> [*])	35,0 (<i>t</i>)	
16	CH ₂	2,55 (<i>m</i> [*])	49,4 (<i>t</i>)	
17	C		210,6 (<i>s</i>)	H ₂ -16, H ₂ -18, H ₂ -19
18	CH ₂	2,08 (<i>m</i> [*])	32,8 (<i>t</i>)	
19	CH ₂	2,50 (<i>m</i> [*])	37,8 (<i>t</i>)	H ₂ -18, H ₂ -26
20	C		126,8 (<i>s</i>)	H ₂ -19
21	C		150,4 (<i>s</i>)	H ₂ -26
22	C		69,2 (<i>s</i>)	H-24, H ₂ -26, H ₂ -33
23	CH	6,81 (<i>d</i> , $J = 10$)	150,4 (<i>d</i>)	H-24, H ₂ -26
24	CH	6,20 (<i>d</i> , $J = 10$)	128,5 (<i>d</i>)	
25	C		185,2 (<i>s</i>)	H-23
26	CH ₂	2,06 (<i>m</i> [*])	35,0 (<i>t</i>)	
27	CH ₂	1,38 (<i>m</i> [*]); 1,30 (<i>m</i> [*])	25,4 (<i>t</i>)	
28-29	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H-27b
30	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	31,9 (<i>t</i>)	H ₂ -28, H ₂ -29, H ₃ -32
31	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	22,7 (<i>t</i>)	H ₂ -29, H ₂ -30, H ₃ -32
32	CH ₃	0,88 (<i>t</i> , $J = 6,9$)	14,1 (<i>q</i>)	H ₂ -30, H ₂ -31
33	CH ₂	1,48 (<i>m</i> [*]); 1,38 (<i>m</i> [*])	36,6 (<i>t</i>)	
34	CH ₂	1,30 (<i>m</i> [*])	25,1 (<i>t</i>)	
35-40	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,6 (<i>t</i>)	H-33a, H ₂ -34, H ₂ -41
41	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	29,3 (<i>t</i>)	
42	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	31,9 (<i>t</i>)	H ₂ -41, H ₂ -43, H ₃ -44
43	CH ₂	1,35-1,25 (<i>m</i> [*])	22,7 (<i>t</i>)	H ₂ -42, H ₃ -44
44	CH ₃	0,88 (<i>t</i> , $J = 6,9$)	14,1 (<i>q</i>)	H ₂ -43

* Kopplungskonstanten infolge Signalüberlappung nicht zuzuordnen

Bedingt durch den raschen Zerfall von Aculeatin C selbst unter inerten Verhältnissen wurde darauf verzichtet, in Analogie zu den Aculeatinen A/B entsprechende Derivate zu synthetisieren sowie Kristallisationsansätze zu bereiten.

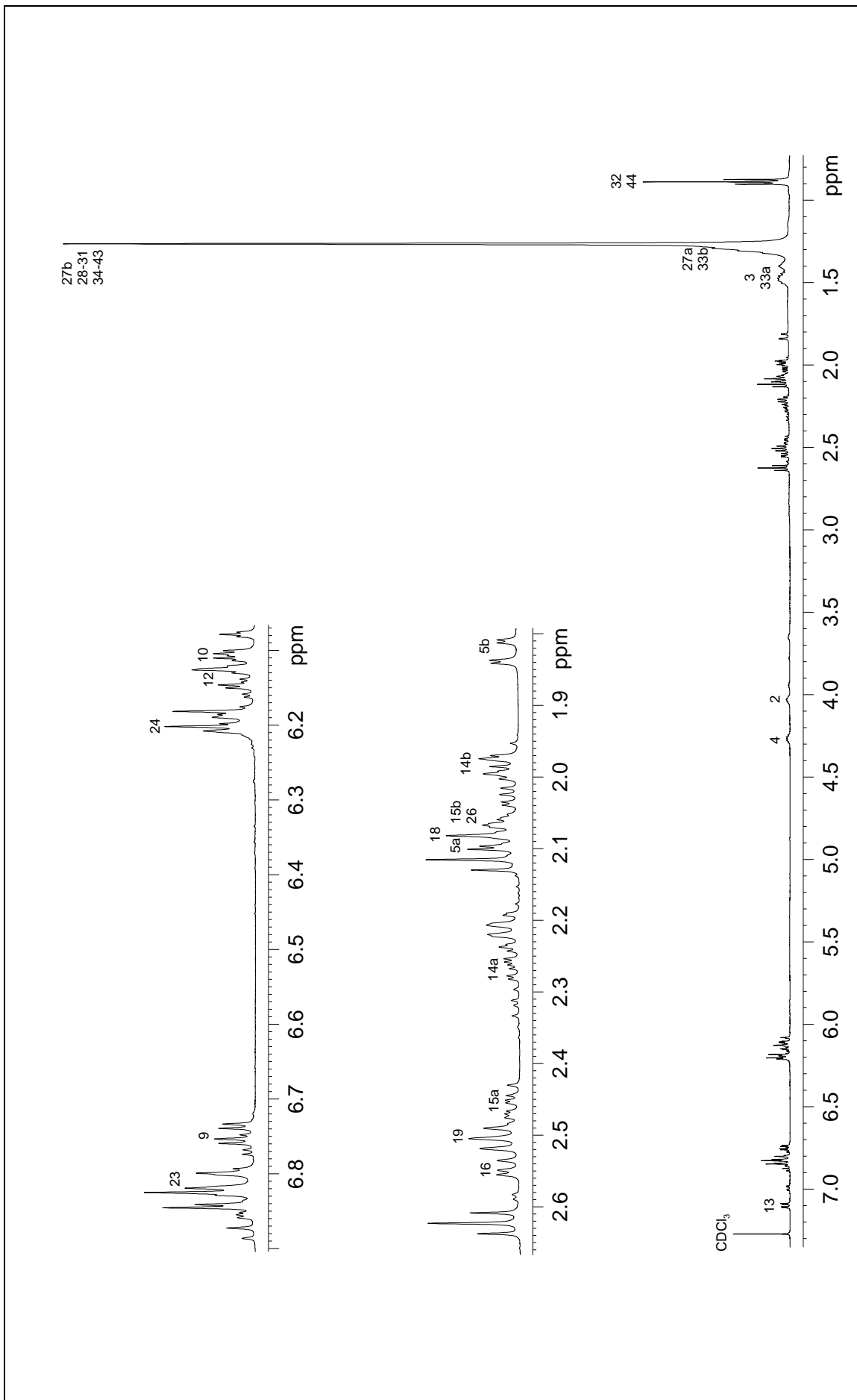


Abb. 9-25. ¹H-NMR-Spektrum von Aculeatin C (500 MHz, CDCl₃).

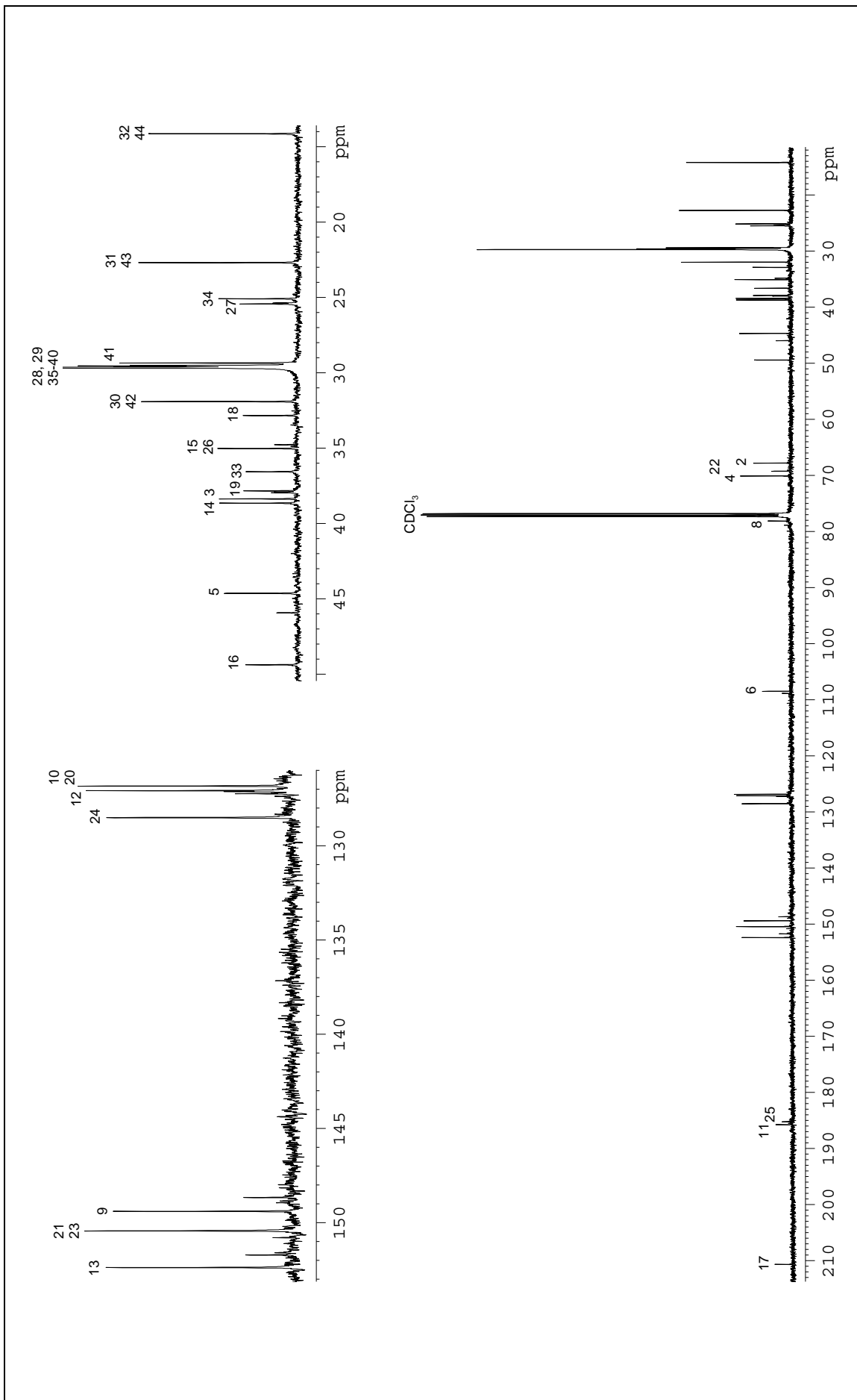


Abb. 9-26. ¹³C-NMR-Spektrum von Aculeatin C (125 MHz, CDCl₃).

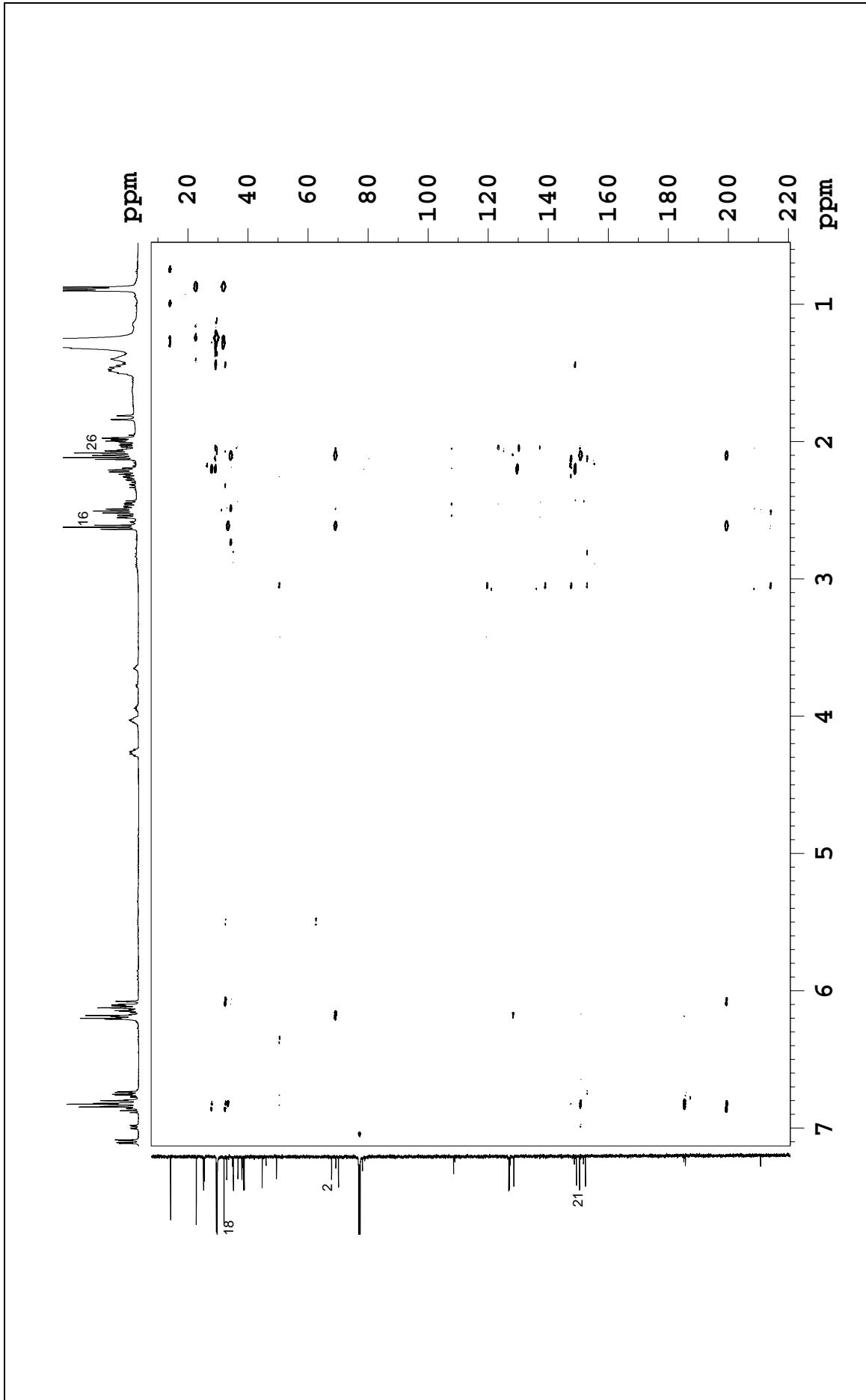


Abb. 9-27. ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum von Aculeatin C (500 MHz, CDCl_3).

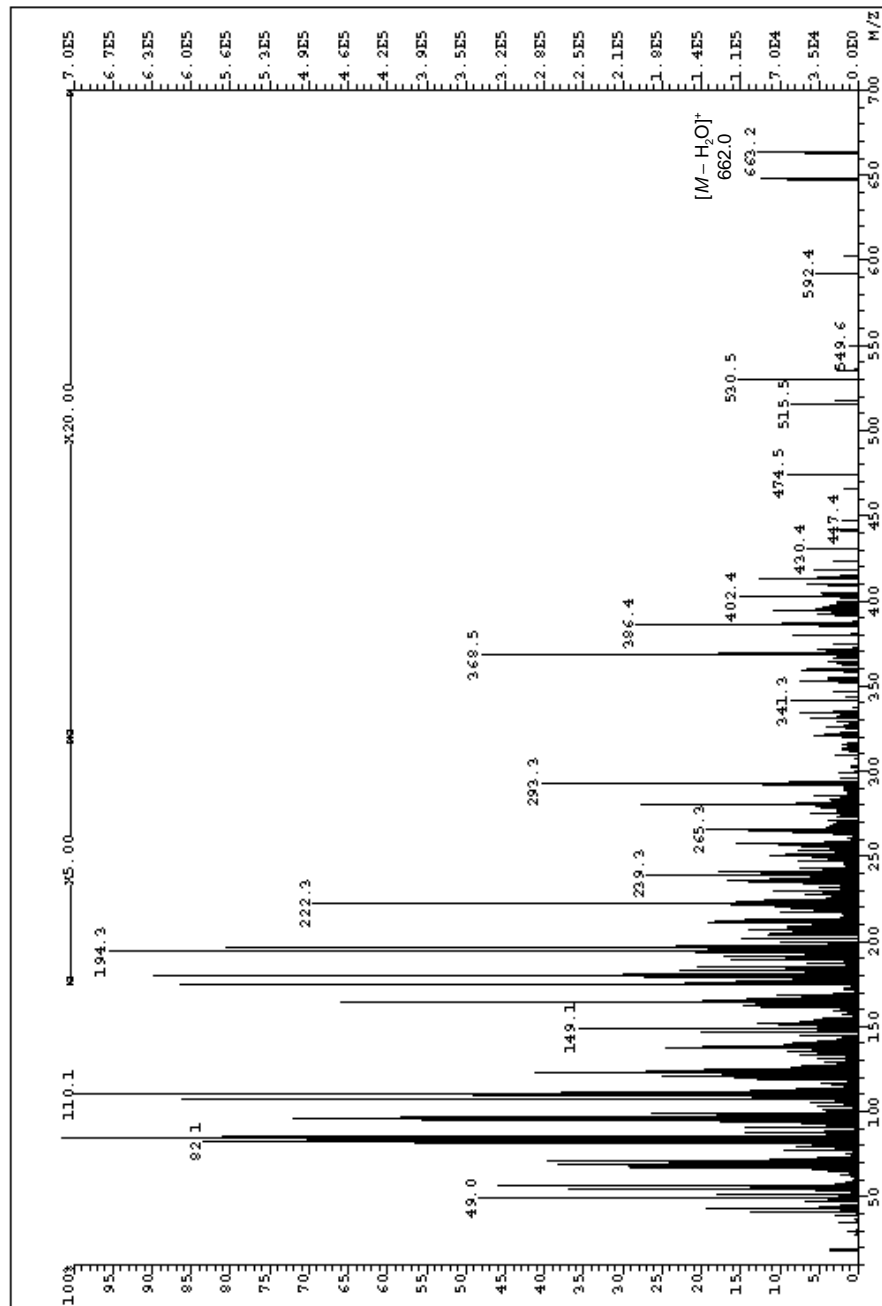


Abb. 9-28. DEI-Massenspektrum für Aculeatin C.

10 Bioaktivität von Rohextrakt und Reinsubstanzen

10.1 Bakterien und Pilze

Die Ergebnisse für die Prüfung der Aculeatine A - C an ausgewählten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie einem Sproßpilz mittels der Verdünnungsmethode lassen sich Tabelle 10-1 auf Seite 105 entnehmen.

Auf der Basis der MIC-Werte, angegeben in den Einheiten „ $\mu\text{g mL}^{-1}$ “ (= ppm) neben „ μM “, erfolgte der Vergleich mit den bekannten Aktivitäten ausgewählter Referenzsubstanzen, konkret Chloramphenicol ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$; M_R 323,13), Tetracyclinhydrochlorid ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$; M_R 480,91), 5-Fluorcytosin ($\text{C}_4\text{H}_4\text{FN}_3\text{O}$; M_R 129,09) und (\pm)-Miconazolnitrat ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HNO}_3$; M_R 479,15). Die zuerst tabellierte Massenkonzentration kommt dabei häufig bei der Charakterisierung pharmazeutischer Präparate zur Anwendung, die Stoffmengenkonzentration typischerweise in der Biochemie.

Bedingt durch den raschen Zerfall von gelagertem Aculeatin C (vgl. Abschnitt 9.3.3) konnte der MIC-Test nur an drei Bakterienspezies reproduzierbar durchgeführt werden. Alle drei Reinsubstanzen zeigten - zumindest für die untersuchten Keime - schwache antibakterielle und keine antimykotische Aktivität, wobei Aculeatin B an *Bacillus cereus* und *Staphylococcus epidermidis* aktiver war als Aculeatin A. Ansonsten bewegten sich die MIC-Werte für beide Verbindungen im selben Bereich, unter Beachtung der DMSO-Eigentoxizität bis einschließlich 12,5 % (v/v) für eine Testkonzentration von 128 ppm. Die hohe natürliche Resistenz des Opportunisten *Pseudomonas aeruginosa* wird nicht zuletzt daraus ersichtlich, daß Chloramphenicol und Tetracyclin als bewährte Breitbandantibiotika diesbezüglich nicht oder nur sehr schwach bakterizid wirken.

10.2 Protozoen

Tabelle 10-2 auf Seite 106 faßt die Aktivitäten sowohl des Dcm- und Btn-Rohextraktes aus *Amomum aculeatum* als auch der zugrundeliegenden drei Reinsubstanzen gegenüber humanpathogenen Protozoenspezies zusammen.

Tab. 10-1. Aktivität der Aculeatine A - C gegen Bakterien und Pilze. Werte als MIC in $\mu\text{g mL}^{-1}$ / μM , n = 2 (n. a.: nicht aktiv; n. g.: nicht gemessen).

Testsubstanz	Antibakterielle Wirkung (MIC)			Antifungale Wirkung (MIC)			
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida albicans</i>
Aculeatin A	64 / 153	n. a.	64 / 153	n. a.	128 / 306	16 / 38	n. a.
Aculeatin B	32 / 76	n. a.	64 / 153	n. a.	128 / 306	8 / 19	n. a.
Aculeatin C	64 / 94	n. a.	n. g.*	n. g.*	n. g.*	16 / 23	n. g.*
Chloramphenicol	2 / 6	4 / 12	1 / 3	n. a.	4 / 12	2 / 6	-----
5-Fluorcytosin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	64 / 496
(±)-Miconazol-nitrat	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1 / 2
Tetracyclinhydrochlorid	< 0,5 / 1	2 / 4	< 0,5 / 1	32 / 67	< 0,5 / 1	n. a.	-----

* rascher Zerfall der Reinsubstanz

Tab. 10-2. Aktivität von *Amomum aculeatum* gegen Protozoen. Werte als IC₅₀ und MIC in µg mL⁻¹ / µM, n = 3 (n. g.: nicht gemessen).

Testobjekt	Antiprotozoäre Wirkung (IC ₅₀ ; MIC)			
	<i>Leishmania donovani</i>	<i>Plasmodium fal-ciparum</i> K1 ^a	<i>Plasmodium fal-ciparum</i> NF 54 ^b	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
Aculeatin A	n. g. ^c	0,075 / 0,179; n. g.	0,084 / 0,201; n. g.	0,37 / 0,88; 1,10 / 2,63
Aculeatin B	n. g. ^c	0,180 / 0,430; n. g.	0,259 / 0,619; n. g.	0,47 / 1,12; 3,30 / 7,88
Aculeatin C	n. g. ^c	0,250 / 0,367; n. g.	0,346 / 0,508; n. g.	2,01 / 2,95; 10,0 / 14,7
Btn-Rohextrakt	n. g. ^c	3,400 / -----; n. g.	2,300 / -----; n. g.	n. g.; 100 / -----
Dcm-Rohextrakt	n. g. ^c	1,700 / -----; n. g.	1,800 / -----; n. g.	3,70 / -----; 11,0 / -----
Benzhidazol	-----	-----	-----	-----
Chloroquin	-----	0,037 / 0,116; n. g.	4,3 · 10 ⁻³ / 0,013; n. g.	0,59 / 2,27; 10,0 / 38,4
Melarsoprol	-----	-----	-----	-----
Natriumstibogluconat	20,9 / 23,0; n. g.	-----	-----	-----
Qinghaosu	-----	0,9 · 10 ⁻³ / 3,2 · 10 ⁻³ ; n. g.	2,6 · 10 ⁻³ / 9,2 · 10 ⁻³ ; n. g.	-----

^a resistent gegenüber Chloroquin und Pyrimethamin

^b empfindlich auf alle bekannten Medikamente

^c Auswertung aufgrund zu hoher Zytotoxizität nicht möglich

Für *Leishmania donovani* und die beiden *Plasmodium-falciparum*-Stämme dienten dabei die IC_{50} -Werte, für *Trypanosoma brucei rhodesiense* sowie *Trypanosoma cruzi* hingegen noch zusätzlich die MIC-Werte zum Vergleich mit standardisierten Referenzsubstanzen, in diesem Fall Benznidazol ($C_{12}H_{12}N_4O_3$; M_R 260,26), Chloroquin ($C_{18}H_{26}ClN_3$; M_R 319,89), Melarsoprol ($C_{12}H_{15}AsN_6OS_2$; M_R 398,34), Natriumstibogluconat ($C_{12}H_{17}Na_3O_{17}Sb_2 \cdot 9 H_2O$; M_R 907,86) und Qinghaosu ($C_{15}H_{22}O_5$; M_R 282,34). Während die üblicherweise aus linear oder halblogarithmisch aufgetragenen, sigmoiden Hemmkurven (s. Abb. 10 auf S. 110) abgelesenen IC_{50} -Werte präzise quantitative Angaben zur Wirkung vor allem von Enzyminhibitoren erlauben, setzen verlässliche Aussagen zur therapeutischen Signifikanz getesteter Verbindungen entsprechende MIC-Daten voraus. So interessiert man sich bei der medizinischen Applikation in erster Linie für die benötigte Minimaldosis über einen bestimmten Zeitraum, um pathogene Erreger möglichst rasch und vollständig zu eradizieren.

Da Aculeatin C zu Beginn der Testreihen im Schweizerischen Tropeninstitut (Basel, CH) gerade als frisches Isolat vorlag, konnte diese Substanz an allen interessierenden Parasitenarten untersucht werden. Kontrollanalysen bei *T. b. rhodesiense* nach Ablauf einiger Monate zeigten deutlich die Zerfallserscheinungen von Aculeatin C, indem sich die später gewonnenen Meßergebnisse markant von den Ausgangswerten unterschieden und vielmehr an die Daten für Aculeatin B annäherten (vgl. Abschnitte 9.3.3, 10.1). Was die Rohextrakte anbetrifft, so beschränkten sich antiplasmodiale sowie trypanozide Aktivitäten auf die lipophile Dcm-Phase mit den enthaltenen Aculeatinen (vgl. Abschnitt 9.1), deren hohe Zytotoxizität die Wirtszellen für den *L.-donovani*- und *T.-cruzi*-Assay stark schädigten. Im ersten Fall ließen sich somit keine reproduzierbaren Ergebnisse anführen, im zweiten Fall lag keine erregerspezifische Wirkung vor. Bei den verbleibenden drei Spezies zeigte stets Aculeatin A die höchste molare Aktivität, gefolgt von den Aculeatinen C und B für Plasmodien beziehungsweise B und C für Trypanosomen. Während für trypomastigote Formen von *T. b. rhodesiense* der IC_{50} -Wert der aktivsten Komponente, Aculeatin A, etwa um den Faktor 70 über demjenigen von Melarsoprol lag, erreichte dieses Isolat bei *P. falciparum* K1 den Wirkungsbereich von Chloroquin, der jedoch bei *P. falciparum* NF 54 wieder um etwa den Faktor 15 überschritten wurde. Vielversprechende Effekte traten somit ausschließlich an dem erstgenannten Plasmodien-Stamm mit Chloroquin- sowie Pyrimethamin-Resistenz auf. Vergleicht man die IC_{50} -Werte des Dcm-Rohextraktes und von Aculeatin A auf der Basis

von Massenkonzentrationen, so erwies sich die Reinkomponente für beide Plasmodien-Stämme rund um den Faktor 20, für *T. b. rhodesiense* um den Faktor 10 aktiver als das Ausgangsgemisch, bei einer empirischen Standardabweichung von rund 14 % für $n = 3$.

10.3 Zytotoxische Wirkung

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt und unter 18.2 detailliert beschrieben, setzt das Testsystem zur Aktivitätsprüfung gegen *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* und *Trypanosoma cruzi* die Infektion geeigneter Wirtszellen mit diesen Parasiten voraus. Um spezifisch antiprotozoäre Wirkungen von genereller Zytotoxizität interessierender Substanzen zu unterscheiden, müssen parallel dazu entsprechende Vergleichsansätze mit L6-Zellen ($\rightarrow T. cruzi$) beziehungsweise Peritonealmakrophagen ($\rightarrow L. donovani$) durchgeführt werden. Zur Vervollständigung der Ergebnisse kamen ferner KB-Zellen zum Einsatz, welche im Gegensatz zu den genannten Linien neoplastischen Charakter aufweisen und somit potentielle Zytostatika in Rohextrakten anzeigen können (s. Tab. 10-3 auf S. 111).

Bezüglich der KB-Zellen veranschaulichen IC_{50} -Werte, bei L6-Zellen IC_{50} - neben MIC-Werten und bei den Makrophagen nur MIC-Werte fragliche Aktivitäten in Relation zur Referenzsubstanz Podophyllotoxin ($C_{22}H_{22}O_8$; M_R 414,41).

Aculeatin C wurde - wie gehabt - unmittelbar nach seiner Isolierung eingesetzt. Wiederum war die zytotoxische Wirkung auf den Dcm-Rohextrakt beschränkt, wobei Aculeatin A die stärksten Effekte an allen Zelllinien zeigte, gefolgt von Aculeatin C und B an KB-Zellen beziehungsweise in umgekehrter Reihenfolge bei L6-Zellen. Beide Zelltypen reagierten im Konzentrationsbereich von 1-10 μ M bei einer empirischen Standardabweichung von < 20 % für $n = 4$, die KB-Zellen vergleichsweise etwas empfindlicher, auch gegenüber Podophyllotoxin mit etwa 170fach stärkerer Aktivität als Aculeatin A. Da die maximal zulässige Toxizität an Makrophagen überschritten wurde, ließen sich die Aculeatine A - C nicht im verfügbaren Assay gegen *L. donovani* testen (vgl. Abschnitt 10.2).

10.4 Cyclooxygenase-1/-2 und 5-Lipoxygenase

Die Aculeatine A und B wurden auf eventuell vorhandene Hemmwirkungen an den Schlüsselenzymen der Arachidonsäure-Kaskade, Cyclooxygenase-1/-2 und 5-Lipoxygenase, nur für stationäre Konzentrationen geprüft, so daß keine sigmoiden Inhibitionskurven vorlagen. Konkret kamen dabei von jeder Substanz 200 mM (\rightarrow Cyclooxygenase-1), 100/200 μ M (\rightarrow Cyclooxygenase-2) sowie 50/100 μ M (\rightarrow 5-Lipoxygenase) zum Einsatz, wobei sich die jeweilige Hemmung - falls vorhanden - prozentual zum Kontrollwert für das entsprechende Enzym berechnet (vgl. Abschnitt 18.3).

Somit fielen teils IC_{40} - (\rightarrow Cyclooxygenase-2), teils IC_{60} -Daten (\rightarrow 5-Lipoxygenase) zum Vergleich mit den IC_{50} -Werten für standardisierte Referenzsubstanzen an, und zwar bezüglich der Cyclooxygenasen Indometacin ($C_{19}H_{16}ClNO_4$; M_R 357,8), für die Lipoxygenase Nordihydroguajaretsäure ($C_{18}H_{22}O_4$; M_R 302,37).

Da der verfügbare Vorrat an Aculeatin C für die geschilderten Untersuchungen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf, D) bereits größtenteils zerfallen war, konnten nur die Aculeatine A und B getestet werden. Die berechneten Hemmkonzentrationen lagen für die Cyclooxygenase-1/-2 > 200 fach, für die Lipoxygenase etwa 100fach über dem Kontrollwert, so daß kein merklicher Einfluß auf den Arachidonsäure-Metabolismus vorliegt.

10.5 Chemilumineszenz

Der unter Abschnitt 18.4 beschriebene Testansatz im zellulären System legt die Methodik dar, um Reinsubstanzen auf eventuell vorhandene Radikalfänger-Eigenschaften und/oder auf Hemmung der NADPH-Oxidase von polymorphkernigen Granulozyten des Menschen hin zu analysieren. Dabei trägt man die prozentual zum Assay ohne Testsubstanzen (= 0 % Hemmung beziehungsweise 100 % Aktivität) berechneten Inhibitionswerte gegen die eingesetzten Konzentrationen der interessierenden Verbindung auf. Durch Fällen der Lotrechten vom Schnittpunkt der Sättigungskurve mit einer Parallelen zur Abszisse im Abstand „50 %“ lassen sich die gefragten IC_{50} -Werte rasch ablesen (s. Abb. 10 auf S. 110).

Über den Vergleich mit einer Referenzsubstanz, im vorliegenden Fall Quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$; M_R 302,24), konnten die gemessenen Effekte pharmakologisch beurteilt werden.

Die weit fortgeschrittene Zersetzung des gelagerten Aculeatins C erforderte wiederum die Beschränkung der Testansätze auf die Aculeatine A und B, wobei erstere Komponente rund doppelt so aktiv wirkte wie die zweite und sogar die Inhibitionsrate von Quercetin um etwa 20 % übertraf (s. Tab. 10-3 auf S. 111). In Abhängigkeit von der Probenkonzentration betrug die empirische Standardabweichung durchschnittlich rund 10 % für $n = 4$. Mit den gewonnenen Ergebnisse war es allerdings nicht möglich, zu entscheiden, ob die starken Effekte von Aculeatin A auf Radikalfang oder Enzymhemmung oder vielleicht sogar auf beidem beruhen.

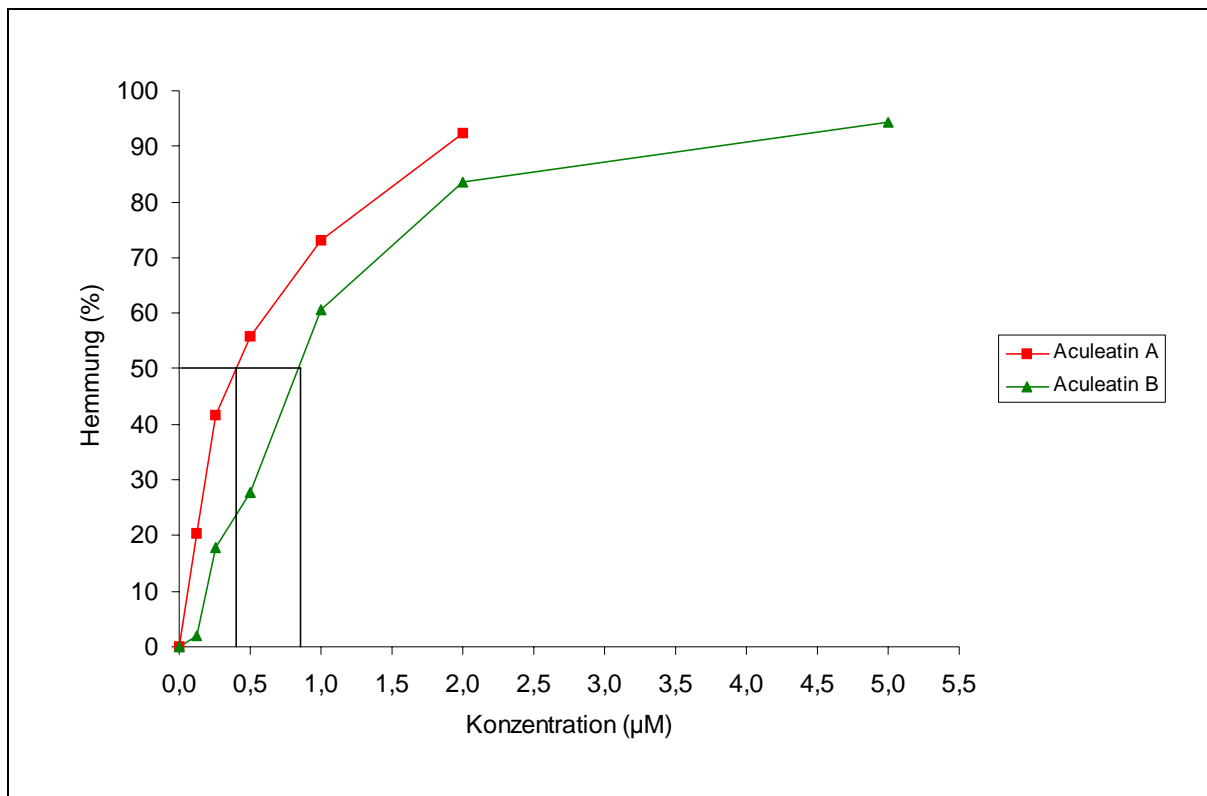


Abb. 10. Antioxidative Aktivität der Aculeatine A und B.

Tab. 10-3. Wirkung von *Amomum aculeatum* auf Zelllinien, Enzyme des Arachidonsäure-Stoffwechsels und reaktive Sauerstoffspezies. Werte als IC_x und MIC in µg mL⁻¹ / µM, n = 4 für Zytotoxizität und Chemilumineszenz, n = 2 für Cyclooxygenase und Lipoxygenase (n. a.: nicht aktiv; n. g.: nicht gemessen).

Testobjekt	Zytotoxizität (IC _x ; MIC)		Enzyminhibition (IC _x)		Antioxidative Aktivität (IC _x)		
	KB-Zellen (x = 50)	L6-Zellen (x = 50)	Makrophagen	Cyclooxygenase-1 (x = 50)	Cyclooxygenase-2	5-Lipoxygenase	Chemilumineszenz (x = 50)
Aculeatin A	0,7 / 1,7; n. g.	0,7 / 1,7; 1,1 / 2,6	n. g.; < 10 / 24	> 83,7 / 200	83,7 / 200 (x: 40)	20,9 / 50 (x: 60)	0,17 / 0,40
Aculeatin B	0,9 / 2,0; n. g.	2,4 / 5,7; 3,3 / 7,9	n. g.; < 10 / 24	> 83,7 / 200	> 83,7 / 200 (x: 40)	18,8 / 45 (x: 60)	0,36 / 0,87
Aculeatin C	1,1 / 1,6; n. g.	5,2 / 7,6; 10 / 15	n. g.; < 10 / 15	n. g.*	n. g.*	n. g.*	n. g.*
Btn-Rohextrakt	n. a.	n. g.; 100 / -----	n. g.; n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.
Dcm-Rohextrakt	< 50 / -----; n. g.	n. g.; 11 / -----	n. g.; n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.
Indometacin	-----	-----	-----	0,3 / 0,8	0,3 / 0,8 (x: 50)	-----	-----
Nordihydroguajaretsäure	-----	-----	-----	-----	-----	0,15 / 0,50 (x: 50)	-----
Podophyllotoxin	4,1 · 10 ⁻³ / 0,010; n. g.	0,012 / 0,029; > 100 / 241	n. g.	-----	-----	-----	-----
Quercetin	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,15 / 0,50

* rascher Zerfall der Reinsubstanz

V Diskussion und Ausblick

11 Pflanzliche Inhaltsstoffe

11.1 Extraktion

Grundsätzlich muß bei sämtlichen ethnobotanischen Exkursionen unbedingt ausreichend Material gesammelt werden, das heißt mindestens 1 kg Trockengewicht der in Frage kommenden Pflanzenorgane (z. B. Blätter, Rhizom), da deren Nachbestellung in tropischen wie subtropischen Ländern häufig unerledigt bleibt. Die an Ort und Stelle möglichst gut getrockneten Pflanzenteile sind erst im Labor und kurz vor Perkulationsbeginn manuell vorzuzerkleinern und dann nicht feiner als nötig zu mahlen, um oxidationsempfindliche Inhaltsstoffe weitestgehend zu schonen.

Umfangreiche Extraktionen von Naturprodukten verschiedener Herkunft zeigen inzwischen klar, daß ein lipophiles und ein hydrophiles Lösungsmittel - meist Dichlormethan neben Methanol in dieser Reihenfolge - für quantitative wie pharmakologisch ergiebige Auszüge im Regelfall genügen. Abhängig von der volksmedizinischen Verwendung sind manchmal noch wäßrige Extrakte aus unbehandelten Pflanzenteilen angebracht. Ferner reicht unter ökonomischen Gesichtspunkten eine Extraktion über 10 Tage pro Solvens der Qualität „purum“, welches zuvor mittels TLC auf die Abwesenheit störender Verunreinigungen überprüft wurde, vollkommen aus, um wägbare Substanzmengen aus ungefähr 1 kg Rohprodukt zu gewinnen.

11.2 Screening

Für die Isolierung von Naturstoffen anhand ihrer antibakteriellen oder antimykotischen Eigenschaften stellt die TLC-Bioautographie-Overlay-Technik nach dem Prinzip der Agardiffusion zweifellos die Methode der Wahl dar, zumal sie - vor allem mittels 2D-Entwicklung - nicht nur qualitativ die Anzahl eventuell vorhandener Wirkkomponenten erschließen läßt, sondern auch entscheidende Hinweise zu deren Polarität sowie Trennverhalten und damit zur Auswahl chromatographischer Parameter liefert. Quantitative Aussagen über die Wirkstärke von Rohextrakten ermöglicht der Verdünnungsreihentest in Mikrotiterplatten, indem drei stationäre Konzentrationen zu 1/10/100 ppm eine effiziente Selektion ergiebiger Perkolate ermöglichen. Bakterio-/Fungistase und Bakteri-/Fungizidie lassen sich dabei effektiv über den Umsatz metabolisierbarer Tetrazoliumsalze unterscheiden.

Entsprechende Untersuchungen an Protozoen und ausgewählten Zelllinien basieren stets auf der Verdünnungsmethode, wobei das antiprotozoäre Primärscreening an *Trypanosoma brucei rhodesiense* sowie *Trypanosoma cruzi* bereits Rückschlüsse auf eventuelle Wirkung gegen *Leishmania donovani* oder *Plasmodium falciparum* erlaubt und somit in vitro zeitsparend auf die beiden Trypanosomen-Spezies beschränkt werden kann (vgl. Abschnitte 10.1 bis 10.3).

Zur künftig optimalen Evaluierung vorhandener Rohextrakte ist - vor allem durch Kooperation mit geeigneten Instituten wie dem Universitätsspital Zürich - eine Ausweitung des Screeningprogramms auf weitere problematische Human- und Tierpathogene anzustreben, und zwar im Bereich Bakterien (z. B. *Mycobacterium tuberculosis*, multiresistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme), Pilze (z. B. *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*), Protozoen (z. B. *Cryptosporidium parvum*) und Helminthen (z. B. *Ascaris suum*, *Echinococcus multilocularis*).

11.3 Chromatographie

In der vorliegenden Arbeit haben sich analytische Dünnschichtchromatogramme infolge geringen technischen Aufwands, hoher Aussagekraft und guter Dokumentierbarkeit sowohl im Bereich „Screening“ als auch „Prozeßkontrolle“ bestens bewährt. Die präpa-

rative Variante zeigt gute Resultate bei der raschen Nachisolierung geringer Substanzmengen, beispielsweise für pharmakologische Untersuchungen, kann aber im Falle stark oxidationsempfindlicher Komponenten nur begrenzt eingesetzt werden. Um die Ausbeute zu maximieren, sollten künftig spezielle DC-Platten mit besonders dicken Sorptionsschichten zum Einsatz kommen. Auch Spezialverfahren wie die zentrifugale Schichtchromatographie erlauben effiziente präparative Trennungen (vgl. Nyiredy et al., 1985b, S. 24, 28-30), haben sich aber technisch leider nur wenig durchgesetzt.

Säulenchromatographische Verfahren, konkret VLC und im Anschluß OCC über Kieselgel und Sephadex LH-20, sind grundsätzlich für die sukzessive Aufreinigung von Naturstoffen zu empfehlen, insbesondere hinsichtlich der Variationsmöglichkeiten zwischen Verteilungs- und Gelchromatographie bei Sephadex LH-20. Dieses Prozedere erwies sich für die Aculeatine in Ausbeute und Zeitaufwand (→ Anzahl der benötigten Durchläufe) einer entsprechenden HPLC-Separation deutlich überlegen.

Mit Hilfe des „PRISMA“-Optimierungssystems kann das Hauptkriterium für jede erfolgreiche chromatographische Trennung, nämlich die bestmögliche gegenseitige Abstimmung von stationärer und mobiler Phase, innerhalb weniger Tage erfüllt werden. Schwierig abzutrennende oder stark toxische Lösungsmittel (z. B. *n*-Butanol, Benzol) sollten dabei nicht mehr ausgewählt werden (vgl. Abschnitt 6.3). Häufig ergeben allerdings auch rein empirisch erprobte Fließmittelgemische gute Trennungen, so beispielsweise die mobile Phase für die präparative TLC bei Aculeatin C, deren Bestandteil Toluol laut dem „PRISMA“-Verfahren eigentlich gar nicht in Frage kommt.

Der Nachteil chlorophyllhaltiger Pflanzenteile zeigt sich bezüglich der Aculeatine bei Vergleichsextrakten aus Blättern, wobei die problematische Abtrennung der großen Pigmentmengen mit speziellen Dcm : Hx - beziehungsweise Dcm : Ac -Gemischen an Sephadex LH-20 gelingt. Rhizome als klassische Speicherorgane hingegen weisen keine photosynthetischen Pigmente, dafür aber oftmals hohe Konzentrationen an interessierenden Sekundärmetaboliten sowie Polymeren (z. B. Stärke) auf. Letztere repräsentieren wohl die Hautmenge der inaktiven MeOH- und H₂O-Extrakte aus *Amomum aculeatum*.

Generell ist bei Naturstoffisolierungen zu beachten, daß mit zunehmender Reinheit der Unterfraktionen auch die Zersetzungsgefahr steigt, während selbst empfindliche Verbindungen im Rohextrakt - unter anderem über Redoxgleichgewichte - vor denaturierenden Einflüssen weitgehend geschützt sind.

12 Struktur und Synthese

Die Aculeatine A - C weichen in Grundgerüst wie Substitutionsmuster markant von bisher beschriebenen, teils exotischen Verbindungsklassen innerhalb der Gattung Amomum ab (vgl. Abschnitt 2.3.2).

Beim Vergleich der physikalischen Substanzdaten fallen sofort die Übereinstimmungen - bis auf kleinere meßtechnisch bedingte Differenzen - bezüglich der für das Dienon-System typischen UV-Absorptionsmaxima samt den zugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten ins Auge (vgl. Kapitel 19). Allerdings weisen die spezifischen Drehwerte erhebliche Unterschiede auf, welche bei den Aculeatinen A/B in der entgegengesetzten Konfiguration am Spirozentrum C-6 zu suchen sind, bei den Aculeatinen B/C mit identischer Dioxadispiro-Asymmetrie jedoch auf deren starker Kompensation durch das zusätzliche Stereozentrum an C-22 von Aculeatin C basieren. Aufschlußreich wären in diesem Zusammenhang noch Drehwertbestimmungen in Zeitabhängigkeit von der H⁺-katalysierten Aculeatin-B-Epimerisierung. An weiteren chiroptischen Verfahren sind die Optische Rotationsdispersion (ORD) und der Circulardichroismus (CD) zu nennen, welche in der Natustoffchemie vor allem bei cyclischen Ketonen die exakte Konfigurationsbestimmung häufig ermöglichen (vgl. Christen und Vögtle, 1992, S. 241). Allerdings sei betont, daß diese Korrelierungsmethoden per se keinen absoluten Charakter besitzen wie beispielsweise die anomale Röntgenbeugung (vgl. Abschnitt 7.7) und deshalb nur mit Hilfe gesicherter absoluter Konfigurationen von geeigneten Vergleichsverbindungen - welche für die Aculeatine bislang nicht existieren - Rückschlüsse bei fraglichen Substanzen erlauben (vgl. Christen und Vögtle, 1990, S. 316). Die Schlüsselrolle exakter Konfigurationszuordnungen für Wirkstoffe folgt unter anderem aus dem „Eutomer-Distomer-Prinzip“, wie in Kapitel 3 ausführlich dargelegt.

Das erfolgreich verlaufende ¹³C,¹³C-INADEQUATE-Experiment erlaubte die komplette Konstruktion des C-Skeletts für die Aculeatine A und C, verursachte jedoch durch mannigfache Signalüberlappung im Bereich der Methylengruppen einige Schwierigkeiten bei der Auswertung, so daß künftig ein Lösungsmittelwechsel zu C₆D₆ oder MeOD in Betracht gezogen werden sollte. Im Verlauf einer H/D-Austauschreaktion ist zu beachten, daß CDCl₃ etwa 1 % (v/v) D₂O aufnimmt, wobei die massive Polaritätsänderung Protonensignale in π-Systemen wie Dienonringen maßgeblich beeinflusst. Für mögliche Aussagen über die relative Konfiguration der zweiten Hydroxygrup-

pe von Aculeatin C sollte man den Versuch unternehmen, die konformationsabhängige vicinale Kopplung des OH-Protons an C-22 mit dem CH-Proton an C-23 in [D6]-DMSO aufzuzeichnen. Zur Erfassung intramolekularer Vorgänge wie der auf Seite 115 erwähnten Epimerisierung läßt sich die dynamische NMR-Spektroskopie heranziehen, welche Erkennung und Unterscheidung diastereomerer Konformere gestattet (vgl. Roth et al., 1998, S. 189). Das noch drängende Problem bezüglich der absoluten Konfiguration der Aculeatine könnte dadurch gelöst werden, daß die über Veresterung des stabilsten Vertreters Aculeatin A mit dem (2*R*)- und (2*S*)-Enantiomer von Moshers Reagenz entstehenden C-4-Diastereomere anhand ihrer Differenzen in δ (^1H) die absolute Substituentenorientierung an diesem Zentrum aufzeigen.

Die ausschließlich unter Säureeinfluß beobachtete Epimerisierung von Aculeatin B zu einem etwa äquimolaren Gemisch der Aculeatine A/B stellt zwangsläufig die Fragen in den Raum, wie und warum diese Umlagerung spontan ausschließlich unidirektional (s. Abb 12-1) verläuft. Aus der mechanistischen Betrachtung der in Abschnitt 4.3 behandelten Spiroketalisierung geht unmittelbar hervor, daß Ketale unter H^+ -Einwirkung

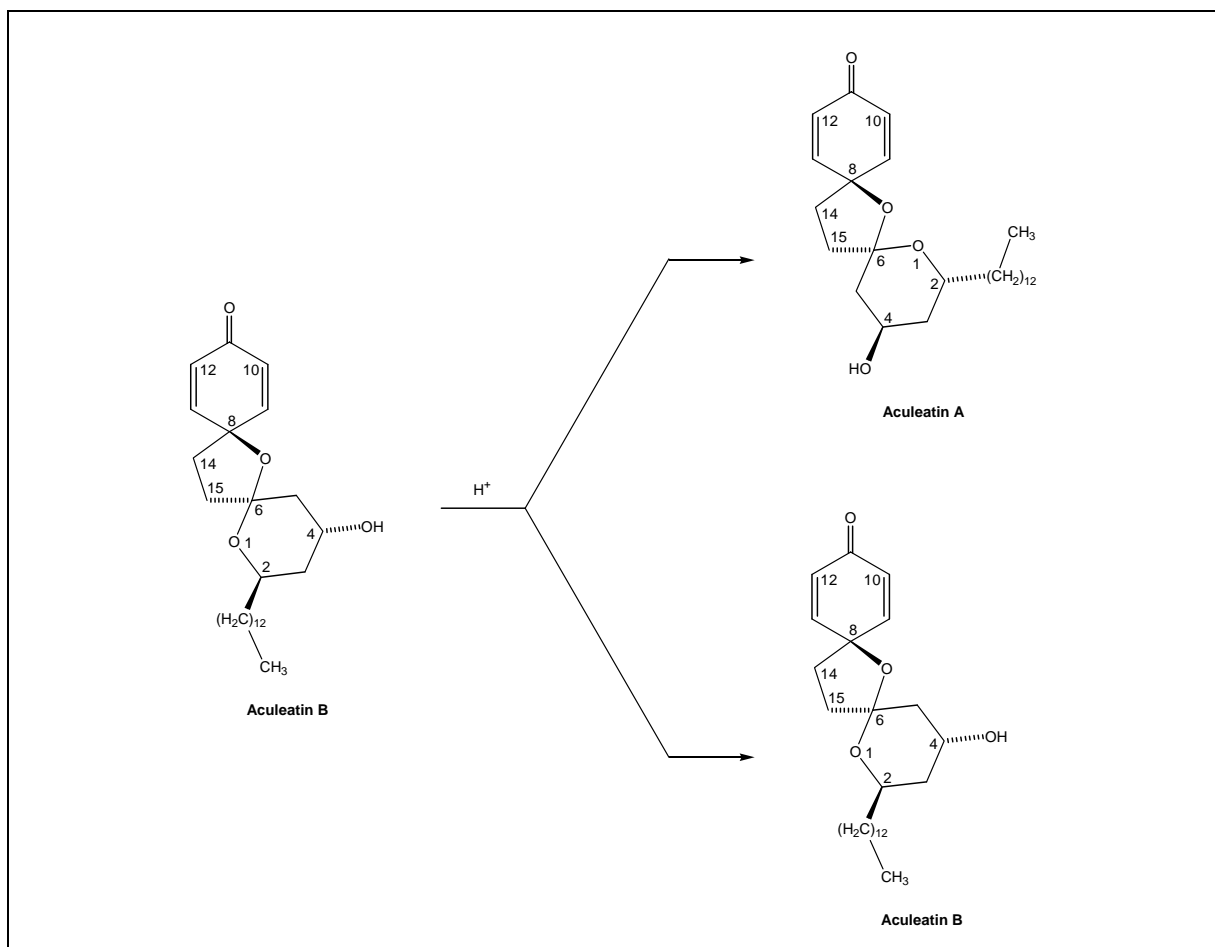


Abb. 12-1. Säurekatalysierte Epimerisierung von Aculeatin B.

über eine Oxoniumstruktur zum Carbeniumion mit gelöster Sauerstoffbrücke reagieren (s. Abb. 4-2 auf S. 21). Übertragen auf Aculeatin B wird hierbei die C–O–Bindung innerhalb des Oxanringes kurzzeitig gelöst, wodurch die verbleibenden Substituenten an C-6 eine trigonal-planare Orientierung einnehmen (s. Abb. 9-19 auf S. 92). Da der Ligand für den nachfolgenden Ringschluß in den Positionen C-2 und C-4 je ein Asymmetriezentrum beinhaltet, bezeichnet man die beiden stereochemisch nicht äquivalenten Seiten an C-6 in der Ebene des Oxolanringes als diastereofacial. Für die Angriffsrichtung senkrecht zur Ebene des Oxolanringes auf der Seite der Alkylkette (C-2) beziehungsweise vom Betrachter aus gesehen gilt der Stereodeskriptor *Re*, von der Rückseite des Oxolanringes aus entsprechend *Si*. Im Übergangsstadium des Carbeniumions stellt also C-6, woran nachfolgend die Hydroxygruppe von vorn (→ Aculeatin B) oder hinten (→ Aculeatin A) addiert, ein Prochiralitätszentrum dar (vgl. Hauptmann und Mann, 1996, S. 104). Ebenso wie durch Umklappen des „Oxansessels“ ändern die Substituenten von C-2 und C-4 im Verlauf des Ligandentausches an C-6 ihre Positionen von axial nach äquatorial und umgekehrt (s. Abb. 9-17 auf S. 91). Da der sperrige Tridecylrest in Aculeatin B eigentlich die sterisch günstigere äquatoriale Stellung einnimmt, läßt sich die dennoch bessere Säurestabilität von Aculeatin A im wesentlichen aus dessen größerem anomeren Effekt herleiten, welcher jedoch für die C-6-einschließende Spirostruktur aus Fünf- und Sechsring nur schwer zu definieren ist (s. Abb. 9-5, 9-18 auf S. 79, 91). Mit der dargelegten Epimerisierung geht gleichzeitig eine massive Veränderung des resultierenden Dipolmoments für das gesamte Molekül einher, so daß schon nach wenigen Zentimetern Laufstrecke im Dünnschichtchromatogramm das unpolare Aculeatin A deutlich weiter wandert als das sein C-6-Epimer und als das infolge zusätzlicher Sauerstofffunktionen noch polarere Aculeatin C.

Was die Instabilität von Aculeatin B bei Aufbewahrung in CDCl_3 beziehungsweise die Herkunft der katalysierenden Säure anbetrifft, so verdeutlicht Abbildung 12-2 auf Seite 118 den Verlauf der photolytischen Oxidation von Trichlormethan (**1**) und entsprechende Folgereaktionen bei Anwesenheit von Ethanol (**2**)/(**3**). Dieser Stabilisator ist auch in Trichlormethan von HPLC-Qualität bis zu 1 % (v/v) enthalten, für das NMR-Lösungsmittel CDCl_3 jedoch begrifflicherweise ungeeignet. Konkret entsteht aus der Umsetzung des Oxidationsprodukts Phosgen mit äquimolaren Mengen Ethanol Chlorameisensäureethylester, bei Überschuß des Alkohols Kohlensäurediethylester. Die im Zuge von Oxidation wie Veresterung freigesetzte Salzsäure wird dann mit weiterem

Ethanol zu Monochlorethan und Wasser „entschärft“ (2), wobei die Bilanzgleichung (3) eine Erklärung für den notwendigerweise hohen Ethanolgehalt in käuflichem Trichlormethan liefert. Gegebenenfalls läßt sich dieser Stabilisator durch Filtration über basisches Aluminiumoxid wieder entfernen (vgl. Falbe und Regitz, 1989, S. 707).

Wie in Kapitel 3 ausgeführt, existieren für die Aculeatine A/B prinzipiell 8 Enantiomere beziehungsweise 4 diastereomere Enantiomerenpaare, für Aculeatin C jeweils doppelt so viele. Erstere gehören damit zu den Naturstoffen mit drei Chiralitätszentren, treten biogen aber nicht gemäß dem Regelfall als reine Enantiomere auf. Aus Dünnschichtchromatogrammen des Pte-Rohextraktes und dem Isolierungsschema (s. Abb. 9-1 auf S. 74) geht vielmehr klar hervor, daß *Amomum aculeatum* die ersten beiden Komponenten in etwa identischen Mengen enthält, so daß das Vorhandensein beider Epimere nicht als Artefakt angesehen werden kann. Über den Nutzen derart großer Mengen an diastereomeren Sekundärmetaboliten für die Pflanze lassen sich nur spekulative Aussagen treffen, so auch zu der immer noch heiß umstrittenen Frage, warum nicht alle Alkaloide mit einem Chiralitätszentrum (z. B. Nicotin) ausschließlich einer bestimmten Konfiguration - wie beispielsweise die proteinogenen Aminosäuren - angehören (vgl. Roth et al., 1998, S. 83). Eventuell wäre eine Abwehrfunktion der ausgeprägt zytotoxischen Aculeatine gegenüber Mikroorganismen und tierischen Fraßschädlingen denkbar, was auch zu den ökologischen Hauptfunktionen ätherischer Öle als typischer Inhaltsstoffe der Gattung *Amomum* (vgl. Abschnitt 2.3.2) gehört (vgl. Teuscher, 1997, S. 242).

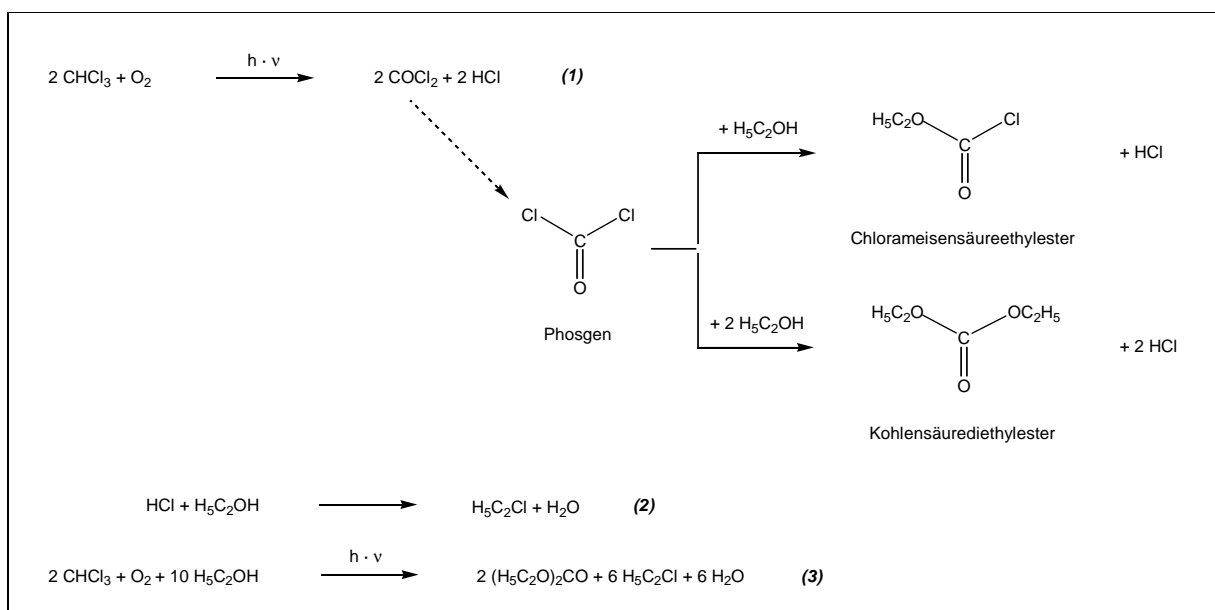


Abb. 12-2. Photolytische Oxidation von Ethanol-stabilisiertem Trichlormethan (gemäß Christen und Vögtle, 1992, S. 88, 194, 617; Falbe und Regitz, 1989, S. 707).

Die differierenden skalaren Eigenschaften der Diastereomere Aculeatin A/B treten nicht zuletzt in der Massenspektrometrie deutlich hervor, da das gewünschte Molekül für Aculeatin A nur im FAB-Verfahren, für Aculeatin B hingegen mittels der DEI-Methode sichtbar wird (s. Abb. 9-14, 9-23 auf S. 87, 96).

Bei Veresterung der Aculeatine A/B mit 4-Brombenzoesäurechlorid wurde das entstandene Reaktionsgemisch nach Abdampfen des Pyridins in Methanol gelöst. Infolge darin enthaltener Wasserspuren reagierten unverbrauchte Reagenzrückstände nach Hydrolyse zum dimeren Anhydrid, welches durch seine Lipophilie - im Gegensatz zum Säurechlorid - nur schwach an Kieselgel adsorbiert wurde, so daß eine effektive Abtrennung lange, schmale Säulen und wenig hydrophile Fließmittel erfordert. Darüber hinaus färbt sich das erwähnte Anhydrid mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz praktisch nicht an, so daß eine zuverlässige Detektion und Unterscheidung vom gewünschten Produkt nur bei 254 nm erfolgen kann. Um geeignete Kristalle für die anomale Röntgenbeugung zu erhalten, sollte der Aculeatin-A-Ester vor Erprobung weiterer Kristallisationstechniken - beispielsweise der Diffusion zweier überschichteter Lösungsmittel (vgl. Christen und Vögtle, 1994, S. 97) - über ein entsprechend optimiertes HPLC-System aufgereinigt werden.

Was die mögliche Biosynthese der Aculeatine anbetrifft, so legen deren Molekularstruktur und das Vorkommen innerhalb der Zingiberaceae (vgl. Abschnitt 2.1) grundsätzliche Analogien zum Gingerol-Stoffwechsel nahe. In enger Orientierung am Reaktionsschema von Abbildung 2-1 auf Seite 10 kann man anhand des Substitutionsmusters der Aculeatine A/B postulieren, daß deren eigentliche Biogenese mit 4-Cumarsäure startet (s. Abb 12-3 auf S. 121). Zwei aufeinanderfolgende Kondensationen mit je einem Molekül Malonyl-CoA liefern die beiden Sauerstofffunktionen im „Keten-Rhythmus“ zur ursprünglichen Carboxylgruppe. Nach Hydrolyse des entstandenen β -Ketoesters zum Triketid **1** kondensiert dieses - wiederum unter Decarboxylierung - mit *n*-Tetradecansäure, wobei das entstandene Intermediat **2** in mehreren sukzessiven Reduktionsschritten an den zwei terminalen Carbonylgruppen und einer Doppelbindung zu dem chiralen *p*-Hydroxyphenyl-*n*-alkyldihydroxyketon **3** umgesetzt wird. Die folgenden - höchst spekulativen - Reaktionsschritte umfassen eine „Phenolat-Dienon-Umlagerung“, welche formal über oxidative [H]-Abspaltung an der phenolischen OH-Gruppe sowie an der Methylengruppe in Position 1 des Alkylrestes und nachfolgender Wasseranlagerung zu dem *p*-Hydroxydienon-Derivat **4** führt. In der Literatur wurde bislang nur

der umgekehrte Weg, das heißt eine Dienon-Phenolat-Umlagerung, bei der Biogenese von Alkylcatecholen mit enger Verwandtschaft zu den [n]-Gingerolen beschrieben (vgl. Juch und Rüedi, 1997, S. 440). Unter Säurekatalyse entsteht schließlich durch nucleophilen Angriff der OH-Gruppe in Position 1 (→ Oxolanring; **5**) beziehungsweise 7 (→ Oxanring; **6**) am Carbonyl-C-Atom in Stellung 3 thermodynamisch begünstigt die beobachtete 1,7-Dioxadispiro[5.1.5.2]dienon-Struktur mit drei Chiralitätszentren (*). Entscheidende Hinweise auf die reale Existenz des als Edukt für die Spiroketalisierung diskutierten Intermediates **4** ergibt die Strukturformel von Aculeatin C (s. Abb. 9-24 auf S. 97), dessen zweite Cyclohexadienon-Einheit genau die in **4** postulierte, *para*-ständige Hydroxygruppe aufweist und somit in Anbetracht der fehlenden Ketogruppe zwischen C-33 und C-44 als „Prospiro-Einheit“ bezeichnet werden kann. Generelle Aussagen zur Biogenese des strukturell anspruchvollsten Aculeatins C sind mit noch größeren Unsicherheitsfaktoren behaftet. So benötigt die zusätzliche Ketogruppe an C-17 ein Tetraketid als Vorläufermolekül, entstanden aus 4-Cumarsäure nach dreimaliger Kondensation mit Malonyl-CoA. In Analogie zu den Curcuminoiden (vgl. Teuscher, 1997, S. 185 f.) liefert die folgende Kondensation mit einer Phenylacrylsäure - konkret 2-Cumaryl-CoA mit entsprechender Alkylsubstitution in *ortho*- und *meta*-Stellung - die erforderlichen Strukturmerkmale des Restes an C-2. Die abschließende Spiroketalisierung zum 1,7-Dioxadispiro[5.1.5.2]dienon-System erfolgt in Anlehnung an Aculeatin B. Ein Vergleich der Abbildungen 2-1 und 12-3 auf den Seiten 10 und 121 zeigt unmittelbar, daß die exocyclische Hydroxygruppe von den Aculeatin-Dispiranen biosynthetisch der [n]-Gingerol-OH-Gruppe mit (5*S*)-Konfiguration entspricht. Rückschlüsse auf die bislang noch unbekannt absolute Stereochemie der Aculeatine an Position 4 lassen sich allerdings nur sehr eingeschränkt ziehen, zumal - den experimentellen Rahmen dieser Diplomarbeit bei weitem überschreitend - inzwischen auch ein Aculeatin D isoliert werden konnte (vgl. Heilmann et al., 2001a, S. 1281 f.). Interessanterweise handelt es sich dabei um ein Epimer des Aculeatins B mit Inversion der Hydroxygruppe in Stellung 4 und damit der relativen Konfiguration *rel*-(2*R*,4*S*,6*S*).

Die Anwendung der Cramerschen Regel auf den Vorgang der Ketalisierung am entstehenden Spiroatom C-6, womit sich das bevorzugt gebildete Diastereomer - Aculeatin A oder B - vorhersagen ließe, setzt ein asymmetrisch substituiertes Atom vicinal zum Prochiralitätszentrum an C-3 voraus (vgl. Kapitel 3). Anhand der 5-Hydroxygruppe in β -Stellung zum Spirozentrum kann somit keine Entscheidung getroffen werden.

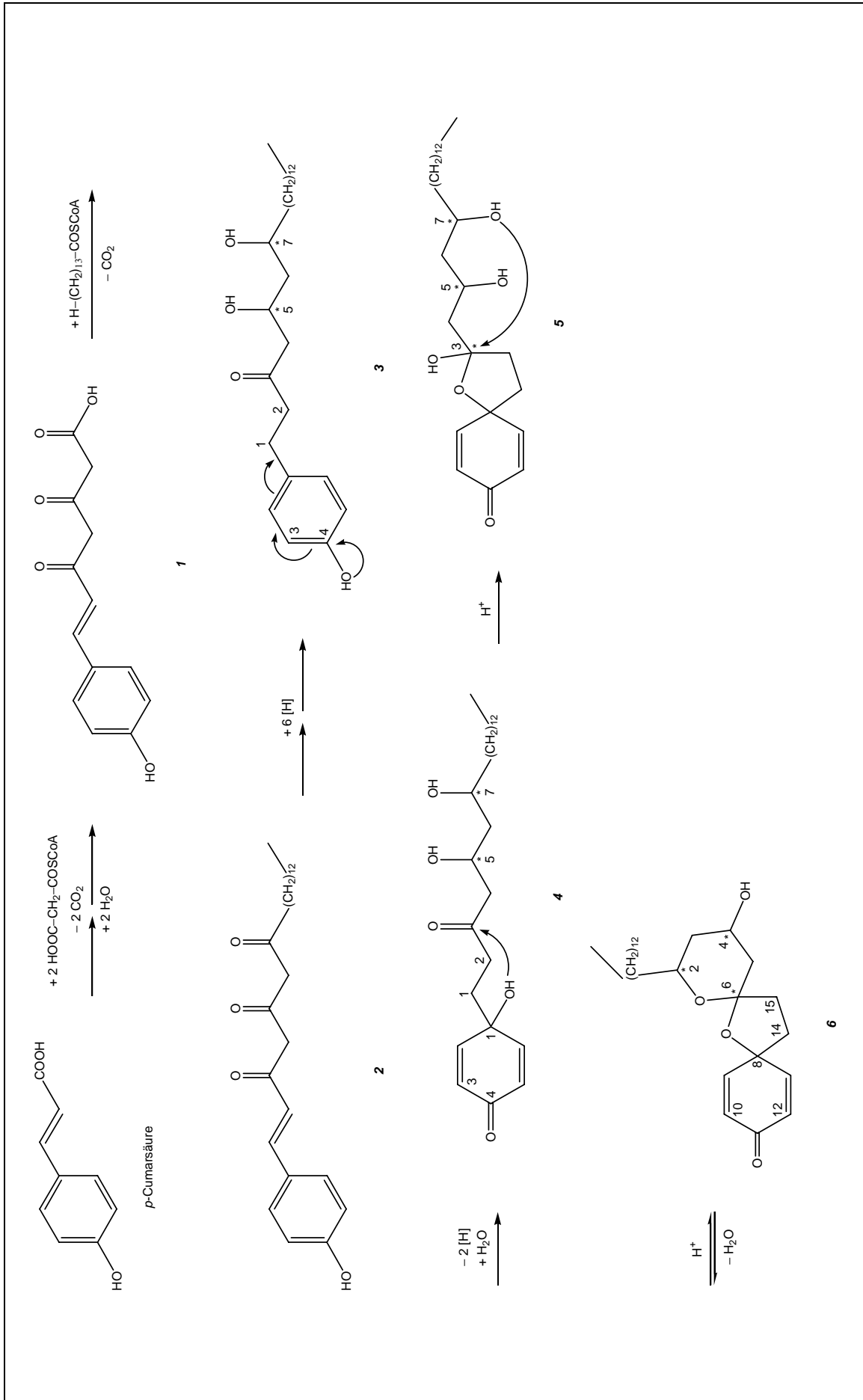


Abb. 12-3. Biosynthese-Vorschlag für den Aculeatin-A/B-Strukturtyp.

Zur detaillierten Aufklärung des Biosyntheseweges der Aculeatine wäre es von Vorteil, Tracer-Experimente beispielsweise mittels radioaktiv markierter Substrate (vgl. Nuhn, 1997, S. 35) des Gingerol-Metabolismus an *Amomum aculeatum* in situ oder in Pflanzenzellkulturen auszuführen.

13 Pharmakologie und Arzneistoffentwicklung

Im Anschluß an Detektion, Isolierung und Strukturaufklärung interessierender Komponenten eignen sich Verfahren wie Blättchen-, Lochplatten- oder Zylindertest, welche ebenso wie die TLC-Overlay-Technik auf dem Prinzip der Agardiffusion beruhen, allenfalls zu Bioaktivitätsvergleichen zwischen Wirkstoffen und Referenzsubstanzen, während für reproduzierbare IC₅₀- und MIC-Werte der Verdünnungsreihentest in Mikrotiterplatten unumgänglich ist.

Diesbezüglich sollte für *Pseudomonas aeruginosa* künftig die Referenzsubstanz Chloramphenicol durch das allgemein bei Gram-negativen Keimen stark wirksame Gentamicin ersetzt werden (vgl. Abschnitt 8.1). Das in Methanol bei Raumtemperatur nur schwer solubilisierbare Antimykotikum 5-Fluorcytosin kann auch ohne H₂O-Zusatz (→ raschere Verdunstung im N₂-Strom!) nach vorsichtigem Erwärmen im Wasserbad auf etwa 50 °C leicht in Lösung überführt werden. Im *Leishmania-donovani*-Ansatz wäre es von Vorteil, anstelle des in vitro schwach wirksamen Natriumstibogluconats die Alternativpräparate Pentamidin oder Amphotericin B zu verwenden. Zwecks Verringerung von Zeit- und Arbeitsaufwand kann bei Analysen zur Zytotoxizität ein bereits im Kulturmedium gut löslicher Indikatorfarbstoff eingesetzt werden, um die Aktivitäten unmittelbar nach der ersten Inkubation ablesen zu können (vgl. Abschnitt 18.2).

Für die sinnvolle Erweiterung des Testsystems an Reinsubstanzen in Richtung klinisch problematischer Human- und Tierpathogene gelten die schon unter Abschnitt 11.2 genannten Kriterien, wobei sich für die Suche nach neuartigen Zytostatika eine Zusammenarbeit mit dem National Cancer Institute (Bethesda, USA) besonders anbietet (vgl. Abschnitt 8.3). Diese Kooperationen mit externen Instituten schaffen auch die notwendigen Voraussetzungen, um Verbindungen mit vielversprechender In-vitro-Aktivität auf das Tiermodell zu übertragen, wobei für den *Plasmodium-falciparum*-Stamm

K1 (→ Resistenz gegenüber dem 4-Aminochinolin-Derivat Chloroquin sowie dem Diaminopyrimidin-Derivat Pyrimethamin) Labormäuse nach Infektion mit *Plasmodium berghei* entsprechende Analogieschlüsse erlauben. Diesbezüglich gelten folgende IC₅₀-Aktivitätskriterien: $< 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ → äußerst aktiv; 10^{-3} - $10^{-2} \mu\text{g mL}^{-1}$ → sehr aktiv; 10^{-2} - $10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$ → aktiv; 10^{-1} - $5 \cdot 10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$ → schwach aktiv; $> 5 \cdot 10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$ → inaktiv. Somit kann Aculeatin A als „aktiv“ beurteilt werden. Das „Mausmodell“ eignet sich auch ideal für den Fall trypanozider Reinsubstanzen gegen die Erreger der Schlafkrankheit, unter besonderer Berücksichtigung der gefährlicheren ostafrikanischen Form. Im Verlauf der Suche nach neuartigen Therapeutika gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Ostafrika) sowie *Trypanosoma brucei gambiense* (Westafrika) wäre zu überlegen, das Spermidin-haltige Trypanothion als potentiell „Angriffsziel“ näher ins Auge zu fassen, welches in Trypanosomen das Tripeptid Glutathion als bekanntes Puffersystem für zelluläre Redoxsysteme ersetzt (vgl. Pühler et al., 1999, S. 229).

Zur näheren physiologischen Charakterisierung der erwiesenermaßen zytotoxischen Aculeatine dienen mit gutem Erfolg molekularbiologische Techniken wie die bewährte mRNA-Phänotypisierung im zellulären Bereich, in deren Verlauf pathologisch relevante Botenstoffe (z. B. Interleukin-2) bereits auf der Ebene ihrer mRNA-Transkripte quantifiziert werden. Der Chemilumineszenz-Test einerseits unter Zusatz von FMLP, andererseits bei Anwesenheit von Hyperoxid in Salzform (z. B. KO_2) läßt die Frage entscheiden, ob die hohe antioxidative Aktivität vor allem von Aculeatin A auf Inhibition der NADPH-Oxidase oder Radikalfang oder auch auf beidem beruht.

Infolge seiner Instabilität konnte Aculeatin C nur an Protozoen sowie ausgewählten Zelllinien getestet werden, wie in Kapitel 10 bereits mehrmals erwähnt. Zum unmittelbaren Aktivitätsvergleich zwischen Reinkomponenten und Referenzsubstanzen wird im chemischen Bereich stets die Stoffmengenkonzentration herangezogen. Allerdings weisen einige der simultan eingesetzten Chemotherapeutika (z. B. Tetracyclinhydrochlorid, Melarsoprol) Molekulargewichte im M_R -Bereich der Aculeatine A/B auf, so daß auch die Massenkonzentrationen wichtige Anhaltspunkte über lohnende Bioaktivitäten liefern. Die bereits große antiprotozoäre Basisaktivität des lipophilen Rohextraktes, welche von den Reinsubstanzen lediglich um den Faktor 10-20 übertroffen wird (vgl. Abschnitt 10.2), hat ihre Ursache primär in der hohen Konzentration an Sekundärmetaboliten im Rhizom, wobei der vorliegende Fall selbst bei Pflanzen als erfreuliche Ausnahme zu werten ist.

Der bereits in den Abschnitten 9.3.1 und 9.3.2 dargestellte Reaktionsansatz zur quantitativen Veresterung der Aculeatine A/B an ihrer exocyclischen Hydroxygruppe legt die Folgerung nahe, entsprechende Derivate gezielt zu synthetisieren und dann pharmakologisch zu bewerten, was freilich außerhalb des zeitlichen Rahmens dieser Diplomarbeit liegt. Innerhalb der Reihe von Acetyl- über Propionyl-, Butyryl- zu Cinnamoyl-Aculeatin A nahm deren Zytotoxizität an KB-Zellen mit zunehmender Kettenlänge der Säurekomponente signifikant ab, wobei die - wenn auch schwache - antibakterielle Wirkung der Ausgangsverbindung völlig verloren ging (vgl. Heilmann et al., 2000b). Die Schlüsselrolle der OH-Gruppe in Position 4 betreffend Bioaktivität wird nicht zuletzt daraus ersichtlich, daß das auf Seite 120 erwähnte Isolat Aculeatin D mit stereochemischer Inversion an C-4 im Verhältnis zum Epimer Aculeatin B doppelte Zytotoxizität (→ KB-Zellen) bei gleichzeitig halbiertem antiplasmodialer Wirkung (→ *P. falciparum* K1/NF 54) aufweist (vgl. Heilmann et al., 2001a, S. 1282). In Zusammenarbeit mit dem Institut für Organische Chemie der Universität Zürich wurden ferner Untersuchungen angestellt, die 4-Hydroxygruppe der Aculeatine A/B jeweils konfiguratativ zu invertieren, um semisynthetisch abgewandelte Dioxadispirodienon-Strukturen zu erzeugen, was bislang noch zu keinem Erfolg führte (vgl. Gorla, 2001).

Diese semipräparativen Umwandlungen können schließlich auch herangezogen werden, um die Aculeatine gemäß der Tracer-Methode zu markieren und somit an ihrem Wirkort in zellulären wie subzellulären Strukturen zu lokalisieren. In der Folge ebenen Rezeptorstudien den Weg, um die pharmakophore Gruppe dieser neuartigen Naturstoffe auf die erwünschten physiologischen Effekte hin zu optimieren. In Übereinstimmung mit den gewonnenen Ergebnissen folgt aus der Pfeifferschen Regel für die bemerkenswert bioaktiven Aculeatine eine entsprechend hohe Stereoselektivität (vgl. Kapitel 3).

Rückblickend bleibt noch zu bemerken, daß die ursprüngliche Zielsetzung der vorliegenden Diplomarbeit, anhand ethnopharmakologischer Kenntnisse neuartige, medizinisch relevante Naturstoffe mit vielversprechenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzuspüren, im wesentlichen erreicht worden ist (vgl. Teil I). Vor allem soll diesbezüglich auch die Bedeutung der klassischen Disziplin „Pharmakognosie - Phytochemie“ in den Vordergrund treten, welche durch ihre große Methodenvielfalt die neueren, eher molekularbiologisch orientierten Fachrichtungen der Pharmazie geradezu ideal ergänzt und damit ihre Schlüsselposition in der Arzneistoffforschung zu Recht behauptet.

VI Experimenteller Teil

14 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Die Sammlung der Rhizome (ca. 1 kg) und Blätter (ca. 2,5 kg) von *Amomum aculeatum* erfolgte in der Zentralprovinz von Papua-Neuguinea nahe Port Moresby im September 1996 anlässlich einer ethnobotanischen Exkursion unter Leitung von Professor Otto Sticher. Dr. Matthias Baltisberger (Geobotanisches Institut, ETH Zürich, CH) ordnete neben Dr. Max M. J. van Balgooy (Rijksherbarium, Leiden, NL) das luftgetrocknete Material systematisch ein, wobei beide Institutionen einen Herbarbeleg mit der Identifikationsnummer ETH 96/1 erhielten.

Nach Zerschneiden vor allem der verholzten Pflanzenteile zu Stücken von wenigen Zentimetern Länge wurden diese in einer Ultrazentrifugalmühle - Zyklonmodus (Retsch, Berlin, D) zu Pulver mit < 1 mm Korngröße (Siebeinsatz: 1,0) gemahlen.

Für die sukzessiv-erschöpfende Extraktion des pulverisierten Rhizoms mit Petrol-ether (24,5 L), Dichlormethan (17,5 L), Methanol (36,0 L), Methanol : Wasser (7 : 3; 31,5 L) und Wasser (20,0 L) kam ein kombiniertes Verfahren aus Mazeration (über Nacht) mit Perkolation (bei Tag) zum Einsatz. Petrolether 30-60 °C purum wurde vor Gebrauch frisch überdestilliert, alle übrigen Lösungsmittel lagen in HPLC-Qualität (Romil, Kölliken, CH) vor. Das Drogenpulver mischte man vor Entfettung im lipophilen und weiterem Auszug im hydrophilen Bereich in einer Perkulationsröhre (17 cm × 42 cm) unterschüssig (Volumenverhältnis 2 : 1) mit Quarzsand, gereinigt und gegläht (Hänseler, Herisau, CH) und engte die gebildeten Extrakte fortlaufend an Rotationsverdampfern (Büchi, Flawil, CH) bei Temperaturen ≤ 40 °C ein. Für die Vergleichsextraktion der Blätter hingegen wurden lediglich 25 g an pulverisiertem Material im Volumenverhältnis 1 : 1 mit Quarzsand gemischt und in einem Chromatographierohr (3,3 cm × 40 cm) mit überdestilliertem Petrolether 30-60 °C purum perkoliert. Der Zeitbedarf für

die Perkolation mit Petrolether betrug - unter dünnenschichtchromatographischer Effektivitätskontrolle (vgl. Abschnitt 15.1) - für das Rhizom etwa 10 Tage, für die Blätter 48 h. Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte die Aufbewahrung aller Rohextrakte nach Lyophilisierung an der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Christ, Osterode, D) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Stickstoff und Lichtabschluß.

15 Chromatographische Verfahren

15.1 Dünnschichtchromatographie

Sowohl für die analytischen als auch die präparativen Anwendungen kamen stets die beschichteten DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ 0,2 mm (Merck, Darmstadt, D) in speziellen DC-Kammern (Camag, Muttenz, CH) unter Kammersättigung zur Anwendung. Sämtliche verwendeten Lösungsmittel der Herstellungsqualität „purum“, „purissimum“, „p. a.“ und „HPLC-rein“ wurden zuvor auf Abwesenheit organischer Verunreinigungen dünnenschichtchromatographisch untersucht; lediglich Petrolether 30-60 °C purum sowie Tetrahydrofuran p. a. (Scharlau, Barcelona, E) mußten vor Gebrauch frisch überdestilliert werden. Die Anfärbung organischer Bestandteile erfolgte durch sukzessives Besprühen der entwickelten DC-Platten mit Lösung I (5 %ige (v/v) ethanolische Schwefelsäure p. a.) und Lösung II (1 %ige (w/v) ethanolische Vanillinlösung p. a.) des Vanillin-Schwefelsäure-Reagenzes vor Erhitzen auf 110 °C für 5-10 min und Auswertung im VIS. Spezifische Verfärbungen sowie Löschverhalten oder Fluoreszenz einzelner Komponenten bei 254/366 nm wurden mit Bleistift an Ort und Stelle vermerkt und die DC-Platten abschließend zur Dokumentation mit Klarsichtfolie überklebt.

Zur präparativen dünnenschichtchromatographischen Reindarstellung von Aculeatin C erfolgte die linienförmige Auftragung von jeweils 5-10 mg der entsprechenden VLC-Fraktion auf eine MeOH-gesäuberte DC-Platte mittels Linomat IV (Camag, Muttenz, CH) über 18 cm bei einer Trennstrecke von 8 cm. Nach Entwicklung in Tcm : Tlo : MeOH (7 : 4 : 1), UV-Detektion und Auskratzen der gewünschten Zone wurde die

Substanz durch Tcm : MeOH (9 : 1) unter Umrühren desorbiert, die entstandene Lösung filtriert und zum Schluß an 20 cm³ Sephadex LH-20 aufgereinigt (vgl. Abschnitt 15.2). Dieses Verfahren kam bei rund 28% (w/w) der VLC-Gesamtausbeute für Dcm : EtOAc (4 : 6) zur Anwendung.

15.2 Säulenchromatographie

Bei der Vakuum-Flüssigkeitschromatographie (VLC) wurde der Petrolether-Rohextrakt zu vier gleich großen Portionen von jeweils 2,78 g pro Durchlauf an dieselbe Menge von Säulenmaterial gebunden und anschließend auf die trocken gepackte stationäre Phase aufgetragen: Kieselgel 60 A C. C., 35-70 µm (Chromagel, Peypin, F); 120 cm³ Bettvolumen. Nach Überschichten des adsorbierten Materials mit Quarzsand saugte man dann unter leichtem Vakuum (Wasserstrahlpumpe) eine eluotrope Fließmittelreihe steigender Hydrophilie im Stufengradienten zu 20 % (v/v)-Schritten durch die stationäre Phase, das heißt Hx (10) → Hx : Dcm (8 : 2) → Hx : Dcm (6 : 4) →→ Dcm (10) →→ EtOAc (10) → → MeOH (10). Alle verwendeten Lösungsmittel waren von HPLC-Qualität (Romil).

Die erhaltene VLC-Fraktion für Dcm : EtOAc (6 : 4) wurde zu zwei identischen Portionen nach Adsorption an jeweils 1 g der stationären Phase über eine Offene Säule (OCC) zum Aculeatin-A/B-Rohprodukt gereinigt: Kieselgel 60 A C. C., 60-200 µm (Chromagel); Dcm : MeOH (9,75 : 0,25), HPLC-Qualität (Romil); 141 cm³ Bettvolumen. Bei 47 % (w/w) der VLC-Fraktion für Dcm : EtOAc (4 : 6) führte man die Reinigung zum Aculeatin-C-Rohprodukt in zwei gleich großen Portionen ebenso über eine Offene Säule (OCC) aus: Kieselgel 60 A C. C., 60-200 µm (Chromagel); Mtbe : Dee : Hx (7,50 : 2,41 : 0,09), HPLC-Qualität (Romil); 53 cm³ Bettvolumen. Die Endausbeute für Aculeatin A/B (zugrundeliegende VLC-Fraktion vollständig aufgetrennt) ergab sich bei weiterer Aufarbeitung der Rohprodukte wiederum jeweils zu zwei Portionen, nach Lösung in wenigen Millilitern der mobilen Phase, mittels Offener Säule (OCC): Sephadex LH-20; Chx : Dcm : MeOH (7 : 4 : 1), HPLC-Qualität; 79 cm³ Bettvolumen. Zur Endreinigung des Hauptanteils von Aculeatin C (zugrundeliegende VLC-Fraktion zu 75 % aufgetrennt) kam gleichermaßen in zwei Schritten dieselbe stationäre Phase zum Tragen, hingegen MeOH, HPLC-Qualität (Romil) als Fließmittel, worin auch das Sepha-

dex-LH-20-Pulver aufbewahrt wurde. Vor Gewinnung sämtlicher physikalischer wie pharmakologischer Substanzdaten erfolgte stets eine kurze Aufreinigung der bei -20 °C unter Stickstoff und Lichtabschluß gelagerten Reinkomponenten: Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, S); MeOH, HPLC-Qualität (Romil); 20 cm^3 Bettvolumen.

Die Säuberung von Sephadex LH-20 bewerkstelligte man mit 1 % (w/v) NaOH p. a. sowie 1 % (w/v) Na_2EDTA p. a. in MeOH, HPLC-Qualität (Romil) unter tropfenweisem Zusatz von Wasser bis zur vollständigen Solubilisierung. Je nach Grad der Verunreinigung betrug die Einwirkungszeit 12-24 h, zum Nachspülen verwendete man MeOH.

16 Spektrometrische und spektroskopische Verfahren

16.1 Ultraviolett-spektroskopie

Zur Aufnahme der UV-Spektren lagen die Aculeatine A - C als Lösung in Methanol von HPLC-Qualität (Romil) zu $16\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ vor und wurden in Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL[®] 1,000 (Hellma, Müllheim, D) überführt. Als Meßgerät diente das Spektrometer UVIKON 930 (Kontron, Herts, GB).

16.2 Polarimetrie

Die Bestimmung der optischen Drehung erfolgte als Lösung in Trichlormethan von HPLC-Qualität (Romil) zu folgenden Konzentrationen: Aculeatin A $\rightarrow 9,39 \cdot 10^{-3}\text{ g cm}^{-3}$, Aculeatin B $\rightarrow 2,00 \cdot 10^{-3}\text{ g cm}^{-3}$, Aculeatin C $\rightarrow 1,27 \cdot 10^{-2}\text{ g cm}^{-3}$. Nach gründlichem Spülen des Polarimeterrohres ($l = 1\text{ dm}$) mit Aceton, Isopropylalkohol und Trichlormethan sowie anschließendem Trocknen im Stickstoff-Strom wurden die Messungen bei 589 nm (Natrium-D-Linie) und 23 °C mit Hilfe des Polarimeters Perkin-Elmer 241 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) durchgeführt.

16.3 Kernresonanz-Spektroskopie

Zur Aufzeichnung des ^1H -NMR-Spektrums für Aculeatin B, der ^{13}C -NMR-Spektren für die Aculeatine A/B sowie des $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektrums für Aculeatin A fand das Spektrometer Bruker AMX-300 (Betrieb bei 300,13 MHz für ^1H und 75,47 MHz für ^{13}C), zur Aufnahme aller übrigen NMR-Spektren das Gerät Bruker DRX-500 (Betrieb bei 500,13 MHz für ^1H und 125,77 MHz für ^{13}C) (Bruker, Fällanden, CH) am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften der ETH Zürich Verwendung. Bezüglich der Referenzierung wurden die internen Standardwerte für C_6D_6 (δ (^{13}C): 128,0 ppm; δ (^1H) für Spuren von C_6H_6 : 7,16 ppm) und CDCl_3 (δ (^{13}C): 77,0 ppm; δ (^1H) für Spuren von CHCl_3 : 7,27 ppm) herangezogen. Bei allen Substanzen erfolgten die Messungen zu je 20-30 mg bei 295 K in etwa 500 μL deuteriertem Lösungsmittel; lediglich für das Inverse-Gated-Decoupling- ^{13}C -Spektrum und die $^{13}\text{C},^{13}\text{C}$ -INADEQUATE-Spektren lagen bis zu 110 mg an Einwaage vor unter Zusatz von ca. 1 mg Chrom(III)-acetylacetonat (Sigma-Aldrich, Steinheim, D). Die H/D-Austauschreaktion wurde durch Beigabe von 50 μL Deuteriumoxid (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) zum $^{13}\text{C},^{13}\text{C}$ -INADEQUATE-Ansatz bewerkstelligt. Als Meßröhrchen kamen die „Precision NMR Sample Tubes“, 5 mm \times 178 mm (Dr. Glaser, Basel, CH) zur Anwendung, als Lösungsmittel „Benzene- d_6 “ (Dr. Glaser) für das NOESY- Spektrum von Aculeatin A/B, „Chloroform- d “, stabilisiert mit Silber (Cambridge Isotope Laboratories) hingegen bei allen übrigen Aufnahmen.

16.4 Massenspektrometrie

Die DEI-Spektren (Ionisierungsenergie: 70 eV) wurden neben dem DCI-Spektrum für Aculeatin C (NH_3 als Reaktandgas) mit dem Massenspektrometer Hitachi-Perkin-Elmer-RMUGM erzeugt, wohingegen für die FAB-Messung (Ionisierungsenergie: 8,3 keV; Matrix: 3-Nitrobenzylalkohol) bei Aculeatin A das Gerät VG-ZAB-2-SEQ zum Einsatz kam. Allen Bestimmungen lag eine positive Ionisierung mit der Angabe des relativen Masse/Ladungs-Verhältnisses in Prozent zugrunde.

17 Chemische Derivatisierung

Die Veresterung der Aculeatine A und B erfolgte mit geringen Abänderungen nach der Vorschrift in Linden et al., 1996, S. 590. Dazu ließ man zunächst je 20 mg Reinsubstanz mit dem etwa sechsfachen molaren Überschuss ($\cong 66$ mg) an 4-Brombenzoesäurechlorid 98 % (Sigma-Aldrich) in 1,6 mL Pyridin p. a. (Fluka, Buchs, CH) für 15 h bei 45 °C unter Umrühren reagieren, wobei eine deutliche Farbvertiefung von Gelb zu Braunrot auftrat. Nach möglichst quantitativem Entfernen des Pyridins an Rotationsverdampfer und Lyophilisator zeigte der Rückstand in entsprechenden Dünnschichtchromatogrammen eine Ausbeute an verestertem Produkt von ca. 60 % (Aculeatin A) beziehungsweise 40 % (Aculeatin B): DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck,); Dcm : MeOH (9,85 : 0,15), HPLC-Qualität (Romil); Detektion bei 254 nm. Die Auftrennung des vorliegenden Substanzgemisches erfolgte mittels Säulenchromatographie: Kieselgel 60 A C. C., 60-230 μm (Chromagel); Dcm : MeOH (9,8: 0,2); 35 cm³ Bettvolumen. Zur dünn-schichtchromatographischen Analyse der Einzelfractionen dienten wiederum die schon genannten DC-Alufolien (vgl. Abschnitt 15.1) mit dem entsprechenden Fließmittel sowie Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz p. a. neben UV-Licht (254 nm), für die Kristallisationsversuche mit aufgereinigtem Produkt unter anderem NMR-Meßröhrchen, 5 mm \times 178 mm (Dr. Glaser).

18 Pharmakologische Untersuchungen

18.1 Antimikrobielle Aktivität

Für die Prüfung auf antibakterielle wie antimykotische Wirkung kamen folgende standardisierte Teststämme zum Einsatz: *Bacillus cereus* (ATCC 10702), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Micrococcus luteus* (ATCC 99431), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) und *Candida albicans* (ATCC 25790). Der für die aktivitätsgeleitete Isolierung

etablierte TLC-Bioautographie-Overlay-Assay (vgl. Saxena et al., 1995) lief dabei in der Weise ab, daß der Petrolether-Rohextrakt zuerst mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennt wurde: TLC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck); 1. Dimension → Dcm : MeOH (9 : 1), 2. Dimension → EtOAc : Hx (1 : 1). Nach Trocknen und Zerteilen des entwickelten Chromatogramms zu gleichgroßen Stücken (10 cm × 10 cm) folgte deren Überschichtung in Petrischalen mit je 10 mL Impfagar, bereitet aus sterilisiertem Mueller-Hinton-Agar (Oxoid, Basingstoke, GB) und je 100 µL Impfbouillon, welche wiederum als Übernachtskultur von 30 µL *B.-cereus*-Stammlösung in 10 mL Mueller-Hinton-Bouillon (Oxoid) zu einer Dichte von 10⁷-10⁸ Keimen pro Milliliter vorlag. Nach Inkubation für 16-20 h bei 37 °C wurden die Agarschichten mit einer 0,25 %igen (w/v) wäßrigen Lösung von 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Fluka) besprüht und 30 min später betrachtet. Zonen ohne bakteriellen Metabolismus erschienen hell auf violetterm Hintergrund und zeigten im Vergleich mit dem parallel entwickelten Chromatogramm unter identischen Bedingungen klar die Lokalisierung bakterizider Komponenten an.

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) für die Aculeatine A und B beruhte hingegen auf einer Variante der Bouillon-Verdünnungsmethode nach Frost, 1994. Jeweils 30 µL der Bakterien- und Pilz-Stammlösungen transferierte man in 10 mL Mueller-Hinton-Bouillon (→ Bakterien) beziehungsweise 10 mL Sabouraud-Flüssigmedium (Oxoid) (→ Pilz) zur Inkubation für 12 h bei 37 °C. Nach Verdünnung mit frischem Medium im Verhältnis 1 : 100 und Kontrollausstrich zur Identitätsüberprüfung (Referenzkulturen) wurden 51,2 µL der methanolischen Stammlösung mit der Testkomponente ($c_m = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) in Vertiefung 1 einer MICROTTEST™ Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt. Dem Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff folgte die Zugabe von 50 µL DMSO purum, 50 µL steriler Bouillon und 100 µL keimhaltiger Bouillon, so daß eine Substanzkonzentration von 256 µg mL⁻¹ (= 256 ppm) vorherrschte. Unter fortlaufender 1 : 2-Verdünnung mit der auf 10⁵-10⁶ Keime pro Milliliter eingestellten Bouillon in den folgenden Vertiefungen ließ sich somit - bei Beachtung der DMSO-Eigentoxizität - ein Konzentrationsbereich von 0,5-128 ppm erfassen, indem nach Inkubation für 12 h bei 37 °C jeweils 10 µL einer 0,25 %igen (w/v) wäßrigen Lösung von 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Fluka) in jede Vertiefung pipettiert wurden, um nach 15 min die Farb-reaktion zu detektieren, wobei am MIC-Wert der Umschlag nach Violett definitions-

gemäß gerade unterbleiben mußte. Neben Blindproben ohne Testsubstanz sicherten Positivkontrollen mit Chloramphenicol (Siegfried, Zofingen, CH) und Tetracyclinhydrochlorid (Fluka) für Bakterien sowie 5-Fluorcytosin (Sigma, St. Louis, USA) und (\pm)-Miconazolnitrat (Sigma) für Pilze die Meßergebnisse ab (s. auch Abb. 8-1 auf S. 59). 5-Fluorcytosin wurde dabei zur vollständigen Solubilisierung in MeOH:H₂O(1:1) gelöst.

Zu Beginn der Aktivitätsprüfung an *Leishmania donovani* inkubierte man Peritonealmakrophagen der Maus mit RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FBS in 16-Kammer-Objektträgern (Lab-tec). Nach 24 h erfolgte die Zugabe von amastigoten *L.-donovani*-Formen (Stamm MHOM-ET-67/L82), welche aus einer infizierten Hamster-Milz stammten, in dreifachem Überschuß zu den Makrophagen, wobei 4 h später die noch freien Protozoen mit dem Wechsel des überstehenden Mediums entfernt wurden. Dem Ersatz der Kulturflüssigkeit durch entsprechende Verdünnungen interessierender Komponenten am Folgetag und Inkubation bei 37 °C unter einer luftähnlichen, mit 5 % (v/v) CO₂ angereicherten Atmosphäre für 96 h schlossen sich das Absaugen des Mediums, die Fixierung der Objektträger in Methanol sowie eine Färbung mit Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung nach Giemsa an. Das Verhältnis von infizierten zu nicht-infizierten Makrophagen wurde mikroskopisch prozentual zum Kontrollansatz bestimmt, um abschließend den IC₅₀-Wert über lineare Regression zu berechnen. Als Positivkontrolle diente Natriumstibogluconat.

Die Aktivitätsanalyse bezüglich der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* K1 (Resistenzstamm gegenüber Chloroquin und Pyrimethamin) sowie *Plasmodium falciparum* NF 54 (empfindlich für alle bekannten Therapeutika) basierte auf einer Variante des [³H]-Hypoxanthin-Inkorporationstests (vgl. Matile und Pink, 1990). Konkret wurden dabei infizierte Erythrozyten des Menschen für 48 h bei 37 °C unter einer O₂-reduzierten/CO₂-angereicherten Atmosphäre in Mikrotiterplatten mehreren Verdünnungsreihen der Testkomponenten ausgesetzt. Nach Zugabe von [³H]-Hypoxanthin, eintägiger Inkubation und Fixierung der Zellen auf einem Glasfaserfilter folgte die Registrierung der vorhandenen Radioaktivität mittels eines Flüssigkeits-Szintillations-Zählgerätes. Die sich ergebende sigmoide Hemmkurve lieferte die gewünschten IC₅₀-Werte (vgl. auch Ancelin et al., 1998; Desjardins et al., 1979; Ponnudurai, 1987). Als Positivkontrollen dienten Chloroquin sowie Qinghaosu.

Das Testsystem für *Trypanosoma brucei rhodesiense* folgte im wesentlichen der Anleitung von Baltz et al., 1985, indem 50 µL MEM ergänzt durch 2-Mercaptoethanol

und 15 % (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum in eine 96er Mikrotiterplatte pipettiert sowie die betreffenden Substanzen in Reihenverdünnungen vorgelegt wurden, bevor man 50 µL der Trypanosomen-Suspension (Stamm STIB 900) jeder Vertiefung zugab und den Ansatz bei 37 °C unter einer 5 %igen (v/v) CO₂-Atmosphäre für 72 h inkubierte. Nach einer weiteren zwei- bis vierstündigen Inkubation mit 10 µL einer Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Alamar Blue[®] ermöglichte ein Cytofluor-2300-Lesegerät (Millipore, Bedford, USA) die quantitative Messung der Fluoreszenzstrahlung von 590 nm bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm (vgl. Rätz et al., 1997). Zur Berechnung der IC₅₀-Werte wertete man die Fluoreszenzrate prozentual zum Kontrollwert aus; als Positivkontrolle wurde Melarsoprol herangezogen.

Das Screeningverfahren für *Trypanosoma cruzi* startete mit L6-Zellen (Skelettmyoblasten der Ratte), welche man wiederum in 96er Mikrotiterplatten zu einer Dichte von 2 000 Zellen pro 100 µL RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 10 % (v/v) FBS und 2mM L-Glutamin, aussäte, um nach 24 h 5 000 trypomastigote Formen von *T. cruzi* (Stamm Tulahuen C2C4 mit β-Galactosidase-Gen (lacZ)) pro Vertiefung neben einer Reihenverdünnung interessierender Komponenten zuzufügen. Im Anschluß an die Inkubation bei 37 °C unter einer 5 %igen (v/v)-CO₂-Atmosphäre für 4 Tage erfolgte die Extinktionsmessung bei 540 nm, nachdem das Substrat „CPRG/Nonidet“ in einer zwei- bis vierstündigen Farbreaktion von den Zellen umgesetzt worden war. Zur Berechnung der IC₅₀-Werte diente die erhaltene sigmoide Hemmkurve, als Positivkontrolle Benzimidazol.

18.2 Zytotoxizität

Die Prüfung an KB-Zellen (Zervix-Adenokarzinom des Menschen; ATCC CCL 17) erfolgte mit einigen Abänderungen auf der Grundlage der Screening-Technik nach Swanson und Pezzuto, 1990, S. 273-297, wobei 96er MICROTEST[™] Zellkulturplatten (Becton Dickinson) sowie ein Inokulum von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter zum Einsatz kamen. Die gewünschten Testkonzentrationen wurden durch Verdünnung der ethanolschen Stammlösung mit Wasser bereitet, so daß der Ethanolgehalt bei einem Ansatzvolumen von 150 µL stets ≤ 1 % (v/v) betrug. Zur quantitativen Analyse fügte man 15 µL einer 0,5 %igen (w/v) Lösung von 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetra-

zoliumbromid (Fluka) in PBS-Puffer nach 72 h zu. Im Laufe der Inkubation für 4 h bei 37°C metabolisierten die überlebenden Zellen das Reagenz zu einem unlöslichen Formazan-Farbstoff, welcher nach Absaugen des Kulturmediums in 150 µL einer 10 %-igen (w/v) Lösung von Natriumdodecylsulfat (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, USA) in Wasser solubilisiert wurde. Nach erneuter Inkubation für 24 h bei Raumtemperatur erfasste ein Mikroplatten-Lesegerät MRX (Dynex, Embrach, CH) die Extinktion bei 540 nm. Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte trug man die optische Dichte gegen den dekadischen Logarithmus der sechs eingesetzten Substanzkonzentrationen auf. Als Positivkontrolle kam Podophyllotoxin > 98 % HPLC (Fluka) zum Einsatz (vgl. auch Heilmann et al., 2001b, S. 2193 f.).

Für Vergleichsuntersuchungen an L6-Zellen (Skelettmyoblasten der Ratte; ATCC CRL 1458) lagen die Komponenten als Lösung in DMSO bei einer Stammkonzentration von 10 mg mL⁻¹ vor, wobei infolge der Eigentoxizität eine Endkonzentration für DMSO von ≤ 1 % (v/v) einzustellen war. Die Inkubation wurde in dem Medium RPMI 1640 mit Zusatz von 10 % (v/v) FBS sowie 1 % (v/v) einer 200-millimolaren L-Glutaminlösung bei 37 °C unter einer luftähnlichen, mit 5 % (v/v) CO₂ angereicherten Atmosphäre in 96er Costar™ Zellkulturplatten durchgeführt. Dabei hat es sich bewährt, Suspensionen auf 4 · 10⁴ Zellen pro Milliliter einzustellen, nach Absetzen der Zellen über Nacht die Kulturflüssigkeit abzusaugen und anschließend 150 µL Medium mit der jeweiligen Testkomponente zuzufügen, um in der Folge eine Verdünnungsserie über sechs Einzelschritte jeweils im Verhältnis 1 : 3 zu bereiten. Pro Zellkulturplatte konnten maximal vier Substanzen geprüft werden. Nach Inkubation für 72 h erforderte die Bestimmung des MIC-Wertes eine genaue Betrachtung der Platten unter einem inversen Mikroskop, wohingegen die Berechnung der IC₅₀-Werte eine weitere zweistündige Inkubation mit 10 µL einer Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Alamar Blue® (Laboserv, Gießen, D) pro Vertiefung voraussetzte. Ein Cytofluor-2300-Lesegerät (Millipore) ermöglichte die quantitative Messung der Fluoreszenzstrahlung von 590 nm bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm. Als Positivkontrolle kam wiederum Podophyllotoxin zum Einsatz.

Die Bestimmung der Zytotoxizität für interessierende Isolate an Peritonealmakrophagen der Maus erfolgte simultan zur Aktivitätsprüfung an *Leishmania donovani* im selben Versuchsansatz durch Ermitteln derjenigen minimalen Testkonzentration, für die keine überlebenden Makrophagen mehr vorlagen (siehe Abschnitt 18.1).

18.3 Arachidonsäure-Metabolismus

Die für das Cyclooxygenase-1-Testsystem verwendete mikrosomale Enzym-Präparation stammte aus Schafsamenblasen. Für die zugrundeliegende Testmischung wurden 1,0 µg an Cyclooxygenase-Trockensubstanz, 1 mmol reduziertes Glutathion (Merck), 1 mmol Adrenalinbitartrat (Caelo, Hilden, D) und 0,5 mmol Na₂EDTA (Merck) in 190 µL 0,1-molarem TRIS-HCl-Puffer aufgelöst. Nach Zugabe von 10 µL der ethanolischen Test- oder Kontrollösung sowie Vorinkubation für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte der Reaktionsstart mit 10 µL einer 4,5-mikromolaren 1-[¹⁴C]-Arachidonsäurelösung, 0,05 µCi abs. (Amersham, Braunschweig, D) bei 37 °C im Wasserbad, der Reaktionsstop nach 20 min mit 10 µL 10 %iger (v/v) Ameisensäure und Einfrieren bei -20 °C. Zur Auftrennung der Arachidonsäure-Metaboliten diente ein computergesteuertes HPLC-Gerät 1050 (Hewlett-Packard, Böblingen, D) bei Wahl der stationären Phase LiChrospher® 100 RP-18 (Merck). Unter Bezug der durch Radioaktivitätsdetektion bestimmten Peakflächen für Prostaglandin E₂ auf die Flächen für die Blindproben ohne Testsubstanz ließ sich die Hemmung der Cyclooxygenase-1 in Prozent des Kontrollwertes berechnen, wobei Indometacin als Positivkontrolle diente (detailliert bei Heilmann, 1997, S. 224 f.).

Als Basisansatz für das Cyclooxygenase-2-Testsystem diente eine Mischung aus 10 µL von 0,1-millimolarem TRIS-HCL-Puffer pH 8,0, 10 µL von 50-millimolarem Na₂EDTA (Merck) und 50 µL von 18-millimolarem Adrenalin-D-hydrogentartrat (Fluka) - jeweils in Assaypuffer gelöst - neben 10 µL der Testsubstanz in Ethanol p. a. zu 50 µg mL⁻¹. Die nach entsprechender Verdünnung mit Enzympuffer in gebrauchsfertiger Form zu 0,2 U pro Mikroliter vorliegende ovine Cyclooxygenase-2 (Reinenzym von Cayman, Ann Arbor, USA) wurde nach Auftauen, Temperieren, Zentrifugation und Volumenergänzung auf 100 µL der Probe beigefügt sowie nach Zusatz von 10 µL einer 5-mikromolaren Hämatinlösung in Assaypuffer für 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch 10 µL einer ethanolischen, 5-mikromolaren Arachidonsäurelösung, der Abbruch nach Inkubation bei 37 °C im Wasserbad für 20 min mittels 10 µL einer 10 %igen (v/v) Ameisensäure. Zur Detektion der HPLC-getrennten Produkte kam im Falle von 1-[¹⁴C]-Arachidonsäure, 0,05 µCi abs. (Amersham) der Radioaktivitätsmonitor LB 507 B (Berthold, Wildbad, D) zum Einsatz, für nicht-markierte Arachidonsäure der Photodiodenarray-Detektor HP 1040 (Hewlett-Packard). Die

Berechnung der Cyclooxygenase-2-Hemmung in Prozent des Kontrollwertes basierte auf der Integration der Chromatogramm-Peakflächen für PGE₂ und Arachidonsäure, wobei das Flächenverhältnis die Bestimmung der relativen Hemmwerte ermöglichte. Indometacin diente wiederum als Positivkontrolle (weitere experimentelle Details vgl. Reininger, 2001, S. 218-234).

Die Leukozyten für das 5-Lipoxygenase-Testsystem wurden aus Schweineblut isoliert und als Suspension auf $1,5 \cdot 10^7$ intakte Zellen pro Milliliter eingestellt. Der Testansatz bestand aus 2,5 mL der Leukozytenpräparation, 50 µL ethanolischer Substanzlösung, 10 µL einer 9-mikromolaren 1-[¹⁴C]-Arachidonsäurelösung, 0,1 µCi abs. (Amersham), 10 µmol Ionophor A 23187 (Boehringer, Mannheim, D), 20 µL einer 0,2-molaren CaCl₂-Lösung und 10 µL einer 10-mikromolaren Arachidonsäurelösung (Sigma Chemie, München, D). Nach Inkubation für 8 min bei 37 °C im Wasserbad stoppte man die Reaktion mit 10 µL 25 %iger (v/v) NaOH sowie 525 µL 1 %iger (v/v) Ameisensäure und schüttelte die Arachidonsäure samt den entstandenen Metaboliten mit 4 mL Essigsäureethylester aus. Dem Eindampfen des Extraktes folgte ein Aufnehmen in 100 µL Ethanol p. a. und die anschließende Auftrennung mittels HPLC an der für den Cyclooxygenase-1-Test (vgl. S. 135) beschriebenen Anlage. Die Berechnung der 5-Lipoxygenase-Hemmung in Prozent des Kontrollwertes basierte auf einem Vergleich der durch Radioaktivitätsdetektion ermittelten Peakflächen für 5-Hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraensäure mit den Flächen für die Blindproben ohne Testsubstanzen, wobei Nordihydroguajarsäure als Positivkontrolle diente (für weiterführende Informationen vgl. Heilmann, 1997, S. 227 f.).

18.4 Chemilumineszenz

Polymorphkernige Granulozyten aus humanem Spenderblut wurden in Suspension zu 50 µL mit demselben Volumen einer $2 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösung von Luminol (Sigma, Deisenhofen, D), 100 µL HBSS-Puffer und 50 µL der Testlösung (< 0,1 % (v/v) DMSO) gemischt sowie für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Reaktionsstart durch Zugabe von 50 µL einer $5 \cdot 10^{-7}$ -molaren FMLP-Lösung (Reagenz von Sigma) erfolgte die Messung verschiedener Substanzkonzentrationen mit Hilfe eines 6-Kanal-Biolumatens LB 9505 (Berthold) gegen einen Blindwert mit HBSS-Puffer anstelle von Testlösung. In Anpas-

sung an die vorherrschende Reaktionskinetik ließ sich die direkt nach Zugabe des Stimulus entstehende Chemilumineszenz - unter mehr oder minder starker Reduktion durch die Testkomponente - kontinuierlich über einen Zeitraum von 15 min bei 37 °C mit Quercetin als Positivkontrolle verfolgen (Details vgl. Heilmann, 1997, S. 221-223).

19 Physikalische Daten der Aculeatine A - C

Aculeatin A {*rel*-(2*R*,4*R*,6*R*)-4-Hydroxy-2-tridecyl-1,7-dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-on}.

Blaßgelbes Öl. C₂₆H₄₂O₄. M_R 418,61. M_E 418,31. $[\alpha]_D^{23}$ -5,3 Grad cm³ g⁻¹ dm⁻¹ (*c_m* = 0,9 % (w/v) in CHCl₃). λ_{\max} (UV) 230 nm; lg ϵ_{230} 4,17 (*c* = 3,7 · 10⁻⁵ M in MeOH). DEI-MS (70 eV; positive Ionisierung): *m/z* (relative Intensität) = 400 (< 1 %, C₂₆H₄₀O₃⁺, [M - H₂O]⁺), 285 (1 %), 235 (2 %), 208 (5 %), 165 (42 %), 107 (100 %). FAB-MS (8,3 keV; positive Ionisierung): *m/z* = 441 ([M + Na]⁺).

Aculeatin B {*rel*-(2*R*,4*R*,6*S*)-4-Hydroxy-2-tridecyl-1,7-dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-on}; {6-*epi*-Aculeatin A}.

Gelbes Öl. C₂₆H₄₂O₄. M_R 418,61. M_E 418,31. $[\alpha]_D^{23}$ +50,0 Grad cm³ g⁻¹ dm⁻¹ (*c_m* = 0,2 % (w/v) in CHCl₃). λ_{\max} (UV) 230 nm; lg ϵ_{230} 4,14 (*c* = 3,8 · 10⁻⁵ M in MeOH). DEI-MS (70 eV; positive Ionisierung): *m/z* (relative Intensität) = 419 (2 %, C₂₆H₄₃O₄⁺, [M + H]⁺), 400 (2 %), 208 (17 %), 165 (100 %), 107 (78 %).

Aculeatin C {*rel*-(2*R*,4*R*,6*S*)-2-[4-(3-Dodecyl-2-heptyl-3-hydroxy-6-oxocyclohexa-1,4-dienyl)-2-oxobutyl]-4-hydroxy-1,7-dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-on}.

Blaßgelbes Öl. C₄₂H₆₄O₇. M_R 680,95. M_E 680,47. $[\alpha]_D^{23}$ +1,4 Grad cm³ g⁻¹ dm⁻¹ (*c_m* = 1,3 % (w/v) in CHCl₃). λ_{\max} (UV) 227 nm; lg ϵ_{230} 4,18 (*c* = 2,9 · 10⁻⁵ M in MeOH). DEI-MS (70 eV; positive Ionisierung): *m/z* (relative Intensität) = 662 (< 1 %, C₄₂H₆₂O₆⁺, [M - H₂O]⁺), 386 (2 %), 368 (5 %), 293 (5 %), 280 (4 %), 222 (9 %), 194 (13 %), 168 (7 %), 110 (67 %), 84 (100 %). DCI-MS (positive Ionisierung): *m/z* (relative Intensität) = 679 (1 %, [M - H]⁺), 293 (100 %).

20 Taxonomische Übersicht

- Bacteria: *Bacillus cereus* Frankland et Frankland
Chlamydia pneumoniae Grayston et al.
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers
Helicobacter pylori (Marshall et al.) Goodwin et al.
Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn
Mycobacterium tuberculosis (Zopf) Lehmann et Neumann
Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula
Staphylococcus aureus Rosenbach
Staphylococcus epidermidis (Winslow et Winslow) Evans
- Fungi: *Aspergillus aculeatus* Lizuka
Aspergillus fumigatus Fresenius
Candida albicans (Robin) Berkhout
Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin
- Protozoa: *Cryptosporidium parvum* Tyzzer
Leishmania donovani Laveran et Mesnil
Plasmodium berghei Vincke et Lips
Plasmodium falciparum Welch
Trypanosoma brucei gambiense Dutton
Trypanosoma brucei rhodesiense Stephens et Fantham
Trypanosoma cruzi Chagas
- Helminthes: *Ascaris suum* Goeze
Echinococcus multilocularis Leuck. et Vogel
- Insecta: *Dacus oleae* Gmel.
Lymantria dispar L.
Lymantria monacha L.
- Mammalia: *Homo sapiens* L.
Rattus norvegicus Berkenhout
- Plantae: *Amomum aculeatum* Roxb.
Amomum aromaticum Roxb.
Amomum compactum Soland. ex Maton
Amomum koenigii J. F. Gmel.

- Plantae: *Amomum krevanh* Pierre ex Gagnep
Amomum maximum Roxb.
Amomum medium Lour.
Amomum subulatum Roxb.
Amomum villosum Lour.
Amomum xanthioides Wall.
Pimenta officinalis Berg
Podophyllum peltatum L.
Zingiber officinale Rosc.

VII Bibliographie

Alberts, B. et al. Molekularbiologie der Zelle. Übersetzt von L. Jaenicke et al. 2. Auflage. Weinheim; Basel (Schweiz); Cambridge; New York, NY: VCH, 1990.

Ancelin, M. L., Calas, M., Bompart, J. et al. Antimalarial Activity of 77 Phospholipid Polar Head Analogs: Close Correlation between Inhibition of Phospholipid Metabolism and In Vitro *Plasmodium falciparum* Growth. Blood 1998; 91.4: 1426-1437.

Baltz, T., Baltz, D., Giroud, Ch. and J. Crockett. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. EMBO J. 1985; 4: 1273-1277.

Beltran, I. C. and K. Y. Kiew. Cytotaxonomic Studies in the Zingiberaceae. Notes RBG Edinb. 1984; 41.3: 541-559.

Bikales, N. M., executive editor. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. Plastics, Resins, Rubbers, Fibers. Volume 8. Keratin to Modacrylic Fibers. New York; London; Sydney; Toronto: Interscience Publishers, 1968.

Brandis, H. et al., Hrsg. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Begründet von H. Reploh und H. J. Otte. Unter Mitarbeit von R. Ansorg et al. 7., neubearbeitete Auflage. Stuttgart; Jena; New York: Gustav Fischer, 1994.

Brockhaus-Enzyklopädie: in 24 Bänden. 19., völlig neubearbeitete Auflage. Band 16. Nos. - Per. Mannheim: Brockhaus, 1991.

Bruchhausen, F. v. et al., Hrsg. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5., vollständig neubearbeitete Auflage. Band 4. Drogen: A - D. R. Hänsel et al., Hrsg. Be-

arbeitet von R. D. Aye et al. Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Barcelona; Budapest: Springer, 1992.

Bruchhausen, F. v. et al., Hrsg. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5., vollständig neubearbeitete Auflage. Band 7. Stoffe: A - D. F. v. Bruchhausen et al., Hrsg. Bearbeitet von M. Albinus et al. Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Barcelona; Budapest: Springer, 1993a.

Bruchhausen, F. v. et al., Hrsg. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5., vollständig neubearbeitete Auflage. Band 8. Stoffe: E - O. F. v. Bruchhausen et al., Hrsg. Bearbeitet von M. Albinus et al. Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Barcelona; Budapest: Springer, 1993b.

Bruchhausen, F. v. et al., Hrsg. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5., vollständig neubearbeitete Auflage. Band 9. Stoffe: P - Z. F. v. Bruchhausen et al., Hrsg. Bearbeitet von M. Albinus et al. Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Barcelona; Budapest: Springer, 1993c.

Buckingham, J., executive editor. Dictionary of Natural Products. First edition. Volume One. A - C. London; Glasgow; New York; Tokyo; Melbourne; Madras: Chapman & Hall, 1994.

Cannell, R. J. P., ed. Natural Products Isolation. In: J. M. Walker, series editor. Methods in BiotechnologyTM; Volume 4. Totowa: Humana Press, 1998.

Christen, H. R. und F. Vögtle. Organische Chemie: von den Grundlagen zur Forschung. 2. Auflage. Band I. Frankfurt am Main: Salle / Aarau; Frankfurt am Main; Salzburg: Sauerländer, 1992.

Christen, H. R. und F. Vögtle. Organische Chemie: von den Grundlagen zur Forschung. Band II. Frankfurt am Main: Salle / Aarau; Frankfurt am Main; Salzburg: Sauerländer, 1990.

Christen, H. R. und F. Vögtle. Organische Chemie: von den Grundlagen zur Forschung. Band III. Frankfurt am Main: Salle / Aarau; Frankfurt am Main; Salzburg: Sauerländer, 1994.

Desjardins, R. E., Canfield, C. J., Haynes, J. D. and J. D. Chulay. Quantitative Assessment of Antimalarial Activity In Vitro by a Semiautomated Microdilution Technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979; 710-718.

Denniff, P., Macleod, I. and D. A. Whiting. Studies in the Biosynthesis of [6]-Gingerol, Pungent Principle of Ginger (*Zingiber officinale*). *J. C. S. Perkin I* 1980; 2637-2644.

Dong, H., Gou, Y.-L., Cao, S.-G. et al. Eicosenones and methylated flavonols from *Amomum koenigii*. *Phytochemistry* 1999; 50: 899-902.

Engler, A., Hrsg. Die natürlichen Pflanzenfamilien: nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere der Nutzpflanzen. Unter Mitwirkung zahlreicher hervorragender Fachgelehrter. Begründet von A. Engler und K. Prantl. 2., stark vermehrte und verbesserte Auflage. Band 15a. Angiospermae: Reihen Farinosae, Liliiflorae, Scitamineae. Redigiert von L. Diels. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1930.

Falbe, J. und M. Regitz. Römpp Chemie Lexikon. Bearbeitet von zahlreichen Fachkollegen. Zentralredaktion: E. Hillen-Maske. Band 1. A - Cl. 9., erweiterte und neubearbeitete Auflage. Stuttgart; New York: Thieme, 1989.

Falbe, J. und M. Regitz. Römpp Chemie Lexikon. Bearbeitet von zahlreichen Fachkollegen. Zentralredaktion: E. Hillen-Maske. Band 4. M - Pk. 9., erweiterte und neubearbeitete Auflage. Stuttgart; New York: Thieme, 1991.

Falbe, J. und M. Regitz. Römpp Chemie Lexikon. Bearbeitet von zahlreichen Fachkollegen. Zentralredaktion: E. Hillen-Maske. Band 5. Pi - S. 9., erweiterte und neubearbeitete Auflage. Stuttgart; New York: Thieme, 1992.

Forth, W. et al., Hrsg. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 6., völlig neubearbeitete Auflage. Korrigierter Nachdruck. Mannheim; Leipzig; Wien; Zürich: BI-Wissenschafts-Verlag, 1992.

Fresenius, P. und K. Görlitzer. Organisch-chemische Nomenklatur: Grundlagen, Regeln, Beispiele. 4., durchgesehene und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, 1998.

Friebolin, H. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung. 3. Auflage. Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH, 1999.

Frost, J. A. Testing for Resistance to Antimicrobial Drugs. In: H. Chart, ed. Methods in Practical Laboratory Bacteriology. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, 1994: 73-82.

Fugmann, B., Lang-Fugmann, S. und W. Steglich, Hrsg. Römpp-Lexikon Naturstoffe. Bearbeitet von G. Adam et al. Stuttgart; New York: Thieme, 1997.

Geckeler, K. E. und H. Eckstein. Analytische und präparative Labormethoden: grundlegende Arbeitstechniken für Chemiker, Biochemiker, Mediziner, Pharmazeuten und Biologen. Braunschweig: Friedrich Vieweg & Sohn, 1987.

Gorla, F. Untersuchungen zur Synthese von Derivaten der beiden Naturstoffe Aculeatin A und Aculeatin B aus *Amomum aculeatum*. Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. Rüedi. Bericht Frühjahr/Sommer. Zürich: Universität Zürich, 2001: 1-8.

Hänsel, R., Sticher, O. und E. Steinegger. Pharmakognosie-Phytopharmazie. 6. Auflage. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio: Springer, 1999.

Hauptmann, S. und G. Mann. Stereochemie. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1996.

Hegnauer, R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Band 2. Monocotyledoneae. Basel; Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1963.

Hegnauer, R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Band 7. Nachträge zu Band 1 und Band 2. Basel; Boston; Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1986.

Heilmann, J. Phytochemische Untersuchungen der Blüten von *Buphthalmum salicifolium* L. sowie Studien zur antiphlogistischen Wirkung und zur Penetration von Flavonoiden und deren Metaboliten. Inaugural-Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Düsseldorf: 1997.

Heilmann, J., Brun, R., Mayr, S., Rali, T. and O. Sticher. Minor cytotoxic and antibacterial compounds from the rhizomes of *Amomum aculeatum*. *Phytochemistry* 2001a; 57: 1281-1285.

Heilmann, J., Mayr, S., Brun, R., Rali, T. and O. Sticher. Antiprotozoal Activity and Cytotoxicity of Novel 1,7-Dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-one Derivatives from *Amomum aculeatum*. *Helv. Chim. Acta* 2000a; 83: 2939-2945.

Heilmann, J., Mayr, S., Wasescha, M. and O. Sticher. Novel Dispiroketalen from *Amomum aculeatum*: Isolation, Semisynthetic Derivatives and Biological Activity. In: Abstracts of Plenary Lectures, Workshops, Short Lectures and Posters - Natural Products Research in the New Millennium (International Congress and 48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA)). September 3-7. Zurich: ETH Zurich, 2000b: SL01.

Heilmann, J., Wasescha, M. R. and T. Schmidt. The Influence of Glutathione and Cysteine Levels on the Cytotoxicity of Helenanolide Type Sesquiterpene Lactones against KB Cells. *Phytochemistry* 2001b; 9: 2189-2194.

Hesse, M., Meier, H. und B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 5., überarbeitete Auflage. Stuttgart; New York: Thieme, 1995.

Holdsworth, D. and P. Mahana. Traditional Medicinal Plants of the Huon Peninsula Mororobe Province, Papua New Guinea. *Int. J. Crude Drug Res.* 1983; 21.3: 121-133.

Holleman, A. F. *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. Begründet von A. F. Holleman, fortgeführt von E. Wiberg. 91.-100., verbesserte und stark erweiterte Auflage, von N. Wiberg. Berlin; New York: de Gruyter, 1985.

Juch, M. and P. Rüedi. 33. Isolation, Structure, and Biological Activities of Long-Chain Catechols of *Plectranthus sylvestris* (Labiatae). *Helv. Chim. Acta* 1997; 80: 436-448.

Kamchonwongpaisan, S., Nilanota, C., Tarnchompoo, B. et al. An Antimalarial Peroxide from *Amomum krervanh* Pierre. *Tetrahedron Lett.* 1995; 36.11: 1821-1824.

Kocienski, P. and R. Whitby. Allenol Ether Intermediates in the Synthesis of 1,7-Dioxaspiro[5.5]undec-4-enes and 1,6-Dioxaspiro[4.5]dec-3-enes. *Synthesis* 1991: 1029-1038.

Krapcho, A. P. Synthesis of Carbocyclic Spiro Compounds via Intramolecular Alkylation Routes. *Synthesis* 1974; 383-419.

Kremnitz, W. A. *Neuguinea: aus dem Pflanzenreich; floristische und ethnobotanische Betrachtungen*. Frieding-Andechs: Ambro Lacus, 1988.

Kruse, G., Hrsg. Nomenklatur der organischen Chemie / IUPAC. Übersetzt von U. Schröder. Im Auftrag der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Zusammenarbeit mit der Neuen Schweizerischen Chemischen Gesellschaft und der Gesellschaft Österreichischer Chemiker. Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo: VCH, 1997.

Linden, A., Juch, M., Moghaddam, F. M., Zaynizadeh, B. and P. Rüedi. The Absolute Configuration of Salvileucolide Methyl Ester, a Sesterterpene from Iranian *Salvia* Species. *Phytochemistry* 1996; 41.2: 589-590.

Lipscomb, A., McKinnon, R. and J. Murray. Papua New Guinea. Hawthorn: Lonely Planet Publications, 1998.

List, P. H. und L. Hörhammer, Hrsg. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Für Apotheker · Arzneimittelhersteller · Ärzte und Medizinalbeamte. Begonnen von W. Kern. Herausgegeben in Gemeinschaft mit H. J. Roth und W. Schmid. Vollständige (vierte) Neuauflage. Sechster Band. Chemikalien und Drogen. Teil A: N - Q. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1977.

Lorentz, H. A. Nova Guinea. Résultats de L'Expédition Scientifique Néerlandaise à la Nouvelle-Guinée en 1907 et 1909. Volume VIII. 2me Partie. Botanique. Leide: Librairie et Imprimerie ci-devant E. J. Brill, 1914.

Matile, H. and J. R. L. Pink. *Plasmodium falciparum* Malaria Parasite Cultures and Their Use in Immunology. In: I. Lefkovits and B. Pernis, eds. Immunological Methods; Volume IV. San Diego; New York; Boston; London; Sydney; Tokyo; Toronto: Academic Press, 1990: 221-234.

McKinley, J., Aponick, A., Raber, J. C., Fritz, C., Montgomery, D. and C. T. Wigal. Reactions of Alkylolithium and Grignard Reagents with Benzoquinone: Evidence for an Electron-Transfer Mechanism. *J. Org. Chem.* 1997; 62: 4874-4876.

Nuhn, P. Naturstoffchemie: mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe. 3., völlig neu bearbeitete Auflage. Stuttgart; Leipzig: Hirzel, 1997.

Nyiredy, S., Dallenbach-Tölke, K. and O. Sticher. The "PRISMA" Optimization System in Planar Chromatography. *J. Planar Chromatogr.* 1988; 1: 336-342.

Nyiredy, S., Erdelmeier, C. A. J., Meier, B. und O. Sticher. „PRISMA“: Ein Modell zur Optimierung der mobilen Phase für die Dünnschichtchromatographie, vorgestellt anhand verschiedener Naturstofftrennungen. *Planta Med.* 1985a; 3: 241-246.

Nyiredy, S., Erdelmeier, C. A. J., Meier, B. und O. Sticher. „PRISMA“ - Optimierung der mobilen Phase in der präparativen CLC. *GIT Supplement Chromatographie* 1985b; 4: 24-30.

Perron, F. and K. F. Albizati. Chemistry of Spiroketals. *Chem. Rev.* 1989; 89:1617-1661.

Ponnudurai, T. Chapter 7. Plasmodiidae: Erythrocytic Stages. In: A. E. R. Taylor and J. R. Baker, eds. *In Vitro Methods for Parasite Cultivation*. London; San Diego; New York; Berkeley; Boston; Sydney; Tokyo; Toronto: Academic Press, 1987: 153-179.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Klinisches Wörterbuch begründet 1894 von O. Dornblüth. 19.-254. Auflage herausgegeben von W. Pschyrembel. Bearbeitet von der Wörterbuch-Redaktion des Verlags unter der Leitung von H. Hildebrandt. 258., neu bearbeitete Auflage. Berlin: de Gruyter, 1998.

Pühler, A., Regitz, M. und R. D. Schmid, Hrsg. Römpp kompakt Lexikon Biochemie und Molekularbiologie. Bearbeitet von U. Bornscheuer et al. Stuttgart; New York: Thieme, 1999.

Quadri-Spinelli, T. Biological Screening of Medicinal Plants from Papua New Guinea and Phytochemical Investigation on the Fern *Cyclosorus interruptus*. Diss. ETH No. 13820. Zurich: 2000.

Räz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R. and R. Brun. The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*) in vitro. *Acta Trop.* 1997; 68: 139-147.

Reininger, E. Vergleichende phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zur Hemmung der Prostaglandin-H-Synthase Isoenzyme mit Arzneidroge n der chinesischen Medizin, insbesondere *Platycodi radix* und *Chaenomelis fructus*. Inaugural-Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Düsseldorf: 2001.

Roth, H. J., Müller, C. E. und G. Folkers. Stereochemie und Arzneistoffe: Grundlagen - Betrachtungen - Auswirkungen. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, 1998.

Saxena, G., Farmer, S., Towers, G. H. N. and R. E. W. Hancock. Use of Specific Dyes in the Detection of Antimicrobial Compounds from Crude Plant Extracts Using a Thin Layer Chromatography Agar Overlay Technique. *Phytochem. Anal.* 1995; 6: 125-129.

Schneider, G. Pharmazeutische Biologie. 2., neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Mannheim; Wien; Zürich: Bibliographisches Institut, 1985a.

Schneider, W. Wörterbuch der Pharmazie. Band 4. Geschichte der Pharmazie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1985b.

Schröder, Joachim. The Chalcone/Stilbene Synthase-type Family of Condensing Enzymes. In: S. D. Barton and K. Nakanishi, editors-in-chief. *Comprehensive Natural Products Chemistry. Volume 1. Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives.* U. Sankawa, volume editor. Amsterdam; Lausanne; New York; Oxford; Shannon; Singapore; Tokyo: Elsevier, 1999: 749-771.

Schumann, K. Monographie der Zingiberaceae von Malaisien und Papuasien. Separat-Abdruck aus Engler's botanischen Jahrbüchern. Band 27. Heft 3. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1899.

Stahl, E. und W. Schild. Pharmazeutische Biologie. 4. Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen. Stuttgart; New York: Gustav Fischer Verlag, 1981.

Strasburger, E. et al., Begr. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 33. Auflage neu bearbeitet von P. Sitte et al. Stuttgart; Jena; New York: G. Fischer, 1991.

Swanson, S. M. and J. M. Pezzuto. Bioscreening Technique for Cytotoxic Potential and Ability to Inhibit Macromolecule Biosynthesis. In: E. B. Thompson, ed. Drug Bioscreening. Drug Evaluation Techniques in Pharmacology. New York; Weinheim; Basel; Cambridge: VCH, 1990: 273-277.

Süßmuth, R. et al. Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum. 2., völlig überarbeitete Auflage. Stuttgart; New York: Thieme, 1999.

Takido, M., Yoshikawa, Y., Yamanouchi, S. and Y. Kimura. 1*H*-Indene-2,3-dihydro-4-carboxyaldehyde and 1*H*-Indene-2,3-dihydro-5-carboxyaldehyde from the Seeds of *Amomum medium*. Phytochemistry 1978; 17: 327-328.

Teuscher, E. Biogene Arzneimittel. 5., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, 1997.

Tschirch, A. Handbuch der Pharmakognosie. Zweiter Band. Spezielle Pharmakognosie. Zweite Abteilung. Leipzig: Verlag von Chr. Herm. Tauchnitz, 1917.

Vaillancourt, V. et al. The Total Synthesis of Spiroketal-Containing Natural Products. In: J. ApSimon, ed. The Total Synthesis of Natural Products; Volume 8. New York; Chichester; Brisbane; Toronto; Singapore: John Wiley & Sons, 1992: 533-691.

Wagner, H., Bladt, S. und E. M. Zgainski. Drogenanalyse: dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1983.

Woodley, E., ed. Medicinal Plants of Papua New Guinea. Part 1: Mororobe Province. Wau Ecology Institute Handbook No. 11. Weikersheim: Margraf, 1991.

Anhang

A Abbildungsnachweis

Die der Abbildung 2-3 auf Seite 13 zugrundeliegende Photographie wurde anlässlich der ethnobotanischen Exkursion nach Papua-Neuguinea im September 1996 unter Anleitung von Professor Otto Sticher aufgenommen.

Die entsprechende Aufnahme für Abbildung 5 auf Seite 31 erfolgte unmittelbar vor Beginn der Drogenpulverisierung im November 1997 am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften in Zürich durch den Verfasser der vorliegenden Arbeit.

B Abkürzungen und Symbole

$[\alpha]_D^{23}$	spezifische Drehung (bei 23 °C und 589 nm)
ax	axial
Å	Ångström (= 10^{-10} m)
Ac	Aceton
ATCC	American Type Culture Collection
Btn	<i>n</i> -Butanol
<i>c</i>	molare Konzentration
c_m	Massenkonzentration
Chx	Cyclohexan
CCL	Certified Cell Line
CIP	Cahn-Ingold-Prelog

COSY	Correlated Spectroscopy
δ	Chemische Verschiebung (bezogen auf einen Standard)
<i>d</i>	Dublett
Dcm	Dichlormethan
Dee	Diethylether
DC	Dünnschichtchromatographie (= TLC)
DCI	Direct Chemical Ionization
DEI	Direct Electron Impact
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
FAB	Fast-Atom Bombardement
FBS	Fetal Bovine Serum
FMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
Hx	<i>n</i> -Hexan
Hz	Hertz
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC _x	Inhibitory Concentration (für x % der Versuchsorganismen)
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment
<i>J</i>	Kopplungskonstante
λ_{\max}	Absorptionsmaximum
LDL	Low-Density Lipoproteins
<i>m</i>	Multipllett
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
M	molar (mol L ⁻¹)
<i>M</i>	Molekül

M_E	exaktes Molekulargewicht
M_R	relatives Molekulargewicht
MeOH	Methanol
Mtbe	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MEM	Minimal Essential Medium
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
3-NOBA	3-Nitrobenzylalkohol
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy
OCC	Open Column Chromatography
p. a.	pro analysi
ppm	Parts per million
Pte	Petrolether
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMA	Phorbolmyristylacetat
q	Quartett
rpm	revolutions per minute
R_f	Retentionsfaktor
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RPMI	Rich medium (developed at Roswell Park Memorial Institute)
s. lat.	sensu lato (im weiteren Sinne)
SOD	Superoxid-Dismutase
t	Triplett
Tcm	Trichlormethan
Tlo	Toluol
TLC	Thin Layer Chromatography (= DC)
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TRIS	α, α, α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
UV	Ultraviolett
VLC	Vacuum Liquid Chromatography

v/v	volume per volume (Volumenprozent)
VIS	Visible (sichtbares Licht)
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight (Massenprozent)

C Elektronische Datenverarbeitung

Diese Diplomarbeit wurde mit Hilfe von Adobe®FrameMaker®5.5 unter Ergänzung durch weitere Spezialprogramme wie unter anderem CS ChemDraw Pro®5.0 und CS Chem3D Pro®5.0 erstellt.