

**Phytochemische und pharmakologische *in vitro*  
Untersuchungen zu *Hypericum empetrifolium* WILLD.**



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

vorgelegt von

Apotheker **Sebastian Schmidt**

aus Bamberg

**2013**



Diese Arbeit wurde im Zeitraum von September 2009 bis September 2013 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 19. September 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 08. November 2013

|                    |                           |                  |
|--------------------|---------------------------|------------------|
| Prüfungsausschuss: | Prof. Dr. Gerhard Franz   | (Vorsitzender)   |
|                    | Prof. Dr. Jörg Heilmann   | (Erstgutachter)  |
|                    | Prof. Dr. Adolf Nahrstedt | (Zweitgutachter) |
|                    | Prof. Dr. Joachim Wegener | (Dritter Prüfer) |



# Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Heilmann für die Möglichkeit bedanken, in seinem Arbeitskreis zu arbeiten und eine Dissertation zu einem interessanten Thema anzufertigen. Vielen Dank, lieber Jörg, für Deine stets herzliche und freundschaftliche Art, mir in allen fachlichen Fragen, aber auch in privaten Dingen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Meinem Freund Dr. Guido Jürgenliemk, der mir durch seine Erfahrung in phytochemischen, botanischen, zwischenmenschlichen und vor allem kulinarischen Problemen eine große Hilfe war, möchte ich ganz besonders danken. Lieber Guido, Du warst immer da!

Dr. Birgit Kraus sei herzlich gedankt für Ihre Unterstützung im Umgang mit den Mikroskopen und den vielen guten Anregungen und Tipps rund um die Zellkultur.

Bei Gabi Brunner und Anne Grashuber möchte ich mich an dieser Stelle ausdrücklich und von Herzen für die wertvolle Hilfe in allen praktischen Dingen bedanken.

Unserer Sekretärin Hedwig Ohli wünsche ich Alles Gute und hoffe, dass sie ganz bald schon wieder die unterhaltsame erste Ansprechpartnerin im Sekretariat des Lehrstuhls sein wird.

Den Mitarbeitern der Zentralen Analytik, Annette Schramm, Georgine Stühler, Fritz Kastner, Josef Kiermaier und Wolfgang Söllner möchte ich für die Messungen der NMR- und MS-Spektren meinen Dank aussprechen.

Herrn PD Dr. Axel Dürkop danke ich für die Hilfe bei der Aufnahme der CD-Spektren, sowie Herrn Prof. Dr. Thomas Schmidt aus Münster für die Simulation der ECD-Spektren.

Frau Prof. Dr. Eleni Skaltsa und ihrem Arbeitskreis in Athen bin ich für das Sammeln und Extrahieren des Pflanzenmaterials sehr zu Dank verpflichtet.



Meinen lieben Laborkollegen danke ich von Herzen für die Unterstützung und die Aufheiterung, die fachlichen Diskussionen und lustigen Stunden im Labor, welche das Arbeiten im Arbeitskreis zu einem unvergesslich schönen Abschnitt in meinem Leben gemacht haben: Ich danke Susanne Knuth, die mich erst auf die Idee brachte, zu promovieren und darüber hinaus den weltbesten Grünkohl kocht, Kathi Zenger und Beata Kling, die mich immer zum Sport animiert haben – manchmal sogar mit Erfolg, Rosi Scherübl für ihre stets fröhliche Art und ihr unvergleichliches Lachen, Moni Untergehrer für die angenehmen Stunden im „Glaskasten“, meinem fränkischen Freund und Kupferstecher Markus Löhr, meinem persönlichen Literaturpapst und Freund in allen Lebenslagen Marcel Flemming, Daniel Bücherl als Inbegriff der Redseligkeit und Freund der belanglosen Unterhaltung, dem tschechischen Sprachgenie Petr Jirasek, meinem Sonnenschein Edna Makule und meinem stets korrekten, grundehrlichen Kollegen aus der BUZ, Stefan Wiesneth.

Auch „Danke sagen“ möchte ich Matej Barbic, Susann Haase, Sarah Sutor, Anne Freischmidt, Sebastian Schwindl und dem Hieu.

Ebenfalls danken möchte ich den Gastwissenschaftlern Dr. Andrija Smelcerovic und Dr. Louh Gabin für die fruchtbaren Diskussionen und die Möglichkeit etwas aus deren Land und Kultur zu erfahren.

Gerne habe ich die Master- und Bachelor-Arbeiten von Julia Paterson, Angeliki Mathioudaki und Sandra Seidl mit begleitet. Ich danke den Wahlpflichtstudentinnen, Alexia Zamanikas und Karin Gold sowie der „Frau Schiller“ für die angenehme Zusammenarbeit und deren Hilfe. Nicht vergessen möchte ich Natalie Asthausen, die mir die Zeichnung von *H. empetrifolium* dankenswerterweise angefertigt hat.

Vielen Dank auch an Daniela Schneider, der Mama meines Patenkindes, die mit Ihren liebevollen „Durchhaltepaketen“ für die körperliche Grundsicherung für die Stunden vor dem PC gesorgt hat. Das Team der Anthemis Apotheken und insbesondere deren Chefin Carole Holzhäuer verdient meinen Dank, nicht zuletzt für die exquisiten und geselligen Weihnachtsfeiern! „Last but not least“ gilt mein ganz besonderer Dank meinen Freunden, allen voran Tobias Elflein, seiner lieben Frau Caro mit Emilio und Daniel Schmitt. Ihr seid immer für mich da gewesen, egal in welcher Lebenssituation.



# Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

## Publikationen

Schmidt, Sebastian; Jürgenliemk, Guido; Skaltsa, Helen; Heilmann, Jörg (2012): Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. In: *Phytochemistry* 77, S. 218-225

Schmidt, Sebastian; Jürgenliemk, Guido; Schmidt, Thomas J.; Skaltsa, Helen; Heilmann, Jörg (2012): Bi-, tri-, and polycyclic acylphloroglucinols from *Hypericum empetrifolium*. In: *J. Nat. Prod.* 75 (10), S. 1697-1705

## Poster

Schmidt, Sebastian; Jürgenliemk, Guido; Skaltsa, Helen; Heilmann, Jörg (2010): Two novel phloroglucinols from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. In: *Planta Med.* 76 (12), P-597

**7th Tannin Conference (Presymposium) and 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research  
Berlin, Germany, 29th August - 2nd September 2010**

Schmidt, Sebastian; Jürgenliemk, Guido; Skaltsa, Helen; Heilmann, Jörg (2012): Neue trizyklische Acylphloroglucinole aus *Hypericum empetrifolium* mit *in vitro* antiproliferativer Aktivität an Endothelzellen. In: *Z. Phytother.* 33 (S1), P-17

**Phytotherapeutika 2012, 17.-19. Mai 2012, Wien**





*Für meine Mama und meinen Papa,*

*meine Schwester Kerstin,*

*meine Brüder Thomas, Ralf und Rainer*

*sowie mein Patenkind Kaja-Luna*

---



# Inhaltsverzeichnis

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Die Gattung <i>Hypericum</i> L. ....</b>                                  | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Botanik, Taxonomie, Phytochemie und Chemotaxonomie .....                     | 1         |
| 1.1.2      | Die Sektion 19 <i>Coridium</i> SPACH .....                                   | 5         |
| 1.1.3      | <i>Hypericum empetrifolium</i> subsp. <i>empetrifolium</i> WILLD. ....       | 6         |
| 1.1.3.1    | Etymologie, Botanik und Taxonomie .....                                      | 6         |
| 1.1.3.2    | Bioaktivität und Phytochemie .....   | 12        |
| 1.1.4      | Acylphloroglucinole .....  | 14        |
| <b>1.2</b> | <b>Die Angiogenese .....</b>   | <b>19</b> |
| 1.2.1      | Physiologie der Angiogenese .....  | 19        |
| 1.2.2      | Anti-Angiogenese als therapeutisches Target .....                            | 20        |
| 1.2.2.1    | Tumorthherapie .....   | 21        |
| 1.2.2.2    | Therapie der altersbedingten Makuladegeneration .....                        | 22        |
| 1.2.3      | Anti-angiogene Aktivität ausgewählter Naturstoffe .....                      | 23        |
| <b>1.3</b> | <b>Zielsetzung .....</b>   | <b>26</b> |
| 1.3.1      | Isolierung von Acylphloroglucinolen aus <i>Hypericum empetrifolium</i> ..... | 26        |
| 1.3.2      | Testung auf eine mögliche anti-angiogene Aktivität .....                     | 26        |
| <b>2</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>   | <b>27</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Phytochemische Methoden .....</b>   | <b>27</b> |
| 2.1.1      | Geräte, Gefäße und Software .....  | 27        |
| 2.1.2      | Chemikalien und Lösungsmittel .....  | 29        |
| 2.1.3      | Pflanzenmaterial .....   | 30        |
| 2.1.4      | Extraktion des Pflanzenmaterials .....                                       | 30        |
| 2.1.5      | Fraktionierung und Isolierung .....  | 30        |
| 2.1.5.1    | Flash-Chromatographie .....  | 30        |
| 2.1.5.2    | Fraktionskontrolle .....   | 32        |
| 2.1.5.2.1  | Dünnschichtchromatographie .....   | 32        |
| 2.1.5.2.2  | <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopie .....                                       | 34        |
| 2.1.5.3    | Semi-präparative HPLC .....  | 34        |
| 2.1.6      | Strukturaufklärung und Charakterisierung .....                               | 35        |
| 2.1.6.1    | Massenspektrometrie .....  | 35        |
| 2.1.6.2    | NMR-Spektroskopie .....  | 36        |
| 2.1.6.3    | UV-Vis-Spektroskopie .....   | 37        |
| 2.1.6.4    | Polarimetrie .....   | 38        |
| 2.1.6.5    | CD-Spektroskopie .....   | 39        |

## II Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.1.6.5.1  | Aufnahmen am CD-Spektropolarimeter .....  | 39        |
| 2.1.6.5.2  | Simulation von CD-Spektren mittels TDDFT.....                                     | 39        |
| 2.1.6.6    | Dünnschichtchromatographie.....   | 40        |
| 2.1.7      | Stabilitäts- und Reinheitsuntersuchungen von Substanz 8 .....                     | 41        |
| 2.1.7.1    | <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopie.....   | 41        |
| 2.1.7.2    | Analytische HPLC.....   | 41        |
| <b>2.2</b> | <b>Zellbiologische Methoden .....</b>   | <b>42</b> |
| 2.2.1      | Geräte und Software .....   | 42        |
| 2.2.2      | Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien .....                              | 43        |
| 2.2.3      | Kulturmedien und sonstige Lösungen.....   | 44        |
| 2.2.4      | Zellen .....  | 45        |
| 2.2.5      | Allgemeine Verfahren .....  | 45        |
| 2.2.5.1    | Subkultivierung der Zellen (Passagieren).....                                     | 46        |
| 2.2.5.2    | Bestimmung der Zellzahl .....   | 46        |
| 2.2.5.3    | Kryokonservierung der Zellen .....  | 47        |
| 2.2.5.4    | Herstellung der Stammlösungen.....  | 47        |
| 2.2.6      | Proliferations-Assay.....   | 48        |
| 2.2.7      | Migrations-Assay .....  | 49        |
| 2.2.8      | MTT-Assay .....   | 49        |
| 2.2.9      | Tube-formation-Assay.....   | 50        |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>   | <b>52</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Phytochemische Untersuchungen.....</b>   | <b>52</b> |
| 3.1.1      | Isolierungsstrategie .....  | 52        |
| 3.1.2      | Fraktionierung des PE-Extraktes und Isolierung .....                              | 54        |
| 3.1.2.1    | Fraktionierung von PE-3 .....   | 55        |
| 3.1.2.2    | Fraktionierung von PE-3.1 .....   | 56        |
| 3.1.2.2.1  | Fraktionierung von PE-3.1.2 .....   | 58        |
| 3.1.2.2.2  | Aufreinigung von PE-3.1.2.2 per semi-präparativer HPLC .....                      | 58        |
| 3.1.2.2.3  | Fraktionierung von PE-3.1.3 .....   | 60        |
| 3.1.2.2.4  | Aufreinigung von PE-3.1.3.2 per semi-präparativer HPLC .....                      | 61        |
| 3.1.2.2.5  | Aufreinigung von PE-3.1.3.1 per semi-präparativer HPLC .....                      | 62        |
| 3.1.2.3    | Screening der restlichen PE-Fraktionen per <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopie ..... | 63        |
| 3.1.2.4    | Fraktionierung von PE-4 .....   | 65        |
| 3.1.2.4.1  | Fraktionierung von PE-4.2 .....   | 65        |
| 3.1.2.4.2  | Aufreinigung von PE-4.2.1 per semi-präparativer HPLC .....                        | 66        |
| 3.1.2.5    | Fraktionierung von PE-6 .....   | 68        |
| 3.1.2.5.1  | Fraktionierung von PE-6.2 .....   | 69        |
| 3.1.2.5.2  | Aufreinigung von PE-6.2.1 per semi-präparativer HPLC .....                        | 70        |
| 3.1.2.6    | Fraktionierung von PE-7 .....   | 71        |
| 3.1.2.6.1  | Fraktionierung von PE-7.2 .....   | 72        |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| 3.1.2.6.2 | Aufreinigung von PE-7.2.1 per semi-präparativer HPLC .....   | 73  |
| 3.1.2.7   | Aufreinigung von PE-3.1.2.1 per semi-präparativer HPLC .....   | 74  |
| 3.1.3     | Strukturaufklärung und Charakterisierung der isolierten Verbindungen .....                                 | 76  |
| 3.1.3.1   | Identifizierung gemeinsamer Strukturmerkmale .....   | 76  |
| 3.1.3.1.1 | Das Phloroglucin-Grundgerüst .....   | 76  |
| 3.1.3.1.2 | Die aliphatische Acyl-Seitenkette .....  | 77  |
| 3.1.3.1.3 | Die intramolekulare Wasserstoffbrücke .....  | 78  |
| 3.1.3.2   | Monozyklische Acylphloroglucinole .....  | 81  |
| 3.1.3.2.1 | Substanzen 1 und 2 (Empetrifelixin A und B) .....  | 81  |
| 3.1.3.2.2 | Substanzen 3 und 4 (Empetrifelixin C und D) .....  | 87  |
| 3.1.3.2.3 | Substanzen 5 (Empetrikajaforin) und 6 .....  | 89  |
| 3.1.3.2.4 | Substanzen 7, 8 und 9 (Empetrikathiforin) .....  | 93  |
| 3.1.3.3   | Bizyklische Acylphloroglucinole .....  | 96  |
| 3.1.3.3.1 | Substanzen 10 und 11 (Empetrikarinen A und B) .....  | 96  |
| 3.1.3.3.2 | Substanzen 12 und 13 (Empetrikarinol A und B) .....  | 99  |
| 3.1.3.3.3 | Substanzen 14 und 15 .....   | 102 |
| 3.1.3.3.4 | Substanzen 16 und 17 .....   | 104 |
| 3.1.3.4   | Tri- und polyzyklische Acylphloroglucinole .....   | 106 |
| 3.1.3.4.1 | Substanzen 18, 19 (Empetriferdinan A, B) und 20 (Empetriferdinol) .....                                    | 106 |
| 3.1.3.4.2 | Substanzen 21/22 (Empetrifranzinan A/B) und 23 (Empetrifranzinan C) ..                                     | 110 |
| 3.1.4     | Charakterisierung der Substanzen 2, 8, 11, 13, 15 und 19 per DC mit verschiedenen<br>Sprühreagenzien ..... | 113 |
| 3.1.4.1   | Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz .....  | 115 |
| 3.1.4.2   | Detektion mit Eisen(III)chlorid-Reagenz .....  | 115 |
| 3.1.4.3   | Detektion mit Naturstoffreagenz .....  | 116 |
| 3.1.4.4   | Detektion mit Echtblausalz-Reagenz .....   | 117 |
| 3.1.4.5   | Detektion mit Folin-Ciocalteus-Reagenz .....   | 118 |
| 3.1.4.6   | Detektion mit dem „Cer-Molybdat-Reagenz“ .....   | 119 |
| 3.1.4.7   | Detektion mit dem Reagenz nach Godin .....   | 120 |
| 3.1.5     | Stabilitäts- und Reinheitsuntersuchungen von Substanz 8 .....  | 121 |
| 3.1.5.1   | Stabilitätsuntersuchung per <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopie .....   | 121 |
| 3.1.5.2   | Reinheitsuntersuchung per analytischer HPLC .....  | 122 |
| 3.1.6     | Zusammenfassung und Diskussion der phytochemischen Untersuchungen .....                                    | 122 |
| 3.1.6.1   | NMR-geleitete Fraktionierung und Isolierung .....  | 122 |
| 3.1.6.2   | Übersicht über die isolierten Verbindungen .....   | 124 |
| 3.1.6.3   | Weitere Acylphloroglucinole aus Sektion 19 .....   | 130 |
| 3.1.6.4   | Chemotaxonomische Einordnung der Acylphloroglucinole aus Sektion 19 ..                                     | 132 |
| 3.1.6.4.1 | C-geranylierte Monozyklen .....  | 132 |
| 3.1.6.4.2 | Acylphloroglucinol-Terpen-Addukte .....  | 133 |
| 3.1.6.4.3 | O-prenylierte Monozyklen .....   | 134 |
| 3.1.6.4.4 | O-Geranylierung und Modifikationen .....   | 135 |
| 3.1.6.4.5 | Bizyklische Verbindungen vom Chroman(CA) und Chromen(CE)-Typ .....   | 135 |

## IV Inhaltsverzeichnis

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 3.1.6.4.6  | Trizyklische Verbindungen mit Xanthen-Struktur .....                     | 136        |
| 3.1.6.4.7  | Polyzyklische Verbindungen mit Citran-Struktur .....                     | 136        |
| 3.1.6.5    | Zusammenfassung der chemotaxonomischen Aspekte .....                     | 138        |
| 3.1.6.6    | Biosynthetische Aspekte .....  | 140        |
| 3.1.6.6.1  | Monozyklische Acylphloroglucinole .....                                  | 141        |
| 3.1.6.6.2  | Bi-, tri- und polyzyklische Acylphloroglucinole .....                    | 142        |
| 3.1.6.7    | Diskussion der Charakterisierung per DC .....                            | 143        |
| 3.1.6.8    | Diskussion der Stabilität gegenüber Temperatur und Licht .....           | 144        |
| <b>3.2</b> | <b>Zellbiologische Untersuchungen .....</b>                              | <b>146</b> |
| 3.2.1      | Proliferations-Assay .....   | 146        |
| 3.2.2      | Migrations-Assay .....   | 147        |
| 3.2.3      | Vergleich von Substanz 8 mit Phloroglucinol .....                        | 148        |
| 3.2.3.1    | Proliferations-Assay .....   | 148        |
| 3.2.3.2    | MTT-Assay .....  | 150        |
| 3.2.3.3    | Tube-formation-Assay .....   | 150        |
| 3.2.4      | Zusammenfassung und Diskussion der zellbiologischen Untersuchungen ..... | 154        |
| 3.2.4.1    | Mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen .....                             | 154        |
| 3.2.4.2    | Vergleich mit anderen anti-angiogen aktiven Naturstoffen .....           | 155        |
| <b>4</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>157</b> |
| <b>5</b>   | <b>SUMMARY .....</b>   | <b>159</b> |
| <b>6</b>   | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                       | <b>161</b> |
| <b>7</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>163</b> |
| <b>8</b>   | <b>ANHANG .....</b>  | <b>181</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Hypericum* L.

### 1.1.1 Botanik, Taxonomie, Phytochemie und Chemotaxonomie

Bei den Johanniskräutern handelt es sich um eine weltweit vorkommende Gattung, die nur in Wüstenregionen und der Arktis bzw. der Antarktis bisher nicht beschrieben wurde (Schütt und Schulz 2007). Die Wuchsform reicht von mehrjährigen Stauden, Halbsträuchern und Sträuchern bis hin zu Bäumen sowie einjährigen Kräutern (Robson 1977). Die Gattung *Hypericum* L. umfasst zwischen 450 und 500 Arten (Crockett und Robson 2011) und kann anhand des Blütendiagramms (Frohne und Jensen 1998) sowie durch folgende Blütenformel nach (Lüder 2013) charakterisiert werden:  $*K_5 C_5 A_\infty G(\underline{3-5})$

Die Laubblätter sind meist gegenständig, selten quirlig und weisen oft durchscheinende schizogene Öl- oder schwarz erscheinende Hypericinbehälter auf. Nebenblätter sind nicht vorhanden. Das fünfzählige Perianth setzt sich aus grünen, nicht verwachsenen Kelchblättern und gelben, freien Blütenkronblättern zusammen. Der Blütenstand ist eine endständige zusammengesetzte Trugdolde. Die Staubblätter stehen in drei oder fünf Bündeln, der oberständige Fruchtknoten setzt sich aus ebenfalls drei oder fünf Fruchtblättern zusammen. Die Frucht bildet in der Regel eine vielsamige Kapsel (Ernst 2003, Schütt und Schulz 2007, Lüder 2013).

*Hypericum* gehört neben acht weiteren Gattungen zur Familie der Hartheugewächse, Hypericaceae JUSSIEU, welche weltweit insgesamt etwa 540 Arten auf sich vereint. Diese lässt sich wiederum in drei Tribus unterteilen. Neben *Lianthus* N. ROBSON, *Triadenum* RAF, *Thornea* BREEDLOVE & MCCLINTOCK und *Santomasia* N. ROBSON gehört *Hypericum* L. dem Tribus Hypericeae CHOISY an, welcher fast 80% der Arten enthält (Stevens 2007).

Lange Zeit wurde die Familie der Hypericaceae nicht als eigenständige Familie betrachtet, sondern man klassifizierte sie als Hypericoideae im Sinne einer Unterfamilie der Clusiaceae bzw. Guttiferae und rechnete sie zu der Ordnung der Theales bzw. Guttiferales (Robson 1977, Frohne und Jensen 1998, Hoffmann 2001). Heute gehört sie als eigenständige Familie zur Ordnung der Malpighiales, die mit fast 40 Familien und rund 16000 Arten eine der

## 2 Einleitung

größten Ordnung innerhalb der Magnoliopsida darstellt (Wurdack und Davis 2009, Meseguer und Sanmartín 2012, Endress et al. 2013).

Eine Übersicht über die systematische Einordnung der Gattung *Hypericum* innerhalb der Klasse der Magnoliopsida bietet **Tabelle 1**.

**Tabelle 1:** Systematische Einordnung der Gattung *Hypericum* innerhalb der Magnoliopsida, Bedecktsamer nach (Strasburger 2012).

| Taxonomische Rangstufe | Taxonomische Einheit        |                       |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| <b>Klasse</b>          | Magnoliopsida               | Bedecktsamer          |
| <b>Unterklasse</b>     | Rosidae                     | Rosenähnliche         |
| <b>Ordnung</b>         | Malpighiales                | Malpighienartige      |
| <b>Familie</b>         | Hypericaceae JUSSIEU 1789   | Johanniskrautgewächse |
| <b>Tribus</b>          | Hypericeae CHOISY 1821      |                       |
| <b>Gattung</b>         | <i>Hypericum</i> LINNÉ 1753 | Johanniskräuter       |

Enthält eine Gattung eine große Anzahl an Arten, so besteht die Möglichkeit der Unterteilung in weitere hierarchische Ränge. Dazu zählen die Untergattung, die Sektion, die Untersektion, die Serie und Unterserie (Erhardt et al. op. 2002). Seit der schwedische Naturforscher Carl von Linné (1707-1778) in seinem *Species Plantarum* von 1753 die binäre Nomenklatur für Pflanzennamen veröffentlichte, begannen mehrere Botaniker mit der Gruppierung in Sektionen und Untersektionen, um die Vielzahl von Arten, die neu beschrieben wurden, zu klassifizieren. Norman Keith Bonner Robson (\* 1928), ein englischer Botaniker, versucht in seinen Monographien von 1977 bis heute, die teilweise deutlich unterschiedlichen Klassifizierungsversuche anderer Botaniker anhand von morphologischen, geographischen und phylogenetischen Aspekten zu vereinheitlichen (Robson 1977). Die Ergebnisse seiner Untersuchungen zur Gattung *Hypericum* sind in außerordentlich detaillierter Weise in seiner zweiten Studie von 1981 veröffentlicht (Robson 1981).

Allein die Tatsache, dass zu den ursprünglich 30 Sektionen (Robson 1977) bis heute sechs neue (6a, 9a-e) und ab 1990 zahlreiche Untersektionen und Serien dazu gekommen sind, dokumentiert den ständigen Wandel in der systematischen Einteilung aufgrund neuer Erkenntnisse. Eine aktuelle Übersicht über die Klassifizierung der Gattung *Hypericum* und dessen mittlerweile 484 Arten ist in **Tabelle 2**, S. 3 zu finden.

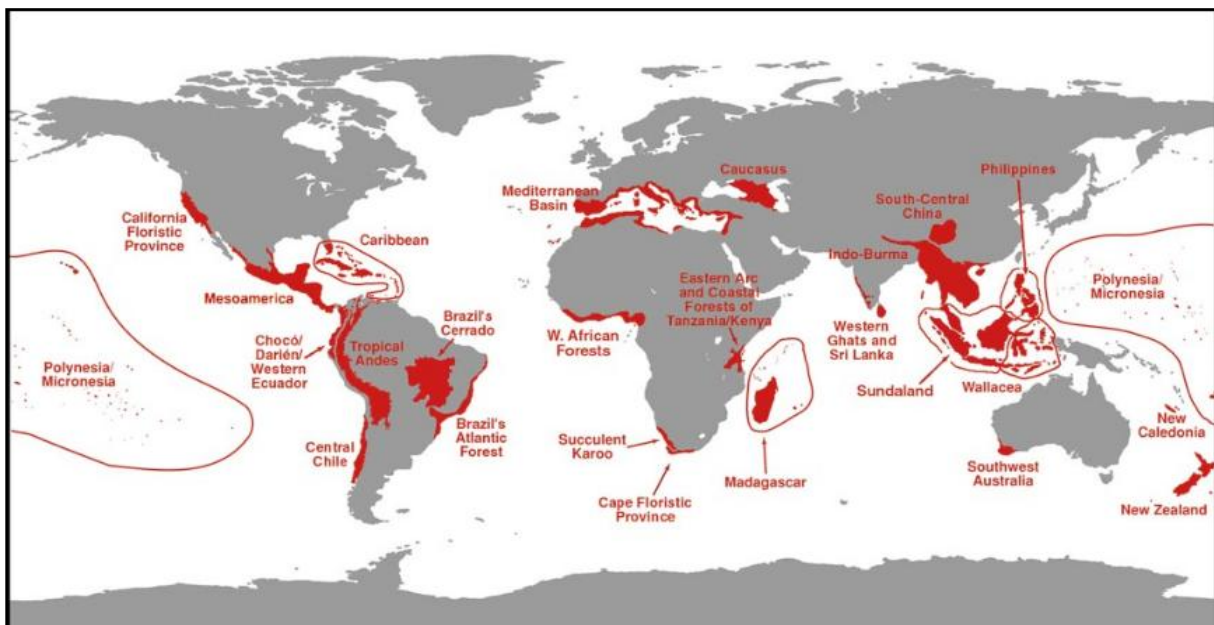
**Tabelle 2:** Übersicht über die Sektionen der Gattung *Hypericum* nach (Crockett und Robson 2011)  
 \*Sektionen, welche in Untersektionen eingeteilt sind; \*\*Sektionen die sowohl in Untersektionen als auch Serien klassifiziert wurden.

|           | <b>Sektion</b>          | <b>Anzahl an Arten</b> | <b>Verbreitung</b>  |
|-----------|-------------------------|------------------------|---|
| <b>1</b>  | <i>Campylosporus</i>    | 10                     | Tropical & SE Africa + adjacent islands, SW Japan   |
| <b>2</b>  | <i>Psorophytum</i>      | 1                      | Spain (Balearic Islands)  |
| <b>3</b>  | <i>Ascyreia</i>         | 43                     | SE Europe, W to SE Asia, S China  |
| <b>4</b>  | <i>Takasagoya</i>       | 5                      | Japan (Ryuku Island), Taiwan, Philippines   |
| <b>5</b>  | <i>Androsaemum</i>      | 4                      | Macaronesia, W & S Europe to Iran, Saudi Arabia, Yemen  |
| <b>6</b>  | <i>Inodora</i>          | 1                      | NE Turkey, Georgia  |
| <b>6a</b> | <i>Umbraculoides</i>    | 1                      | Mexiko (Oaxaca)   |
| <b>7</b>  | <i>Roscyna</i>          | 2                      | Central to E Asia, NE America   |
| <b>8</b>  | <i>Bupleuroides</i>     | 1                      | NE Turkey, Georgia  |
| <b>9</b>  | <i>Hypericum</i> **     | 42                     | Europe, NW Africa, NW America; introduced ( <i>H. perforatum</i> ) into many other parts of the world               |
| <b>9a</b> | <i>Concinna</i>         | 1                      | USA (N California)  |
| <b>9b</b> | <i>Graveolentia</i>     | 9                      | SE Canada, eastern USA to Guatemala   |
| <b>9c</b> | <i>Sampsonia</i>        | 2                      | NE India to S Japan   |
| <b>9d</b> | <i>Elodeoida</i>        | 5                      | E & SE Asia (China to Kashmir)  |
| <b>9e</b> | <i>Monoanthemea</i>     | 7                      | E & SE Asia (China to Sri Lanka)  |
| <b>10</b> | <i>Olympia</i>          | 4                      | S Balkan peninsula, W Turkey, Aegean Islands  |
| <b>11</b> | <i>Campylopus</i>       | 1                      | S Bulgaria, NE Greece, NW Turkey  |
| <b>12</b> | <i>Origanifolia</i>     | 13                     | Turkey, Georgia, Syria  |
| <b>13</b> | <i>Drosocarpium</i>     | 11                     | Madeira, Mediterranean to W Caucasus  |
| <b>14</b> | <i>Oligostema</i>       | 6                      | Europe, Macaronesia, Mediterranean  |
| <b>15</b> | <i>Thasia</i>           | 1                      | Greece, Bulgaria, Turkey  |
| <b>16</b> | <i>Crossophyllum</i>    | 3                      | N Aegean region, Turkey, Caucasus   |
| <b>17</b> | <i>Hirtella</i> **      | 30                     | W Mediterranean & S Europe to Altai   |
| <b>18</b> | <i>Taeniocarpium</i>    | 28                     | Europe, Mediterranean to Iran & Mongolia  |
| <b>19</b> | <b>Coridium</b>         | <b>6</b>               | <b>Mediterranean, Alps, Caucasus</b>  |
| <b>20</b> | <i>Myriandra</i> *      | 29                     | E & central North America to Honduras, Bermuda & Caribbean Islands; introduced (?) into the Azores                  |
| <b>21</b> | <i>Webbia</i>           | 1                      | Canary Islands, Madeira   |
| <b>22</b> | <i>Arthrophyllum</i>    | 5                      | S Turkey, Syria, Lebanon  |
| <b>23</b> | <i>Triadenioides</i>    | 5                      | S Turkey, Syria, Lebanon, Socotra   |
| <b>24</b> | <i>Heterophylla</i>     | 1                      | Turkey (NW & W-central Anatolia)  |
| <b>25</b> | <i>Adenotrias</i>       | 3                      | S Morocco to Mediterranean  |
| <b>26</b> | <i>Humifusoideum</i>    | 12                     | Tropical & S Africa, Madagaskar, SE to E Asia   |
| <b>27</b> | <i>Adenosepalum</i> *   | 25                     | Canary Islands, Madeira, Europe, Africa, SW Asia  |
| <b>28</b> | <i>Elodes</i>           | 1                      | Azores & W Europe   |
| <b>29</b> | <i>Brathys</i> *        | 87                     | Central & South America, Caribbean Islands, SE Canada & eastern USA (S to Florida)                                  |
| <b>30</b> | <i>Trigynobrathys</i> * | 52                     | South America to S Canada, E to SE Asia, the Hawaiian Islands, Australia, New Zealand, Africa; introduced to Europe |

## 4 Einleitung

Waren in älteren Systemen der Blütenbau und die Ausgestaltung bzw. überhaupt das Vorhandensein von hypericinhaltigen Ölbehältern die Einteilungskriterien in verschiedene Sektionen (Kaul 2000, Schütt und Schulz 2007), so sind es heute vor allem phylogenetische Untersuchungen die zum besseren Verständnis von Verwandtschaftsverhältnissen der Arten untereinander beitragen. Dabei kommen kladistische Untersuchungen zum Einsatz, die anhand von Chloroplasten DNA (cpDNA), der Morphologie, von genomischen DNA Sequenzen insbesondere der *internal transcribed spacer* (ITS) Region, zu neuen Erkenntnissen im Bereich der Phylogenie führen (Hazler Pilepić et al. 2010, Nürk et al. 2013). Auch die Klassifizierung nach Robson könnte eine Neuordnung erfahren, was Nürk zufolge aufgrund der aktuellen Datenlage auch notwendig erscheint (Nürk 2011).

Neben der morphologischen Diversität rückt auch immer mehr die phytochemische Vielfalt der einzelnen *Hypericum*-Arten in den Fokus der systematischen Untersuchung und Klassifizierung der Gattung. Im Mediterranen Becken, einem von insgesamt 25 Biodiversitäts-Hotspots unserer Erde (**Abbildung 1**), konnten *Hypericum*-Arten aus knapp zweidrittel der insgesamt 36 Sektionen nachgewiesen und hinsichtlich ihrer Morphologie und dem Vorkommen sekundärer Inhaltsstoffe untersucht werden (Nürk und Crockett 2011).



**Abbildung 1:** Verteilung der weltweit 25 Biodiversitäts-Hotspots (Myers et al. 2000).

In einer umfassenden Untersuchung von Crockett und Robson (2011) konnte festgestellt werden, dass verschiedene sekundäre Inhaltsstoffe durchaus das Potential haben, als chemotaxonomische Marker fungieren zu können.

Die Idee der Chemosystematik, also dem Hinweis auf Verwandtschaft zwischen verschiedenen Pflanzen anhand des Inhaltsstoffspektrums sekundärer Pflanzenstoffe, geht auf Arbeiten des Schweizer Botanikers Augustin Pyramus de Candolle (1779-1841) zurück, der die Meinung vertrat, dass die Formverwandtschaft von Pflanzen mit der Wirkstoffverwandtschaft unmittelbar zusammenhängen kann (Candolle 1816). Erste Arbeiten von Hegnauer (1966) liefern Ansätze zur chemotaxonomischen Einteilung der Guttiferae (Hypericaceae + Clusiaceae), wobei der Fokus auf dem ätherischen Öl und den Hypericinen liegt.

Die Gattung *Hypericum* enthält überwiegend phenolische und polyphenolische, nichtflüchtige sekundäre Inhaltsstoffe (Avato 2005), aber auch ca. 0,1 - 1% ätherisches Öl (Schütt und Schulz 2007), welches aufgrund seiner zahlreichen biologischen Aktivitäten besonders wertvoll erscheint (Bertoli et al. 2011, Guedes et al. 2012). Gerade im Hinblick auf eine mögliche biosystematische bzw. chemotaxonomische Relevanz im Vergleich zwischen Sektionen ist das Wissen um die Zusammensetzung des ätherischen Öls (Petrakis et al. 2005, Crockett 2010) und um das Vorkommen der nichtflüchtigen Substanzen (Kitanov und Nedialkov 1998, Crockett et al. 2005) wichtig. Auf der Suche nach möglichen Alternativen zu der offizinellen Art *H. perforatum* hinsichtlich ihres medizinischen Potentials kann die Chemotaxonomie Hilfestellung leisten (Stojanovic et al. 2013).

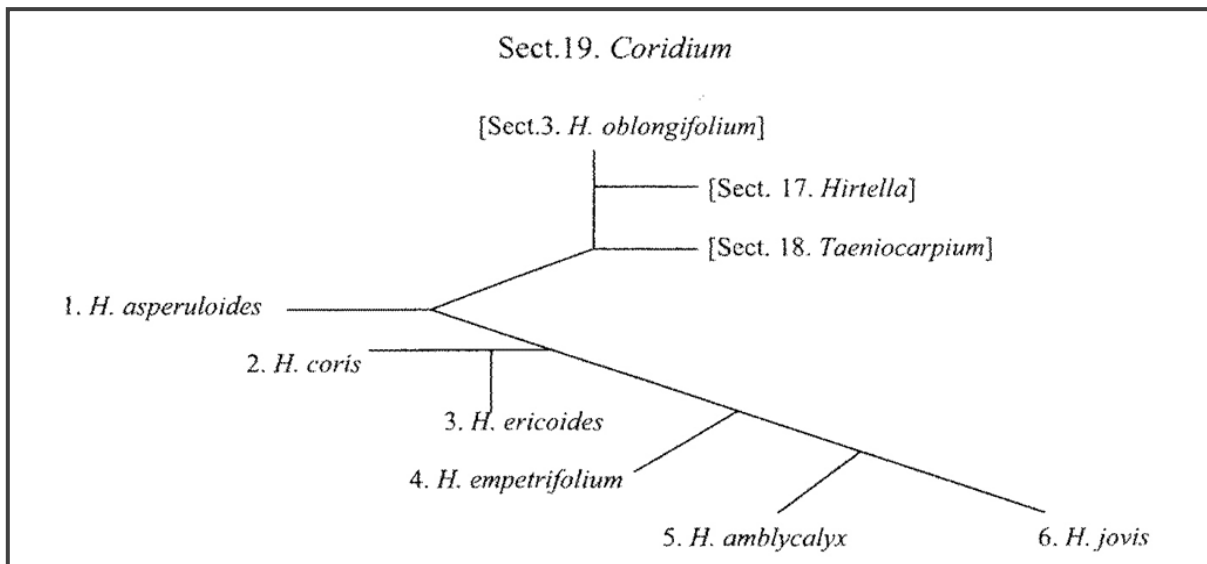
### **1.1.2 Die Sektion 19 *Coridium* SPACH**

Der Name der Sektion *Coridium* leitet sich von *H. coris* L. ab, einer von insgesamt sechs Arten, deren Chromosomenzahl durchweg 9 und der Polyploidiegrad 2 beträgt. Die Einteilung und Beschreibung der Sektion erfolgte bereits 1836 von dem französischen Botaniker Édouard Spach (1801-1879). Zusammen mit den Sektionen 17 *Hirtella* (30 Arten) und 18 *Taeniocarpium* (28 Arten) bildet *Coridium* die sogenannte „Hirtella-Gruppe“, die ihren Ursprung in der O-Türkei bzw. im transkaukasischen Gebiet hat. Eine Gemeinsamkeit der Sektionen untereinander liegt darin, dass sie alle drei von Sektion 3 *Ascyreia* (43 Arten),

## 6 Einleitung

der drittgrößten Sektion, welche im süd- und ostasiatischen Raum vorkommt, abstammen. Aus morphologischer Sicht kommen in allen drei Sektionen Arten mit randständig schwarzen Drüsen in den Blüten vor. *Coridium* lässt sich von den beiden anderen Sektionen abgrenzen durch die fehlende Behaarung und den linearen Blättern, welche in Quirlen zu drei oder vier stehen sowie der Tatsache, dass Blütenkronenblätter und Staubbeutel nach der Blüte abfallen (Robson 2010).

Die Verbreitung der Arten erstreckt sich auf das Mittelmeergebiet, die Alpen und den Kaukasus (Robson 1977). Eine Übersicht über die Abstammungslinie der „Hirtella-Gruppe“, ausgehend von Sektion 3 sowie der einzelnen Arten von *Coridium* ist in **Abbildung 2** dargestellt. Die Arten der Sektion 19 leiten sich von *H. asperuloides* aus dem kaukasischen Biodiversitäts-Hotspot ab (**Abbildung 1**, S. 4).



**Abbildung 2:** Abstammung der *Hypericum*-Arten innerhalb der Sektion 19 (Robson 2010).

### 1.1.3 *Hypericum empetrifolium* subsp. *empetrifolium* WILLD.

#### 1.1.3.1 Etymologie, Botanik und Taxonomie

Die Etymologie des Gattungsnamens ist eng mit der Art *H. empetrifolium* verknüpft. Der Name *Hypericum* leitet sich aller Wahrscheinlichkeit nach von griech. ‚hypéreikon‘, „eine Sippe mit heidekrautähnlichen Laubblättern, Johanniskraut, vielleicht als *Hypericum empetrifolium* zu deuten“ (Hippokr.), ab (Genauast 1996). Es könnte sich aber auch um einen aus ‚hyper‘ (= über, griech.) und ‚eikon‘ (= Bild, griech.) zusammengesetzten Begriff handeln,

der die Verwendung des Krautes als Apotropaikum beschreibt, also einer Pflanze, welche über Götter- bzw. Heiligendarstellungen aufgehängt wurde, um böse Geister abzuhalten (Czygan 2003). In den Regionen Europas, in denen *H. empetrifolium* nicht vorkommt, wurde im Mittelalter wohl *H. perforatum* als sogenanntes *fuga daemonum* verwendet (Ernst 2003). Auch heute noch darf das Johanniskraut nicht fehlen, wenn zu Mariä Himmelfahrt am 15. August die sogenannten ‚Würzbüschel‘ geweiht und diese anschließend im Haus aufgehängt werden (Gräter 1971).

Die Art-Bezeichnung *empetrifolium* setzt sich aus lat. ‚*empetri*‘ und ‚*folium*‘ zusammen. *Empetri* bzw. *Empetrum* ist die wissenschaftliche Bezeichnung der Gattung der Krähenbeeren aus der Familie der Ericaceae. Die wenigen Krähenbeeren-Arten zeichnen sich durch gegenständig oder quirlig angeordnete, nadelförmige Blätter aus. Die Ähnlichkeit der Beblätterung war hier wohl namensgebend. Auch die deutsche Bezeichnung ‚Krähenbeeren-Johanniskraut‘ (Schönfelder und Schönfelder 2011) bzw. deren englische Übersetzung ‚Crowberry-leaved St. John’s Wort‘ spricht für die von Willdenow, dem Entdecker und Namensgeber der Art, 1802 gewählte Nomenklatur (Willdenow 1802).

Schönfelder und Schönfelder (2011) beschreiben *H. empetrifolium* und die morphologischen Unterschiede zu den anderen im Mittelmeerraum vorkommenden *Hypericum*-Arten der Sektion 19 folgendermaßen:

„Kleiner aufrechter oder niederliegender, sich bewurzelnder Zwergstrauch (0,1-0,6 m). Kahle, nadelförmige, nach unten umgerollte Blätter zu 3 quirlständig (**Abbildung 3**, S. 8), Kronblätter 5-10 mm, 3-4 mal so lang wie der am Rand schwarzdrüsige Kelch (**Abbildung 4**, S. 8), Staubblätter in 3 Bündeln. S: Felsstandorte, Macchien, Kiefernwälder. Blütezeit: IV-VI

Ähnlich: *H. coris* L. mit Blättern in Quirlen zu 4 (Frankreich, Italien). Auch die Kreta-Endemiten *H. amblycalyx* COUST. & GAND. und *H. jovis* GREUT. haben 4 Blätter im Quirl, die Kelchblätter sind jedoch ohne Drüsen“

Robson liefert eine wesentlich ausführlichere Beschreibung der Morphologie in seiner Monographie von 2010, es soll aber aus Gründen der Anschaulichkeit nur die Detailzeichnung abgebildet werden, wie sie in **Abbildung 5**, S. 9 zu finden ist.

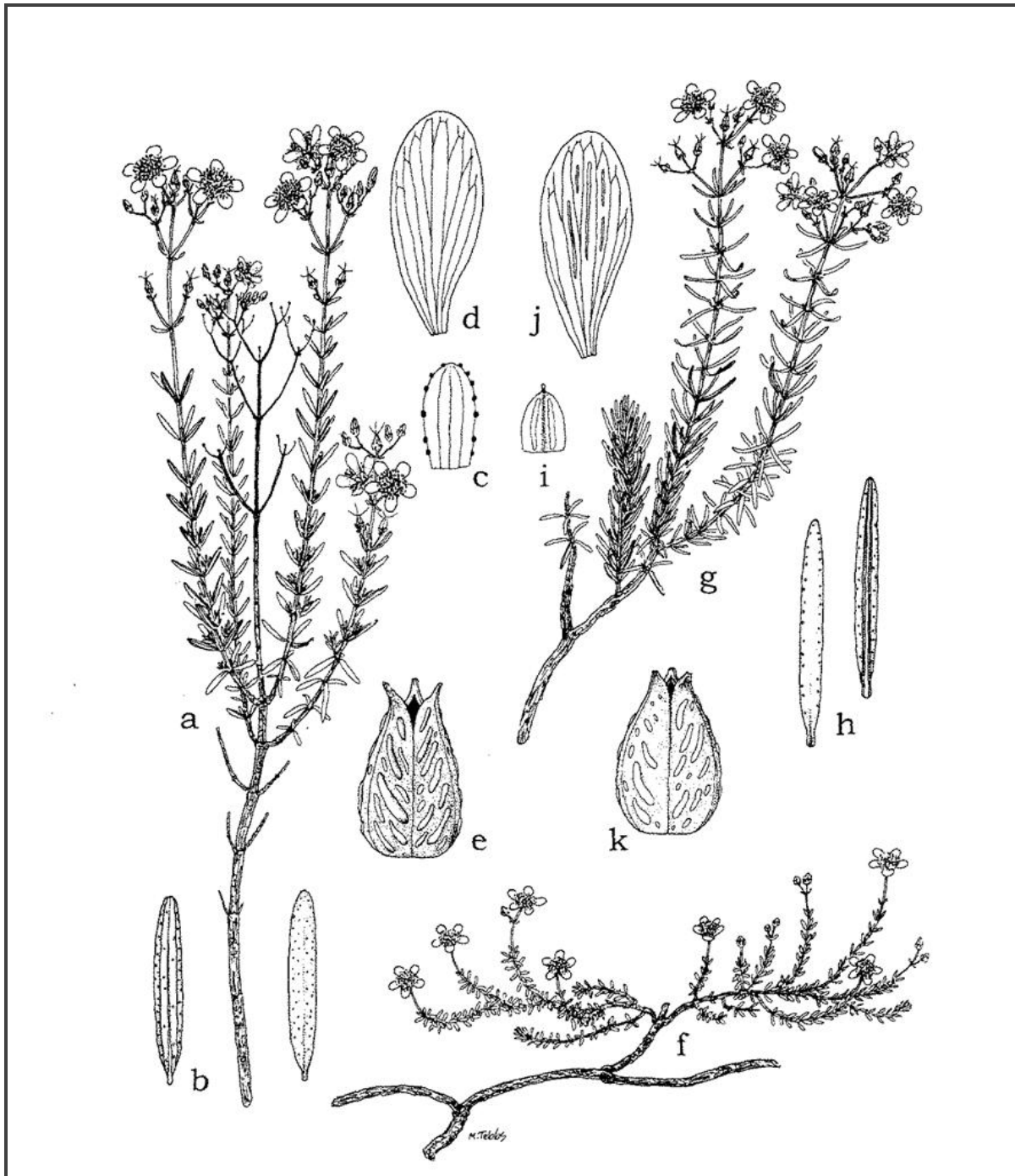
## 8 Einleitung



**Abbildung 3:** *H. empetrifolium* in Aufsicht; am linken oberen Bildrand ist die Quirlständigkeit der nadelförmigen Blätter zu erkennen. Das Foto wurde von Eirini Aplada, Biologist.-M.Sc. aufgenommen und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 4:** *H. empetrifolium*, Detailaufnahme eines dichasialen Blütenstandes; gut zu erkennen sind die schwarzdrüsigen Kelchblätter, die bei *H. amblycalyx* und *H. jovis* fehlen. Das Foto wurde von Eirini Aplada, Biologist.-M.Sc. aufgenommen und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 5:** Detailzeichnung von *H. empetrifolium* subsp. *empetrifolium*: (a) schlanker, aufrechter Habitus, (b) Ober- und Unterseite eines nadelförmigen Laubblattes, (c) Kelchblatt mit schwarzen Drüsen, (d) Blütenkronblatt, (e) Kapsel Frucht; (f) *H. empetrifolium* subsp. *tortuosum* und (g-k) *H. amblycalyx* (Robson 2010).

Eine Übersicht über die taxonomische Einordnung von *H. empetrifolium* subsp. *empetrifolium* innerhalb der Hypericaceae bietet **Tabelle 3**, S. 10. Neben dem gattungsreichsten Tribus Hypericeae mit fünf Gattungen, gehören den beiden anderen Tribus Cratoxyleae und Vismieae jeweils nur zwei Gattungen an. Von den insgesamt neun

## 10 Einleitung

Gattungen ist in Europa nur *Hypericum* zu finden. Die übrigen, teilweise monotypischen Gattungen kommen in tropischen Klimazonen anderer Kontinente vor (Stevens 2007).

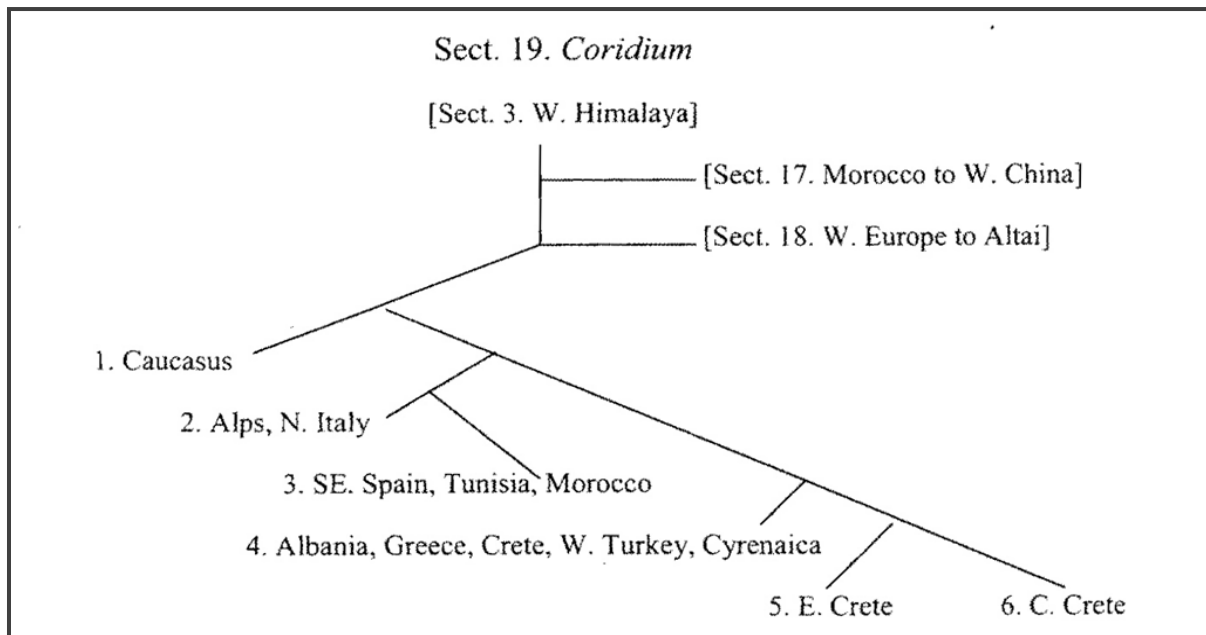
**Tabelle 3:** Die Einteilung der Hypericaceae in die hierarchischen Rangstufen nach (Hagemann 1987, Robson 2010); Grau unterlegt ist die systematische Rangfolge für *Hypericum empetrifolium* subsp. *empetrifolium* ausgehend vom Tribus Hypericeae.

| Tribus      | Gattung (Arten)               | Sektion                   | Art                            | Unterart                    |                     |
|-------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Vismieae    | <i>Vismia</i> (52)            |                           | <i>H. asperuloides</i>         |                             |                     |
|             | <i>Harungana</i> (50)         |                           |                                |                             |                     |
| Hypericeae  | <i>Lianthus</i> (1)           |                           | 1-18                           |                             | <i>H. coris</i>     |
|             | <i>Santomasia</i> (1)         |                           |                                |                             | <i>H. ericoides</i> |
|             | <b><i>Hypericum</i> (420)</b> | <b>19 <i>Coridium</i></b> | <b><i>H. empetrifolium</i></b> | <b><i>empetrifolium</i></b> |                     |
|             | <i>Thornea</i> (2)            | 20-30                     | <i>H. amblycalyx</i>           | <i>tortuosum</i>            |                     |
|             | <i>Triadenum</i> (6)          |                           | <i>H. jovis</i>                |                             |                     |
| Cratoxyleae | <i>Cratoxylum</i> (6)         |                           |                                |                             |                     |
|             | <i>Eliea</i> (1)              |                           |                                |                             |                     |

Beheimatet ist *H. empetrifolium* im ägäischen Raum und kommt dort in Griechenland, auf Kreta, den Ägäischen Inseln, der W-Türkei und darüber hinaus auf dem afrikanischen Kontinent in N-Albanien und Lybien (Cyrenaica) vor. Man findet die Pflanze in Macchien und Kiefernwäldern sowie auf trockenen kalkhaltigen Felshängen, bis in einer Höhe von 2000 m (Robson 2010). An seinem aufrechten Wuchs ist die Art gut zu erkennen, nur auf der Insel Kreta sind zusätzlich zwei eher niederliegend wachsende Varietäten von Rechinger (1943) beschrieben worden. Hagemann (1987) untersuchte im Feldversuch unter kontrollierten Bedingungen über mehrere Jahre hinweg die unterschiedlichen Sippen anhand von selbstgezogenen Pflanzen im Botanischen Garten. Die Samen stammten von Pflanzen vom griechischen Festland: **A** (aufrecht wachsende Art) Ep. Phiotis, 800 m oder von niederliegend wachsenden Arten der Insel Kreta: **B** Mount Salena, 4000 ft (= 1219 m) und **C** White Mountains, 5000 ft (= 1524 m). Sie hob die beiden nur auf Kreta wachsenden Varietäten aufgrund von Wuchsform, Anzahl der Blüten, Beblätterung und weiteren essentiellen Merkmalen hinsichtlich der Beschaffenheit der Samen und insbesondere der Testa auf die Stufe von Subspezies, nämlich *H. empetrifolium* subsp. *oliganthum* (**B**) und *H. empetrifolium* subsp. *tortuosum* (**C**). Die Nomenklatur wurde für die ebenfalls auf Kreta, aber aufrecht

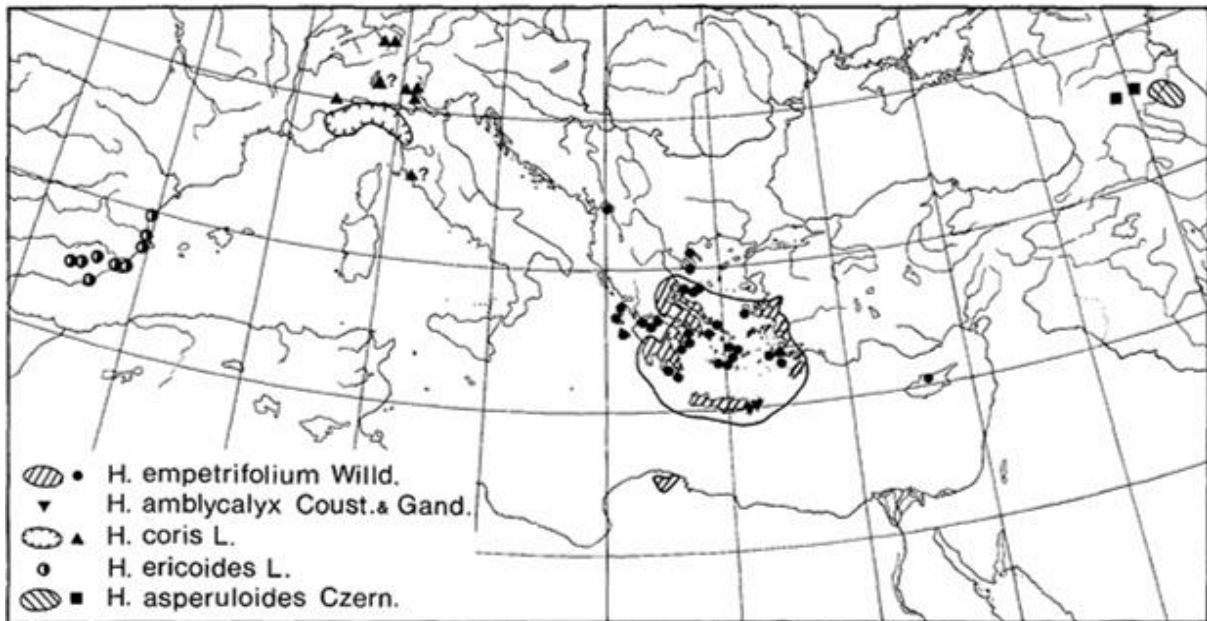
wachsende Art *H. empetrifolium* übernommen und *H. empetrifolium* subsp. *empetrifolium* (**A**) benannt (Robson 2010).

Auf Kreta kommen neben den beiden Subspezies *H. empetrifolium* subsp. *oliganthum* und *tortuosum*, die Arten *H. amblycalyx* und *H. jovis* endemisch vor. Die Abstammungslinie der Sektion 19 ist in **Abbildung 6** für die einzelnen Arten und deren geographische Verteilung dargestellt.



**Abbildung 6:** Abstammung und geographische Verbreitung der Arten der Sektion 19; **1.** *H. asperuloides*, **2.** *H. coris*, **3.** *H. ericoides*, **4.** *H. empetrifolium*, **5.** *H. amblycalyx*, **6.** *H. jovis* (Robson 2010).

In einer etwas älteren Abbildung spiegelt sich diese phylogenetische und geographische Entwicklung auch im Verbreitungsgebiet der Arten wider (**Abbildung 7**, S. 12). Die jüngste Art der Sektion, *H. jovis* ist nicht auf der Karte von 1978 eingezeichnet, da diese erst in den 1980er Jahren von dem Schweizer Botaniker Werner Greuter neu beschrieben wurde (Greuter et al. 1984).



**Abbildung 7:** Verbreitung der *Hypericum*-Arten der Sektion *Coridium* (Hagemann 1987).

### 1.1.3.2 Bioaktivität und Phytochemie

*H. empetrifolium* ist eine bisher wenig untersuchte Art. Sie hat ihren Verbreitungsschwerpunkt in der Türkei und Griechenland, wo sie auch in der traditionellen Medizin Verwendung findet. Im ‚*Corpus Hippocraticum*‘, einem der ältesten systematischen Berichte mit insgesamt 62 Abhandlungen über medizinische Praktiken des Mittelmeerraumes, wird unter anderem das ‚*uperikon*‘ genannt. Dies war wohl ein Sammelbegriff für *H. empetrifolium*, *H. coris* und *H. triquetrifolium*. Als Indikation nennt Pollio „Pulmonary apoplexy“ und „Uterus hardening and shifting“ (Pollio et al. 2008). Tuzlacy (2006) berichtet von der Behandlung von Nierensteinen und Magenerkrankungen in der Türkei, Vokou et al. (1993) von der externen Anwendung als Waschung zur Wundheilungsförderung sowie gegen Verbrennungen und Herpes. Ein methanolischer Extrakt des Krautes von *H. empetrifolium* zeigte im Tierversuch an Ratten eine anti-inflammatorische und schmerzlindernde Aktivität (Trovato et al. 2001), was *in vitro* durch einen inhibitorischen Effekt auf die humane leukozytäre Myeloperoxidase (MPO) Aktivität bestätigt werden konnte (Pabuçcuoğlu et al. 2003). Crockett et al. (2008) waren in der Lage, zwei Acylphloroglucinole aus dem DCM-Extrakt der Früchte zu isolieren, welche ebenfalls anti-inflammatorisches Potential durch die Hemmung der Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1 und -2) sowie der Lipooxygenase (LOX) erkennen ließen.

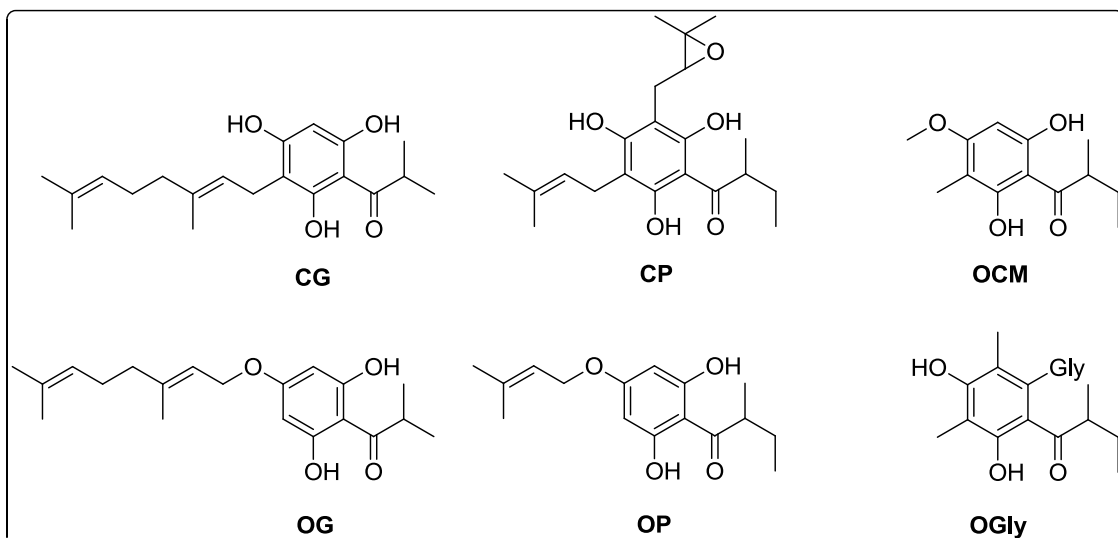
Couladis et al. (2002) zeigten, dass sich die anti-oxidative Aktivität und der zytotoxische Effekt auf humane Krebszellen dreier MeOH-Extrakte in Abhängigkeit vom Standort der Pflanze unterscheiden lassen. Auf der Suche nach einer Alternative zu *H. perforatum* hinsichtlich eines möglichen anti-oxidativen Effektes erwies sich der methanolische Extrakt aus *H. empetrifolium* als ebenbürtig (Konyalioglu et al. 2002), was möglicherweise auf einen höheren Flavonoid- (als Al<sub>3</sub>-Komplex bestimmt) und Gesamt-Phenol-Gehalt (mit dem Folin-Ciocalteus-Reagenz bestimmt) zurückgeführt werden könnte (Meral und Konyahoglu 2003). Bei der Quantifizierung der Flavonoide Rutin, Isoquercitrin, Luteolin- und Quercetin-4'-glukosid, Quercetin, Naringenin, Luteolin und Apigenin per HPLC-UV konnten zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den beiden Arten detektiert werden. Der Gesamt-Gehalt der untersuchten Flavonoide lag bei *H. empetrifolium* allerdings niedriger (Elgin et al. 2008). In einer anderen Arbeit von Meral und Karabay (2002) konnte zum ersten Mal eine antibakterielle in vitro Aktivität gegen vier gram-positive sowie vier gram-negative Stämme gezeigt werden. Ein 70%iger wässriger EtOH-Extrakt aus den Blättern von *H. empetrifolium* zeigte eine geringere Inhibierung der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) im Vergleich mit einer alkaloidhaltigen Droge, was weitere Untersuchungen hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Einsatzes gegen M. Parkinson interessant macht (Dilek und Oguz 2009). In verschiedenen analytischen Arbeiten wurde der Gehalt an (Proto)Pseudohypericin und (Proto)Hypericin in Abhängigkeit von der Höhe und dem Entwicklungsgrad der Blüten und Früchte sowie der Blätter untersucht (Xenophontos et al. 2007, Xenophontos et al. 2008). Konnte Pseudohypericin mit einer photometrischen Methode nach DAC86 bei 590 nm nicht und Hypericin nur in Spuren nachgewiesen werden (Kitanov 2001), so war es Alali et al. (2009) möglich, per LC-MS und LC-PDA beide Naphodianthrone in einem methanolischen Extrakt von *H. empetrifolium* nachzuweisen. Tawaha et al. (2010) bestimmten den Hypericin-Gehalt per HPLC-UV auf 0,002% (m/m), daneben den Gehalt an Hyperforin auf 0,094% (m/m), was bis dahin nicht detektiert werden konnte (Crockett et al. 2005, Alali et al. 2009).

### 1.1.4 Acylphloroglucinole

Eine Übersicht über natürlich vorkommende Acylphloroglucinole und deren biologische Aktivität ist bei Pal Singh und Bharate (2006) zu finden.

Die Acylphloroglucinole aus der Gattung *Hypericum* bestehen chemisch gesehen aus dem Phloroglucingrundkörper (1,3,5-Trihydroxybenzol) und einer Acylgruppe, welche entweder aliphatischen oder aromatischen Charakter besitzen kann. Die aromatischen Verbindungen werden häufig als Benzophenone bezeichnet, welche als Vorstufen der Xanthone angesehen werden können (Cuesta-Rubio et al. 2005, Demirkiran 2007). Im Folgenden soll an ausgewählten Substanzen die Strukturvielfalt innerhalb der Gattung *Hypericum* deutlich gemacht und diese anhand unterschiedlicher Strukturmerkmale klassifiziert werden.

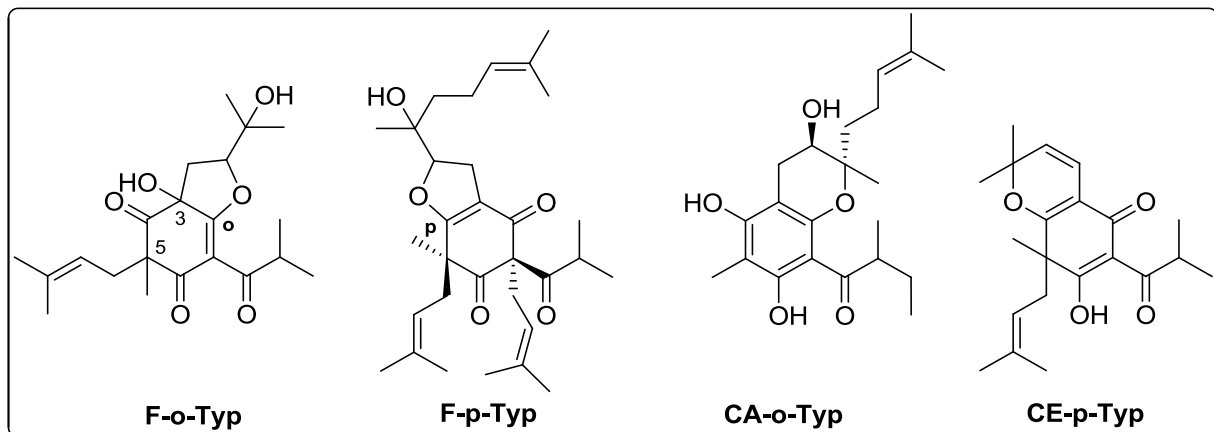
Der Phloroglucin-Grundkörper ist in den meisten Fällen in vielfältiger Weise modifiziert und nur vereinzelt unsubstituiert (Lin und Wu 2003). Typisch für die Gattung sind Prenyl- bzw. Geranylreste, die entweder O- oder C-verknüpft sind. Es sind aber auch Methylierungs- und Methoxylierungsprodukte sowie vereinzelt auch O-Glykoside zu finden (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8:** Monozyklische Acylphloroglucinole die entweder C-geranyliert (**CG**) oder O-geranyliert (**OC**, Athanasas et al. 2004) sind, eine C-Prenylierung (**CP**, Gibbons et al. 2005) oder O-Prenylierung (**OP**, Schmidt et al. 2012a) aufweisen. O- und C-methylierte Verbindung (**OCM**, Wang et al. 2010) sowie O-Glykoside (**OGly**, Wang et al. 2008).

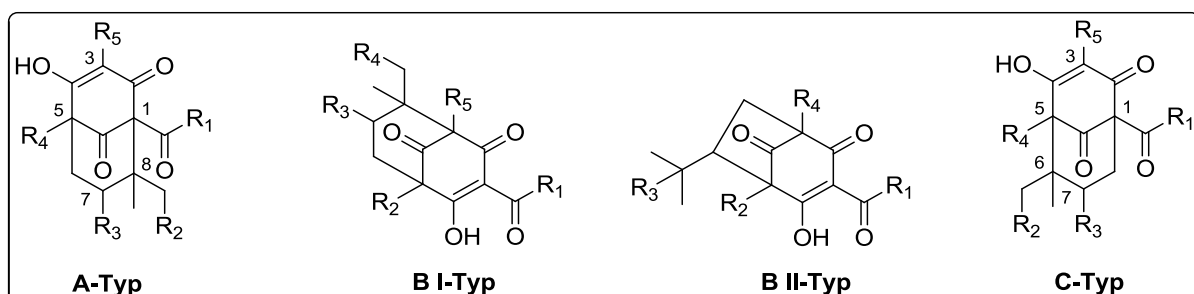
Die Prenyl- und Geranylreste können jeweils Zyklisierungsreaktionen mit den Hydroxylgruppen des Phloroglucinkörpers unter Bildung von bicyklischen polyprenylierten Acylphloroglucinolen (BPAPs) durchlaufen. Diese lassen sich in verschiedene Typen,

abhängig von dem entstandenen Heterozyklus, einteilen. So kann man bityklische Furano (**F**)- Derivate oder Pyrano-Derivate, vom Chroman (**CA**)- oder Chromen (**CE**)-Typ klassifizieren, wobei der Ringschluss entweder mit der OH-Gruppe in ortho- oder der para-Position zur Acyl-Seitenkette erfolgen kann (**Abbildung 9**).



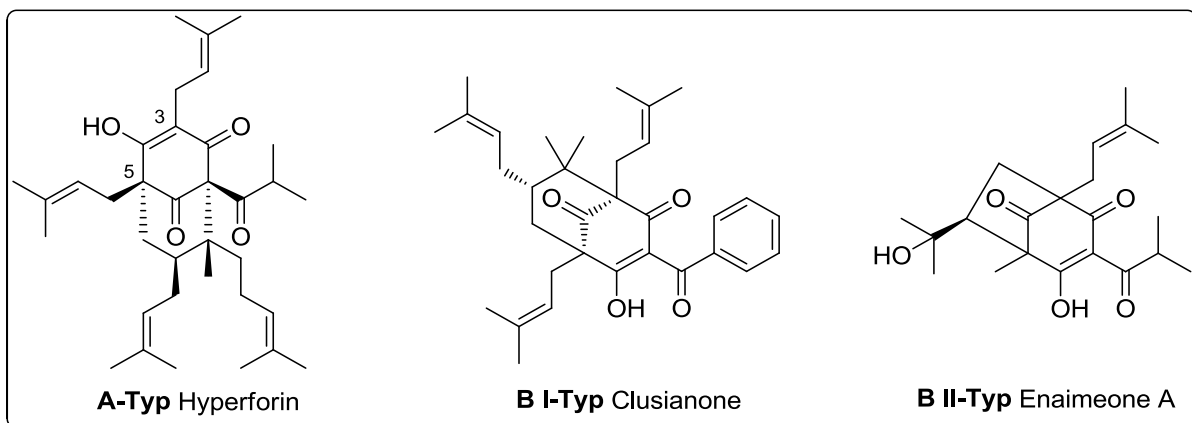
**Abbildung 9:** Klassifizierung der bityklischen polyprenylierten Acylphloroglucinole (BPAPs) vom Furano(**F**)-, Chroman(**CA**)- und Chromen(**CE**)-Typ; Die Zyklisierung der Prenyl- oder Geranyl-Kette in Position 3 oder 5 erfolgt im Bezug zur Acyl-Seitenkette in ortho(o)- oder para(p)-Position. Beispielverbindungen vom **F-o-Typ**, **CE-p-Typ** (Winkelmann 2001), **F-p-Typ** (Tanaka et al. 2008) und **CA-o-Typ** (Mamemura et al. 2011) kommen neben dem nicht abgebildeten **CA-p-Typ** (Schmidt et al. 2012b) und **CE-o-Typ** (Bernardi et al. 2005) in der Gattung *Hypericum* vor.

Erfolgt der Ringschluss hingegen über eine C-C-Bindung des Prenyl- oder Geranylrestes mit einem C-Atom des Phloroglucinol-Grundgerüsts, entstehen sogenannte polyzyklische polyprenylierte Acylphloroglucinole (PPAPs), welche anhand unterschiedlicher Verknüpfungen in verschiedene Typen (**Abbildung 10**) eingeteilt werden (Dakanali und Theodorakis 2011).



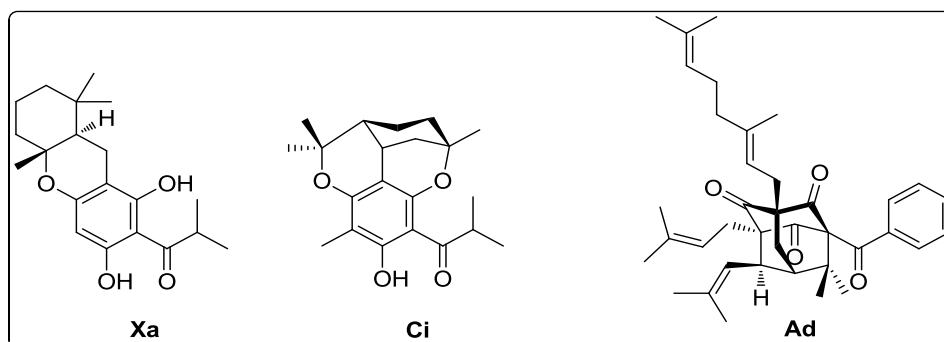
**Abbildung 10:** Klassifizierung der verschiedenen Verknüpfungstypen der PPAPs. Beim **A-Typ** erfolgt die C-C-Verknüpfung von C-5→C-1, beim **B I-** und **B II-Typ** von C-5→C-3 bzw. C-3→C-5 und beim **C-Typ** von C-1→C-5.

In der Gattung *Hypericum* konnten bisher nur Verbindungen des A-, B I- und B II-Typs gefunden werden, der C-Typ hingegen noch nicht. Ausgewählte Beispielsubstanzen aus *Hypericum* sind in **Abbildung 11** dargestellt. Auch bei den PPAPs ist die Zyklisierung von Prenyl- und Geranyl-Seitenketten in Position 3 und/oder 5 zu Furano- oder Pyrano-Derivaten prinzipiell möglich, welche entsprechend der Nomenklatur der bicyklischen Verbindungen in die verschiedenen F- bzw. CE- und CA-Typen unterschieden werden können, wie z.B. Furohyperforin und Isomere (Lee et al. 2006) sowie das Pyrohyperforin (Shan et al. 2000).



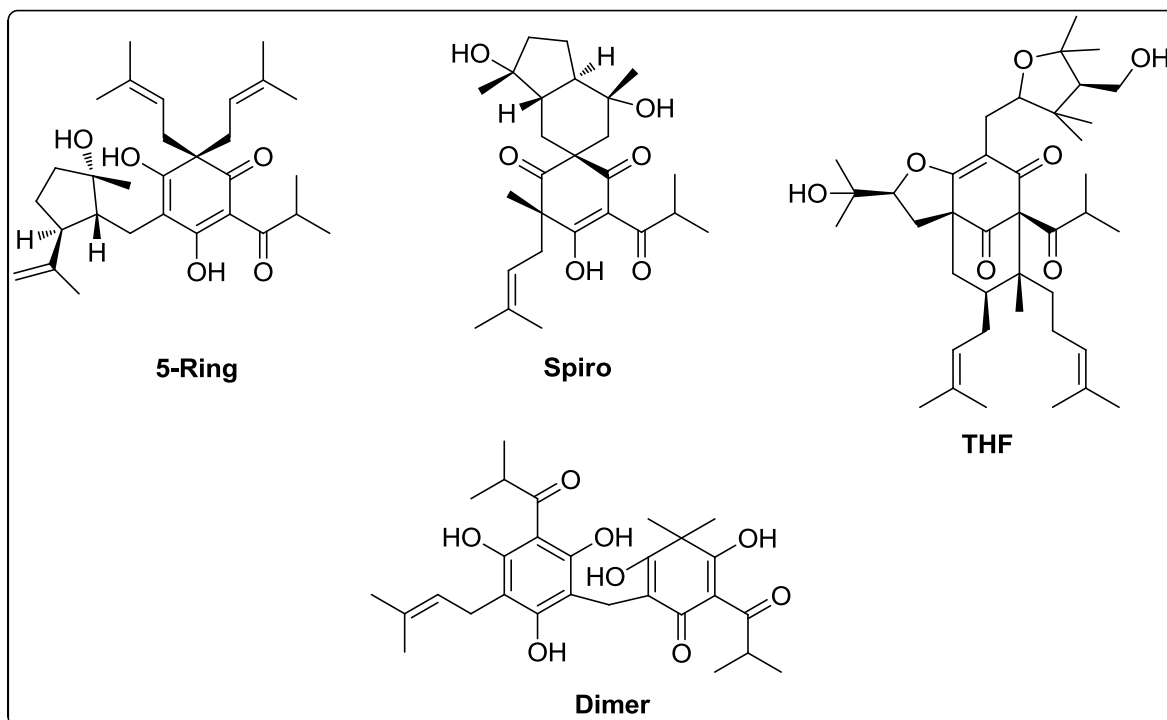
**Abbildung 11:** Beispielverbindungen für PPAPs des Typs **A** (Hyperforin, Gurevich et al. 1971), **B I** (Clusianone, Hu und Sim 2000) und **B II** (Enaimeone A, Winkelmann 2001).

Ähnlich komplexe Strukturen können entstehen, wenn ein Geranylrest über ein Chroman- oder Chromen-Zwischenprodukt noch einen zweiten Zyklisierungsschritt zu einem trizyklischen Xanthen- oder über eine zweite OH-Gruppe des Phloroglucins zu einem Citran-Derivat durchläuft. Der Ringschluss kann aber auch über zwei C-Atome des Phloroglucinols erfolgen, was zu ungewöhnlichen Adamantan-Verbindungen führt (**Abbildung 12**).



**Abbildung 12:** Tri- und polyzyklische Acylphloroglucinole vom Xanthen(**Xa**, Athanasas et al. 2004), Citran(**Ci**, Tanaka et al. 2010) und Adamantan(**Ad**-Typ (Ishida et al. 2010).

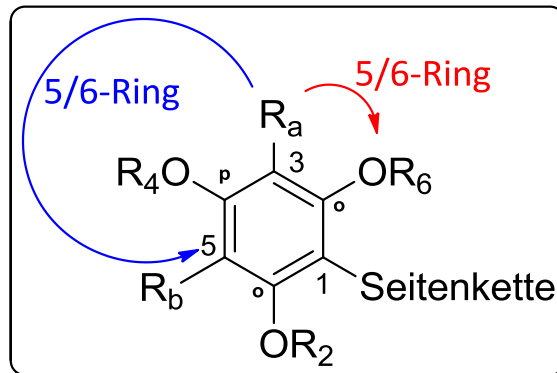
Eine weitere Besonderheit stellen monoterpenoide Verbindungen wie das Hypercalin C dar, bei dem ein 5-Ring-Monoterpen möglicherweise ankondensiert ist. Dieser kann zu Spiro-Verbindungen weiterreagieren. Ein Biosyntheseweg ist bei Abe et al. (2012) postuliert. Aus *H. cohaerens* konnte ein ungewöhnliches Tetrahydrofuran-Terpen-Addukt isoliert werden (Liu et al. 2013). Etwas häufiger in der Gattung *Hypericum* kommen dimere Kondensationsprodukte (**Abbildung 13**) vor, welche ursprünglich aus verschiedenen Farnen isoliert wurden (Penttilä et al. 1963).



**Abbildung 13:** C-C-verknüpfte Terpen-Addukte und dimere Verbindung: **5-Ring**-Addukte (Nagai und Tada 1987), **Spiro**- Verbindungen (Abe et al. 2012), Tetrahydrofuran(**THF**)-Kondensate (Liu et al. 2013) und **dimere** Verbindungen (Rocha et al. 1995).

In **Abbildung 14**, S. 18 sind die Strukturvarianten der Acylphloroglucinole, wie sie in der Gattung *Hypericum* zu finden sind, schematisch zusammengefasst. Prinzipiell sind auch immer Kombinationen der verschiedenen Modifikationen möglich.

Zusammenfassung der Strukturvarianten



Acyl-Seitenkette : Acetyl-, Isopropyl-, Isobutyryl-, 2-Methylbutyryl-, Isovalerianyl-  
Benzoyl- und verschiedene Hydroxybenzyl-Reste

$R_2, R_4, R_6$  : H, Methyl-, Prenyl-, Geranyl-, Glykosyl-Reste

$R_a, R_b$  : H, Methyl-, Prenyl-, Geranyl-Reste

An C-3 und C-5 können zusätzlich zur  $R_a$  und  $R_b$  Methyl-, Prenyl-, Geranyl-Reste ankondensiert sein.

Die Zyklisierung eines Prenyl- oder Geranyl-Restes =  $R_a$  oder  $R_b$  kann mit einer Hydroxylgruppe sowohl in o- oder p-Stellung zur Seitenkette erfolgen, das gilt in gleicher Weise für den Ringschluss mit einem C-Atom in Position 1, 3 oder 5.

**Abbildung 14:** Der Phloroglucin-Grundkörper und prinzipielle Modifikationsmöglichkeiten, wie sie in der Gattung *Hypericum* zu finden sind.

## 1.2 Die Angiogenese

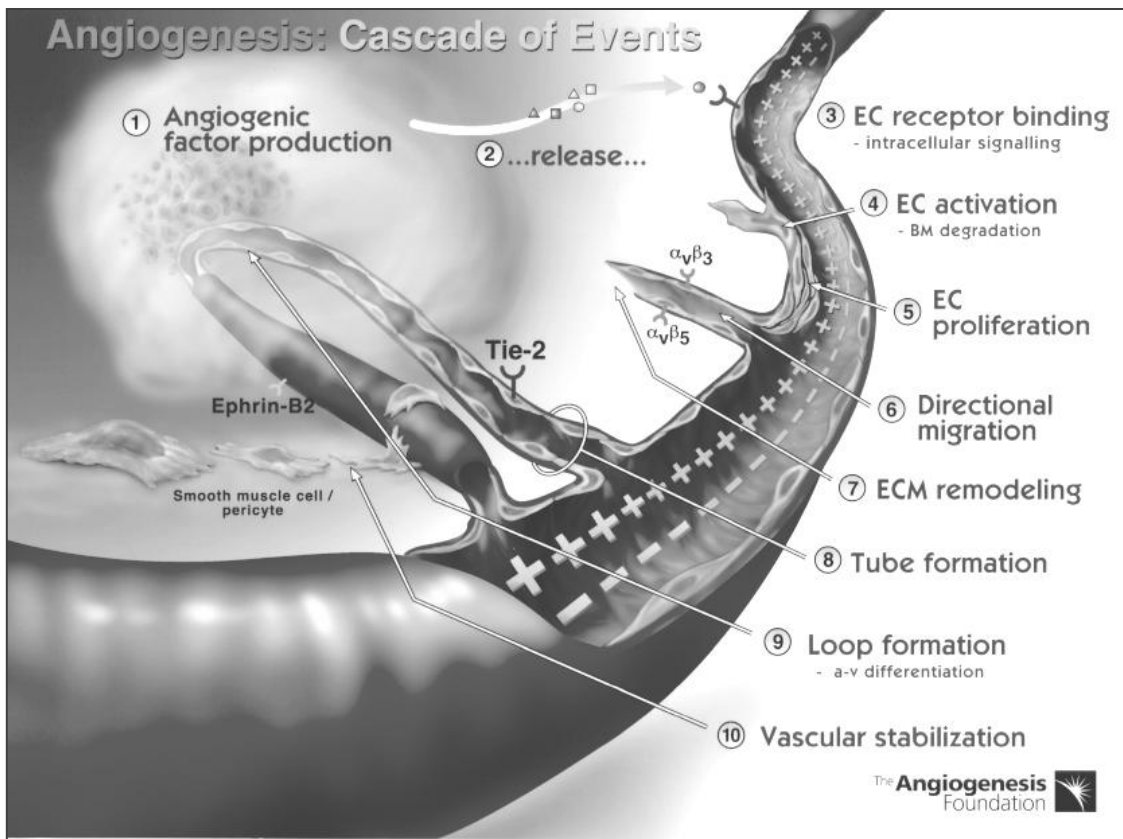
### 1.2.1 Physiologie der Angiogenese

Endothelzellen bilden die innerste, einlagige Schicht der Blut- und Lymphgefäße und sind für den parakrinen Gas-, Flüssigkeits- und Stoffaustausch verantwortlich. Zusammen mit der Basalmembran und subendothelialelem Bindegewebe bilden sie die sogenannte *Tunica intima* oder kurz Intima der Arterien und Venen. Bei Kapillaren hingegen besteht die Intima nur aus Endothelzellen und der teilweise diskontinuierlichen Basalmembran, in der eine zweite lückenhafte Zelllage aus Perizyten hauptsächlich zur Stabilisierung liegt (Leonhardt 1990).

Die Angiogenese, also die Aussprossung von neuen Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen, spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen, bei denen eine Neovaskularisation notwendig ist, wie zum Beispiel dem Wachstum, der Wundheilung, im Ovar bei der Follikelreifung und der Corpus-luteum Entwicklung sowie dem Aufbau der Uterusschleimhaut (Taherigorabi und Khazaei 2012).

Im Unterschied dazu bezeichnet man die *de novo* Bildung von Blutgefäßen als Vaskulogenese, wenn sich die Endothelzellen aus sogenannten endothelialen Vorläuferzellen (engl. endothelial progenitor cells, EPC) oder Angioblasten rekrutieren. Dieser Vorgang kann auch im Erwachsenenalter auftreten, ist aber gerade in der frühen Embryogenese bei der Ausbildung eines Blutgefäßnetzwerkes von entscheidender Bedeutung (Joussen et al. 2003).

Eine Variante der Angiogenese stellt die Arteriogenese dar, mit deren Hilfe verstopfte Arterien durch Reifung bereits bestehender Arteriolen komplett ersetzt werden können. Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Vorgängen liegt im Auslöser. Wird die Angiogenese vor allem durch Hypoxie bzw. Ischämie stimuliert, so sind es bei der Arteriogenese hauptsächlich physikalische Faktoren, wie Scherkräfte zwischen benachbarten Gefäßen, die eine Rolle spielen (Heil et al. 2006). Eine Übersicht über die drei Vorgänge sowie natürlicher Aktivatoren und Inhibitoren ist bei Carmeliet (2000) zu finden. Der Mechanismus der Angiogenese vollzieht sich schrittweise und ist in **Abbildung 15**, S. 20 dargestellt.



**Abbildung 15: Schrittweiser Mechanismus der Angiogenese.** Zunächst werden vom einem bestimmten Gewebeteil, das kann verletztes oder hypoxisches Gewebe aber auch Tumorgewebe sein, Angiogeneseaktivatoren ausgesendet (1). Dabei handelt es sich in der Regel den Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial growth Factor), kann sich aber auch um eine Vielzahl anderer Stimuli handeln (Joussen et al. 2003). Diese binden an bestimmten Rezeptoren auf den Endothelzellen (2) und setzen eine Signalkaskade in Gang (3), welche die Produktion bestimmter Enzyme zur Perforierung des bestehenden Gefäßes auslöst (4). Gleichzeitig beginnen die Zellen zu proliferieren und zielgerichtet zu migrieren (5). Spezielle Integrine dienen dem Verankern neuer Gefäße (6), wobei die Extrazelluläre Matrix (ECM) mittels Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) abgebaut und umgeformt wird (7). Die Endothelzellen bilden währenddessen ein neues Blutgefäß ('tube', 8) und schließen letztlich den Kreislauf, damit das Blut zirkulieren kann (9). Abschließend stabilisieren Perizyten und Muskelzellen das neue Gefäß (10). Die Abbildung ist zu finden unter: <http://www.angio.org/img/cascadehi.jpg>.

### 1.2.2 Anti-Angiogenese als therapeutisches Target

Eine verstärkte oder fehlgesteuerte Angiogenese kann aber auch zum Problem werden und wird für eine Reihe von Erkrankungen verantwortlich gemacht. Hierzu zählen neben vielen anderen, vor allem pathologische Vorgänge am Auge, wie die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) oder die diabetische Retinopathie aber auch Tumorerkrankungen, Psoriasis, rheumatoide Arthritis und Atherosklerose (Carmeliet und Jain 2000, Carmeliet 2005, Cao 2010).

### 1.2.2.1 Tumorthherapie

Epidemiologischen Daten des deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg zufolge betrug in Deutschland im Jahr 2008 die Inzidenz für Krebserkrankungen 469 800. Das entspricht im Vergleich zu 2006 einem Zuwachs von 43 000. Prognosen zufolge soll die Zahl in den nächsten Jahren weiter ansteigen. Die Prävalenz lag 2008 bei 1,33 Millionen ([www.dkfz.de](http://www.dkfz.de)). Laut dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) stehen Krebserkrankungen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle als Todesursache. Bei Frauen stellt der Brustkrebs sowie der Dickdarm- und Mastdarmkrebs die häufigsten Krebsarten dar. Beim Mann sind es neben dem Prostata- und dem Darmkrebs vor allem der Lungenkrebs, welcher zum Tode führt. Bei Kindern dominieren Leukämie, ZNS-Tumore und Lymphome als Krebsarten ([www.gesundheitsforschung-bfmb.de](http://www.gesundheitsforschung-bfmb.de)).

Bei den Ursachen für verschiedene Krebserkrankungen unterscheidet man zwischen exogenen und endogenen Risikofaktoren, wobei man annimmt, dass 80-90% aller Krebsfälle exogen bedingt sind. Neben Rauchen und Überernährung, chemischen Noxen und bestimmten Strahlungsarten sind häufig auch Viren und Bakterien Auslöser einer Krebserkrankung. Bei Frauen steht das Zervixkarzinom durch Humane Papillomaviren (HPV) und bei den Männern der Magen- und Leberkrebs, bedingt durch *Helicobacter pylori* bzw. Hepatitis-B-Viren an erster Stelle (Schooltink 2012). Die endogenen Risikofaktoren wie Säurereflux und Gallensteine spielen eine eher untergeordnete Rolle (Hiddemann und Bartram 2010).

Die Behandlungsmöglichkeiten der verschiedenen Krebsarten umfasst die chirurgische Entfernung des Tumors, die Strahlentherapie und die Chemotherapie mit Zytostatika. Allerdings gibt es seit längerem neue Strategien in der Tumorthherapie. Eine davon stammt von J. Folkman, der 1971 die Rolle der Angiogenese als Target bei der Bekämpfung von Tumoren beschrieb. Er stellte schlicht fest, dass ein Tumor ohne kontinuierliche Gefäßneubildung nicht wachsen kann, was in zahlreichen *in vitro* Versuchen in der Folgezeit bestätigt werden konnte (Ribatti 2008). Heute versucht man die Erkenntnisse um die Mechanismen der Angiogenese therapeutisch zu nutzen, um dem Tumor den „Lebenssaft abzdrehen“ (Bendas 2009). Eine Übersicht über den Benefit der Kombination aus Anti-Angiogenese und Chemotherapie schildern Ma und Waxman (2008).

Aktuell (*September 2013*) sind elf monoklonale Antikörper als VEGF-Hemmer und 16 Proteinkinase-Inhibitoren als Zytostatika zugelassen ([www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de)), deren Angriffspunkte und die daraus resultierenden inhibitorischen Effekte auf das VEGF-vermittelte Signal in **Abbildung 16**, S. 23 schematisch dargestellt sind.

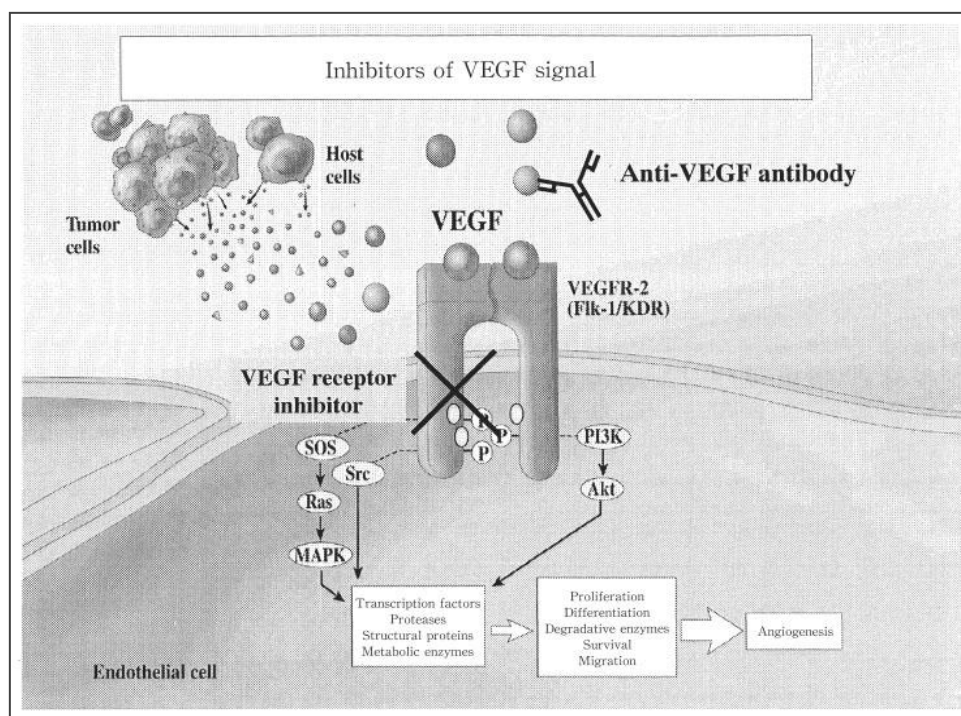
### 1.2.2.2 Therapie der altersbedingten Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) stellt in den Industrienationen die häufigste Erblindungsursache dar (Freund et al. 2013). Dem Bundesverband der Augenärzte zufolge ist die AMD mit einem Anteil von 50% auch in Deutschland die häufigste Ursache für schwere Sehbehinderung. Die Anzahl der Erblindungen liegt demnach bei ca. 5000 pro Jahr ([www.augeninfo.de](http://www.augeninfo.de)). Zu den beiden häufigsten Risikofaktoren zählen Rauchen und eine genetische Prädisposition. Schätzungen der *AMD Alliance International* zufolge sollen in Deutschland 4,5 Millionen von der Krankheit betroffen sein (Finger et al. 2007). Neueren Daten zufolge lag die Prävalenz im Jahr 2012 bei 1,6 Millionen und soll bis zum Jahr 2030 auf über zwei Millionen ansteigen ([http://www.dog.org/wp-content/uploads/2013/03/DOG\\_Weissbuch\\_2012\\_fin.pdf](http://www.dog.org/wp-content/uploads/2013/03/DOG_Weissbuch_2012_fin.pdf)).

Bei der Makuladegeneration handelt es sich aus pathologischer Sicht allgemein um eine Funktionseinschränkung bzw. -verlust der *Macula lutea*, also der Stelle in der Netzhaut mit der höchsten Dichte an Photorezeptoren. Betroffen sind sowohl das retinale Pigmentepithel (RPE) als auch die aufgelagerte sogenannte Bruch'sche Membran, welche als Grenzmembran die Netzhaut (Retina) von der Aderhaut (Choroidea) trennt.

Im Frühstadium der Erkrankung kommt es zu Ablagerungen (Drusen) und Hyper- sowie Hypopigmentierungen der RPE, was von den meisten Patienten aber nicht bemerkt wird. Die Spätstadien hingegen unterscheidet man in eine ‚trockene‘ und eine ‚feuchte‘ AMD. Bei der trockenen Spätform sterben im Bereich der äußeren Schichten der Netz- und Aderhaut vermehrt Zellen ab (geographische Atrophie), wohingegen sich bei der feuchten, aggressiveren Form sogenannte chorioidale Neovaskularisationen aus der Aderhaut heraus entwickeln. Diese neuen Blutgefäße führen wiederum über Ödeme oder Hämorrhagien zur Degeneration der Makula und zum Funktionsverlust der neuronalen Zellelemente der Retina. Dieser Prozess bedingt einen zunehmenden Verlust der Wahrnehmung in der Mitte des Gesichtsfeldes (Finger et al. 2007). Während die trockene Form nicht therapiert werden

kann, stehen für die feuchte AMD neben der photodynamischen Therapie (PDT) und der intravitrealen Gabe von Triamcinolon einige anti-angiogen wirksame Medikamente zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um VEGF-Inhibitoren, die als Antikörper bzw. Aptamer den Wachstumsfaktor direkt abfangen (Freund et al. 2013). Aktuell (September 2013) sind vier Medikamente als antineovaskuläre Mittel zur Behandlung der feuchten AMD zugelassen ([www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de)). Neben dem 2004 zugelassenen anti-VEGF-Aptamer Pegaptanib (Macugen®), kommen derzeit die Antikörper Ranibizumab (Lucentis®) und das Fusionsprotein Aflibercept (Eylea®) sowie der Antikörper Bevacizumab (Avastin®), allerdings im „off-label-use“, zum Einsatz, wobei bedarfsadaptiert injiziertes Ranibizumab als Mittel der Wahl angesehen werden kann (Arznei-telegramm 2013).

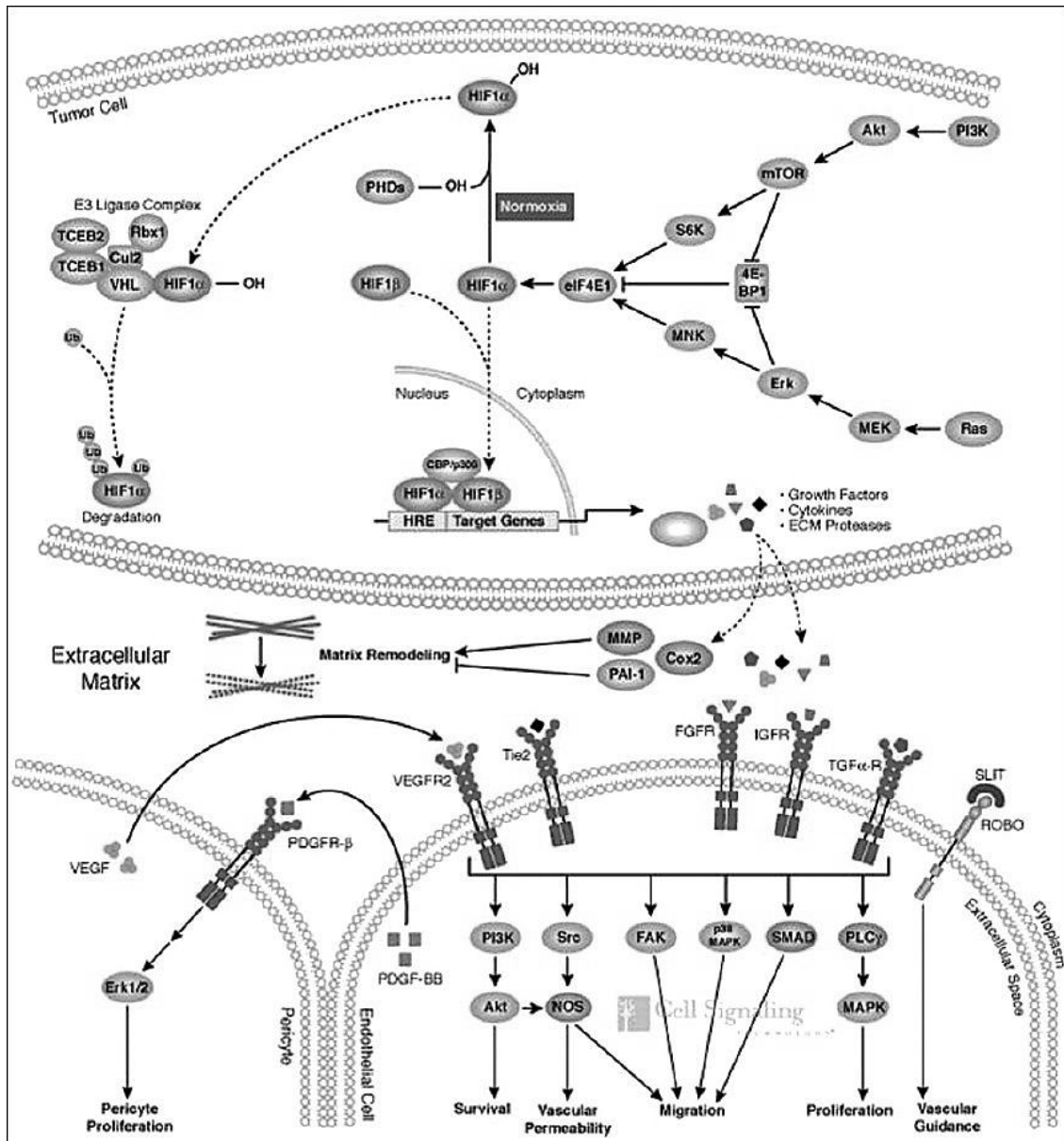


**Abbildung 16:** Angriffspunkte der derzeit zugelassenen Medikamente: VEGF-Hemmer und VEGF-Rezeptor-Inhibitoren. Die Abbildung ist zu finden unter: <http://www.naika.or.jp/im2/42/03/figs/sym2/6/fig4.jpg>

### 1.2.3 Anti-angiogene Aktivität ausgewählter Naturstoffe

Die relativ geringe Anzahl an derzeit zugelassenen Medikamenten, verbunden mit hohen Therapiekosten und steigender Zahlen der Neuerkrankungen an Krebs und AMD machen die Suche nach neuen Angiogenese-Inhibitoren notwendig. Die Wirkstoffe gegen Tumorerkrankungen und der feuchten AMD fangen entweder den Wachstumsfaktor (VEGF)

ab, oder beeinflussen dessen Tyrosin-Kinase-Rezeptor auf der Endothelzelle. Es gibt aber zahlreiche weitere Zielstrukturen sowohl außerhalb als auch in der Zelle selbst, die für eine mögliche Inhibierung der Angiogenese in Frage kommen. Die Zusammenhänge und Angriffsmöglichkeiten sind in **Abbildung 17** zumindest ansatzweise dargestellt.



**Abbildung 17:** Signalkaskaden in der Tumorzelle und der Endothelzelle bieten Angriffspunkte für neue anti-angiogene Substanzen. Die Abbildung ist zu finden unter:

<http://www.cellsignal.com/pathways/angiogenesis.jsp>

Eine Übersicht über Angiogenese-Inhibitoren der Zukunft und deren Angriffspunkte, die „den Tumor von der Versorgung abschneiden sollen“, liefern Zündorf und Dingermann (2007).

Im Bereich der Naturstoffe zeigen vor allem das Hyperforin und Aristoforin, ein stabileres Derivat, hoffnungsvolle Ansätze das Tumorwachstum zu hemmen (Schempp et al. 2002, Schempp et al. 2005, Gartner et al. 2005). Im Signaling von HUVEC reduziert Hyperforin unter anderem die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern, was die Proliferation der Endothelzellen beeinflusst (Lorusso et al. 2009). Eine Übersicht über die Mechanismen einer antitumoralen bzw. anti-angiogenen Aktivität des Hyperforins liefern Medina et al. (2006). Darüber hinaus sind bereits eine Reihe von anti-angiogenen Aktivitäten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben worden (Quiney et al. 2006a, Quiney et al. 2006b). Neben dem Hyperforin selbst steht seit einiger Zeit auch ein stabiles Dicyclohexylammonium (DCHA)-Salz zur Verfügung, was vergleichbare Aktivitäten wie das Hyperforin selbst zeigt (Martínez-Poveda et al. 2010). Für Garcinol, ein dem Hyperforin strukturell ähnliches Phloroglucinol aus *Garcinia indica*, Clusiaceae, wurden bereits ähnliche „anticancer“ Eigenschaften nachgewiesen (Saadat und Gupta 2012). Das Humulon, ein ebenfalls poly-prenyliertes Acylphloroglucinol, reduzierte die VEGF-Produktion in Kolonkarzinom- und murinen Endothelzellen und zeigte darüber hinaus einen direkte anti-angiogenen Effekt im ‚Chorio-Allantoic Membrane‘ (CAM)-Assay (Shimamura et al. 2001). In einem anderen *in vivo*-Assay, dem ‚Matrigel plug assay‘, war das Lupulon in der Lage, die Gefäßneubildung zu reduzieren (Siegel et al. 2008). In einem ähnlichen *in vivo*-Modell, dem ‚Matrigel sponge assay‘, war für das Xanthohumol, einem Chalkon aus Hopfenzapfen, gleichfalls eine Hemmung der Angiogenese festgestellt worden (Albini et al. 2006). Neben dem Hyperforin, was eine gewisse Vorreiterrolle auf der Suche nach neuen Angiogenese-Hemmern im Bereich der Naturstoffe darstellt, konnten aber für eine Reihe anderer, überwiegend polyphenolischer Substanzen vergleichbare inhibierende Effekte auf die verschiedenen Vorgänge der Gefäßneubildung gezeigt werden (Mojzis et al. 2008, Jeong et al. 2011). Für das Phloroglucinol, dem Grundbaustein vieler Polyphenole, konnten Kim und Kim (2010) sowohl angiopräventive als auch anti-oxidative und anti-inflammatorische Effekte nachweisen, was in einem direkten Zusammenhang mit der Hemmung der Bioaktivität von Endothelvorläuferzellen stehen könnte (Kwon et al. 2012).

## 1.3 Zielsetzung

### 1.3.1 Isolierung von Acylphloroglucinolen aus *Hypericum empetrifolium*

Die vor allem im ostmediterranen Raum wachsende Art *H. empetrifolium* stellt aus phytochemischer Sicht eine interessante Art dar, weil bisher nur zwei Acylphloroglucinole isoliert werden konnten. Mit Hilfe von verschiedenen chromatographischen Methoden sollten möglichst viele Verbindungen dieser Substanzklasse aus einem Petrolether-Extrakt aus den oberirdischen Teilen der Pflanze isoliert werden. Es wurde ganz bewusst auf eine bioaktivitäts-geleitete Fraktionierung verzichtet, weil bei dieser Methode oft Substanzen, die nur in sehr geringer Menge in der Pflanze vorkommen, nicht erfasst werden. Gerade diese „Minor“-Verbindungen können einen wertvollen Beitrag im Hinblick auf chemotaxonomische Zusammenhänge zwischen den Arten und Sektionen der Gattung *Hypericum* leisten.

### 1.3.2 Testung auf eine mögliche anti-angiogene Aktivität

Acylphloroglucinole zählen zu einer Verbindungsklasse im Sekundärstoffspektrum der Gattung *Hypericum*, welche viele verschiedene *in vitro* Aktivitäten zeigen. Gerade das Hyperforin, dem wohl prominentesten polyprenylierten Derivat, zeigt neben inhibitorischen bzw. zytotoxischen Effekten auf das Wachstum von Bakterien, Viren, Malaria-Erreger, Krebszellen, auch ein interessantes Potential als Angiogenesehemmer. Allerdings erweist sich die Substanz als temperatur-, licht- und vor allem sauerstoffanfällig. Auf der Suche nach stabileren Acylphloroglucinolderivaten sollten die isolierten Verbindungen in verschiedenen *in vitro*-Assays auf eine mögliche anti-angiogene Aktivität getestet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Phytochemische Methoden

#### 2.1.1 Geräte, Gefäße und Software

Die phytochemischen Methoden in der vorliegenden Arbeit umfassten neben der Fraktionierung des Pflanzenextraktes die Aufreinigung und Charakterisierung der isolierten Verbindungen insbesondere deren Strukturaufklärung. Um diese Arbeiten durchzuführen, bedurfte es verschiedener Geräte, Laborgefäße und Softwareprogramme (**Tabelle 4**). Darüber hinaus kamen diverse Chemikalien (**Tabelle 5**, S. 29) und Lösungsmittel (**Tabelle 6**, S. 29) zum Einsatz.

**Tabelle 4:** Geräte, Gefäße und Software für die phytochemischen Untersuchungen

|                                     | <b>Modellbezeichnung</b>   | <b>Hersteller</b>    |
|-------------------------------------|--|----------------------|
| <b>Analysenwaage</b>                | R 160 P  | Sartorius, Göttingen |
| <b>CD-Spektropolarimeter</b>        | J-710  | JASCO, Groß-Umstadt  |
| <b>DC-Geräte</b>                    | Linomat 5 (Auftragung)<br>Reprostar 3 (Dokumentation)<br>WinCats 1.4.2 (Software)  | Camag, Muttenz (CH)  |
| <b>DC-Kammern</b>                   | Doppeltrogkammer 20 x 20 cm<br>Doppeltrogkammer 10 x 10 cm   | Camag, Muttenz (CH)  |
| <b>Flash-Chromatographie-Anlage</b> | Spot Liquid Chromatography Flash<br>Armen Glider Flash V2.3 (Software)   | Armen, Saint-Ave (F) |
| <b>Glaspipetten</b>                 | Mess- und Vollpipetten<br>verschiedener Volumina   | Brand, Wertheim      |
| <b>Heizplatte</b>                   | Thermoplate S  | Desaga, Nümbrecht    |
| <b>HPLC-Anlage, analytisch</b>      | Elite LaChrom:<br>L-2200 (Autosampler)<br>L-2130 (Pumpe)<br>L-2455 (DAD)<br>L-2350 (Säulenofen)<br>EZChromElite 3.1.7 (Software) | VWR, Darmstadt       |

Fortsetzung Tabelle 4: Geräte, Gefäße und Software für die phytochemischen Untersuchungen

|  | <b>Modellbezeichnung</b>   | <b>Hersteller</b>                                |
|--|--|--|
| <b>HPLC-Anlage,<br/>semipräparativ</b> | ProStar:<br>410 (Autosampler)<br>210 (zwei Pumpen)<br>335 (Detektor)<br>701 (Fraktionskollektor)<br>Galaxie 1.9.302.952 (Software) | Varian, Darmstadt                                |
| <b>Massenspektrometer</b>              | HREI-MS: Finnigan MAT SSQ 710 A  | ThermoQuest, Egelsbach                           |
|  | HRESI-MS: Q-TOF 6540 UHD   | Agilent, Darmstadt                               |
| <b>Messkolben</b>                      | 5 ml, 10 ml und 25 ml  | Brand, Wertheim                                  |
| <b>Messzylinder</b>                    | 10-1000 ml   | Brand, Wertheim                                  |
| <b>NMR-Röhrchen</b>                    | 507-HP-8   | Norell, Landisville (USA)                        |
|  | NMR Shigemi  | Shigemi Co., LTD., Tokyo (JPN)                   |
| <b>NMR-Spektrometer</b>                | AVANCE 600 kryo  | Bruker, Ettlingen                                |
|  | AVANCE 400   |  |
|  | AVANCE 300   |  |
| <b>NMR-Software</b>                    | MestReNova 6.0.2-5475  | Mestrelab Research, Santiago de Compostela (ESP) |
|  | Topspin 3.1  | Bruker, Ettlingen                                |
| <b>Polarimeter</b>                     | UniPol L1000   | Schmidt + Haensch, Berlin                        |
| <b>Probendosierspritze</b>             | 100 µl (DC Auftragung)   | Hamilton, Bonaduz (CH)                           |
|  | 5 ml (manuelle Injektion bei semipräparativer HPLC-Anlage)   |  |
| <b>Quarzküvette</b>                    | QS; 10,00 mm   | Hellma, Müllheim                                 |
| <b>Rotationsverdampfer</b>             | Laborota 4003-control  | Heidolph, Schwabach                              |
|  | MR 3004 safety S   |  |
|  | Rotavac vario control  |  |
| <b>UV-Spektrophotometer</b>            | Cary 50 Scan   | Varian, Darmstadt                                |
|  | Cary WinUV 3.00(182) (Software)  |  |
| <b>Zeichenprogramm</b>                 | ChemBioDraw Ultra 12.0   | PerkinElmer Inc.,<br>Waltham (USA)               |

## 2.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 5: Chemikalien

|                                  | Spezifizierung / Qualität  | Hersteller        |
|----------------------------------|--|-------------------|
| <b>Ammoniumcerculfat</b>         | Ce(NH <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, p.a. (EMSURE®) | Merck, Darmstadt  |
| <b>Ammoniummolybdat</b>          | (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O                   | Merck, Darmstadt  |
| <b>Anisaldehyd</b>               | p-Methoxybenzaldehyd, zur Synthese   | Merck, Darmstadt  |
| <b>Diphenylboryloxyethylamin</b> | 2-Aminoethyldiphenylborinat, ≥ 97%   | Fluka, Buchs (CH) |
| <b>Echtblausalz B</b>            | 3,3'-Dimethoxybiphenyl-4,4'-bis(diazonium)-dichlorid   | Fluka, Buchs (CH) |
| <b>Eisen(III)chlorid</b>         | FeCl <sub>3</sub> , p.a.   | Merck, Darmstadt  |
| <b>Folin-Ciocalteus</b>          | Zusammensetzung: siehe Molybdat-   | Merck, Darmstadt  |
| <b>Phenolreagenz</b>             | Wolfram-Reagenz (Tabelle 15, S. 40)  |                   |
| <b>Macrogol 400</b>              | Polyethylenglykol 400, zur Synthese  | Merck, Darmstadt  |
| <b>Vanillin</b>                  | 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd   | Roth, Karlsruhe   |

Tabelle 6: Lösungsmittel

|                               | Spezifizierung / Qualität   | Hersteller               |
|-------------------------------|---|--------------------------|
| <b>Acetonitril</b>            | p.a. (EMSURE®)<br>für die HPLC (Lichrosolv®)                                    | Merck, Darmstadt         |
| <b>Ameisensäure</b>           | 98-100%, p.a.   | Merck, Darmstadt         |
| <b>Chloroform, deuteriert</b> | Chloroform-d <sub>1</sub> 99,8%   | Deutero, Kastellaun      |
| <b>Cyclohexan</b>             | p.a.  | Acros, Geel (B)          |
| <b>Essigsäure</b>             | 100%, anhydrous, p.a. (EMSURE®)   | Merck, Darmstadt         |
| <b>Ethanol</b>                | absolute  | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| <b>Ethylacetat</b>            | p.a.  | Acros, Geel (B)          |
| <b>Hexan</b>                  | p.a.  | Acros, Geel (B)          |
| <b>Methanol</b>               | p.a. (EMSURE®)<br>für die HPLC (Lichrosolv®)<br>für die Spektroskopie (Uvasol®) | Merck, Darmstadt         |
| <b>Perchlorsäure</b>          | 60%, p.a. (EMSURE®)   | Merck, Darmstadt         |
| <b>Schwefelsäure</b>          | 95-97%, p.a.  | Merck, Darmstadt         |

Das Wasser zur Herstellung von Verdünnungen oder zur Verwendung als Lösungsmittel entsprach „Reinstwasser“ (18 mS/cm) und wurde aus der Reinstwasseranlage (**Tabelle 17**, S. 42) gewonnen.

### 2.1.3 Pflanzenmaterial

Die oberirdischen Teile von *Hypericum empetrifolium* subsp. *empetrifolium* WILLD., Hypericaceae wurden am Mt Pelion in Zentral-Griechenland im Juni 2009 gesammelt und von Prof. Theophanis Constandinidis von der Fakultät für Biologie der Universität von Athen identifiziert. Ein Belegexemplar ist in der ATHU (Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products) mit der Identifikationsnummer „Skaltsa & Lazari 131-09“ hinterlegt.

### 2.1.4 Extraktion des Pflanzenmaterials

Die luftgetrockneten und pulverisierten oberirdischen Teile von *Hypericum empetrifolium* WILLD. (922 g) wurden mit 1,5 l Petrolether mazeriert, und man erhielt 11 g eines braunschwarzen Spissum-Extraktes. Diese Arbeiten wurden dankenswerterweise von Dr. V. Saroglou im Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products der Universität von Athen im Arbeitskreis von Frau Prof. E. Skaltsa durchgeführt.

### 2.1.5 Fraktionierung und Isolierung

#### 2.1.5.1 Flash-Chromatographie

Der PE-Extrakt und alle Unterfraktionen wurden an der Flash-Chromatographie-Anlage bei einer Wellenlänge von 290 nm fraktioniert. Hierbei kamen zum Einen vorgepackte Trennsäulen für die Flash-Chromatographie in zwei verschiedenen Größen (**Tabelle 7**, S. 31) zum Einsatz und zum Anderen wurden leere Kartuschen vom Typ SVP D26 selbst mit 30 g Kieselgel 60 oder Lichroprep® RP-18 als stationärer Phase befüllt (**Tabelle 8**, S. 31). Die Trennleistung der manuell gepackten Säulen war im Vergleich mit der vorgepackten Variante etwas schlechter, aber dennoch akzeptabel.

**Tabelle 7:** Vorgepackte Trennsäulen für die Flash-Chromatographie S1 und S2

|           | Bezeichnung  | Partikelgröße | Inhalt | Säulenvolumen | Beladung  | Hersteller       |
|-----------|--------------|---------------|--------|---------------|-----------|------------------|
| <b>S1</b> | SVP D40-Si60 | 15-40 µm      | 90 g   | 131 ml        | 0,9-4,5 g | Merck, Darmstadt |
| <b>S2</b> | SVF D26-Si60 | 15-40 µm      | 30 g   | 44 ml         | 0,3-1,5 g | Merck, Darmstadt |

**Tabelle 8:** Manuell gepackte „SVF D26-Trennsäulen“ S3 und S4

|           | Stationäre Phase | Bezeichnung       | Spezifizierung                          | Hersteller       |
|-----------|------------------|-------------------|---|------------------|
| <b>S3</b> | SiGel            | Kieselgel 60      | 63-200 µm für die Säulenchromatographie | Merck, Darmstadt |
| <b>S4</b> | C18-SiGel        | Lichroprep® RP-18 | 25-40 µm für die Säulenchromatographie  | Merck, Darmstadt |

Bei Verwendung der Säule S1 fungierte eine mit 10 g Kieselgel oder RP-18 Material manuell gepackte Kartusche der Dimension SVF-D26 als Vorsäule. Für die Fraktionierungsschritte mit den Säulen S2, S3 und S4 wurde keine Vorsäule verwendet.

Prinzipiell wurde das Probenmaterial trocken auf die Trenn- bzw. Vorsäule gegeben. Hierfür war es notwendig, die Probe zunächst in Hexan oder Cyclohexan zu lösen und anschließend mit der 5-fachen Menge an stationärer Phase am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einzurotieren.

Sowohl die Trennsäulen als auch die Vorsäule sind vor jedem Lauf mit einem Fließmittelgemisch, welches den Anfangsbedingungen der jeweiligen Trennsysteme für die Flash-Chromatographie (**Tabelle 9**) entsprach, ausreichend äquilibriert worden.

**Tabelle 9:** Trennsysteme (Flash\_1 bis Flash\_10) für die Flash-Chromatographie

|                | Säule | FM          | Gradient [%]  | Zeit [min] | Fluss [ml/min] | V/Reagenzglas [ml] |
|----------------|-------|-------------|---------------|------------|----------------|--------------------|
| <b>Flash_1</b> | S1    | Hexan-EtOAc | 0 → 100 EtOAc | 0-60       | 30             | 20                 |
| <b>Flash_2</b> | S1    | Hexan-EtOAc | 0 → 50 EtOAc  | 0-40       | 20             | 10                 |
|                |       |             | 100 EtOAc     | 40-50      |                |                    |
|                |       |             | 100 MeOH      | 50-60      |                |                    |

Fortsetzung Tabelle 9

|                 | Säule | FM          | Gradient<br>[%]      | Zeit<br>[min] | Fluss<br>[ml/min] | V/Reagenz-<br>glas [ml] |
|-----------------|-------|-------------|----------------------|---------------|-------------------|-------------------------|
| <b>Flash_3</b>  | S1    | Hexan-EtOAc | 0 → 10 EtOAc         | 0-60          | 20                | 15                      |
|                 |       |             | 10 → 100 EtOAc       | 60-70         |                   |                         |
| <b>Flash_4</b>  | S4    | MeOH-EtOAc  | 100 MeOH             | 0-15          | 20                | 15                      |
|                 |       |             | 0 → 100 EtOAc        | 15-20         |                   |                         |
|                 |       |             | 100 EtOAc            | 20-30         |                   |                         |
| <b>Flash_5</b>  | S1    | Hexan-EtOAc | 0 → 50 EtOAc         | 0-85          | 20                | 20                      |
|                 |       |             | 50 → 100 EtOAc       | 85-100        |                   |                         |
|                 |       |             | 100 MeOH             | 100-120       |                   |                         |
| <b>Flash_6</b>  | S4    | MeCN-MeOH   | 80:20 (V/V)          | 0-30          | 15                | 15                      |
| <b>Flash_7</b>  | S1    | Hexan-EtOAc | 0 → 50 EtOAc         | 0-80          | 20                | 20                      |
|                 |       |             | 50 → 100 EtOAc       | 80-105        |                   |                         |
|                 |       |             | 100 MeOH             | 105-120       |                   |                         |
| <b>Flash_8</b>  | S4    | MeCN-MeOH   | 80:20 (V/V)          | 30            | 10                | 10                      |
| <b>Flash_9</b>  | S1    | Hexan-EtOAc | 10 → 100 EtOAc       | 0-40          | 15                | 15                      |
|                 |       |             | 100 MeOH             | 40-55         |                   |                         |
| <b>Flash_10</b> | S4    | EtOAc-MeOH  | 100 MeOH             | 0-30          | 15                | 15                      |
|                 |       |             | 100 MeOH → 100 EtOAc | 30-45         |                   |                         |
|                 |       |             | 100 EtOAc            | 45-55         |                   |                         |

### 2.1.5.2 Fraktionskontrolle

#### 2.1.5.2.1 Dünnschichtchromatographie

Um den Verlauf der einzelnen Fraktionierungsschritte zu verfolgen, konnte das UV-Spektrum der Flash-Chromatographie-Anlage herangezogen werden. Unverzichtbar jedoch war die dünnschichtchromatographische Kontrolle der einzelnen Fraktionen. Hierbei wurden die Probenlösungen jedes Reagenzglases mittels Mikropipetten oder dem Linomat 5 auf DC-Platten mit verschiedenen stationären Phasen (**Tabelle 10**, S. 33) aufgetragen. In der Regel handelte es sich um 5 bis maximal 20 µl Auftragevolumen.

**Tabelle 10:** Verbrauchsmaterial bei der Dünnschichtchromatographie

|                      | Bezeichnung   | Hersteller       |
|----------------------|---|------------------|
| <b>DC-Platten</b>    | TLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> Aluminiumfolie 20 x 20 cm        | Merck, Darmstadt |
|                      | TLC Silica gel 60 RP-18 F <sub>254s</sub> Aluminiumfolie 20 x 20 cm | Merck, Darmstadt |
| <b>Mikropipetten</b> | Blaubrand® intraMARK (5, 10, 20 µl)                                 | Brand, Wertheim  |

Für die Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme wurden Doppeltriggammern verschiedener Größen sowie diverse Fließmittelsysteme (**Tabelle 11**) verwendet, wobei immer auf eine ausreichend fließmittelgesättigte Atmosphäre in der Kammer geachtet wurde.

**Tabelle 11:** Fließmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie

|              | Bestandteile                  | Volumen-Teile |
|--------------|-------------------------------|---------------|
| <b>FM 1</b>  | Cyclohexan-EtOAc-HOAc         | 60-38-2       |
| <b>FM 2A</b> | Cyclohexan-EtOAc              | 50-50         |
| <b>FM 3</b>  | Cyclohexan-EtOAc-HOAc         | 70-28-2       |
| <b>FM 4</b>  | Cyclohexan-EtOAc-HOAc         | 65-33-2       |
| <b>FM 4J</b> | Cyclohexan-EtOAc              | 90-10         |
| <b>FM 8</b>  | MeCN-MeOH                     | 80-20         |
| <b>FM 9</b>  | Cyclohexan-EtOAc-Ameisensäure | 68-30-2       |

Nach dem Trocknen der Platten im Abzug, wurden die Chromatogramme zunächst underivatisiert bei 254 und 366 nm sowie bei Tageslicht betrachtet. Danach wurden die DC-Platten entweder mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (AS) oder dem Naturstoff-Reagenz (NSR) besprüht, um anschließend auf der Heizplatte bei 120 °C für zehn Minuten bis zur Farbentwicklung getrocknet zu werden. Im Falle des Naturstoffreagenzes erfolgte eine Nachdetektion mit Macrogol-Lösung (ML) zur Intensivierung der Bandenfärbung und somit zur Erhöhung der Nachweisgrenze für die einzelnen Substanzen. Die Zusammensetzung und Herstellung der Sprühreagenzien ist in **Tabelle 12**, S. 34 zu finden. Die Dokumentation erfolgte mit dem Reprostar 3 und die Auswertung mit WinCats® bei Tageslicht (AS) bzw. 365 nm (NSR + ML).

**Tabelle 12:** Detektionsreagenzien für die Fraktionskontrolle

|  | Vorschrift                     | Bestandteile              | Menge  |
|--|--------------------------------|---------------------------|--------|
| <b>Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz</b> | (Wagner et al. 1983)           | Anisaldehyd               | 0,5 ml |
|  |                                | Essigsäure                | 10 ml  |
|  |                                | Methanol                  | 85 ml  |
|  |                                | Schwefelsäure             | 5 ml   |
| <b>Naturstoffreagenz</b>                 | (Europäisches Arzneibuch 2011) | Diphenylboryloxyethylamin | 1 g    |
|  |                                | Methanol                  | 100 ml |
| <b>Macrogol-Lösung</b>                   | (Europäisches Arzneibuch 2011) | Macrogol 400              | 5 g    |
|  |                                | Methanol                  | 100 ml |

Die DC wurde sowohl zur Fraktionskontrolle als auch für die Methoden- und Fließmittelfindung aller Fraktionierungs- und Aufreinigungsschritte eingesetzt.

#### 2.1.5.2.2 <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie

Ein weiteres Instrument zur Fraktionskontrolle und Findung der Acylphloroglucinole stellte die <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie dar. So wurden alle Fraktionen nach dem Vereinigen entweder komplett oder in Anteilen in 0,5 ml Chloroform-d<sub>1</sub> gelöst, ein Protonenspektrum bei 300,13 MHz am Bruker avo 300 bei 295 K aufgenommen und mittels Mestrenova<sup>®</sup> ausgewertet.

#### 2.1.5.3 Semi-präparative HPLC

Die aufzureinigenden Fraktionen wurden in einem Lösungsmittelgemisch, welches den Anfangsbedingungen des jeweiligen Trennsystems entsprach, gelöst und durch Spritzenvorsatzfilter mit der Porengröße 0,25 µm von der Firma Wicom, Heppenheim filtriert. Die Injektion erfolgte manuell bei Raumtemperatur und die Injektionsvolumina betragen nicht mehr als 500 µl. Das Volumen der Probenschleife lag bei 2 ml, die Konzentration der gelösten Fraktionen im Durchschnitt bei 10 mg/ml. Die Chromatographie erfolgte mit einer semi-präparativen HPLC-Anlage unter Verwendung zweier HPLC-Säulen (**Tabelle 13**, S. 35). In **Tabelle 14**, S. 35 sind die Bedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte aufgelistet.

**Tabelle 13:** HPLC-Säulen H1 und H2

|           | Bezeichnung              | Partikelgröße | Dimension     | Hersteller        |
|-----------|--------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| <b>H1</b> | Dynamax Pursuit XRs, C18 | 5 µm          | 250 x 10,0 mm | Varian, Darmstadt |
| <b>H2</b> | Eurosphere, C18          | 7 µm          | 250 x 16,0 mm | Knauer, Berlin    |

**Tabelle 14:** Trennsysteme (HPLC\_1 bis HPLC\_6) für die semipräparative HPLC

|               | Säule | FM                    | Gradient [%] | Zeit [min] | Fluss [ml/min] |
|---------------|-------|-----------------------|--------------|------------|----------------|
| <b>HPLC_1</b> | H1    | MeOH-MeCN             | 70 → 98 MeCN | 0-20       | 3              |
|               |       |                       | 98 MeCN      | 20-40      |                |
| <b>HPLC_2</b> | H1    | MeCN                  | 100          | 0-45       | 3              |
| <b>HPLC_3</b> | H1    | MeOH-MeCN             | 60 → 98 MeCN | 0-20       | 3              |
|               |       |                       | 98 MeCN      | 20-40      |                |
| <b>HPLC_4</b> | H1    | H <sub>2</sub> O-MeCN | 80 → 98 MeCN | 0-30       | 3              |
| <b>HPLC_5</b> | H2    | H <sub>2</sub> O-MeCN | 60 → 98 MeCN | 0-30       | 7              |
| <b>HPLC_6</b> | H1    | H <sub>2</sub> O-MeCN | 60 → 98 MeCN | 0-35       | 3              |

Das Sammeln der Peaks erfolgte manuell in Reagenzgläsern unter zu Hilfenahme des UV-Spektrums bei 290 nm, welches mit einem DAD ermittelt wurde. Das Lösungsmittel in den einzelnen Reagenzgläsern wurde im Abzug bei Raumtemperatur unter konstanter Stickstoffatmosphäre abgepustet. Der Rückstand konnte somit unmittelbar in deuteriertem Chloroform aufgenommen und die Proben anschließend in die Abteilung NMR-Spektroskopie der Zentralen Analytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg zur Durchführung der 1D- und 2D-NMR-Experimente gegeben werden.

## 2.1.6 Strukturaufklärung und Charakterisierung

### 2.1.6.1 Massenspektrometrie

Die Aufnahme der hochaufgelösten Massen erfolgte bei Raumtemperatur an zwei verschiedenen Massenspektrometern in der Abteilung Massenspektrometrie der Zentralen Analytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg. Die Elektronenstoß-

Ionisierung (EI) wurde im positiven Modus bei 70 eV am Finnigan MAT SSQ 710 A und die Elektrospray-Ionisation (ESI) sowohl im positiven als auch negativen Modus am Q-TOF 6540 UHD durchgeführt. Die erhaltenen Massen wurden mit denen für die jeweilige Substanz in ChemBioDraw® berechneten Werte verglichen und auf vier Nachkommastellen angegeben.

Aus den Molekülionen  $M^+$  und den Quasi- oder Pseudo-Molekülionen wie z.B.  $[M + H]^+$  oder  $[M - H]^-$  lassen sich mit Hilfe der hochaufgelösten Präzisionsmassenbestimmung die Molekülmasse und die Elementarzusammensetzung bestimmen, woraus sich die Bruttoformel der Verbindung ableiten lässt (Budzikiewicz und Schäfer 2012).

Die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente (DBÄ), welche die Anzahl an Ringen bzw. Doppelbindungen im Molekül angibt, konnte nach folgender Formel erfolgen (Hänsel und Sticher 2010):

**Formel 1: Berechnung der Doppelbindungsäquivalente**

$$DB\ddot{A} = \frac{(2n + 2) - m}{2}$$

DBÄ Doppelbindungsäquivalente  
 n Anzahl der Kohlenstoffatome  
 m Anzahl der Wasserstoffatome

### 2.1.6.2 NMR-Spektroskopie

Die aufgereinigten Verbindungen wurden prinzipiell in 0,5 ml deuteriertem Chloroform gelöst und in NMR-Röhrchen (507-HP-8) gefüllt. Bei sehr kleinen Substanzmengen (< 1 mg) wurden die Verbindungen in speziellen Röhrchen (NMR-Shigemi) vermessen. Die Menge an  $CDCl_3$  betrug hierbei nur 0,3 ml.

Die Messungen erfolgten an verschiedenen NMR-Spektrometern in der Abteilung NMR-Spektroskopie der Zentralen Analytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg. Die 1D und 2D NMR-Spektren wurden am Bruker avo 600 kryo bei 295 K aufgenommen (600,25 MHz für die  $^1H$ - und 150,93 MHz für die  $^{13}C$ -NMR Spektren), auf das Signal des nichtdeuterierten  $CHCl_3$  ( $\delta_H$  7,27 ppm, s) im Lösungsmittel bzw. des deuterierten  $CDCl_3$  ( $\delta_C$  77,0 ppm) bezogen und mit Topspin® ausgewertet.

Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe eindimensionaler ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR) und zweidimensionaler ( $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -HMBC/HSQC,  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -COSY,  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY/ROESY) Verfahren.

Zunächst wurde die Anzahl der Kohlenstoffatome im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum unter Erstellung einer „Peakliste“ bestimmt. Mit Hilfe der  $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) Spektren konnten heteronukleare Kopplungen direkt am jeweiligen Kohlenstoff gebundener Protonen visualisiert werden. Nun konnte im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum anhand der Gesamthöhe des Integrals (= alle Stufen der Integrationskurve), welche der Gesamtzahl der im Molekül vorhandenen Wasserstoffatome wie sie in der Summenformel vorkommen entspricht, die Anzahl der Wasserstoffatome pro Stufenhöhe berechnet werden (Rücker et al. 2008). Mit Hilfe der sogenannten „n + 1“-Regel (n = Anzahl der Protonen an direkt gebundenen Nachbar-Kohlenstoffatomen) konnte die Multiplizität der Signale bestimmt werden, was wiederum die Ermittlung der Kopplungskonstanten ( $J$  in Hz) ermöglichte.

Die  $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) Spektren dienen zur Visualisierung heteronuklearer Kopplungen über mehrere Bindungen ( $^2J$ ,  $^3J$ ,  $^4J$ -Korrelationen), was für die Bestimmung der Verknüpfung der einzelnen Molekülteile miteinander essentiell war. Homonukleare Kopplungen über zwei, drei oder vier Bindungen konnten mittels  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -COSY (*CORrelated SpectroscopY*) Spektren ermittelt werden. Homonukleare Kernkopplungen bis zu einem Abstand von 5 Å über den Raum wurden mit  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY*) und  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -ROESY (*Rotating frame Overhauser Enhancement SpectroscopY*) Techniken gemessen, anhand derer die räumliche Anordnung funktioneller Gruppen im Molekül und somit die relative Stereochemie bestimmt werden konnte (Hänsel und Sticher 2010, Hesse et al. 2012, Friebolin 2013).

### 2.1.6.3 UV-Vis-Spektroskopie

Die isolierten Verbindungen wurden in MeOH für die Spektroskopie gelöst, in eine Quarzküvette (Schichtdicke = 1 cm) gefüllt und die Lösung am UV Spektrophotometer im Wellenlängenbereich von 200 - 800 nm bei Raumtemperatur gegen reines MeOH für die Spektroskopie als Kompensationsflüssigkeit vermessen. Die Konzentrationen der Untersuchungslösungen wurden so gewählt bzw. durch Verdünnungsschritte so angepasst, dass die Absorption im linearen Bereich zwischen 0,25 und 0,75 lag. Daraus konnten die

Absorptionsmaxima abgelesen und die molaren Absorptionskoeffizienten berechnet werden (Rücker et al. 2008). Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz:

**Formel 2: Lambert-Beersches Gesetz**

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

folgt:

**Formel 3: Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten**

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot d}$$

- $\varepsilon$  molare Absorptionskoeffizient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
- A Absorption
- c Konzentration [mol/l]
- d Schichtdicke der Messküvette [cm]

Die Angabe des molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte in logarithmierter Form.

#### 2.1.6.4 Polarimetrie

Zur Bestimmung des Drehwertes wurden die isolierten Verbindungen in MeOH für die Spektroskopie gelöst und im Messrohr ( $l = 5 \text{ cm}$ ) des Polarimeters vermessen. Die Wellenlänge betrug bei allen Messungen 589 nm, welche der D-Linie des Natriumlichtes entspricht. Die Temperatur betrug zwischen 20 und 21 °C. Die Messungen erfolgten innerhalb einer Minute sechsmal gegen reines MeOH für die Spektroskopie als Kompensationsflüssigkeit. Daraus wurde der Mittelwert bestimmt und die spezifische Drehung nach folgender Formel berechnet (Rücker et al. 2008):

**Formel 4: Berechnung des Drehwertes**

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{c \cdot l}$$

- $\alpha$  Drehwinkel [°]
- c Konzentration [g/100 ml]
- l Schichtdicke [cm]
- T Temperatur [°C]
- D D-Linie des Natriumlichtes

## 2.1.6.5 CD-Spektroskopie

### 2.1.6.5.1 Aufnahmen am CD-Spektropolarimeter

Die isolierten Verbindungen wurden zur Messung des Circular dichroismus in MeOH für die Spektroskopie gelöst, in Quarzküvetten (1 cm) gefüllt und gegen reines Lösungsmittel bei Raumtemperatur am CD-Spektropolarimeter vermessen. Die Konzentrationen der Lösungen entsprachen denen der UV-Messungen. Die CD-Spektren wurden per Microsoft® Excel aus der molaren Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge (200 - 400 nm) graphisch dargestellt. Die Berechnung der molaren Elliptizität erfolgte nach folgender Formel (Rücker et al. 2008):

#### Formel 5: Berechnung der molaren Elliptizität

$$[\theta]_M = \frac{\theta \cdot M}{100 \cdot c \cdot l}$$

|              |   |
|--------------|---|
| $[\theta]_M$ | molare Elliptizität [ $^{\circ} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ] |
| $\theta$     | Elliptizität [ $^{\circ}$ ]   |
| M            | molare Masse [g/mol]  |
| c            | Konzentration [g/ml]  |
| l            | Schichtdicke [dm]   |

### 2.1.6.5.2 Simulation von CD-Spektren mittels TDDFT

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration eines Acylphloroglucinols, wurden ECD Spektren simuliert. Das zugrundeliegende Prinzip ist die zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie (Time-dependent density functional theory, TDDFT), wobei das Molekül von Interesse nach Geometrieoptimierung einer Energieminimierung einer Dichtefunktional-Theorie-Methode (DFT) unterzogen wurde. Die genaue Durchführung ist bei Schmidt et al. (2012b) zu finden. Diese quantenmechanischen Methoden wurden dankenswerterweise von Prof. Thomas Schmidt, Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster durchgeführt.

Die so simulierten Spektren wurden mit dem experimentell ermittelten verglichen.

### 2.1.6.6 Dünnschichtchromatographie

Die Untersuchungen wurden auf Kieselgelplatten für die Dünnschichtchromatographie und FM 9 (**Tabelle 11**, S. 33) als mobiler Phase durchgeführt. Es wurden Lösungen der verschiedenen Substanzen in einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt und je 5 µl mit der Probendosierspritze am Linomat 5 aufgetragen. Die Chromatogramme wurden entweder unter UV-Licht oder nach der Detektion mit dem Echtblausalz-Reagenz, dem Eisen(III)chlorid-Reagenz, dem Molybdat-Wolframat-Reagenz, dem „Cer-Molybdat-Reagenz“ nach USP 36 oder dem Reagenz nach Godin (**Tabelle 15**) sowie dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz, dem Naturstoff-Reagenz und der Macrogol-Lösung (**Tabelle 12**, S. 34) unter 254 nm, 365 nm oder bei Tageslicht betrachtet. Die Aufnahmen wurden mit dem Reprostar 3 gemacht und mit der Software WinCats® ausgewertet.

**Tabelle 15:** Sprühreagenzien

|   | Vorschrift                               | Bestandteile        | Menge          |
|---|--|---------------------|----------------|
| <b>Echtblausalz-Reagenz</b>   | (Wagner et al. 1983)                     | Echtblausalz B      | 0,2 g          |
|   |  | Wasser              | 100 ml         |
| <b>Eisen(III)chlorid-Reagenz</b>  | (Pachaly 2012)                           | Eisen(III)chlorid   | 1% in EtOH 50% |
| <b>Molybdat-Wolframat-Reagenz</b>   | (Europäisches Arzneibuch 2011)           | Natriumwolframat    | 100 g          |
|   |  | Natriummolybdat     | 25 g           |
|   |  | Salzsäure           | 100 ml         |
|   |  | Phosphorsäure 85%   | 50 ml          |
|   |  | Lithiumsulfat       | 150 g          |
|   |  | Brom                | einige Tropfen |
|   |  | Wasser              | 850 ml         |
| Das Reagenz entspricht dem Folin-Ciocalteus-Reagenz ( <b>Tabelle 5</b> , S. 29) |  |                     |                |
| <b>Reagenz nach Godin</b>   | (Godin 1954)                             | 1% Vanillin in EtOH | 1 Teil         |
|   |  | Perchlorsäure 3%    | 1 Teil         |
| <b>„Cer-Molybdat-Reagenz“</b>   | (The United States pharmacopeia 36 2012) | Ammoniumcersulfat   | 0,38 g         |
|   |  | Ammoniummolybdat    | 3,8 g          |
|   |  | Schwefelsäure 2N    | 100 ml         |

## 2.1.7 Stabilitäts- und Reinheitsuntersuchungen von Substanz 8

### 2.1.7.1 <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie

In ein NMR Röhrchen (507-HP-8) wurden am 06. März 2013 (t = 0 Tage) 0,5 ml einer Lösung von Substanz **8** (c = 10 mg/ml) eingefüllt und bis zum 11. März 2013 (t = 5 Tage) bei Raumtemperatur direkter Sonneneinstrahlung und normaler Zimmerbeleuchtung ausgesetzt. Zum Zeitpunkt t = 0 und t = 5 wurde jeweils ein <sup>1</sup>H-NMR Spektrum bei 295 K am Bruker avo 400 (400,13 MHz) aufgenommen und mit Topspin® ausgewertet. Die Stabilität der Verbindung konnte durch den direkten Vergleich entsprechender Signale im Protonenspektrum ermittelt werden.

### 2.1.7.2 Analytische HPLC

Die Reinheitsbestimmung von Substanz **8** wurde an der analytischen HPLC-Anlage durchgeführt. Dabei kam folgende Säule (R1) der Firma Merck, Darmstadt zum Einsatz: Hibar® 250-4 Purospher Star RP-18e (5 µm). Die Bedingungen sind in **Tabelle 16** wiedergegeben. Die Substanz wurde in einem Gemisch aus 0,1%-iger Ameisensäure (FA) und 95%igem Acetonitril (40 : 60), was den Anfangsbedingungen des Gradienten entsprach, gelöst und durch einen 0,25 µm Spritzenvorsatzfilter der Firma Wicom, Heppenheim filtriert. Die Konzentration lag bei 50 µM. Das Injektionsvolumen betrug 50 µl.

**Tabelle 16:** HPLC-Bedingungen für die Reinheitsbestimmung

| Säule     | Säulenofen<br>[°C] | FM                 | Gradient<br>[%]     | Zeit<br>[min] | Fluss<br>[ml/min] |
|-----------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------|-------------------|
| <b>R1</b> | 20                 | FA 0,1% - MeCN 95% | 60 → 100 (MeCN 95%) | 0-30          | 1                 |

Die Detektion erfolgte bei 290 nm. Die chromatographische Reinheit wurde mit der Software EZChromElite® nach dem Verfahren der Normalisierung bestimmt und in Prozent angegeben.

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Geräte und Software

Bei den zellbiologischen Arbeiten kamen folgende Geräte und Software (**Tabelle 17**), Chemikalien, Pufferlösungen und Lösemittel (**Tabelle 18**, S. 43), sowie diverse Verbrauchsmaterialien (**Tabelle 19**, S. 44) zum Einsatz.

**Tabelle 17:** Geräte für die zellbiologischen Arbeiten

|   | <b>Modellbezeichnung</b>                     | <b>Hersteller</b>                         |
|---|--|---|
| <b>Autoklaven</b>                                       | Autoklav 23                                  | Melag, Berlin                             |
|   | Varioklav 500                                | H+P, Oberschleißheim                      |
| <b>Hämozytometer</b>                                    | Neubauer improved                            | Brand, Wertheim                           |
| <b>Inkubator</b>  | NU-5500 E                                    | NUAIRE, Plymouth (USA)                    |
| <b>Mikroskope</b>                                       | Axio Observer<br>AxioVision 4.8.1 (Software) | Zeiss, Göttingen                          |
|   | CK X 41 SF                                   | Olympus, Hamburg                          |
|   | PrimoVert                                    | Zeiss, Göttingen                          |
| <b>Pipetten</b>   | 2,5 Reference (0,1-2,5 µl)                   | Eppendorf, Hamburg                        |
|   | 10 Reference (2,5-10 µl)                     |   |
|   | 100 Research (10-100 µl)                     |   |
|   | 1000 Research (100-1000 µl)                  |   |
|   | 100 Research, 12-Kanal (10-100 µl)           |   |
| <b>Plattenlesegerät</b>                                 | Spectra FluorPlus                            | Tecan, Crailsheim                         |
|   | Xfluor4 V 4.40 (Software)                    |   |
| <b>Reinstwasseranlage</b>                               | Astacus LS                                   | MembraPure, Bodenheim                     |
| <b>Sicherheitswerkbänke</b>                             | HERASafeKS                                   | Thermo, Langenselbold                     |
| <b>Software zur Erhebung<br/>biostatistischer Daten</b> | GraphPad Prism 4.02                          | GraphPad Software Inc.,<br>La Jolla (USA) |
|   | Microsoft Office Excel 2007                  | Microsoft Corporation,<br>Redmond (USA)   |
| <b>Software zur<br/>Bildbearbeitung</b>                 | Picasa 3.9.0                                 | Google Inc., Mt. View (USA)               |
| <b>Wasserbad</b>  | WB 22  | Memmert, Schwabach                        |
| <b>Zentrifuge</b>                                       | Megafuge 1.0                                 | Heraeus Sepatech, Osterode                |

## 2.2.2 Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 18:** Chemikalien, Pufferlösungen und Lösemittel

|                        | Spezifizierung / Qualität   | Hersteller                  |
|------------------------|---|-----------------------------|
| <b>ECGM</b>            | Endothelzellen-Wachstumsmedium mit 2% FCS   | Provitro GmbH, Berlin       |
| <b>Antibiotics</b>     | 50,00 ng/ml Amphotericin B<br>50,00 µg/ml Gentamicin  |                             |
| <b>Supplement mix</b>  | 0,4% ECGS/H (endothelial cell growth supplement/Heparin)<br>0,10 ng/ml EGF (epidermal growth factor)<br>1,00 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor)<br>1,00 µg/ml Hydrocortisone |                             |
| <b>Collagen G</b>      | 0,4%ige Collagenlösung in HCl, Typ I  | Biochrom, Berlin            |
| <b>DMSO</b>            | Dimethylsulfoxid, p.a.  | Sigma-Aldrich, Taufkirchen  |
| <b>FCS</b>             | Fötales Kälberserum, Superior   | Biochrom, Berlin            |
| <b>Kristallviolett</b> | Tris(4-dimethylaminophenyl)methylum-chlorid; Syn. Methylrosaniliniumchlorid (INN)   | Merck, Darmstadt            |
| <b>M199</b>            | Medium 199  | PAN GmbH, Aidenbach         |
| <b>Matrigel™</b>       | Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced Phenol Red Free  | BD Biosciences, Heidelberg  |
| <b>MTT</b>             | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid, ~98%   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen  |
| <b>Na-Citrat</b>       | Tri-Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O, p.a.  | Merck, Darmstadt            |
| <b>PBS</b>             | Dulbeccos phosphate buffered saline   | Biochrom, Berlin            |
| <b>Phloroglucinol</b>  | 1,3,5-Trihydroxybenzol, p.a.  | Merck, Darmstadt            |
| <b>SDS</b>             | Natriumdodecylsulfat, 92,5 – 100,5%   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen  |
| <b>Trypanblau</b>      | 3,3'-Dimethyl-4,4'-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-disulfonaphthyl-3-azo)-[1,1'-biphenyl], dye content ~37%   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen  |
| <b>Xanthohumol</b>     | 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3'prenylchalkon, 98%   | Nookandeh Institut, Hamburg |

**Tabelle 19:** Verbrauchsmaterialien

|                              | <b>Abmessungen</b>                                    | <b>Hersteller</b>      |
|------------------------------|---|------------------------|
| <b>μ-slides (ibiTreat)</b>   | 15 wells, Ø 4 mm (inner well),<br>Ø 5 mm (upper well) | Ibidi, Martinsried     |
| <b>Falcon tubes</b>          | 10 ml, 50 ml  | Greiner, Frickenhausen |
| <b>Kryoröhrchen</b>          | 2 ml  | Greiner, Frickenhausen |
| <b>Kulturflaschen</b>        | 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup>              | Greiner, Frickenhausen |
| <b>Pasteur-Pipetten Glas</b> | 150 mm, 230 mm  | VWR, Darmstadt         |
| <b>Pipettenspitzen</b>       | 0,5-10 μl   | Abimed, Langenfeld     |
|                              | 100 μl, 1000 μl                                       | Sarstedt, Nümbrecht    |
| <b>Reaktionsgefäße</b>       | 1,5 ml  | Eppendorf, Hamburg     |
| <b>Serologische Pipetten</b> | 5 ml, 10 ml, 25 ml                                    | Greiner, Frickenhausen |
| <b>Testplatten</b>           | 24-well, 96-well                                      | TPP, Trasadingen (CH)  |

### 2.2.3 Kulturmedien und sonstige Lösungen

Zur Kultivierung und Lagerung der Zellen wurden verschiedene Kulturmedien (**Tabelle 20**) verwendet, wobei die Hitzeinaktivierung des FCS durch 30-minütiges Erhitzen bei 56 °C im Wasserbad erfolgte. Anschließend wurde das FCS auf Raumtemperatur abgekühlt, zu 50 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 20:** Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien

|                                | <b>Bestandteile</b>   | <b>Menge</b> |
|--------------------------------|-----------------------|--------------|
| <b>Kulturmedium für HMEC-1</b> | ECGM                  | 500 ml       |
|                                | Supplement mix        | 23,5 ml      |
|                                | Antibiotics           | 3,5 ml       |
|                                | FCS, hitzeinaktiviert | 50 ml        |
| <b>Abstopp-Medium</b>          | M199                  | 500 ml       |
|                                | FCS, hitzeinaktiviert | 50 ml        |
| <b>Wegfriermedium</b>          | ECGM                  | 4,2 ml       |
|                                | DMSO                  | 0,8 ml       |
|                                | FCS, hitzeinaktiviert | 5 ml         |

Bei der Kultivierung, dem Zählen und Färben der Zellen kamen die in **Tabelle 21** aufgeführten Lösungen zum Einsatz.

**Tabelle 21:** Sonstige Lösungen

|                                      | Zusammensetzung                                |
|--------------------------------------|--|
| <b>Kollagen-Lösung</b>               | 0,25% (V/V) Collagen G in PBS                  |
| <b>Trypsin/EDTA-Lösung, verdünnt</b> | 10% (V/V) Trypsin/EDTA-Lösung in PBS           |
| <b>Trypanblau-Lösung</b>             | 0,4% (m/V) Trypanblau in PBS, sterilfiltriert  |
| <b>MTT-Reagenz</b>                   | 4 mg/ml MTT in PBS, sterilfiltriert            |
| <b>SDS-Lösung</b>                    | 10% (m/V) SDS in Reinstwasser, sterilfiltriert |
| <b>Kristallviolett-Lösung</b>        | 0,5% (m/V) in MeOH (20%)                       |
| <b>Na-Citrat-Lösung</b>              | 0,05 M Natriumcitrat in EtOH (50%)             |

## 2.2.4 Zellen

Es wurden ausschließlich humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) verwendet, welche von Dr. E. Ades und F. J. Candel des CDC (USA) und Dr. T. Lawley von der Emory University (USA) dankenswerter Weise bereit gestellt wurden. Hierbei handelt es sich um eine adhärent wachsende SV-40T transfizierte Zelllinie (Ades et al. 1992).

## 2.2.5 Allgemeine Verfahren

Prinzipiell wurden alle Kulturflaschen und Testplatten vor dem Aussäen der Zellen mit Kollagen-Lösung für 20 min im Inkubator bei 95% Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre gecoatet und anschließend die Lösung mit einer Pasteurpipette abgesaugt.

Alle Medien und sonstigen Lösungen die mit Zellen in Kontakt kamen, wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

Um eine optimale Beschichtung und somit richtiges Anwachsen der Zellen zu gewährleisten wurden verschiedene Volumina der Kollagen-Lösung (**Tabelle 22**, S. 46) verwendet.

**Tabelle 22:** Kollagen-Beschichtung der Flaschen und Platten (Oberfläche in cm<sup>2</sup>)

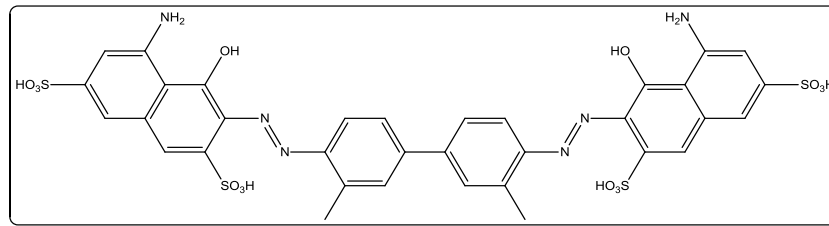
|                          | Kollagen-Lösung [ml] |
|--------------------------|----------------------|
| Kulturflasche (75)       | 15,0                 |
| Kulturflasche (150)      | 30,0                 |
| 24-well-Platten (ca. 50) | 0,5                  |
| 96-well-Platten (ca. 50) | 0,2                  |

### 2.2.5.1 Subkultivierung der Zellen (Passagieren)

Um die konfluenten Zellen zu passagieren, wurde zunächst das Kulturmedium für HMEC-1 mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen für 5 min im Brutschrank mit 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Das EDTA bindet Calcium, was zu einer Aufweichung von Zellheftungs- und Zellstrukturen führt. Das Trypsin treibt durch seine proteolytische Aktivität die Ablösung der Zellen von der Platte voran (Boxberger 2007). Anschließend wurde die Reaktion mit dem Abstopp-Medium und des darin enthaltenen FCS unterbrochen. Die Zellsuspension wurde in Falcon-tubes überführt und bei 1000 U/min für 5 min bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml Kulturmedium für HMEC-1 resuspendiert. Ein Aliquot wurde in eine Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) überführt und mit 20 ml frischem Medium (ECGM) aufgefüllt. Für die verschiedenen Assays wurden nur Endothelzellen verwendet, die maximal 15 Passagen durchlaufen haben.

### 2.2.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach dem Resuspendieren des Zellpellets in Kulturmedium für HMEC-1. 50 µl Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau-Lösung gemischt und davon 10 µl in die Neubauer-Zählkammer eingefüllt. Der anionische Farbstoff (**Abbildung 18**, S. 47) bindet an zytosolische Proteine, wodurch tote Zellen blau erscheinen. Die überlebenden Zellen zeichnen sich mit weißer Farbe vor dem blauen Hintergrund ab.



**Abbildung 18:** Trypanblau

Die Zellzahl wurde nach Boxberger (2007) ermittelt: Die Neubauer-Kammer besteht aus neun Großquadraten, von denen die vier Eckquadrate in je 16 Gruppenquadraten unterteilt sind. Aus der Summe der Zellen in jedem Eckquadrat wird der Mittelwert gebildet und entsprechend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Angabe der Zellzahl erfolgte in Zellen pro ml.

**Formel 6: Berechnung der Zellzahl pro ml**

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{Zellen der vier Großquadrate}}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

**2.2.5.3 Kryokonservierung der Zellen**

Um Zellen zu lagern, wurden sie in einer Kulturflasche (150 cm<sup>2</sup>) bis zur Konfluenz bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert, anschließend wie beim Passagieren mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und in 6 ml Wegfriermedium resuspendiert. Um eine optimale Abkühlrate von 1 °C pro Minute zu gewährleisten, wurden Aliquots von 1,5 ml in Kryovials zunächst über 24 Stunden in einer mit Watte gefüllten Styroporbox bei -80 °C eingefroren, um danach in flüssigem Stickstoff gelagert zu werden (Boxberger 2007).

Um Zellen aufzutauen, wurden die Kryovials bei Raumtemperatur angetaut und mit 37 °C warmem Kulturmedium für HMEC-1 portionsweise in ein Falcon-Tube überführt. Um das im Wegfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen, wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und anschließend in einer Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgesät.

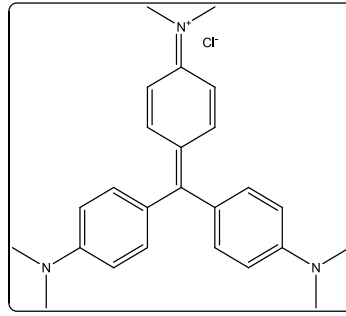
**2.2.5.4 Herstellung der Stammlösungen**

Prinzipiell wurden die zu untersuchenden Substanzen in DMSO gelöst. Die Aliquotierung in 1,5 ml Reaktionsgefäße erfolgte so, dass das Volumen eines jeden Aliquots 2,4 µl betrug. Die Konzentrationen der einzelnen Stammlösungen betragen entweder 50 mM oder 100 mM.

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Nach dem Auftauen wurde Kulturmedium für HMEC-1 ad 1,2 ml zugegeben und die Stammlösungen in diesem ersten Schritt somit 1:500 verdünnt. Bei den Assays wurden die Untersuchungslösungen dann in doppelter Endkonzentration zu den Zellen gegeben, so dass eine Verdünnung von 1:1000 aus der Stammlösung resultierte und damit auch die DMSO-Konzentration nie mehr als 0,1% betrug. Für alle weiteren Verdünnungsschritte wurde das Kulturmedium für HMEC-1 verwendet.

### 2.2.6 Proliferations-Assay

Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei konstanter Luftfeuchtigkeit (95%) inkubiert. Die Endothelzellen wurden in 96-well Platten (100 µl, 1,5 x 10<sup>3</sup> Zellen/well) in Kulturmedium für HMEC-1 ausgesät. In die wells am Rand der Platte wurde nur PBS-Puffer bzw. M199 gegeben. Nach 24 Stunden, also der Zeit, in der die Zellen adhäsiv anwachsen, wurde das Medium einer Referenz-Platte abgesaugt und die Zellen mit Kristallviolettlösung für 10 Minuten gefärbt und anschließend mit Reinstwasser gewaschen. Der basische Farbstoff (**Abbildung 19**, S. 49) färbt die DNA-Abschnitte, welche nicht mit Histonen assoziiert sind. Dies lieferte einen Basislinienwert (Proliferation = 0%), ab dem die Proliferation betrachtet wurde. Die Zellen in den anderen Platten wurden mit steigenden Konzentrationen der zu testenden Verbindungen versetzt. Nach einer Inkubation von 72 Stunden bei 37 °C (5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) wurden die Zellen wie bereits beschrieben angefärbt. Nach dem Trocknen aller Platten wurden 100 µl Citratpuffer zugegeben und die Absorption bei 540 nm am Plattenlesegerät gemessen. Als Negativ-Kontrolle wurde auf jeder 96-well Platte in zwei Reihen (= 12 wells) reines Kulturmedium für HMEC-1 inklusive 0,1% DMSO zugesetzt. Die Absorption der Negativ-Kontrolle wurde einer Proliferation von 100% gleichgesetzt (Proliferation = 100%). Die proliferations-hemmenden Effekte der getesteten Verbindungen wurden auf die Negativ-Kontrolle bezogen und in Prozent angegeben. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit GraphPadPrism® mittels der Funktion „nonlinear regression (curve fit), sigmoidal dose-response (variable slope)“ berechnet (n = 3, jede Konzentration in Hexaplikaten). Aus den Werten der drei voneinander unabhängigen Experimente mit unterschiedlichen Zell-Passagen wurde der Mittelwert samt Standardabweichung per Microsoft® Excel berechnet. Als Referenz wurde das prenylierte Chalkon Xanthohumol (XAN) in verschiedenen Konzentrationen verwendet.



**Abbildung 19:** Kristallviolett (= Gentianaviolett)

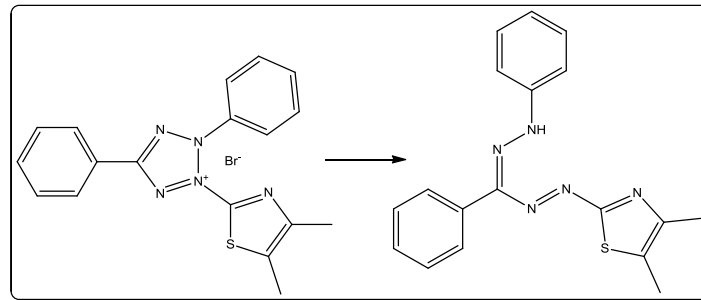
### 2.2.7 Migrations-Assay

Der Assay wurde in Anlehnung an das Protokoll von Koltermann (2008) durchgeführt. Die Endothelzellen wurden in 24-well Platten ausgesät und bis zur Konfluenz bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dann wurde der Zellrasen in einer geraden Linie quer durch jedes well mit einer 100 µl Pipettenspitze verwundet. Für jedes well wurde eine neue Spitze benutzt, um saubere „Wundränder“ zu generieren. Die verwundeten Monolayer wurden zwei Mal mit PBS gewaschen um „Zellschrott“ zu entfernen. Sofort wurden die Zellen wieder mit Kulturmedium für HMEC-1 versorgt bzw. mit M199 (= Positiv-Kontrolle) überschichtet. Entweder blieben die Zellen unbehandelt (= Negativ-Kontrolle) oder sie wurden mit den zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen über 19 Stunden inkubiert. Die Aufnahmen wurden nach dieser Zeit mit dem AxioObserver gemacht. Die Hemmung der Migration der Endothelzellen in den freien Spalt konnte für die verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Substanz im direkten Vergleich mit den beiden Kontrollen abgeleitet werden. Abgebildet wurde jeweils ein Bild (n = 1, jede Konzentration in Triplikaten).

### 2.2.8 MTT-Assay

Die Zellen wurden in 96-well Platten (100 µl, 9 x 10<sup>4</sup> Zellen/well) ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht im Inkubator bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit konfluent gewachsen waren, wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen für 24 Stunden stimuliert. Nach dieser Zeit wurde das Medium mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und pro well 100 µl einer frisch zubereiteten 10%igen

(V/V) Lösung des MTT-Reagenzes in Kulturmedium für HMEC-1 auf die Zellen gegeben. Nach drei Stunden im Inkubator wurde die Lösung wieder abgesaugt und 100 µl der SDS-Lösung zupipettiert. Nun wurden die Platten für weitere 24 Stunden unter Lichtausschluss aufbewahrt (Zeit, in der sich die gebildeten blauen Formazankristalle lösen), bevor die Absorption bei 560 nm am Plattenlesegerät gemessen wurde. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, welche nur mit Kulturmedium für HMEC-1 (inklusive 1% DMSO Endkonzentration/well) inkubiert wurden. Die gemessene Absorption der behandelten Zellen wurde prozentual auf die Absorptionswerte der unbehandelten Zellen bezogen und in Prozent Viabilität angegeben (n = 3, jede Konzentration in Hexaplikaten). Anhand der Intensität der Blaufärbung lässt sich die Aktivität der mitochondrialen Reduktase ableiten (**Abbildung 20**).

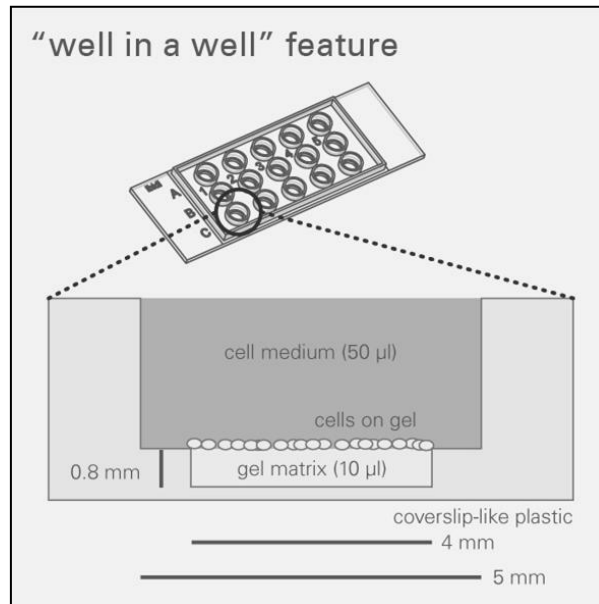


**Abbildung 20:** Reduktion des zugesetzten MTT durch die mitochondriale Reduktase.

### 2.2.9 Tube-formation-Assay

HMEC-1 vermögen auf Matrigel<sup>TM</sup>, einer extrazellulären Matrix, welche aus murinem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom gewonnen wurde, kapillarähnliche Strukturen (tubes) auszubilden. Die µ-slides der Firma ibidi, Feldkirchen verfügen über ein „well in a well“ System, das heißt, dass es in jedem well eine zusätzliche Vertiefung gibt (**Abbildung 21**, S. 51). Zunächst wurden in die untere Vertiefung 10 µl von dem Matrigel<sup>TM</sup>, welches vorher für zwei Stunden im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut wurde, mit vorgekühlten Pipetten eingefüllt und für 30 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Nachdem die Extrazelluläre Matrix (EZM) vollständig polymerisiert war, wurden die Zellen in Kulturmedium für HMEC-1 zugegeben (25 µl,  $1 \times 10^4$  Zellen). Zur Zellsuspension wurden entweder weitere 25 µl Lösungsmittelkontrolle (= Kulturmedium für HMEC-1 inklusive 0,1% DMSO) oder 25 µl der zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Nach 16 Stunden Inkubationszeit

bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit wurden Aufnahmen mit dem PrimoVert gemacht und mit AxioVision® ausgewertet. Gemessen wurde die Gesamt-tube-Länge sowohl der behandelten als auch unbehandelten Zellen und in Pixel ausgedrückt und anschließend mit Microsoft® Excel in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration graphisch dargestellt. Abgebildet wurde ein Bild aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3).



**Abbildung 21:** µ-slide der Firma Ibidi in Seitenansicht. Die Abbildung ist zu finden unter : [http://ibidi.com/fileadmin/about\\_ibidi/press\\_releases/ibidi\\_pr\\_0408.jpg](http://ibidi.com/fileadmin/about_ibidi/press_releases/ibidi_pr_0408.jpg)

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Phytochemische Untersuchungen

#### 3.1.1 Isolierungsstrategie

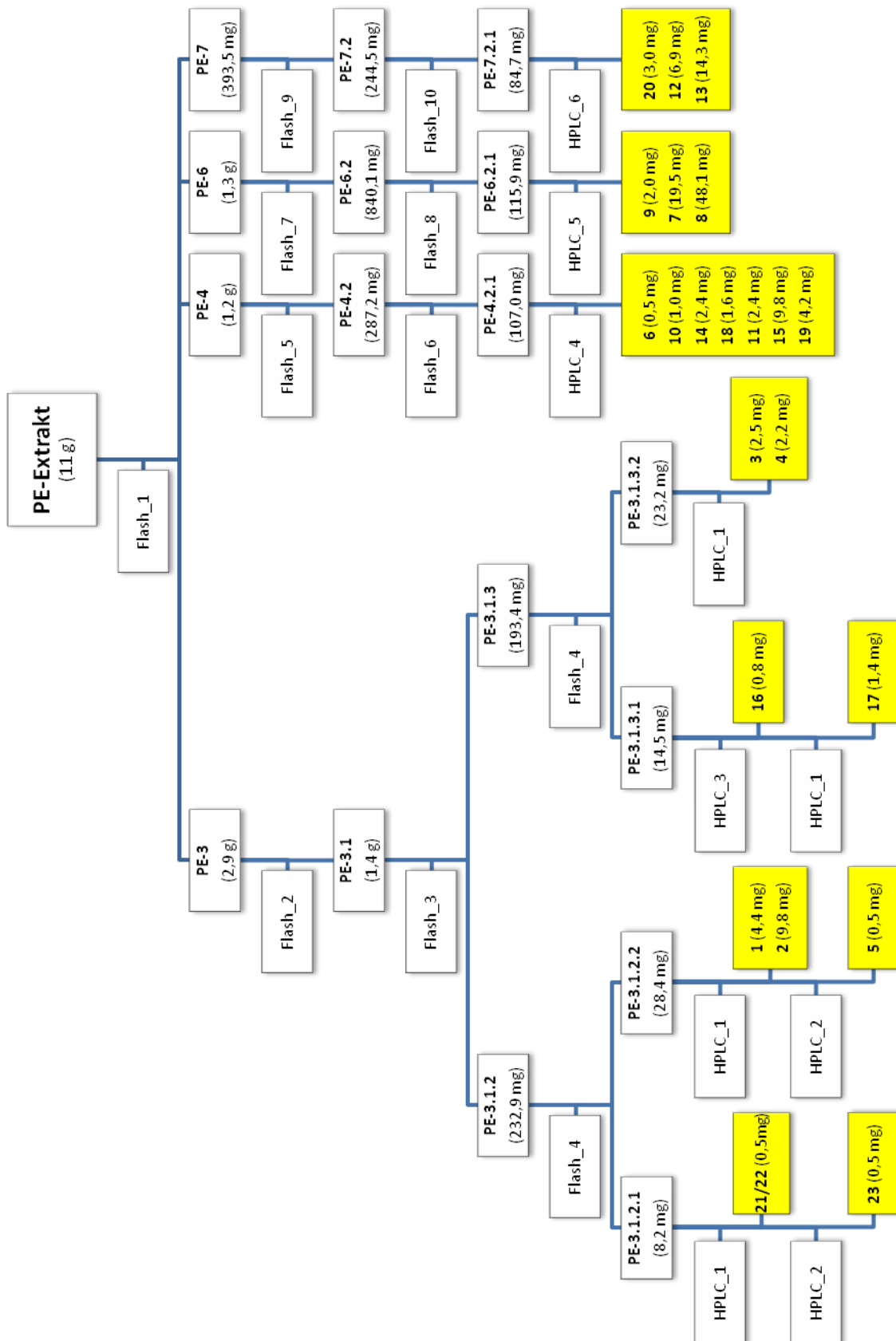
Das Inhaltsstoffspektrum der Gattung *Hypericum* umfasst überwiegend phenolische Inhaltsstoffe. Dazu zählen neben den Naphthodianthronen (Hypericine), Flavonoiden und Biflavonoiden, Procyanidinen, Xanthonen und Kaffeesäurederivaten auch die Phloroglucinderivate (Hyperforine, Schütt und Schulz 2007).

Oft ist die Isolierung von Naturstoffen „dünnschichtchromatographisch-geleitet“, weil die DC eine einfache und leicht durchführbare Methode darstellt. So konnten die Verbindungen **1-5** aufgrund ihrer durch das aromatische Ringsystem bedingten Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und einer ebenfalls beim Hyperforin zu beobachtenden dunkelblauen Eigenfluoreszenz bei 365 nm (Kaul 2000) isoliert werden. Die DC wurde darüber hinaus als Möglichkeit zur Fraktionskontrolle genutzt und nach jedem Fraktionierungsschritt „Übersichts-DCs“ angefertigt.

Alle weiteren Verbindungen mit Ausnahme von Substanz **6** wurden unter anderem mittels ihrer Tieffeld-verschobenen Protonensignale ( $\delta_{\text{H}} > 11$  ppm) im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum als gelbe Öle „NMR-geleitet“ isoliert. Das entsprechende Isolierungsschema der insgesamt 23 Verbindungen ist in **Abbildung 22**, S. 53 zu sehen.

Eine weitere, häufiger angewendete Methode bei der Isolierung von Naturstoffen stellt die „bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung“ dar, bei der alle Fraktionen auf ihre potentielle biologische Aktivität hin untersucht werden, um schlussendlich eine aktive Verbindung in den Händen zu halten.

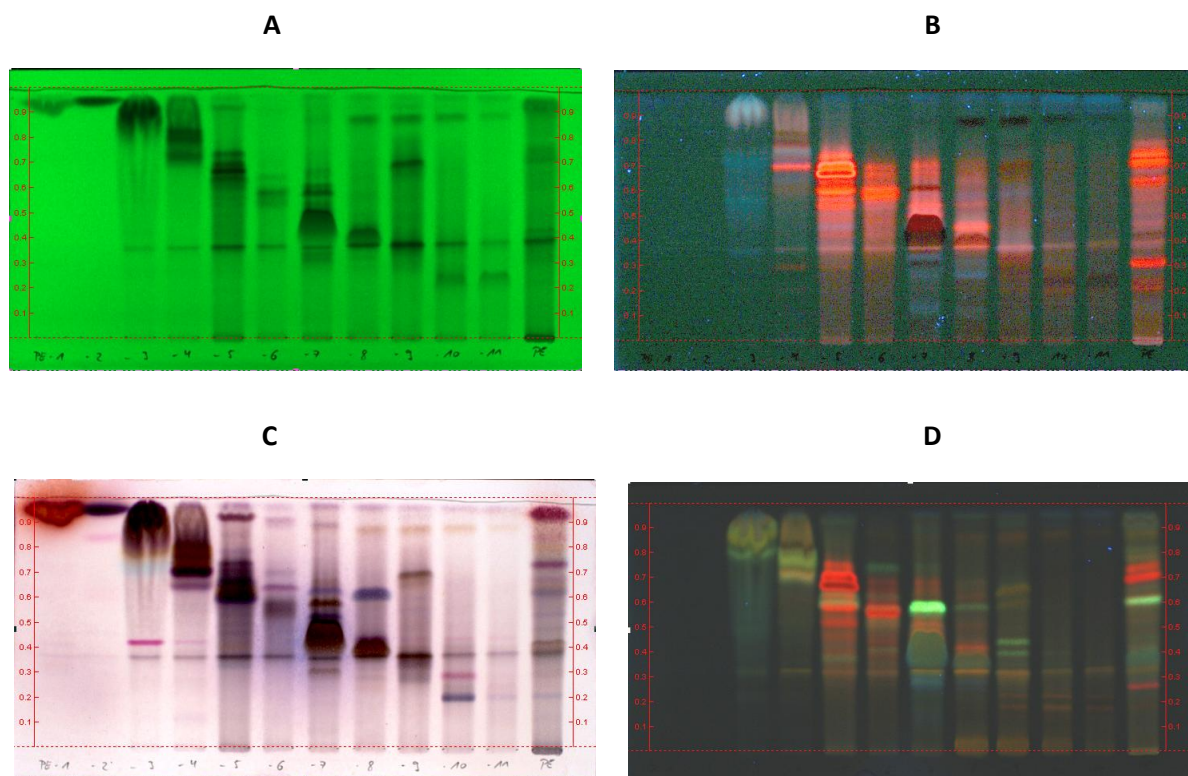
In der vorliegenden Arbeit kam diese Vorgehensweise ganz bewusst nicht zur Anwendung, da der Fokus auf der systematischen Isolierung von Acylphloroglucinolen aus *Hypericum empetrifolium* lag und dann erst die Reinsubstanzen auf mögliche anti-angiogene Eigenschaften getestet werden sollten.



**Abbildung 22:** Isolierungsschema der Fraktionierungsschritte (Flash\_1 bis 10) und Aufreinigungsschritte (HPLC\_1 bis 6) des PE-Extraktes aus 922 g luftgetrockneten oberirdischen Teilen von *H. empetrifolium*.

### 3.1.2 Fraktionierung des PE-Extraktes und Isolierung

Der Spissum-Extrakt (11 g) aus *Hypericum empetrifolium* wurde mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel unter Verwendung eines linearen Gradienten von Hexan-EtOAc (Flash\_1) als mobile Phase fraktioniert. Für die Fließmittelfindung wurden zunächst DC-Vorversuche mit Kieselgel als stationärer Phase durchgeführt. Es wurden 113 Reagenzgläser mit einem Volumen von je 20 ml erhalten, welche aufgrund von Gemeinsamkeiten per DC zu elf Fraktionen (PE-1 bis -11) zusammengefasst wurden. Die Chromatogramme wurden underivatisiert bei 254 nm und 365 nm bzw. bei Tageslicht und 365 nm nach Derivatisierung mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und dem Naturstoff-Reagenz ausgewertet (**Abbildung 23**).



**Abbildung 23:** Übersicht-DCs von PE-1 bis PE-11 (Bahn 1 bis 11) und dem PE-Gesamtextrakt (Bahn 12) underivatisiert bei **A**) 254 nm und **B**) 365 nm bzw. nach Derivatisierung mit **C**) AS (vis) und **D**) NSR (365 nm); SiGel, FM 4

Die Fraktionen PE-1 (Bahn 1) und PE-2 (Bahn 2) mit besonders lipophilen Substanzen können unter den gegebenen Bedingungen nicht chromatographiert werden und laufen mit der Fließmittelfront. Ab Fraktion PE-3 (Bahn 3) sind die Fraktionen in mehr oder weniger gut zu unterscheidende Zonen aufgetrennt worden. Bei 254 nm sind auf jeder der Bahnen fluoreszenz-löschende Banden vorhanden. Auffallend rot fluoreszierende Banden bei 365

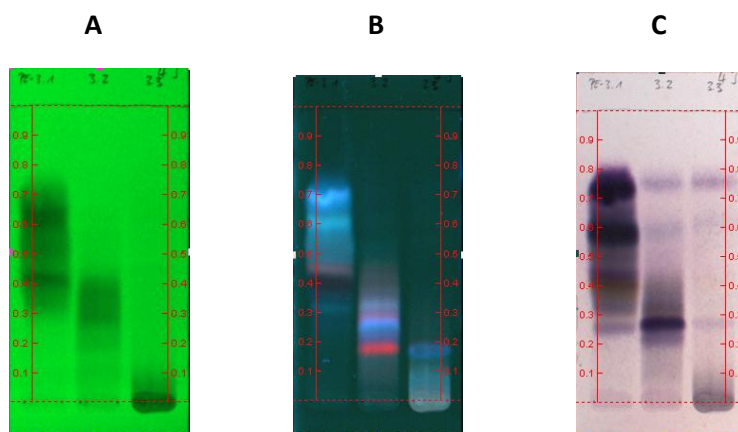
nm im  $R_F$ -Bereich zwischen 0,5 und 0,8 sind in den beiden Fraktionen PE-5 und PE-6 (Bahn 5 und Bahn 6) zu sehen, welche aufgrund der grünen Eigenfarbe der Fraktionen auf Chlorophylle hindeuten.

In Fraktion PE-7 (Bahn 7) ist nach der Detektion mit dem Naturstoffreagenz (NSR) bei 365 nm eine hellgrün-fluoreszierende Bande bei  $R_F = 0,60$  und eine breite dunkelgrün-fluoreszierende Zone im  $R_F$ -Bereich von 0,35 bis 0,45 zu sehen, welche möglicherweise auf die Anwesenheit von Flavonoiden zurück zu führen ist (Wagner et al. 1983). Ansonsten sind bei 365 nm auf der underivatisierten DC-Platte bei  $R_F = 0,90$  schwarz-blaue Zonen vorhanden, die sich in den Fraktionen PE-8 bis PE-11 (Bahn 8 bis 11) wiederfinden.

Da die Chromatogramme des ersten Fraktionierungsschrittes keinen eindeutigen Hinweis auf die Anwesenheit von Acylphloroglucinolen ergaben, wurde für den zweiten Fraktionierungsschritt zunächst auf die Eigenfarbe der Fraktionen PE-1 bis PE-11 geachtet. Hierbei fiel besonders PE-3 durch seine gelbe Farbe auf. Neben Flavonoiden und den Xanthonen, welche als gelb gefärbte phenolische Verbindungen ein auffallendes chemisches Merkmal für die Gattung *Hypericum* darstellen (Frohne und Jensen 1998), werden Acylphloroglucinole häufig als gelbe Öle isoliert (Winkelmann et al. 2000, Winkelmann et al. 2001a, Winkelmann et al. 2001b).

### 3.1.2.1 Fraktionierung von PE-3

Die Fraktion PE-3 (2,9 g, 380-580 ml) wurde, wie schon der Gesamt-PE-Extrakt auch, per Flash-Chromatographie an Kieselgel (Flash\_1) aufgetrennt. Die einzelnen Reagenzgläser wurden per DC mit Fokus auf dunkelblaue Banden bei 365 nm hin entsprechend gepoolt, so dass drei Subfraktionen (PE-3.1 bis -3.3) erhalten wurden. Das Übersichts-DC (**Abbildung 24**, S. 56) wurde auf Kieselgel mit dem FM 4J entwickelt und vor der Derivatisierung mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und anschließender Auswertung bei Tageslicht, bei 254 und 365 nm betrachtet.

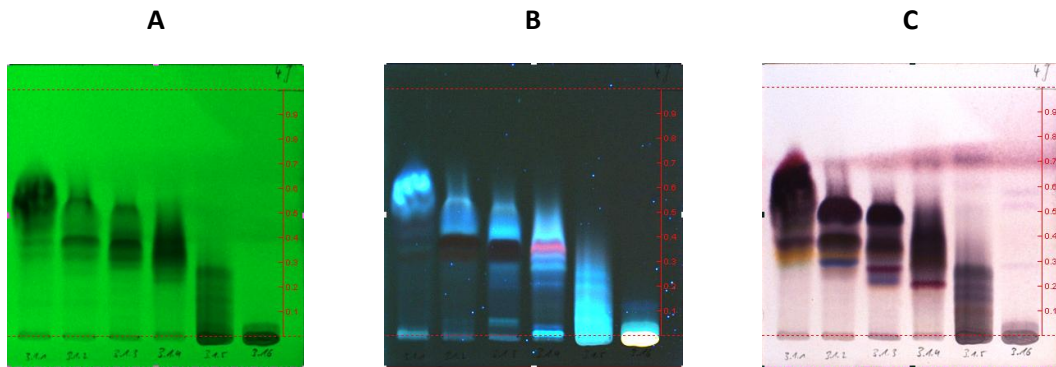


**Abbildung 24:** Übersichts-DCs von PE-3.1 bis PE-3.3 (Bahn 1 bis 3) unterivatisiert bei **A)** 254 nm **B)** 365 nm und **C)** nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 4J

Auf Bahn 1 (PE-3.1) ist bei  $R_F = 0,41$  eine Bande deutlich zu unterscheiden, welche neben einer dunkelblauen Eigenfluoreszenz (365 nm) auch fluoreszenzlöschende Eigenschaften (254 nm) besitzt und mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (vis) eine braune Zone ergibt (**Abbildung 24**). Dies war ein möglicher Hinweis darauf, dass in dieser Fraktion Acylphloroglucinole enthalten sein könnten.

### 3.1.2.2 Fraktionierung von PE-3.1

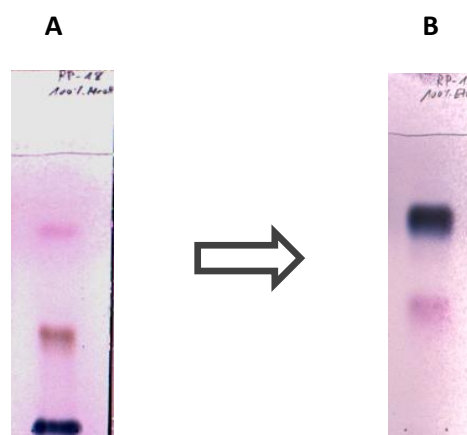
Für die Aufarbeitung von Fraktion PE-3.1 (1,4 g; 0-800 ml) wurde der Fließmittelgradient im Gegensatz zur Fraktionierung von PE-3 (Flash\_1) deutlich abgeflacht, so dass innerhalb einer Stunde nicht von 100% Hexan auf 100% EtOAc, sondern auf nur 10% EtOAc linear umgespült wurde (Flash\_3). Als Ergebnis wurden nach dem Poolen der einzelnen Reagenzgläser sechs Unterfraktionen (PE-3.1.1 bis -3.1.6) erhalten, welche auf Kieselgel mit FM 4J folgende Chromatogramme (**Abbildung 25**, S. 57) ergaben:



**Abbildung 25:** Übersicht-DCs von PE-3.1.1 bis PE-3.1.6 (Bahn 1 bis 6) unterivatisiert bei **A)** 254 nm **B)** 365 nm und **C)** nach Detektion mit AS (vis); SiGel, FM 4J

Die bei 365 nm dunkelblau-fluoreszierenden Banden ( $R_F = 0,40$ ) in PE-3.1.2 und PE-3.1.3 konnten zwar gut von den relativ lipophilen Bestandteilen der Fraktion PE-3.1.1 ( $R_F = 0,5 - 0,7$ ) abgetrennt werden. Es war aber nicht möglich, die Bande bei  $R_F = 0,50$  abzutrennen, welche nach der Detektion mit AS bei Tageslicht als dunkelblauer Fleck erscheint, vor dem Besprühen bei 254 nm aber keine Fluoreszenzlöschung zeigt.

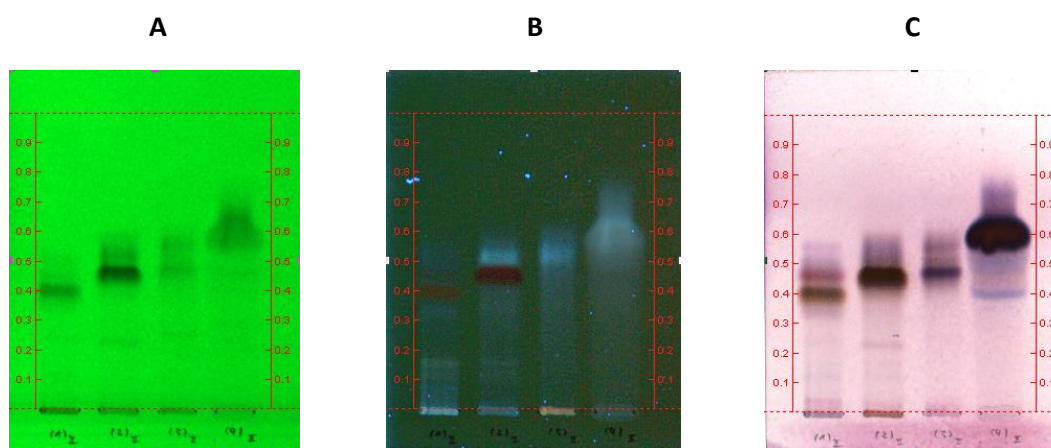
Deshalb erschien an dieser Stelle ein Wechsel der stationären Phase von Kieselgel auf RP-18 als sinnvoll, um die blaue von der braunen Bande zu trennen. In Vorversuchen mit PE-3.1.2 auf entsprechenden DC-Platten (RP-18) wurden Fließmittel verschiedener Polarität ausprobiert. Mit 100% MeOH konnte die Trennung einer rosafarbenen ( $R_F = 0,75$ ) und von einer braunen Bande ( $R_F = 0,40$ ) erreicht werden. Die blaue Bande hingegen verblieb am Start. Mit 100% EtOAc konnten alle Banden vom Start weg und somit von dem RP-Material gespült werden (**Abbildung 26**). Dies ist wichtig für die Übertragung auf Säulenmaterial.



**Abbildung 26:** Dünnschichtchromatogramme zur Fließmittelfindung auf RP-Material mit **A)** 100% MeOH und **B)** 100% EtOAc nach Derivatisierung mit AS.

### 3.1.2.2.1 Fraktionierung von PE-3.1.2

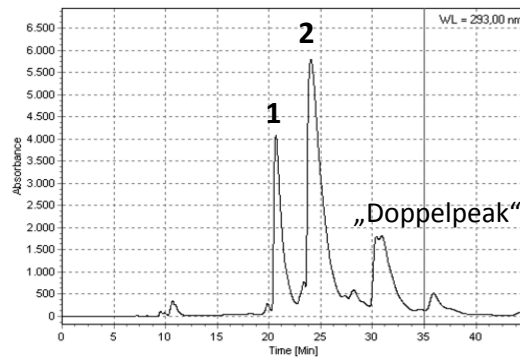
Aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen auf DC-Platten wurde eine Flash-Chromatographie an RP-18 Material mit Fraktion PE-3.1.2 (232,9 mg; 735-795 ml) durchgeführt (Flash\_4). Hierbei wurde 15 min lang mit 100% MeOH, anschließend innerhalb von 5 min auf 100% EtOAc und schließlich für weitere 10 min mit 100% EtOAc gespült. Es wurden vier Fraktionen (PE-3.1.2.1 bis -3.1.2.4) erhalten. In den Übersichts-DCs (**Abbildung 27**) ist die erfolgreiche Trennung der dunkelblauen Zone, hier bei  $R_F = 0,60$  in Fraktion PE-3.1.2.4 (Bahn 4) von der dunkelbraunen Zone bei  $R_F = 0,45$  in Fraktion PE-3.1.2.2 (Bahn 2) nach der Detektion mit AS bei Tageslicht zu sehen.



**Abbildung 27:** Übersichts-DCs von PE-3.1.2.1 bis PE-3.1.2.4 (Bahn 1 bis 4) unterderivatisiert bei **A**) 254 nm **B**) 365 nm und **C**) nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 4J

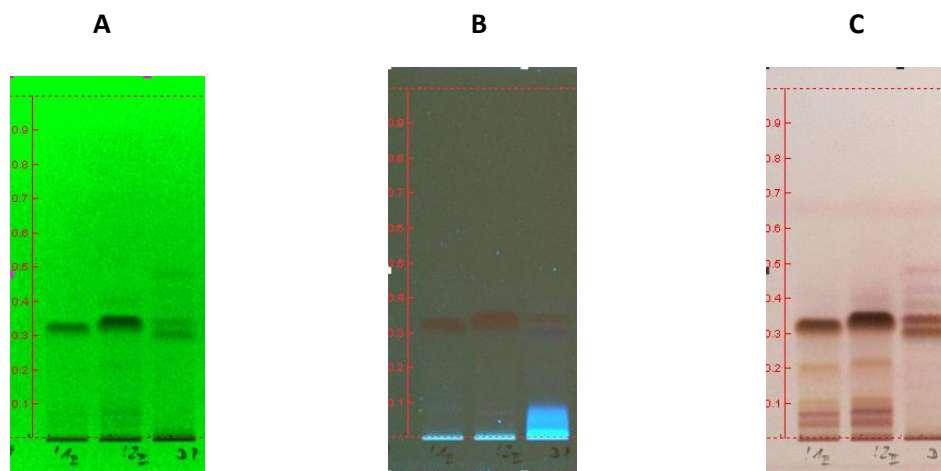
### 3.1.2.2.2 Aufreinigung von PE-3.1.2.2 per semi-präparativer HPLC

Die Aufreinigung von Fraktion PE-3.1.2.2 (28,4 mg, 75-105 ml) erfolgte per semi-präparativer HPLC an RP-Material (HPLC\_1), was die beiden Substanzen **1** (4,4 mg;  $t_R$  20,5 min) und **2** (9,8 mg;  $t_R$  24 min) ergab. Im Chromatogramm war bei einer Wellenlänge von 290 nm neben verschiedenen kleineren Peaks ein auffälliger „Doppelpeak“ ( $t_R$  30 min) zu erkennen (**Abbildung 28**, S. 59), welcher eines weiteren Aufreinigungsschrittes per HPLC bedurfte.



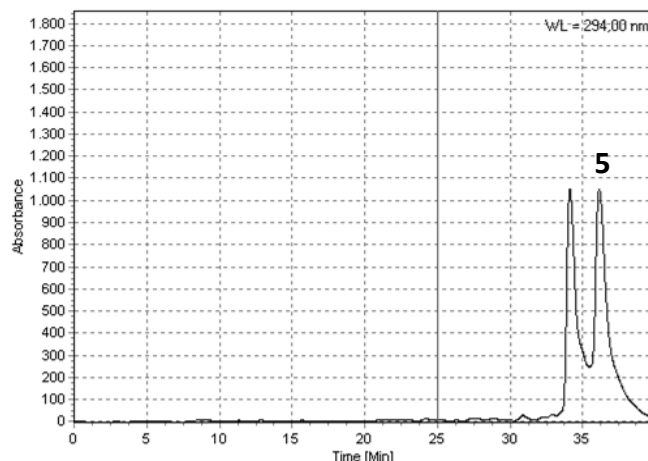
**Abbildung 28:** HPLC-Chromatogramm bei 293 nm von der Aufreinigung von PE-3.1.2.2; HPLC\_1

Im Übersichts-DC (**Abbildung 29**) ist auf Bahn 1 bei  $R_F = 0,32$  Substanz **1** und bei  $R_F = 0,34$  auf Bahn 2 Substanz **2** als braune Kondensationsprodukte mit dem Anisaldehyd zu sehen. Im unteren Drittel der Platte sind zusätzliche Banden zu sehen, was auf mögliche Abbauprodukte während der Chromatographie hindeutete. Verunreinigungen erscheinen aufgrund des nahezu identischen Bandenmusters auf beiden Bahnen unterhalb der Substanzzone als eher unwahrscheinlich.



**Abbildung 29:** Dünnschichtchromatogramme von **1** (Bahn 1), **2** (Bahn 2) und dem „Doppelpeak“ (Bahn 3) underivatisiert bei **A**) 254 nm **B**) 365 nm und **C**) nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 4J

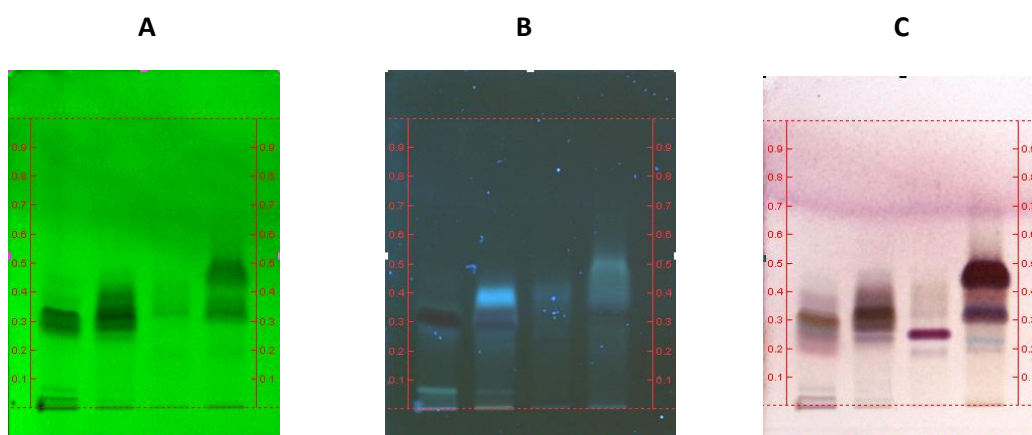
Der „Doppelpeak“ aus dem HPLC-Chromatogramm (**Abbildung 28**) auf Bahn 3, trennte sich unter den gegebenen DC-Bedingungen in zwei Banden auf ( $R_F = 0,30$  und  $0,35$ ) und konnte an einer präparativer HPLC-Säule mittels isokratischer Elution von 100% MeCN (HPLC\_2) in zwei Peaks aufgetrennt werden. Dabei handelte es sich um Substanz **5** (0,5 mg;  $t_R$  35,8 min, **Abbildung 30**, S. 60).



**Abbildung 30:** HPLC-Chromatogramm bei 294 nm von der Trennung des "Doppelpeaks"; HPLC\_2

### 3.1.2.2.3 Fraktionierung von PE-3.1.3

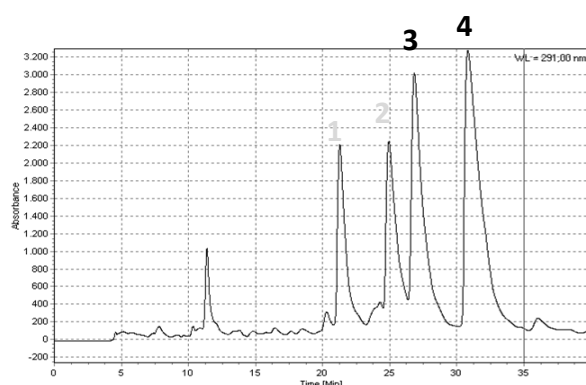
Die Fraktion PE-3.1.3 (193,4 mg; 810-915 ml) wurde wie PE-3.1.2 mittels Flash-Chromatographie (Flash\_4) an RP-Material fraktioniert, wobei vier Unterfraktionen (PE-3.1.3.1 bis -3.1.3.4) erhalten wurden. Im mit Anisaldehyd derivatisierten Dünnschichtchromatogramm (**Abbildung 31**) waren auf Bahn 1 und 2 zwischen  $R_F = 0,30$  und  $0,35$  wiederum dunkelbraune Banden zu sehen die von der dunkelblauen Bande zwischen  $R_F = 0,40$  und  $0,50$  auf Bahn 4 abgetrennt waren.



**Abbildung 31:** Übersichts-DCs von PE-3.1.3.1 bis PE-3.1.3.4 (Bahn 1 bis 4) underivatisiert bei **A**) 254 nm, **B**) 365 nm, **C**) nach Detektion mit AS (vis); SiGel, FM 4J

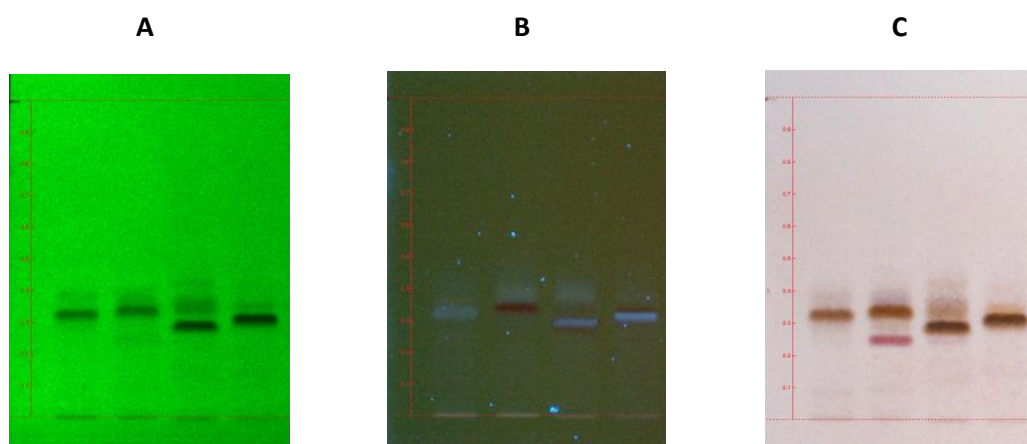
### 3.1.2.2.4 Aufreinigung von PE-3.1.3.2 per semi-präparativer HPLC

Aufgrund der höheren Ausbeute an Fraktion PE-3.1.3.2 (23,2 mg, 75-180 ml) im Vergleich zu PE-3.1.3.1 (14,5 mg) wurde diese als erstes an einer RP-Säule chromatographiert. Die Bedingungen waren die gleichen wie bei der Aufreinigung von Fraktion PE-3.1.2.2 (HPLC\_1), deshalb sind im Chromatogramm (**Abbildung 32**) neben den beiden neuen Substanzen **3** ( $t_R$  26 min) und **4** ( $t_R$  30 min) auch Substanz **1** ( $t_R$  21 min) und **2** ( $t_R$  24,5 min) bei leicht veränderten Retentionszeiten zu sehen.



**Abbildung 32:** HPLC-Chromatogramm bei 294 nm von der Aufreinigung von PE-3.1.3.2; HPLC\_1

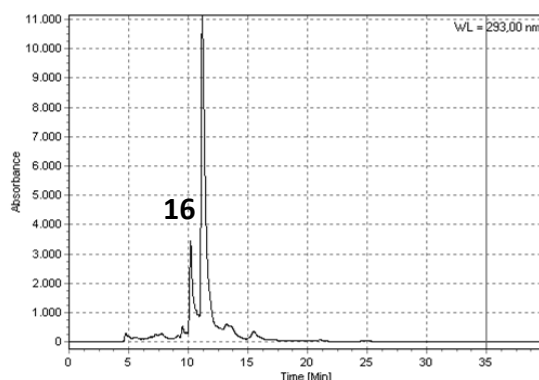
In der Übersichts-DC (**Abbildung 33**) sind Substanz **3** bei  $R_F = 0,29$  (Bahn 3) und Substanz **4** bei  $R_F = 0,31$  (Bahn 4) wiederum als fluoreszenzlöschende (254 nm), dunkelblau-fluoreszierende (365 nm) und nach Detektion mit AS braune Banden (vis) zu erkennen. Auf Bahn 1 und 2 befinden sich die beiden bereits isolierten Substanzen **1** ( $R_F = 0,32$ ) und **2** ( $R_F = 0,34$ ).



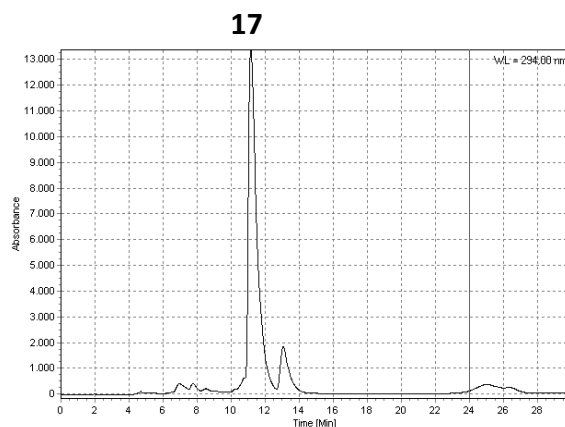
**Abbildung 33:** Übersichts-DCs von PE-3.1.3.2 nach Aufreinigung underivatisiert bei **A**) 254 nm **B**) 365 nm und **C**) nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 4J

### 3.1.2.2.5 Aufreinigung von PE-3.1.3.1 per semi-präparativer HPLC

Für die präparative Trennung von PE-3.1.3.1 (14,5 mg; 15-60 ml) per HPLC an RP-Material wurde ein linearer FM-Gradient (HPLC\_3) verwendet. Im Chromatogramm (**Abbildung 34**) waren zwei unterschiedlich große Peaks zu erkennen. Bei dem kleineren ( $t_R$  10 min) handelte es sich um Substanz **16** (0,8 mg), bei dem deutlich größeren ( $t_R$  11 min) um Substanz **17** (1,4 mg), welche aber nochmals per HPLC aufgereinigt werden musste. Dies konnte erfolgreich mit einem etwas flacheren MeOH-MeCN-Gradienten (HPLC\_1) erreicht werden (**Abbildung 35**).

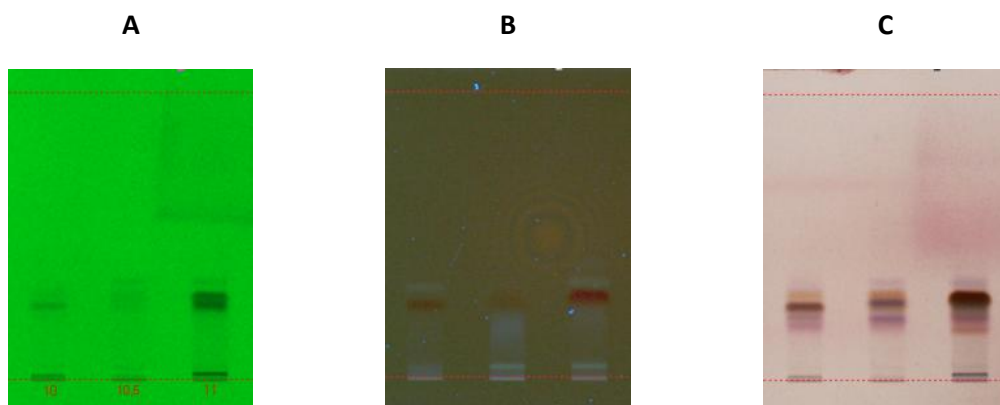


**Abbildung 34:** HPLC-Chromatogramm bei 293 nm von der Aufreinigung von PE-3.1.3.1; HPLC\_3



**Abbildung 35:** HPLC-Chromatogramm bei 294 nm von der Aufreinigung von **17** ( $t_R$  11 min); HPLC\_1

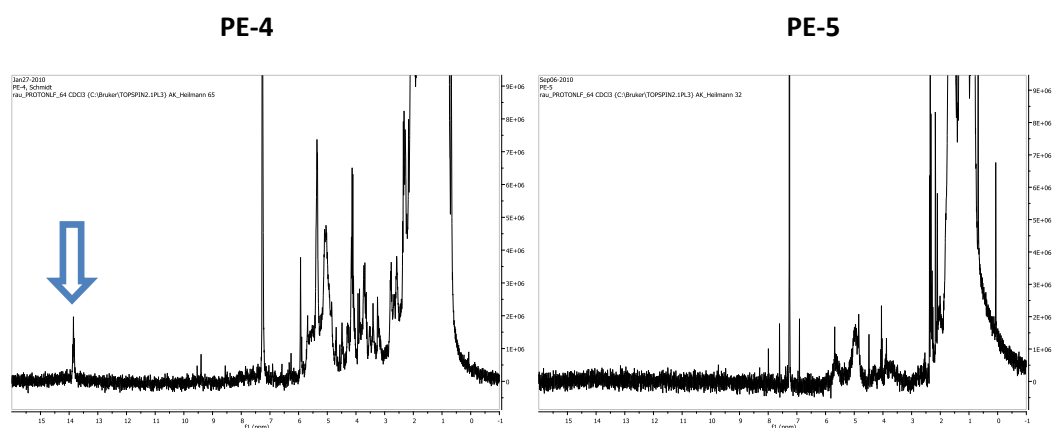
Auf der DC-Platte (**Abbildung 36**, S. 63) sind bei 365 nm auf Bahn 1 und 3 die beiden Substanzen jeweils als dunkelblau-fluoreszierende Banden bei  $R_F = 0,28$  und  $0,30$  gut sichtbar. Auf Bahn 2 wurde eine Zwischenfraktion mit aufgetragen, welche aber nicht weiter bearbeitet wurde.



**Abbildung 36:** Dünnschichtchromatogramme von **16** (Bahn 1), einer Zwischenfraktion (Bahn 2) und **17** (Bahn 3) unterivatisiert bei **A)** 254 nm **B)** 365 nm und **C)** nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 4J

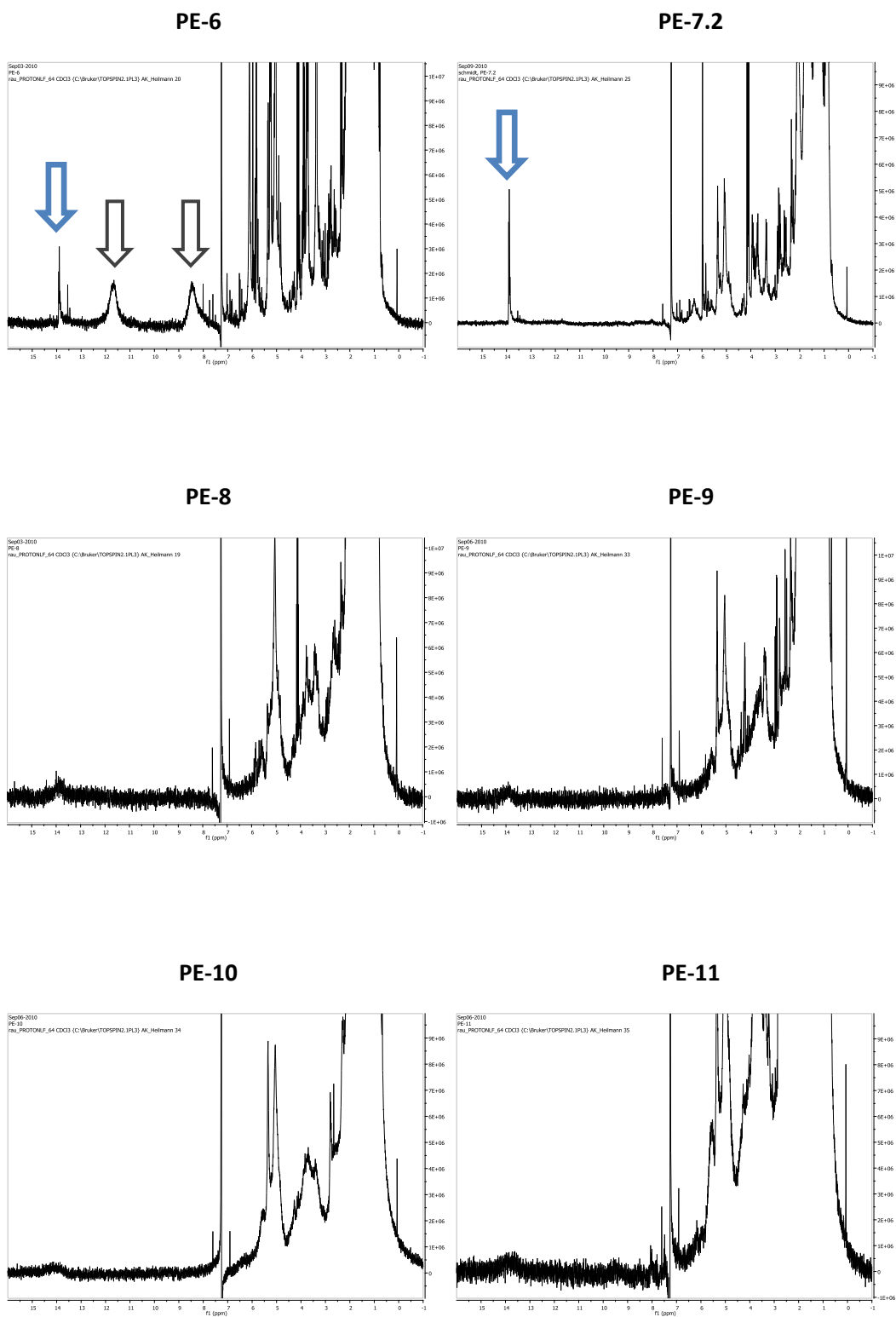
### 3.1.2.3 Screening der restlichen PE-Fractionen per $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie

Ab Fraktion PE-4 wurden alle restlichen Fraktionen bis auf die sehr lipophilen PE-1 und PE-2 per  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum auf tieffeldverschobene Signale hin untersucht. In den Fraktionen PE-4, PE-6 und PE-7.2 waren scharfe Signale bei  $\delta_{\text{H}} \sim 14$  ppm zu sehen. Bei PE-6 sind im Bereich von  $\delta_{\text{H}}$  8,5 ppm und 11,5 ppm zwei zusätzliche, breite Singulets vorhanden. Die Protonenspektren der Fraktionen PE-5 und PE-8 bis PE-11 zeigten keine entsprechenden Signale und wurden daher nicht weiteren Fraktionierungsschritten unterzogen (**Abbildung 37** und **Abbildung 38**, S. 64)



**Abbildung 37:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektren (300,13 MHz, 295 K) von PE-4 und PE-5 in  $\text{CDCl}_3$ ; Der blaue Pfeil deutet auf das tieffeldverschobene Signal bei  $\delta_{\text{H}}$  14 ppm hin.

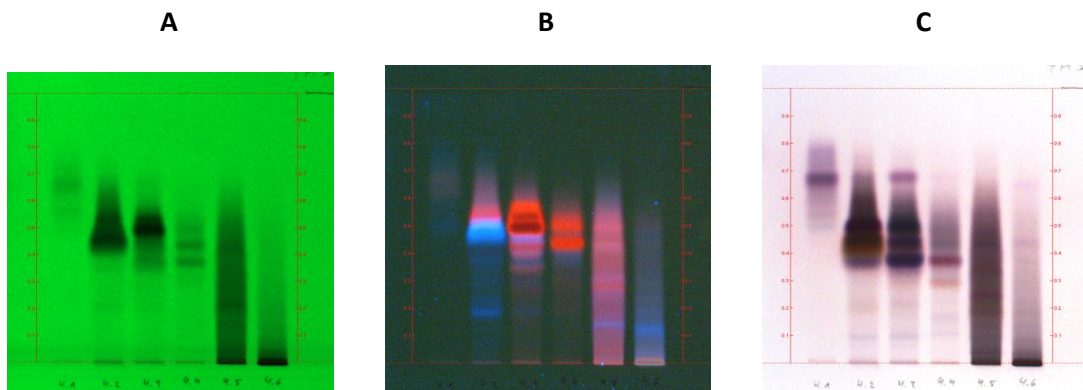
## 64 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 38:** <sup>1</sup>H-NMR Spektren (300,13 MHz, 295 K) von PE-6 bis PE-11 in CDCl<sub>3</sub>; Die blauen Pfeile deuten auf die tieffeldverschobenen Signal bei δ<sub>H</sub> 14 ppm hin, die beiden grauen die etwas ins Hochfeld verschobenen

### 3.1.2.4 Fraktionierung von PE-4

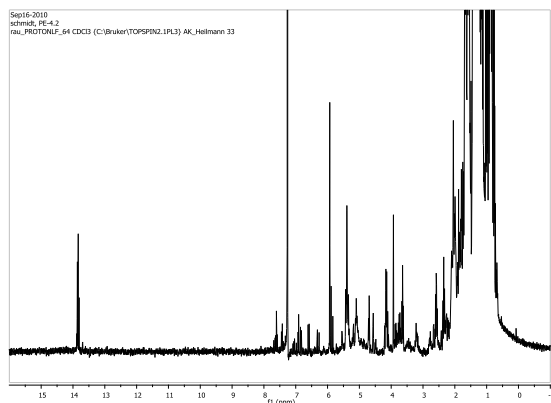
Fraktion PE-4 (1,2 g; 580-740 ml) konnte per Flash-Chromatographie (Flash\_5) in sechs Unterfraktionen PE-4.1 bis -4.6 aufgetrennt werden. Auf dem Übersichts-DC (**Abbildung 39**) waren auf Bahn 3 und 4 bei 365 nm auf halber Höhe intensiv rot-fluoreszierende Banden zu sehen, welche wie eingangs erwähnt auf Chlorophyll hindeuteten. Dieses konnte von den auf Bahn 2, sich in etwa gleicher Höhe befindlichen dunkelblauen-fluoreszierenden Zonen abgetrennt werden.



**Abbildung 39:** Übersichts-DCs von PE-4.1 bis PE-4.6 (Bahn 1 bis 6) unterivatisiert bei **A**) 254 nm **B**) 365 nm und **C**) nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 3

Die anschließende Messung und Auswertung der  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der Fraktionen PE-4.1 bis PE-4.6 bestätigte den Verdacht, dass die Acylphloroglucinole in PE-4.2 angereichert werden konnten, was an dem Singulett bei  $\delta_{\text{H}} \sim 14$  ppm gut zu erkennen war (**Abbildung 40**).

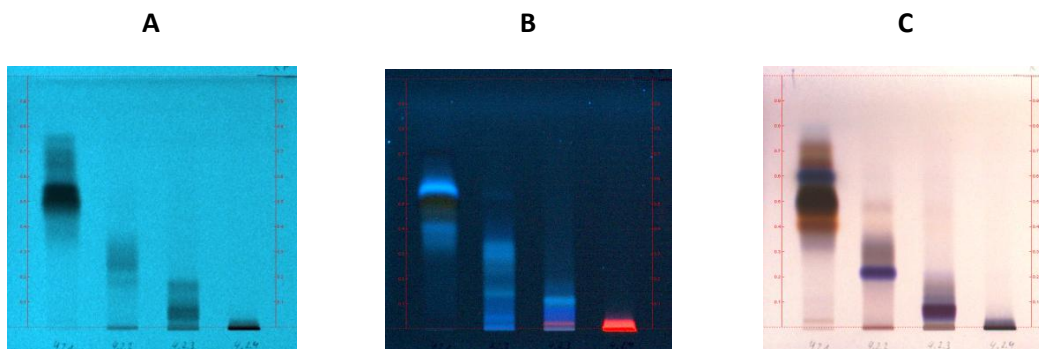
#### 3.1.2.4.1 Fraktionierung von PE-4.2



**Abbildung 40:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von PE-4.2 in  $\text{CDCl}_3$

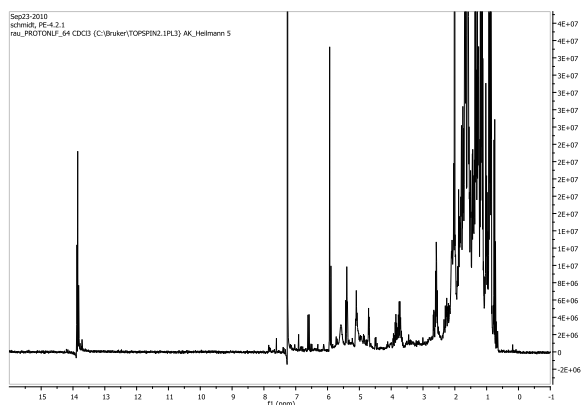
Mit Fraktion PE-4.2 (287,2 mg; 940-1480 ml) wurde eine Flash-Chromatographie an RP-18 Material mit isokratischer Elution (MeCN:MeOH 80:20) über 30 min (Flash\_6) durchgeführt und vier Unterfraktionen PE-4.2.1 bis PE-4.2.4 erhalten. Diesmal wurde zur Fraktionskontrolle eine DC-Platte mit Umkehrphase verwendet und das Chromatogramm mit FM 8, welches dem

Fließmittelgemisch des Trennsystems für die Flash-Chromatographie entsprach, entwickelt. Das restliche Chlorophyll (Bahn 4,  $R_F = 0,01$ ) konnte von den Acylphloroglucinolen (Bahn 1,  $R_F = 0,50$ ) abgetrennt werden, was das Übersichts-DC (**Abbildung 41**) bei 365 nm deutlich machte.



**Abbildung 41:** Übersichts-DCs von PE-4.2.1 bis PE-4.2.4 (Bahn 1 bis 4) unterivatisiert bei **A)** 254 nm **B)** 365 nm und **C)** nach Derivatisierung mit AS (vis); RP-18, FM 8

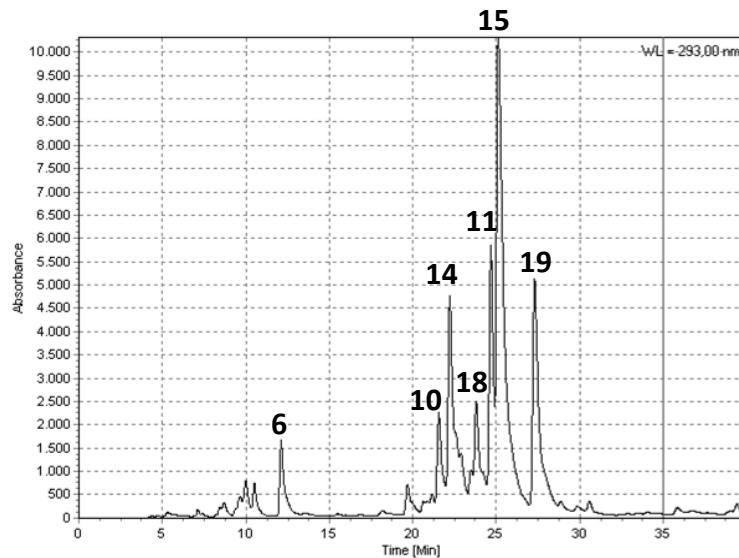
### 3.1.2.4.2 Aufreinigung von PE-4.2.1 per semi-präparativer HPLC



**Abbildung 42:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von PE-4.2.1 in  $\text{CDCl}_3$

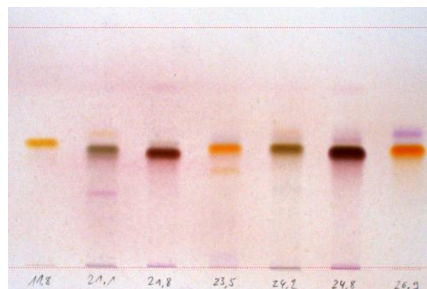
Im Protonenspektrum von Fraktion PE-4.2.1 (107,0 mg; 45-90 ml) konnte das zu erwartende Signal bei  $\delta_{\text{H}} \sim 14$  ppm gefunden werden (**Abbildung 42**). Die Aufreinigung erfolgte an einer RP-Säule mit einem linearen Gradienten von  $\text{H}_2\text{O}$ -MeCN (20:80% (V/V) nach  $\text{H}_2\text{O}$ -MeCN (2:98% (V/V)) innerhalb von 30 min (HPLC\_4). Im Chromatogramm waren neben wenigen kleineren Peaks bei  $t_{\text{R}}$  10 – 17

min, mehrere Peaks im Bereich von  $t_{\text{R}}$  25 – 35 min zu erkennen (**Abbildung 43**, S. 67). Beim manuellen Sammeln der Substanzen an der präparativen HPLC konnten durch rechtzeitiges Wechseln des Reagenzglases die einzelnen Peaks sauber voneinander abgetrennt werden.



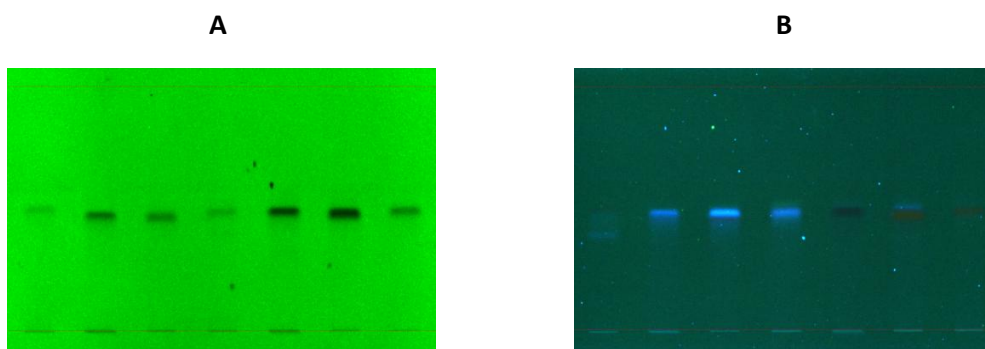
**Abbildung 43:** HPLC-Chromatogramm bei 290 nm von der Aufreinigung von PE-4.2.1; HPLC\_4

Auf der DC-Platte (**Abbildung 44**) stellte sich der Isolierungserfolg folgendermaßen dar: Nach Detektion mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz können schon anhand der Bandenfarbe bei Tageslicht Substanzpaare im  $R_f$ -Bereich von ca. 0,5 identifiziert werden.



**Abbildung 44:** Dünnschichtchromatogramm mit **6, 10, 14, 18, 11, 15** und **19** (Bahn 1 bis 7) nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 3 ohne Säurezusatz

Eine grünliche Färbung ergaben die Substanzen **10** (1,0 mg;  $t_R$  21,1 min) und Substanz **11** (2,4 mg;  $t_R$  24,2 min) auf Bahn 2 und 5. Substanz **14** (2,4 mg;  $t_R$  21,8 min) und Substanz **15** (9,8 mg;  $t_R$  24,8 min) wurden als bräunliche Banden (Bahn 3 und 6) sichtbar, wohingegen sich das Substanzpaar **18** (1,6 mg;  $t_R$  23,5 min) und **19** (4,2 mg;  $t_R$  26,9 min) als gelb-orange Banden (Bahn 4 und 7) darstellte. Die Bande der Substanz **6** (0,5 mg;  $t_R$  11,8 min) auf Bahn 1 erscheint ebenfalls gelb, hat aber strukturell nichts mit den Substanzen **18** und **19** gemeinsam. Vor der Derivatisierung mit AS zeigt sich die Fluoreszenzlöschung und die dunkelblaue Eigenfluoreszenz der Verbindungen (**Abbildung 45**, S. 68).

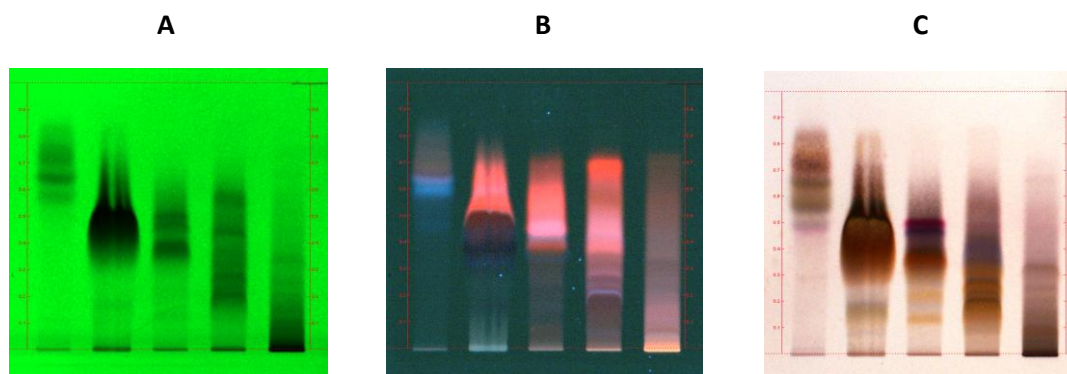


**Abbildung 45:** Dünnschichtchromatogramme mit **6, 10, 14, 18, 11, 15** und **19** (Bahn 1 bis 7) underivatisiert bei **A)** 254 nm und **B)** 365 nm; SiGel, FM 3 ohne Säurezusatz

### 3.1.2.5 Fraktionierung von PE-6

Fraktion PE-6 (1,3 g; 820-980 ml) wurde aufgrund der breiten Signale bei  $\delta_H$  11,5 ppm und  $\delta_H$  8,5 ppm, welche zusätzlich zu den Signalen bei  $\delta_H \sim 14$  ppm im Protonenspektrum zu sehen waren (**Abbildung 38**, S. 64), zur weiteren Fraktionierung per Flash-Chromatographie herangezogen.

Es konnten fünf Subfraktionen PE-6.1 bis -6.5 mit dem Trennsystem Flash\_7 erhalten werden. Per DC (**Abbildung 46**) ist auf Bahn 2 bei 254 nm (Fraktion PE-6.2) im  $R_F$ -Bereich zwischen 0,4 und 0,5 eine breite, fluoreszenzlöschende Zone zu sehen, welche bei 365 nm die für die Acylphloroglucinole typische dunkelblaue Eigenfluoreszenz ergibt.

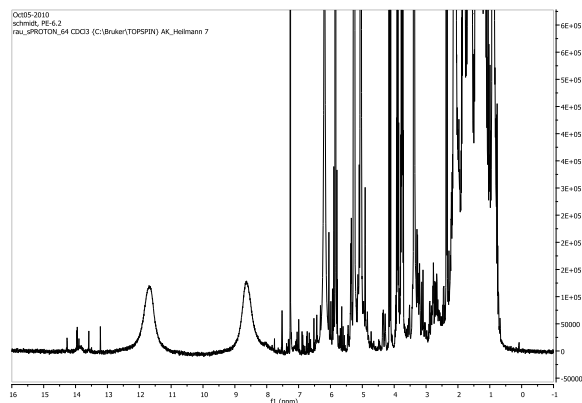


**Abbildung 46:** Übersichts-DCs von PE-6.1 bis PE-6.5 (Bahn 1 bis 5) underivatisiert bei **A)** 254 nm **B)** 365 nm und **C)** nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 1 ohne Säurezusatz

Allerdings sind bei 365 nm oberhalb von  $R_F = 0,5$  intensiv rot fluoreszierende Banden zu sehen, die nicht zufriedenstellend abgetrennt werden konnten. Deshalb musste Fraktion PE-

6.2 einem weiteren Fraktionierungsschritt unterzogen werden, bevor eine Aufreinigung an der HPLC erfolgen konnte.

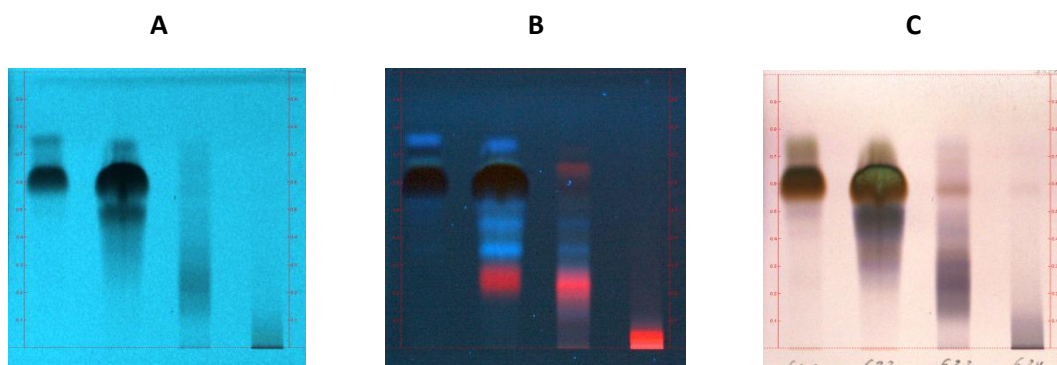
### 3.1.2.5.1 Fraktionierung von PE-6.2



**Abbildung 47:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von PE-6.2 in  $\text{CDCl}_3$

Neben mehreren kleineren scharfen Signalen bei  $\delta_{\text{H}} 14 \pm 0,5$  ppm, stehen in Fraktion PE-6.2 die verbreiterten Signale bei  $\delta_{\text{H}} 8,5$  ppm und 11,5 ppm deutlich im Vordergrund (**Abbildung 47**). Die Fraktionierung von PE-6.2 (840,1 mg; 1020-1480 ml) erfolgte per Flash-Chromatographie an RP-18 (Flash\_8) und ergab vier Unterfraktionen (PE-6.2.1 bis - 6.2.4).

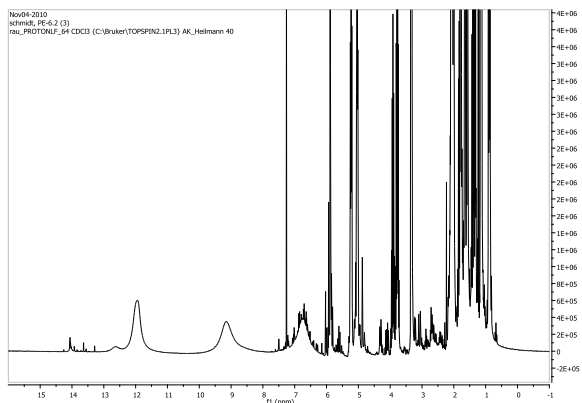
Im Dünnschichtchromatogramm (**Abbildung 48**) fallen auf Bahn 1 und 2 bei  $R_{\text{F}} = 0,60 \pm 0,05$  zwei Banden auf, die vor allem hinsichtlich der dunkelblauen Eigenfluoreszenz bei 365 nm auf das Vorhandensein von Acylphloroglucinolen in den beiden Fraktionen hindeuten. Zur Aufreinigung per HPLC wurde zunächst Fraktion PE-6.2.1 verwendet, weil im Vergleich zu Fraktion PE-6.2.2 aufgrund der geringeren Anzahl an zusätzlichen Banden im DC eine höhere Reinheit und damit weniger Verunreinigungen zu erwarten waren.



**Abbildung 48:** Übersichts-DC von PE-6.2.1 bis PE-6.2.4 (Bahn 1 bis 4) underivatisiert bei **A**) 254 nm **B**) 365 nm und **C**) nach Derivatisierung mit AS (vis); RP-18, FM 8

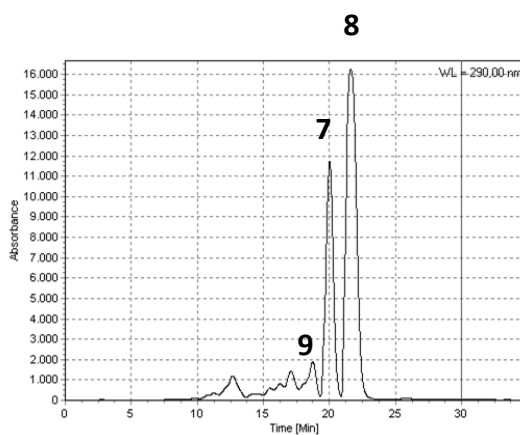
Für die Aufreinigung wurde zunächst PE-6.2.1 aufgrund der tieffeldverschobenen Singulett im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum verwendet (**Abbildung 49**, S. 70).

### 3.1.2.5.2 Aufreinigung von PE-6.2.1 per semi-präparativer HPLC



**Abbildung 49:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von PE-6.2.1 in  $\text{CDCl}_3$

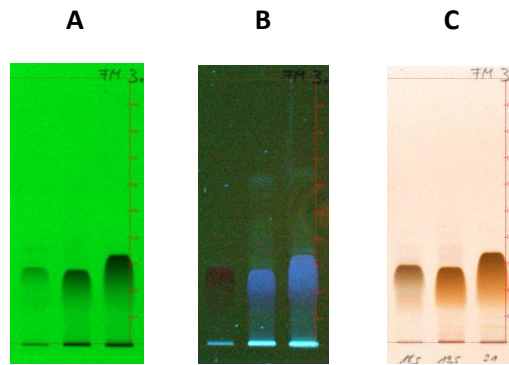
Die Aufreinigung der Fraktion PE-6.2.1 (115,9 mg; 30-40 ml) erfolgte mit der größeren HPLC-Säule (**Tabelle 13**, S. 35). Diese war nötig, um die relativ große Menge der Fraktion in insgesamt elf Läufen aufzureinigen (HPLC\_5). Im Ergebnis konnten die Substanzen **9** (2,0 mg;  $t_R$  18,5 min) **7** (19,5 mg;  $t_R$  19,5 min) und **8** (48,1 mg;  $t_R$  21 min) isoliert werden (**Abbildung 50**).



**Abbildung 50:** HPLC-Chromatogramm bei 290 nm von der Aufreinigung von PE-6.2.1; HPLC\_5

Im HPLC-Chromatogramm (**Abbildung 50**) sind bei 290 nm neben den beiden großen Peaks bei  $t_R = 19,5$  und 21 min mehrere kleine zwischen  $t_R = 10$  und 19 min zu sehen, von denen aber nur der bei  $t_R = 18,5$  min sauber abgetrennt werden konnte.

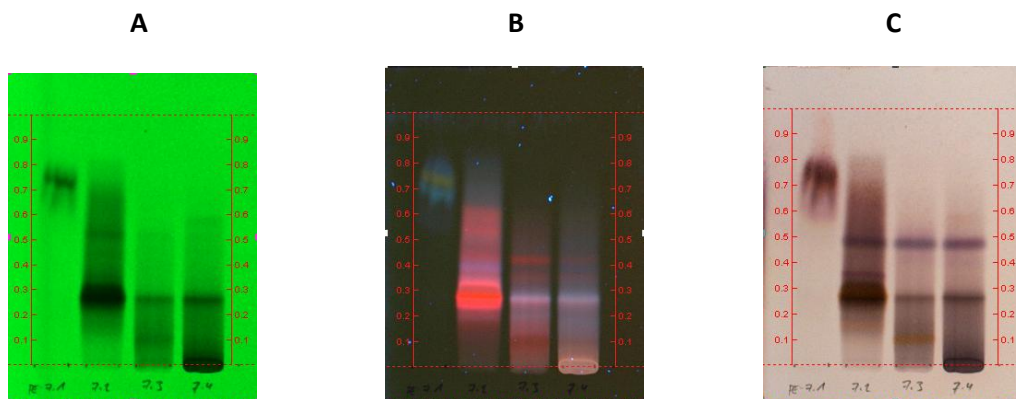
Auf der DC-Platte (**Abbildung 51**, S. 71) sind auf den Bahnen 1 bis 3 im unteren Drittel des Chromatogramms die isolierten Substanzen gut an der charakteristischen Färbung bei Tageslicht nach Detektion mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz zu erkennen.



**Abbildung 51:** Dünnschichtchromatogramme von den Substanzen **9** (Bahn 1), **7** (Bahn 2) und **8** (Bahn3) underivatisiert bei **A)** 254 nm **B)** 365 nm und **C)** nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 3 ohne Säurezusatz

### 3.1.2.6 Fraktionierung von PE-7

Fraktion PE-7 (393,5 mg; 980-1140 ml) zeigte im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum ebenfalls tieffeldverschobene Signale bei  $\delta_{\text{H}} \sim 14$  ppm (Spektrum nicht abgebildet) und wurde wie die Fraktionen PE-4 und -6 ebenfalls per Flash-Chromatographie aufgetrennt (Flash\_9). Es wurden vier Subfraktionen PE-7.1 bis -7.4 erhalten, welche im DC folgendes Bandenmuster ergaben (**Abbildung 52**):



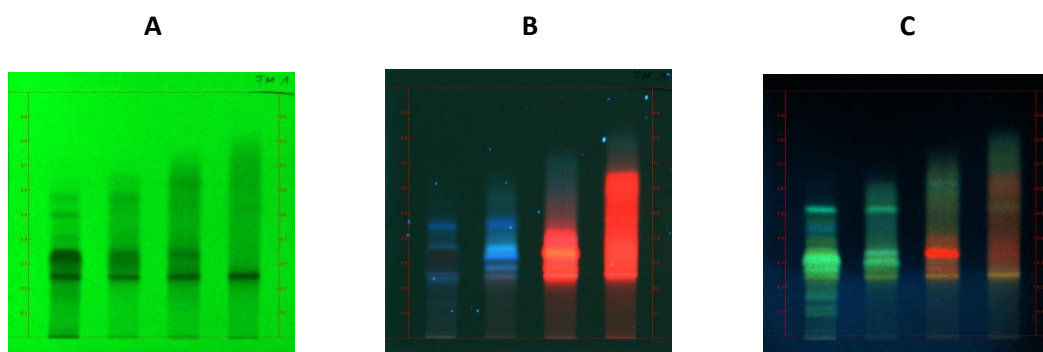
**Abbildung 52:** Übersichts-DCs von PE-7.1 bis PE-7.4 (Bahn 1 bis 4) underivatisiert bei **A)** 254 nm **B)** 365 nm und **C)** nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 4

Bei 365 nm erschien auf Bahn 2 (PE-7.2) bei  $R_{\text{F}} = 0,25$  eine das gesamte Spektrum dominierende rot-fluoreszierende Zone, welche wiederum auf größere Mengen Chlorophyll hindeutete. Allein das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum der einzelnen Fraktionen gab Aufschluss über das potentielle Vorhandensein von Acylphloroglucinolen. So konnte nur im Protonenspektrum der Fraktion PE-7.2 (**Abbildung 38**, S. 64) ein entsprechendes Signal im Tieffeld gefunden werden.

Die restlichen Fraktionen PE-7.1 (Bahn 1), PE-7.3 und PE-7.4 (Bahn 3 und 4) gaben weder im DC noch im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum Hinweise auf die gesuchten Acylphloroglucinole. Somit wurde ausschließlich PE-7.2 für weitere Fraktionierungsschritte ausgewählt.

### 3.1.2.6.1 Fraktionierung von PE-7.2

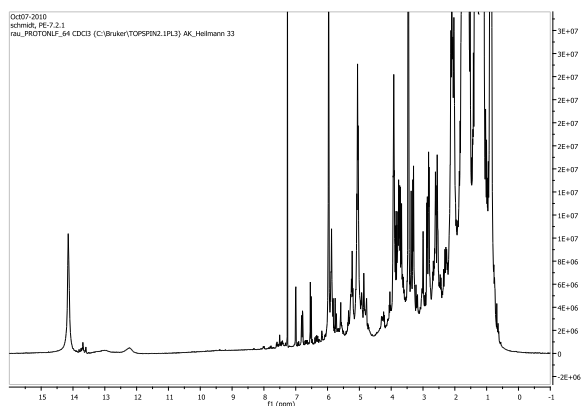
Mittels Flash-Chromatographie an RP-Material (Flash\_10) wurden bei der Fraktionierung von PE-7.2 (244,5 mg; 75-435 ml) vier Unterfraktionen PE-7.2.1 bis PE-7.2.4 erhalten. Im Übersichts-DC (**Abbildung 53**) sind bei 365 nm auf Bahn 3 und 4 rot-fluoreszierende Banden zu erkennen, welche auf der Bahn 1 und 2 (PE-7.2.1 und PE-7.2.2) nicht vorhanden sind. Als Detektionsmittel wurde an dieser Stelle nicht das Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz, sondern das Naturstoffreagenz verwendet, um die Phloroglucinol-Derivate sichtbar zu machen. Nach der Detektion ließen sich die Zonen bei  $R_f = 0,34$  auf Bahn 1 und 2, welche im underivatisierten DC bei 365 nm als dunkelblau-fluoreszierende Banden zu erkennen waren, zu grünlich-gelb fluoreszierenden Zonen anfärben.



**Abbildung 53:** Übersichts-DCs von PE-7.2.1 bis PE-7.2.4 (Bahn 1 bis 4) underivatisiert bei **A**) 254 nm **B**) 365 nm und **C**) nach Derivatisierung mit NSR (365 nm); SiGel, FM 1

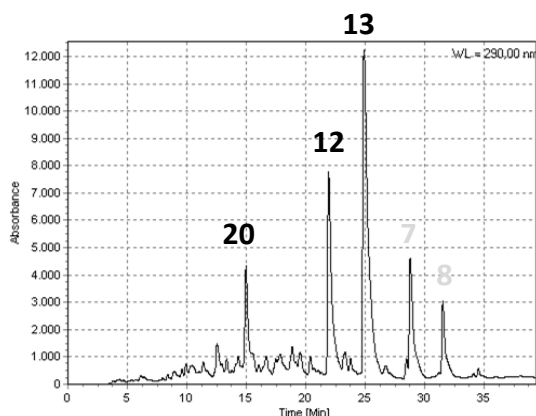
Für die Aufreinigung per HPLC wurde auch aufgrund des Protonenspektrums (**Abbildung 54**, S. 73) die Fraktion PE-7.2.1 ausgewählt.

### 3.1.2.6.2 Aufreinigung von PE-7.2.1 per semi-präparativer HPLC



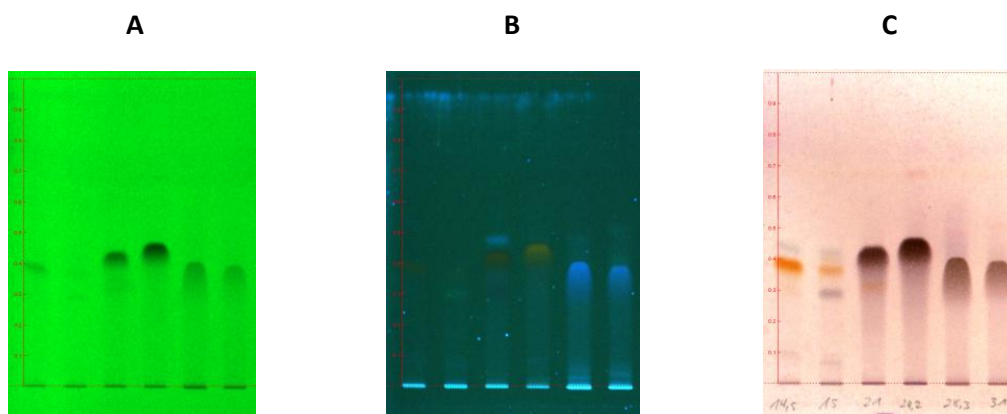
**Abbildung 54:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von PE-7.2.1 in  $\text{CDCl}_3$

Die Aufreinigung von PE-7.2.1 (84,7 mg; 15-45 ml) mit dem Trennsystem HPLC\_6 ergab die Substanzen **20** (3,0 mg;  $t_R$  14,5 min), **12** (6,9 mg;  $t_R$  21 min) und **13** (14,3 mg;  $t_R$  24,2 min), welche sich im HPLC-Chromatogramm (**Abbildung 55**) als scharfe Peaks abzeichneten. Die beiden Peaks bei  $t_R = 28,3$  und 31 min stellten die bereits isolierten Verbindungen **7** und **8** dar.



**Abbildung 55:** HPLC-Chromatogramm bei 290 nm von der Aufreinigung von PE-6.2.1; HPLC\_6

Auf der DC-Platte (**Abbildung 56**, S. 74) ist im Chromatogramm nach dem Besprühen mit AS bei Tageslicht auf der Bahn 1 bei  $R_F = 0,39$  eine durch Randeffekte leicht schräge gelb-orange Bande zu sehen, welche die Substanz **20** darstellt. Die Substanzen **12** (Bahn 3,  $R_F = 0,41$ ) und **13** (Bahn 3;  $R_F = 0,44$ ) erscheinen als dunkelbraune Banden, genauso wie **7** (Bahn 4;  $R_F = 0,35$ ) und **8** (Bahn 5;  $R_F = 0,34$ ). Auf Bahn 2 ist die Schulter des Peaks bei  $t_R = 14,5$  min mit auf die DC-Platte aufgetragen worden, die aber nicht weiter verfolgt wurde.

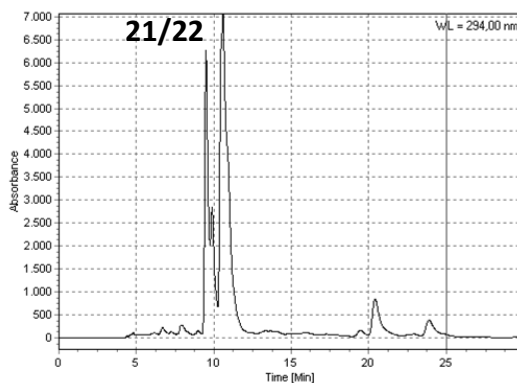


**Abbildung 56:** Dünnschichtchromatogramme von **20** (Bahn 1), **12** (Bahn 3) und **13** (Bahn 4) underivatisiert bei **A**) 254 nm **B**) 365 nm und **C**) nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 2A

### 3.1.2.7 Aufreinigung von PE-3.1.2.1 per semi-präparativer HPLC

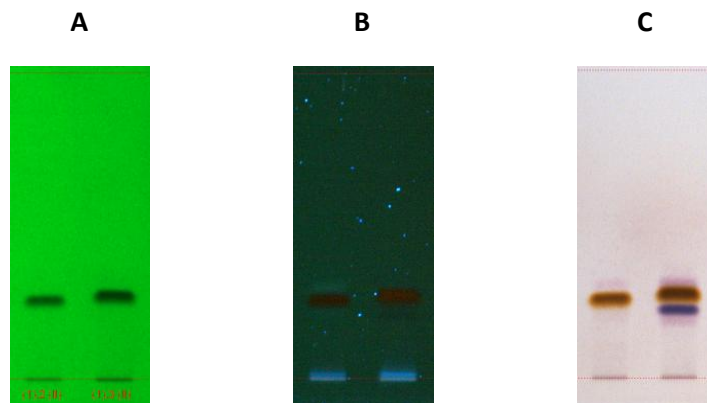
Neben den bereits per  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum untersuchten Fraktionen PE-4 bis PE-11 wurden aufgrund der erfolgreichen Isolierung von 15 Acylphloroglucinolen (**6-20**) per  $^1\text{H-NMR}$ -geleiteter Fraktionierung, alle Unterfraktionen aus dem ausschließlich DC-geleiteten Fraktionierungs-Teil (PE-3) mittels ihrer Protonenspektren untersucht und ausgewertet.

PE-3.1.2.1 (8,2 mg; 0-75 ml) zeigte im Protonenspektrum (nicht abgebildet) ebenfalls tieffeldverschobene Signale. Hierauf wurde die Fraktion per HPLC<sub>1</sub> aufgereinigt, was zu dem Isomerenpaar **21/22** (0,5 mg;  $t_R$  9,5 min) führte. Die kleine Schulter im Chromatogramm (**Abbildung 57**) konnte durch schnelles Wechseln des Reagenzglases zufriedenstellend abgetrennt werden. Der Peak bei  $t_R = 10$  min zeigte ebenfalls ein leichtes Tailing.



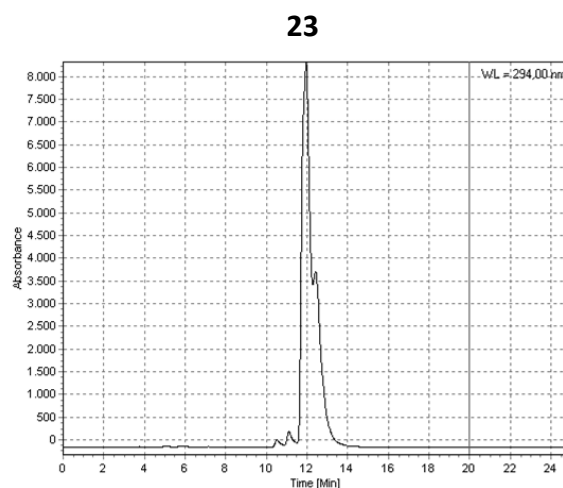
**Abbildung 57:** HPLC-Chromatogramm bei 294 nm von der Aufreinigung von PE-3.1.2.1; HPLC<sub>1</sub>

Im Übersichts-DC (**Abbildung 58**) ist nach der Detektion mit dem AS bei Tageslicht auf Bahn 1 bei  $R_F = 0,27$  eine braune Bande sichtbar (Substanzpaar **21/22**). Auf Bahn 2 ist der Peak bei  $t_R = 10$  min (**Abbildung 57**, S. 74) und Substanz **23** ( $R_F = 0,29$ ) zu erkennen.



**Abbildung 58:** Dünnschichtchromatogramme von **21/22** (Bahn 1) und **23** vor der Aufreinigung (Bahn 2) underivatisiert bei **A**) 254 nm **B**) 365 nm und **C**) nach Derivatisierung mit AS (vis); SiGel, FM 4J

Die Aufreinigung von Substanz **23** (0,5 mg;  $t_R$  11,5 min) erfolgte per HPLC\_2. Aufgrund der Verwendung von 100% MeCN anstatt des MeOH-MeCN-Gradienten (HPLC\_1) konnte im Chromatogramm eine Schulter ( $t_R$  12,5 min) am Hauptpeak erkannt und somit beim manuellen Sammeln der Peaks abgetrennt werden (**Abbildung 59**).



**Abbildung 59:** HPLC-Chromatogramm bei 294 nm von der Aufreinigung von **23** ( $t_R$  11,5 min); HPLC\_2

### 3.1.3 Strukturaufklärung und Charakterisierung der isolierten Verbindungen

Die Strukturaufklärung der Acylphloroglucinole erfolgte mit Hilfe der 1D- und 2D-NMR Spektroskopie sowie der Massenspektrometrie und wurde durch die Identifizierung gemeinsamer Strukturmerkmale wesentlich erleichtert. Charakterisiert wurden die Substanzen mittels UV-Spektroskopie, Polarimetrie und CD-Spektroskopie. Einige ausgewählte Verbindungen wurden außerdem per Dünnschichtchromatographie und verschiedener Sprühreagenzien untersucht.

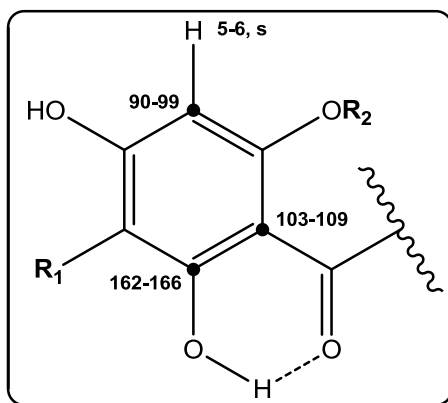
#### 3.1.3.1 Identifizierung gemeinsamer Strukturmerkmale

Alle isolierten Acylphloroglucinole besitzen neben einer aliphatischen Seitenkette das Phloroglucin-Grundgerüst, wobei mindestens eine freie OH-Gruppe des unterschiedlich substituierten 1,3,5-Trihydroxybenzols mit der Carbonylfunktion der Acylseitenkette eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Alle drei Strukturbausteine liefern sowohl im  $^1\text{H}$ -NMR als auch im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum analytisch und spektroskopisch wertvolle Signale.

##### 3.1.3.1.1 Das Phloroglucin-Grundgerüst

In verschiedenen Lehrbüchern der Spektroskopie sind für die aromatischen Kohlenstoffatome im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum je nach Substitutionsmuster chemische Verschiebungen im Bereich von  $\delta_{\text{C}}$  100 bis 160 ppm und für die Protonen an aromatischen Ringen Werte von  $\delta_{\text{H}}$  6,5 bis 8,5 ppm zu finden (Hesse et al. 2012, Friebolin 2013). Für das Benzol sind bei Gottlieb et al. (1997) folgende Werte veröffentlicht: C-/H-1 bis C-/H-6 ( $\delta_{\text{C}}$  128,37 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7,36 ppm, s) in  $\text{CDCl}_3$ .

Im Vergleich dazu sind die Signale der Methingruppen C-2/C-4/C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  94,13 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  5,679 ppm) des Phloroglucinols (1,3,5-Trihydroxybenzol) deutlich ins Hochfeld und die quartären, hydroxylierten Kohlenstoffatome C-1/C-3/C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  158,80 ppm) ins Tieffeld verschoben. Die chemische Verschiebung der drei OH-Gruppen liegt bei  $\delta_{\text{H}}$  9,006 ppm. Die Messungen erfolgten in deuteriertem DMSO bei 399,65 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR Spektrum) und 22,13 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum, [http://sdfs.riodb.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://sdfs.riodb.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/cre_index.cgi)).



**Abbildung 60:** Charakteristische chemische Verschiebungen  $\delta_{C/H}$  in ppm.

Die aliphatischen Acylphloroglucinole besitzen eine Seitenkette, deren Verknüpfung am Phloroglucin-Grundgerüst eine Entschirmung und damit eine Tieffeldverschiebung des nunmehr quartären Kohlenstoffatoms bewirkt. Dies lässt sich im Kohlenstoffspektrum anhand von Signalen bei  $\delta_C$  103-109 ppm erkennen (**Abbildung 60**). Ist die meta-Position unsubstituiert ( $R_1 = H$ ) oder nur einfach substituiert ( $R_1 \neq H$ ) dann können anhand von Signalen im Bereich von  $\delta_C$  90 bis 99 ppm und  $\delta_H$  5-6 ppm die

Methin-Gruppe bzw. Gruppen erkannt werden.

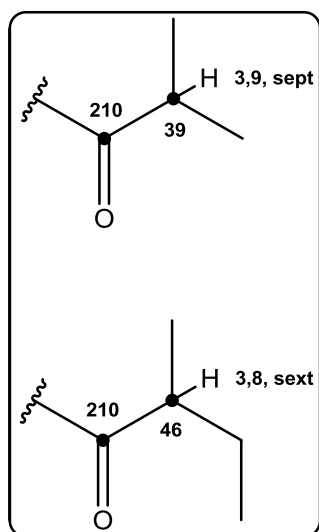
Eine starke Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylfunktion der Seitenkette und einer freien OH-Gruppe ( $R_2 \neq H$ ) in ortho-Position hat Auswirkung auf die chemische Verschiebung des Kohlenstoffs, an dem die Hydroxylgruppe gebunden ist. Dessen Signale sind im Gegensatz zu den nicht OH-Brücken-gebundenen C-Atomen durch die schwächere Abschirmung tieffeldverschoben und liegen im Bereich von  $\delta_C$  162-166 ppm. Ist der Phloroglucinring unsubstituiert ( $R_1 = R_2 = H$ ), dann sind alle drei hydroxylierten Kohlenstoffatome ins Tieffeld verschoben und ergeben Signale im Bereich von  $\delta_C$  165 ppm. Dies konnte für Substanz **6** (**Tabelle 25**, S. 89), aber auch für das Multifidol, dem (2-Methylbutyryl)phloroglucinol aus dem Latex von *Jatropha multifida*, Euphorbiaceae gezeigt werden (Kosasi et al. 1989).

Liegt jedoch eine Keto-Enol-Tautomerie wie beim Humulon vor, dann sind die Signale der beiden C-Atome in ortho-Position deutlich ins Tieffeld zu Werten  $\delta_C > 190$  ppm verschoben (Ayräs et al. 1981).

### 3.1.3.1.2 Die aliphatische Acyl-Seitenkette

Bei den isolierten Verbindungen handelt es sich ausschließlich um Acylphloroglucinol-Derivate, die in der Seitenkette variieren. Diese stellt wie bei den Hopfenbitterstoffen Cohumulon und Colupulon sowie dem wohl bekanntesten Phloroglucinabkömmling Hyperforin einen Isobutyrylrest dar bzw. es handelt sich um einen 2-Methylbutyryl-Rest, wie beim Adhumulon, dem Adlupulon und dem Adhyperforin. Bei den mengenmäßig

bedeutensten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren aus den Hopfenzapfen Humulon und Lupulon ist die Seitenkette aus einer Isovaleriansäure hervorgegangen (Hänsel und Sticher 2010).



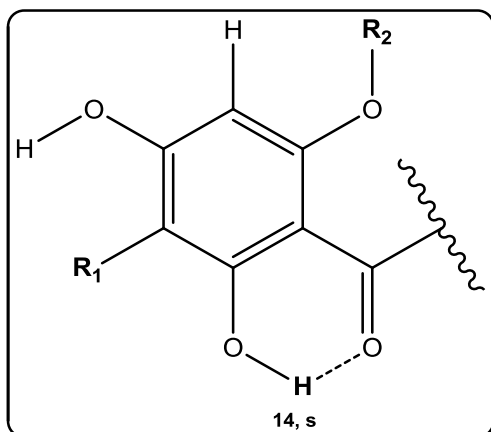
**Abbildung 61:** Aliphatische Acyl-Seitenketten,  $\delta_{C/H}$  in ppm, mult.

Die Carbonylfunktion der Seitenkette ergibt im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ein Signal bei  $\delta_C \sim 210$  ppm (**Tabelle 23**, S. 81). Dieser Tieffeldshift kommt zum einen durch den doppelt gebundenen Sauerstoff und zum anderen durch den Aromaten zustande. Beide üben einen durch ihre Elektronegativität bedingten  $-I$ -Effekt aus, was eine Entschirmung des Kohlenstoffatoms bewirkt. Es kann aber, wie für die Isovalerianyl-Derivate Humulon bzw. Lupulon-Derivate gezeigt, auch weiter hochfeldverschoben sein:  $\delta_C$  200 bis 202 ppm (Goese et al. 1999, Zhao et al. 2005). Der direkt benachbarte Kohlenstoff ergibt im Kohlenstoffspektrum ein Signal bei  $\delta_C \sim 39$  ppm für die Isobutyrylgruppe und  $\delta_C \sim 46$  ppm für die 2-Methylbutyrylgruppe. Die zugehörigen Protonen der Methingruppe ergeben im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum ein Septett bei  $\delta_H \sim 3,9$  ppm (zwei benachbarte Methylgruppen) bzw. ein Sextett bei  $\delta_H \sim 3,8$  ppm (eine Methyl- und eine Ethylgruppe in direkter Nachbarschaft, **Abbildung 61**).

### 3.1.3.1.3 Die intramolekulare Wasserstoffbrücke

Die Austauschbarkeit von an Heteroatomen gebundenen  $-\text{XH}$  Protonen ist durch wesentlich kleinere Bindungsenergien als bei  $-\text{CH}_n$  Protonen ermöglicht. In  $\text{MeOH-d}_4$ , einem protischen Lösungsmittel, findet ein schneller Austausch zwischen den  $-\text{XH}$  und den Protonen des deuterierten Methanol statt. Somit „verschwinden“ die Signale der austauschbaren Wasserstoffatome. In  $\text{MeOH-d}_3$ , bei dem nur die Protonen der Methylgruppe gegen Deuterium ausgetauscht sind oder  $\text{CDCl}_3$  findet der Austausch zwar ebenfalls, aber viel langsamer statt (Meusinger 2010).

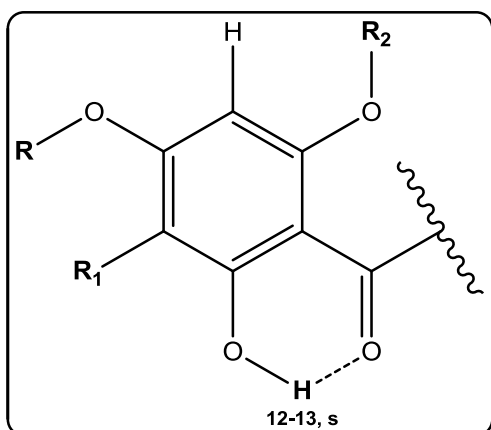
In der vorliegenden Arbeit konnten alle isolierten Verbindungen in deuteriertem Chloroform gelöst werden und somit über die sichtbaren Signale der Hydroxylgruppen und deren Ausbildung von intramolekularen H-Brücken wichtige Informationen gewonnen werden.



**Abbildung 62:** Fixierte H-Brücke;  $\delta_H$  in ppm, mult.

Wenn nur eine Möglichkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke besteht, weil eine OH-Gruppe in ortho-Stellung zur Acyl-Seitenkette substituiert vorliegt ( $R_2 \neq H$ ) und nur die andere frei ist, dann liegen die chemischen Verschiebungen dieser eindeutig fixierten H-Brücke im Bereich von  $\delta_H 14 \pm 1$  ppm. (**Abbildung 62**). Dies ist bei den monozyklischen Verbindungen **1**, **2** und **5**, (**Abbildung 108**, S. 124) den Bicyklen **10**, **11**, **12**, **13**, **16** und **17**, sowie den tri- bzw. polyzyklischen

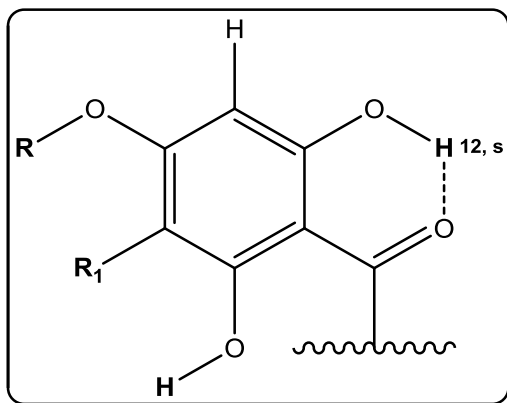
Verbindungen **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23** (**Abbildung 109**, S. 126) zu beobachten. Hierbei ist es bedeutungslos, ob  $R_1 = H$  oder  $R_1 \neq H$  ist.



**Abbildung 63:** H-Brücke in eine Richtung dirigiert;  $\delta_H$  in ppm, mult.

Wenn allerdings  $R_1 \neq H$  und  $R_2 = H$  dann ist die Ausbildung der Wasserstoffbrücke „auf der gleichen Seite“ wie  $R_1$  bevorzugt bzw. energetisch begünstigt (Mammino und Kabanda 2009). Dies trifft bei den Substanzen **7**, **8** und **9** zu. Hier beträgt die chemische Verschiebung der  $\underline{H}O$ -Gruppe  $\delta_H 12$  ppm (**Tabelle 26**, S. 93). Auch die bicyklischen Chroman-Verbindungen **14** und **15**, bei denen der Ringschluss mit der OH-Gruppe in para-Stellung zur Acyl-Seitenkette erfolgt und  $R_2 = H$  ist, unterstützen diese

Theorie bei leicht tieffeldverschobenen Werten von  $\delta_H 13$  ppm (**Tabelle 29**, S. 102).



**Abbildung 64:** H-Brücke in andere Richtung fixiert;  $\delta_H$  in ppm, mult.

Bei den Verbindungen **3** und **4** (**Abbildung 72**, S. 87) besteht  $R_1$  aus einem Geranyl- und R aus einem Limonen-Rest. Das hat zur Folge, dass die Carbonylfunktion der Acyl-Seitenkette eine Wasserstoffbrücke mit der OH-Gruppe in para-Position zu  $R_1$  ausbildet (**Abbildung 64**) und im  $^1H$ -NMR Spektrum ein Signal bei  $\delta_H$  12 ppm zu finden ist. Die freie Hydroxylgruppe gibt ein breites Singulett bei  $\delta_H \sim 7,5$  ppm (**Tabelle 24**, S. 87).

## 3.1.3.2 Monozyklische Acylphloroglucinole

## 3.1.3.2.1 Substanzen 1 und 2 (Empetrifelixin A und B)

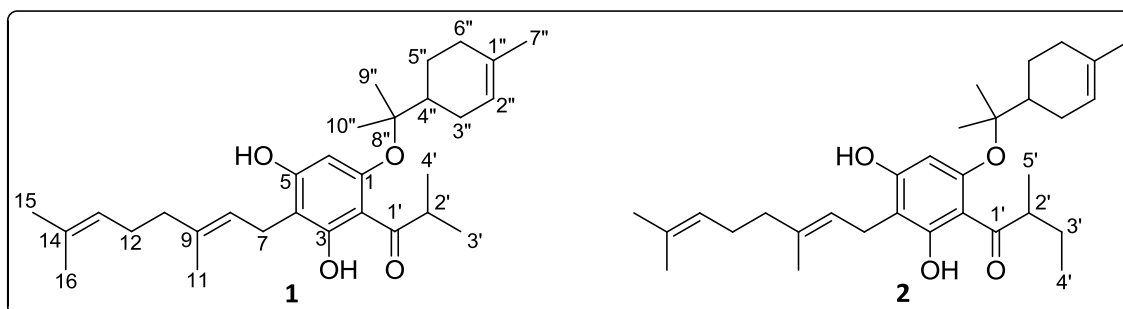


Abbildung 65: Substanzen 1 und 2

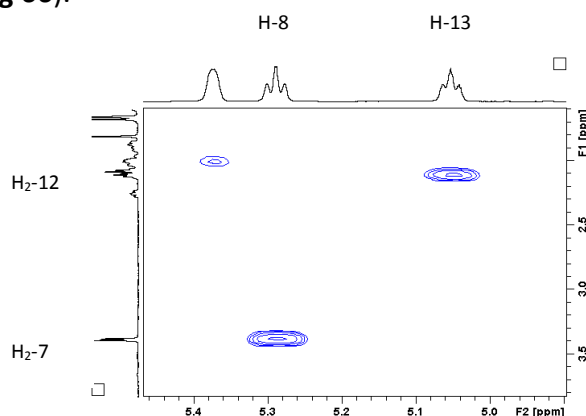
Tabelle 23:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 1 und 2 in  $\text{CDCl}_3$ 

| C/H  | 1                   |                                    | 2                   |                                    |
|------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) |
| 1    | 157,6               |                                    | 157,6               |                                    |
| 2    | 107,7               |                                    | 108,4               |                                    |
| 3    | 163,9               |                                    | 163,7               |                                    |
| 4    | 106,3               |                                    | 106,3               |                                    |
| 5    | 160,6               |                                    | 160,5               |                                    |
| 6    | 98,0                | 6,06 (1H, s)                       | 98,1                | 6,06 (1H, s)                       |
| 7    | 21,6                | 3,38 (2H, d, 7,4)                  | 21,6                | 3,38 (2H, d, 7,3)                  |
| 8    | 121,7               | 5,28 (1H, t, 6,7)                  | 121,7               | 5,29 (1H, t, 7,2)                  |
| 9    | 139,5               |                                    | 139,5               |                                    |
| 10   | 39,6                | 2,07 (2H, m)                       | 39,6                | 2,07 (2H, m)                       |
| 11   | 16,2                | 1,80 (3H, s)                       | 16,1                | 1,82 (3H, s)                       |
| 12   | 26,3                | 2,10 (2H, m)                       | 26,3                | 2,10 (2H, m)                       |
| 13   | 123,6               | 5,05 (1H, t, 6,6)                  | 123,6               | 5,05 (1H, t, 6,7)                  |
| 14   | 132,0               |                                    | 132,0               |                                    |
| 15   | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       |
| 16   | 17,7                | 1,59 (3H, s)                       | 17,7                | 1,59 (3H, s)                       |
| 1'   | 211,4               |                                    | 211,3               |                                    |
| 2'   | 38,8                | 3,95 (1H, sept, 6,7)               | 45,3                | 3,87 (1H, sext, 6,7)               |
| 3'   | 19,5                | 1,17 (3H, d, 6,7)                  | 26,9                | 1,42 (m)<br>1,75 (m)               |
| 4'   | 19,6                | 1,17 (3H, d, 6,7)                  | 11,7                | 0,85 (3H, t, 7,4)                  |
| 5'   |                     |                                    | 17,0                | 1,12 (3H, d, 6,8)                  |
| 1''  | 134,1               |                                    | 134,0               |                                    |
| 2''  | 120,2               | 5,37 (1H, bs)                      | 120,2               | 5,37 (1H, bs)                      |
| 3''  | 26,8                | 1,89 (m)<br>2,01 (m)               | 26,8                | 1,88 (m)<br>2,01 (m)               |
| 4''  | 42,6                | 2,25 (1H, m)                       | 42,5                | 2,25 (1H, m)                       |
| 5''  | 24,5                | 1,35 (m)<br>1,86 (m)               | 24,4                | 1,35 (m)<br>1,86 (m)               |
| 6''  | 30,9                | 1,99 (2H, m)                       | 30,8                | 1,98 (2H, m)                       |
| 7''  | 23,3                | 1,65 (3H, s)                       | 23,3                | 1,65 (3H, s)                       |
| 8''  | 86,1                |                                    | 86,1                |                                    |
| 9''  | 24,3                | 1,38 (3H, s)                       | 24,4                | 1,38 (3H, s)                       |
| 10'' | 23,9                | 1,45 (3H, s)                       | 24,0                | 1,44 (3H, s)                       |
| 3-OH |                     | 13,91 (s)                          |                     | 13,92 (s)                          |
| 5-OH |                     | 6,04 (s)                           |                     | 6,06 (s)                           |

Das HREIMS-Spektrum von Substanz **1** ergab eine Masse  $[M]^+$  von  $m/z$  468,3237, welche zur Summenformel  $C_{30}H_{44}O_4$  (berechnet: 468,3240) führte. Im  $^{13}C$ -NMR Spektrum waren 30 Kohlenstoffsignale zu sehen, welche mittels HSQC als acht Methyl-, sechs Methylen-, sechs Methingruppen und zehn quartäre Kohlenstoffatome identifiziert werden konnten.

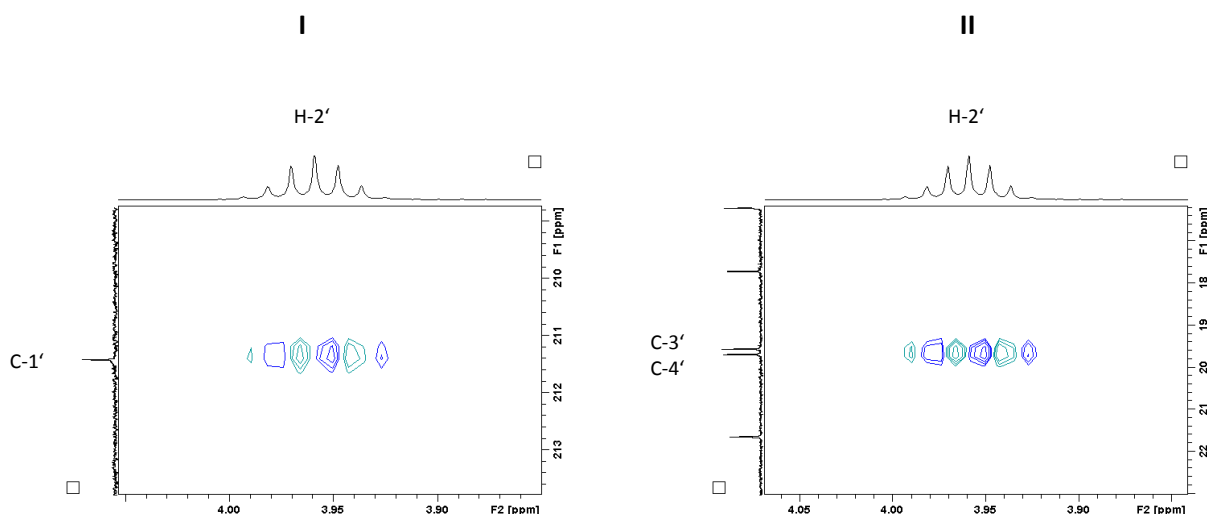
Die Anwesenheit eines **Phloroglucin-Grundkörpers** konnte aufgrund charakteristischer Verschiebungen der Kohlenstoff-Signale C-1 bis C-6 bestimmt werden. Drei der Kohlenstoffsignale  $\delta_C$  157,6 ppm (C-1), 163,9 ppm (C-3) und 160,6 ppm (C-5) lagen im Vergleich zum Phloroglucinol mit den chemischen Verschiebungen im Bereich der hydroxylierten C-Atome. Die Signale der beiden weiteren quartären Kohlenstoff-Atome C-2 ( $\delta_C$  107,7 ppm) und C-4 ( $\delta_C$  106,3 ppm) waren aufgrund der Substitution mit aliphatischen Seitenketten hochfeldverschoben. Die Methin-Gruppe in Position 6 ( $\delta_C$  98,0 ppm;  $\delta_H$  6,06 ppm, s) konnte aufgrund der ähnlichen Werte zum Phloroglucinol ( $\delta_C$  94,1 ppm;  $\delta_H$  5,7 ppm, s) identifiziert werden (siehe 3.1.3.1.1, Seite 76).

Die **Geranyl-Seitenkette** konnte im  $^{13}C$ -NMR Spektrum aufgrund typischer Signale der beiden quartären C-Atome C-9 ( $\delta_C$  139,5 ppm) und C-14 ( $\delta_C$  132,0 ppm) sowie der beiden jeweils benachbarten Methin-Gruppen C-8 ( $\delta_C$  121,7 ppm) und C-13 ( $\delta_C$  123,6 ppm) erahnt werden. Im  $^1H$ -NMR Spektrum zeigten die beiden Methingruppen eine Signalaufspaltung in Triplets, wobei die dem C-8 benachbarte Methylengruppen H-7 ( $\delta_H$  3,38 ppm) ein Dublett ergab. Die Nähe zum Aromaten macht sich auch in der Tieffeldverschiebung (+ 0,23 ppm) von H-8 ( $\delta_H$  5,28 ppm, t,  $J = 6,7$  Hz) im Vergleich zu H-13 ( $\delta_H$  5,05 ppm, t,  $J = 6,6$  Hz) bemerkbar. Bestätigt werden konnte die Vermutung mittels Kreuzsignalen im COSY-Spektrum (**Abbildung 66**).



**Abbildung 66:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum der Geranylseitenkette von **1** mit Kreuzsignalen von H-8 und H<sub>2</sub>-7 sowie H-13 und H<sub>2</sub>-12

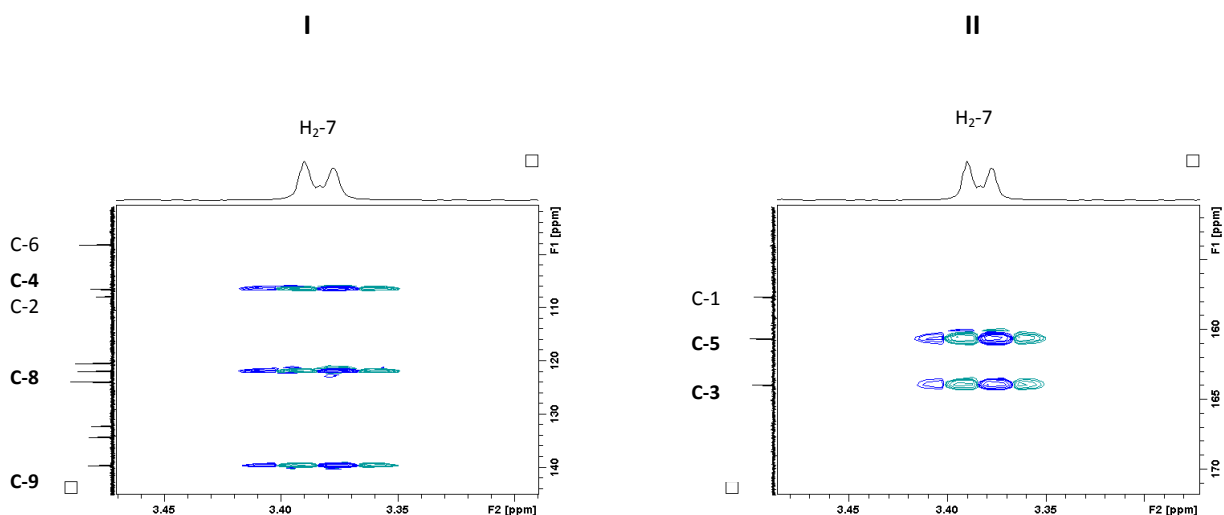
Die **aliphatische Acyl-Seitenkette** in Form einer Isobutyryl-Gruppe konnte im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum aufgrund des tieffeldverschobenen quartären C-Atoms der Carbonylgruppe C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  211,4 ppm) und im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum durch ein Septett C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  38,8 ppm;  $\delta_{\text{H}}$  3,95 ppm,  $J = 6,7$  Hz) eindeutig erkannt werden. Die HMBC-Korrelationen zu den benachbarten Methylgruppen C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  19,5 ppm) und C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  19,6 ppm) sowie zum C-1' sind in HMBC-Spektrum (**Abbildung 67**) zu sehen.



**Abbildung 67:** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **1** mit Korrelationen von I) H-2' zu C-1' und II) C-3' sowie C-4'

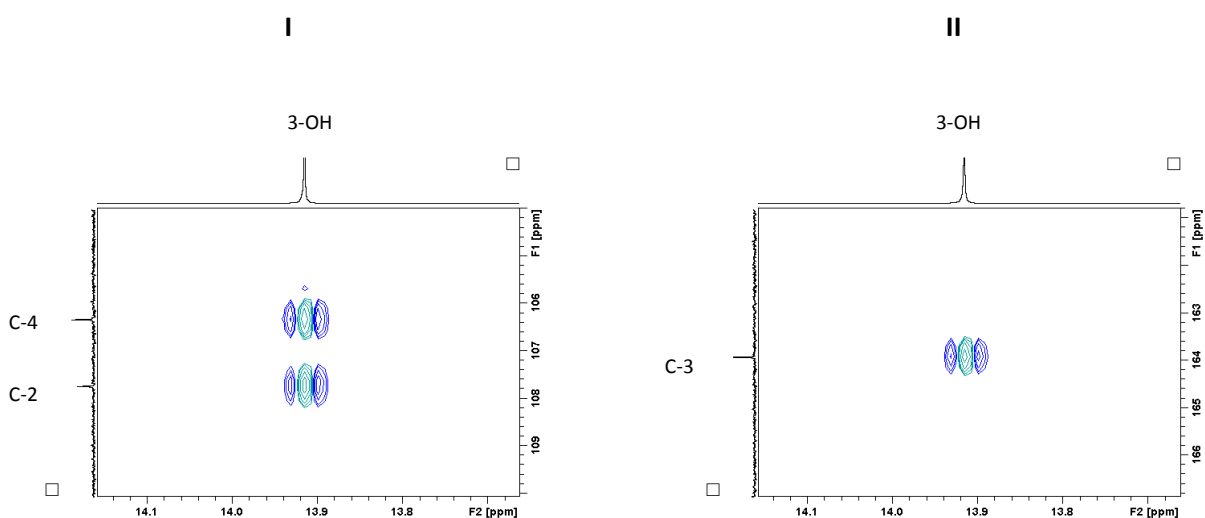
Des Weiteren konnte ein Limonen-Rest identifiziert werden. Die Signale im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum zeigten die gleichen charakteristischen Verschiebungen und Signalaufspaltungen wie in der Literatur für das Limonen beschrieben sind (Aggarwal et al. 2002). Nur das Kohlenstoff-Atom in Position C-8'' ( $\delta_{\text{C}}$  86,1 ppm) war tieffeldverschoben, was auf die Verknüpfung mit einer OH-Gruppe des Acylphloroglucinols hindeutete.

Die Verknüpfung der Geranylgruppe in Position C-4 des Aromaten konnte mit Hilfe der HMBC-Korrelationen der Protonen der Methylen-Gruppe in Position 7 ( $\delta_{\text{C}}$  21,6 ppm;  $\delta_{\text{H}}$  3,38 ppm, d,  $J = 7,4$  Hz) mit den Kohlenstoffatomen C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  163,9 ppm) und C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  106,3 ppm) sowie C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  160,6 ppm) erkannt werden (**Abbildung 68**, S. 84).



**Abbildung 68:** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum der Geranylseitenkette von **1** mit Korrelationen von  $H_2-7$  zu **I**) C-4, C-8 und C-9 sowie **II**) C-3 und C-5

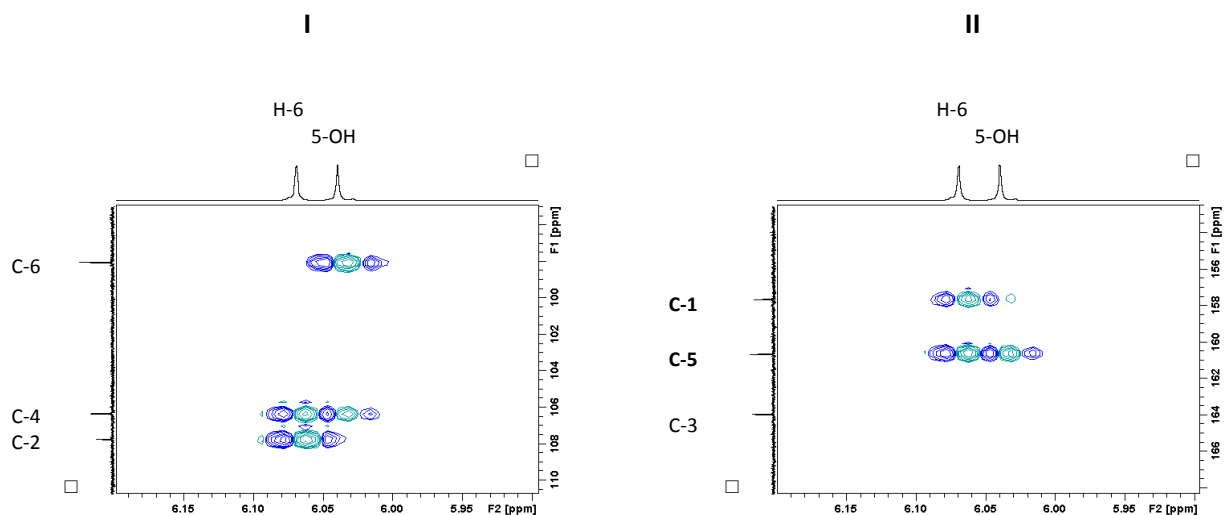
Die Acyl-Seitenkette konnte über HMBC-Kopplungen des wasserstoffbrücken-gebundenen Protons des 3-OH ( $\delta_H$  13,91 ppm, s) mit dem C-3 ( $\delta_C$  163,9 ppm) und dem C-1' ( $\delta_C$  211,4 ppm) in meta-Position zum Geranyl-Rest eindeutig zugeordnet werden (**Abbildung 69**).



**Abbildung 69:** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **1** mit Korrelationen von 3-OH zu **I**) C-2 und C-4 sowie **II**) C-3

Die Position des Limonen-Restes konnte nicht über HMBC-Korrelationen bestimmt werden, weil über die Etherbrücke keine Kopplungen zu sehen waren. Allerdings lieferte die Hochfeldverschiebung des C-1 ( $\delta_C$  157,6 ppm), im Vergleich zu den beiden hydroxylierten C-3 ( $\delta_C$  163,9 ppm) und C-5 ( $\delta_C$  160,6 ppm), einen Hinweis für die Verknüpfung des Limonen-Restes an C-1. Den Beweis für die Position des Terpen-Restes lieferten NOE Interaktionen im

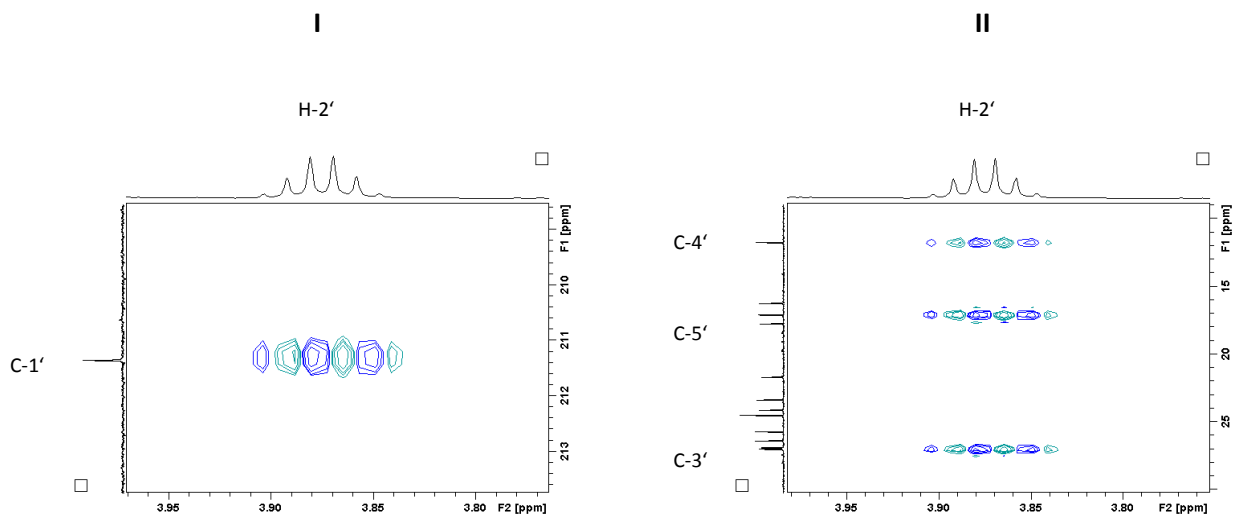
ROESY-Spektrum. Das verbleibende Proton des Aromaten an C-6 ( $\delta_C$  98,0 ppm;  $\delta_H$  6,04 ppm, s) zeigte im HMBC-Spektrum folgerichtig  $^2J$  Kopplungen zu C-1 und C-5 sowie  $^3J$  Kopplungen zu C-2 und C-4, nicht aber zu C-3 (**Abbildung 70**).



**Abbildung 70:** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **1**; I) Korrelationen von 5-OH zu C-4 und C-6 sowie H-6 zu C-2 und C-4; II) Korrelationen von H-6 zu C-1 und C-5 sowie 5-OH zu C-5

Somit konnte Substanz **1** eindeutig als 4-Geranyl-1-O-(p-menthen-8''-yl)-2-(2'-methylpropionyl)-phloroglucinol bestimmt und Empetrifelixin A benannt werden.

Substanz **2** unterschied sich aufgrund ihres HREI-Massenspektrums von  $m/z$  482,3389, was einer Summenformel von  $C_{31}H_{46}O_4$  (berechnet für 482,3396) entsprach, in nur 14 Masseneinheiten von Substanz **1**. Im HSQC-Spektrum waren Signale einer zusätzlichen Methylengruppe ( $\delta_C$  26,9 ppm,  $\delta_H$  1,75 ppm,  $m/1,42$  ppm, m) zu sehen. Dieses, sowie eine Methingruppe in Position C-2' ( $\delta_C$  45,3 ppm,  $\delta_H$  3,87 ppm), welche im Protonenspektrum ein Sextett anstatt eines Septetts zeigte, ließ die Vermutung zu, dass es sich hier um das 2-Methylbutyryl-Derivat von Substanz **1** handelte. Bei sonst nahezu identischen NMR-Daten (**Tabelle 23**, S. 81), konnte aufgrund der Korrelationen von H-2' mit den benachbarten Kohlenstoffatomen C-1' und C-3' bis C-5' im HMBC-Spektrum (**Abbildung 71**, S. 86) die Variation der Acyl-Seitenkette bestätigt werden.



**Abbildung 71:** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **2** mit Korrelation von H-2' mit I) C-1' und II) C-3', C-4' und C-5'

Somit konnte Substanz **2** eindeutig als 4-Geranyl-1-O-(p-menthen-8''-yl)-2-(2'-methylbutyryl)-phloroglucinol identifiziert und als Empetrifelixin B benannt werden.

## 3.1.3.2.2 Substanzen 3 und 4 (Empetrifelixin C und D)

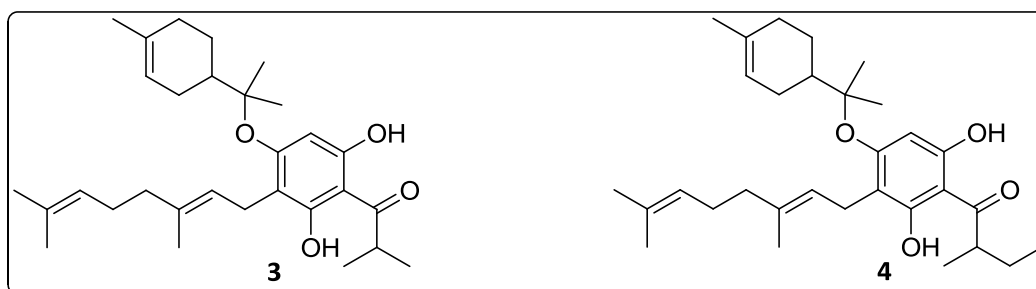
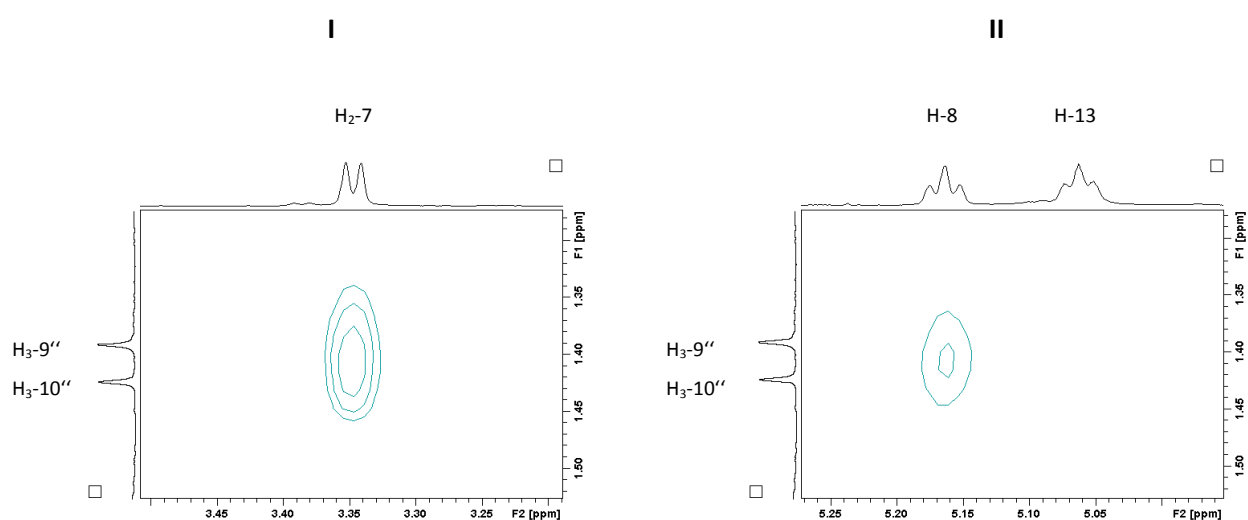


Abbildung 72: Substanzen 3 und 4

Tabelle 24:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 3 und 4 in  $\text{CDCl}_3$ 

| C/H  | 3                   |                                    | 4                   |                                    |
|------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) |
| 1    | 162,6               |                                    | 162,5               |                                    |
| 2    | 109,8               |                                    | 109,8               |                                    |
| 3    | 159,0               |                                    | 159,1               |                                    |
| 4    | 104,8               |                                    | 105,3               |                                    |
| 5    | 160,1               |                                    | 160,1               |                                    |
| 6    | 99,5                | 6,21 (1H, s)                       | 99,5                | 6,20 (1H, s)                       |
| 7    | 22,4                | 3,34 (2H, d, 6,9)                  | 22,4                | 3,34 (2H, d, 6,9)                  |
| 8    | 121,9               | 5,16 (1H, t, 6,6)                  | 121,9               | 5,16 (1H, t, 7,0)                  |
| 9    | 139,3               |                                    | 139,6               |                                    |
| 10   | 39,6                | 2,07 (2H, m)                       | 39,6                | 2,08 (2H, m)                       |
| 11   | 16,2                | 1,81 (3H, s)                       | 16,2                | 1,81 (3H, s)                       |
| 12   | 26,3                | 2,11 (2H, m)                       | 26,3                | 2,11 (3H, s)                       |
| 13   | 123,6               | 5,05 (1H, t, 6,6)                  | 123,6               | 5,06 (1H, t, 6,6)                  |
| 14   | 131,9               |                                    | 131,9               |                                    |
| 15   | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       |
| 16   | 17,6                | 1,59 (3H, s)                       | 17,6                | 1,60 (3H, s)                       |
| 1'   | 210,6               |                                    | 210,4               |                                    |
| 2'   | 39,2                | 3,88 (1H, sept, 6,7)               | 45,9                | 3,74 (1H, sext, 6,6)               |
| 3'   | 19,2                | 1,16 (3H, d, 6,7)                  | 26,8                | 1,40 (m)                           |
|      |                     |                                    |                     | 1,82 (m)                           |
| 4'   | 19,2                | 1,16 (3H, d, 6,7)                  | 11,9                | 0,90 (3H, t, 7,3)                  |
| 5'   |                     |                                    | 16,7                | 1,14 (3H, d, 6,7)                  |
| 1''  | 134,0               |                                    | 134,0               |                                    |
| 2''  | 120,4               | 5,38 (1H, bs)                      | 120,4               | 5,38 (1H, bs)                      |
| 3''  | 26,6                | 1,91 (m)                           | 26,6                | 1,91 (m)                           |
|      |                     | 2,07 (m)                           |                     | 2,07 (m)                           |
| 4''  | 44,1                | 2,04 (1H, m)                       | 44,1                | 2,04 (1H, m)                       |
| 5''  | 24,2                | 1,37 (m)                           | 24,2                | 1,38 (m)                           |
|      |                     | 1,88 (m)                           |                     | 1,89 (m)                           |
| 6''  | 30,9                | 2,00 (2H, m)                       | 30,9                | 2,01 (2H, m)                       |
| 7''  | 23,3                | 1,65 (3H, s)                       | 23,3                | 1,65 (3H, s)                       |
| 8''  | 84,8                |                                    | 84,8                |                                    |
| 9''  | 24,3                | 1,39 (3H, s)                       | 24,2                | 1,39 (3H, s)                       |
| 10'' | 24,1                | 1,42 (3H, s)                       | 24,1                | 1,42 (3H, s)                       |
| 1-OH |                     | 12,14 (bs)                         |                     | 12,12 (bs)                         |
| 3-OH |                     | 7,57 (bs)                          |                     | 7,61 (bs)                          |

Die Summenformeln von Substanzen **3** und **4** konnten per HRESIMS bestimmt werden:  $C_{30}H_{44}O_4$  und  $C_{31}H_{46}O_4$ . Aufgrund ähnlicher  $^1H$ -NMR und  $^{13}C$ -NMR Daten, lag die Vermutung nahe, dass es sich um Stellungs-Isomere der beiden Substanzen **1** und **2** handeln könnte. Der Hauptunterschied lag in der Tieffeldverschiebung der OH-Gruppe ( $\delta_H$  7,57 ppm und 7,61 ppm, beide bs), welche mit C-3 ( $\delta_C$  159,0 und 159,1 ppm) verknüpft war. Zusätzlich konnten Kreuzsignale der beiden Methylgruppen des Limonen-Restes  $H_3-9''$  und  $H_3-10''$  ( $\delta_H$  1,39 ppm, s und 1,42 ppm, s) und der Methylen-Gruppe  $H_2-7$  ( $\delta_H$  3,34 ppm, d,  $J = 6,9$  Hz) sowie der Methin-Gruppe  $H-8$  ( $\delta_H$  5,16 ppm, t,  $J = 6,6$  Hz) des Geranyl-Restes im NOE-Spektrum gefunden werden (**Abbildung 73**).



**Abbildung 73:** Ausschnitte aus dem NOE-Spektrum von **3** mit Interaktionen von  $H_3-9''$  und  $H_3-10''$  zu I)  $H_2-7$  und II)  $H-8$

Da die wasserstoffbrücken-gebundenen Protonen der OH-Gruppen in Position C-1 ( $\delta_H$  12,14 und 12,12 ppm, beide bs) ebenfalls vorhanden waren, konnte die Limonen-Einheit nur mit der Hydroxylgruppe in Position C-5 ( $\delta_C$  160,1 ppm) des Aromaten verknüpft sein.

Substanz **3** wurde als 4-Geranyl-5-O-(p-menthen-8''-yl)-2-(2'-methylpropionyl)-phloroglucinol identifiziert und konsequenterweise Empetrifelixin C benannt.

Bei Substanz **4** handelte es sich um das Methylbutyrylderivat 4-Geranyl-5-O-(p-menthen-8''-yl)-2-(2'-methylbutyryl)-phloroglucinol und erhielt den Trivialnamen Empetrifelixin D.

## 3.1.3.2.3 Substanzen 5 (Empetrikajaforin) und 6

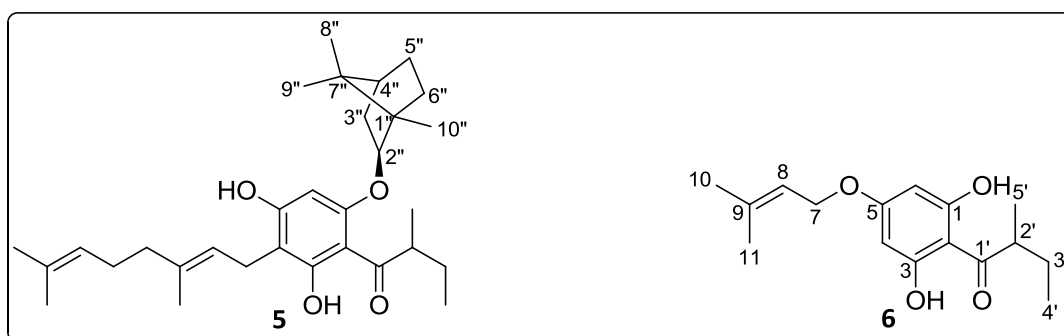
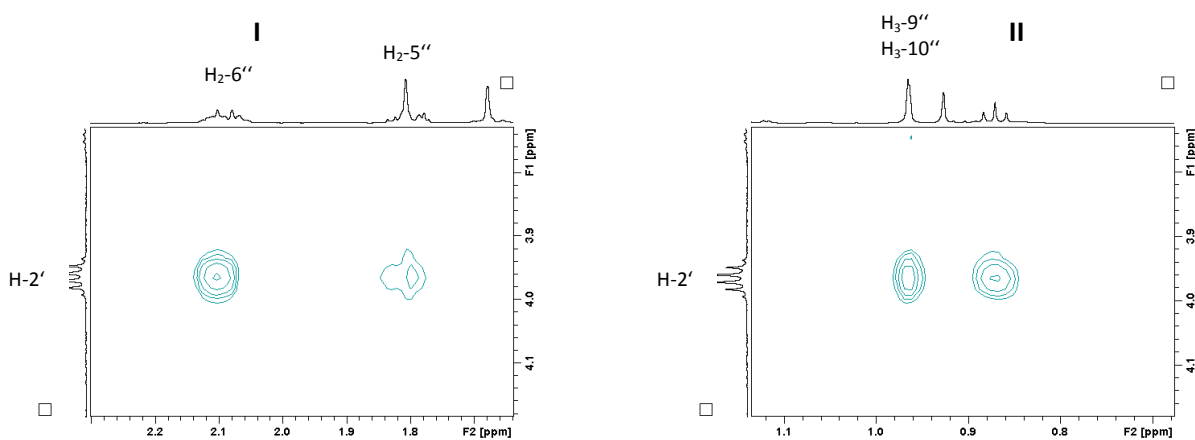


Abbildung 74: Substanzen 5 und 6

Tabelle 25:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 5 und 6 in  $\text{CDCl}_3$ 

| C/H  | 5                   |                                    | 6                   |                                    |
|------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) |
| 1    | 160,7               |                                    | 163,1               |                                    |
| 2    | 105,5               |                                    | 104,4               |                                    |
| 3    | 164,9               |                                    | 164,5               |                                    |
| 4    | 105,7               |                                    | 95,1                | 5,92 (1H, s)                       |
| 5    | 161,5               |                                    | 164,5               |                                    |
| 6    | 92,9                | 5,75 (1H, s)                       | 95,1                | 5,92 (1H, s)                       |
| 7    | 21,5                | 3,38 (2H, d, 7,2)                  | 65,0                | 4,49 (2H, d, 6,7)                  |
| 8    | 121,7               | 5,28 (1H, t, 7,2)                  | 118,6               | 5,44 (1H, t, 6,7)                  |
| 9    | 139,6               |                                    | 139,1               |                                    |
| 10   | 39,7                | 2,08 (2H, m)                       | 25,8                | 1,79 (3H, s)                       |
| 11   | 16,2                | 1,81 (3H, s)                       | 18,2                | 1,73 (3H, s)                       |
| 12   | 26,3                | 2,10 (2H, m)                       |                     |                                    |
| 13   | 123,6               | 5,05 (1H, t, 6,8)                  |                     |                                    |
| 14   | 132,0               |                                    |                     |                                    |
| 15   | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       |                     |                                    |
| 16   | 17,7                | 1,59 (3H, s)                       |                     |                                    |
| 1'   | 210,6               |                                    | 209,9               |                                    |
| 2'   | 45,5                | 3,96 (1H, sext, 6,8)               | 45,9                | 3,70 (1H, sext, 6,4)               |
| 3'   | 26,4                | 1,46 (m)                           | 26,8                | 1,40 (m)                           |
|      |                     | 1,80 (m)                           |                     | 1,84 (m)                           |
| 4'   | 11,7                | 0,87 (3H, t, 7,4)                  | 11,9                | 0,91 (3H, t, 7,4)                  |
| 5'   | 17,8                | 1,17 (3H, d, 6,9)                  | 16,5                | 1,16 (3H, d, 6,7)                  |
| 1''  | 49,5                |                                    |                     |                                    |
| 2''  | 85,5                | 4,38 (1H, m)                       |                     |                                    |
| 3''  | 37,3                | 1,12 (m)                           |                     |                                    |
|      |                     | 2,45 (m)                           |                     |                                    |
| 4''  | 44,7                | 1,77 (1H, m)                       |                     |                                    |
| 5''  | 27,9                | 1,25 (m)                           |                     |                                    |
|      |                     | 1,80 (m)                           |                     |                                    |
| 6''  | 27,3                | 1,42 (m)                           |                     |                                    |
|      |                     | 2,10 (m)                           |                     |                                    |
| 7''  | 47,7                |                                    |                     |                                    |
| 8''  | 19,7                | 0,92 (3H, s)                       |                     |                                    |
| 9''  | 19,0                | 0,96 (3H, s)                       |                     |                                    |
| 10'' | 14,0                | 0,96 (3H, s)                       |                     |                                    |
| 1-OH |                     |                                    |                     | 9,72 (bs)                          |
| 3-OH |                     | 14,57 (s)                          |                     | 9,72 (bs)                          |
| 5-OH |                     | 6,11 (s)                           |                     |                                    |

Die HREIMS von Substanz **5** ergab eine Summenformel von  $C_{31}H_{46}O_4$  (gefunden: 482,3396  $[M]^+$ , berechnet: 482,3396  $[M]^+$ ) und somit das gleiche Molekulargewicht wie Empetrifelixin B. Auch die  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR Daten beider Substanzen unterschieden sich nur im Bereich des Monoterpen-Restes. Die zehn Kohlenstoffatome konnten mittels  $^{13}C$ -NMR Spektrum in zwei quartäre Kohlenstoffatome C-1'' ( $\delta_C$  49,5 ppm) und C-7'' ( $\delta_C$  47,7 ppm), zwei Methin- ( $\delta_C$  44,7 ppm, C-4''; 85,5 ppm, C-2''), drei Methylen- ( $\delta_C$  37,3 ppm, C-3'', 27,9 ppm, C-5'', 27,3 ppm, C-6'') und drei Methyl- ( $\delta_C$  19,7 ppm, C-8'', 19,0 ppm, C-9'', 14,0 ppm, C-10'') Gruppen sortiert werden. Aufgrund der Zyklisierungsneigung des Limonens (Davis und Croteau 2000) lag die Vermutung nahe, es könnte sich um ein bi- oder trizyklisches Monoterpen-Derivat handeln. Ein unmittelbares Zyklisierungprodukt des Limonens stellt unter anderem das Borneol dar, wobei die  $^1H$ -NMR Daten des Bornan zur Identifizierung beitrugen (Tori et al. 1964, Abraham et al. 1989). Bis auf C-2'' ( $\delta_C$  85,5 ppm), welches durch die Bindung über eine Etherbrücke am Phloroglucinol-Grundgerüst tieffeldverschoben war, stimmten die  $^{13}C$ -NMR Daten mit denen des Borneol weitestgehend überein (Orihara und Furuya 1993). Die Position des Bornyl-Restes konnte zum Einen über den Tieffeldshift des C-1 ( $\delta_C$  160,7 ppm) im Vergleich zum C-1 ( $\delta_C$  157,6 ppm) der Substanz **1**, welcher durch die erhöhte Ringspannung im Bornan, den damit verbundenen stärkeren Elektronenzug und somit einer Entschirmung zustande kommt, erklärt werden. Zum Anderen waren NOE-Interaktionen von H-2' ( $\delta_H$  3,96 ppm, sext,  $J = 6,8$  Hz) zu H<sub>2</sub>-5'' ( $\delta_H$  1,80 ppm, m) und H<sub>2</sub>-6'' ( $\delta_H$  2,10 ppm, m) sowie zu den beiden Methylgruppen, H<sub>3</sub>-9'' und H<sub>3</sub>-10'' (beide  $\delta_H$  0,96 ppm, jeweils s) des Bornan-Restes zu sehen und konnten als zusätzliches Argument für die Verknüpfung mit Position C-1 des Aromaten angeführt werden (**Abbildung 75**).



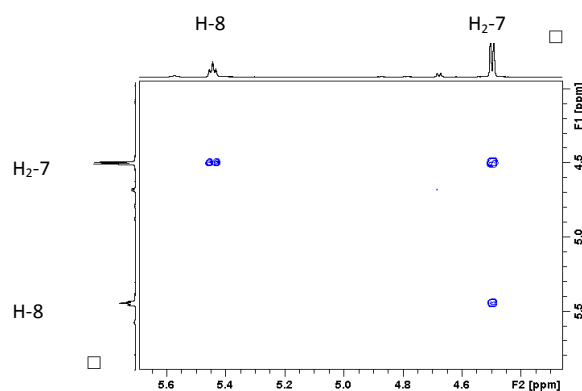
**Abbildung 75:** Ausschnitte aus dem NOE-Spektrum von **5** mit Interaktionen des H-2' mit I) H<sub>2</sub>-6'' und H<sub>2</sub>-5'' sowie II) den beiden Methylgruppen H<sub>3</sub>-9'' und H<sub>3</sub>-10'' des Bornan-Restes

Somit konnte Substanz **5** als 1-O-(Bornan-2''-yl)-4-geranyl-2-(2'-methylbutyryl)-phloroglucinol identifiziert und als Empetrikajaforin benannt werden.

Substanz **6** wurde bereits aus *Leontonyx squarrosus* (Bohlmann und Suwita 1978) und *Helichrysum crispum* (Bohlmann und Suwita 1979) isoliert. Beide gehören zur Familie der Asteraceae. In der vorliegenden Arbeit konnte das Vorkommen in der Gattung *Hypericum* zum ersten Mal beschrieben werden.

Die  $^1\text{H-NMR}$  Daten wurden mit denen in der Arbeit von (Bohlmann und Suwita 1978) verglichen, und auch aufgrund der HMBC und NOESY Daten konnte die Struktur eindeutig aufgeklärt werden. Ergänzt werden konnten auch die  $^{13}\text{C-NMR}$  Daten sowie weitere physikalische Kenndaten.

Die Methingruppe H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  5,44 ppm, t,  $J = 6,7$  Hz) des Prenylrestes zeigte im COSY-Spektrum (**Abbildung 76**) Kopplungen zur Methylengruppe H<sub>2</sub>-7 ( $\delta_{\text{H}}$  4,49 ppm, d,  $J = 6,7$  Hz), deren Kohlenstoffatom im  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum einen deutlichen Tieffeldshift ( $\delta_{\text{C}}$  65,0 ppm) zeigte.

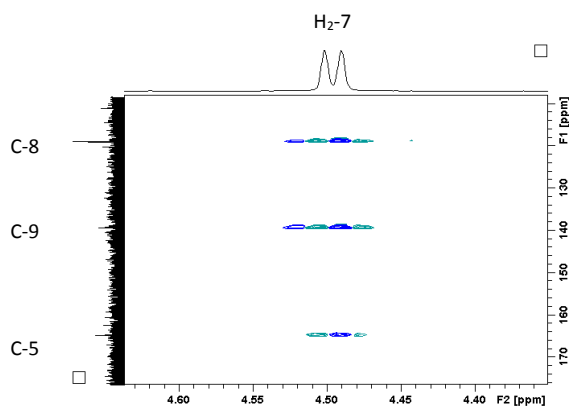


**Abbildung 76:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum des Prenylrestes von **6** mit Kreuzsignalen von H-8 und H<sub>2</sub>-7

Dieser Tieffeldshift konnte bei einer Verbindung aus *H. calycinum* ebenfalls beobachtet werden und war ein Indiz dafür, dass bei Substanz **6** ebenfalls eine O-Prenylierung des Phloroglucinols vorliegen musste (Decosterd et al. 1991). Bei C-prenylierten Verbindungen, wie z. B. den Hopfenbitterstoffen liegt die chemische Verschiebung der Methylengruppe im Bereich von  $\delta_{\text{C}}$  20 – 24 ppm (Borremans et al. 1975).

## 92 Ergebnisse und Diskussion

Bestätigt werden konnte die Position mittels HMBC-Korrelationen des H<sub>2</sub>-7 über die Etherbrücke zum C-5 ( $\delta_c$  164,5 ppm) des Aromaten, welche neben den Kopplungen zu C-8 ( $\delta_c$  118,6 ppm) und C-9 ( $\delta_c$  139,1 ppm) zu sehen waren (**Abbildung 77**).



**Abbildung 77:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **6** mit Korrelationen von H<sub>2</sub>-7 mit C-5, C-8 und C-9

## 3.1.3.2.4 Substanzen 7, 8 und 9 (Empetrikathiforin)

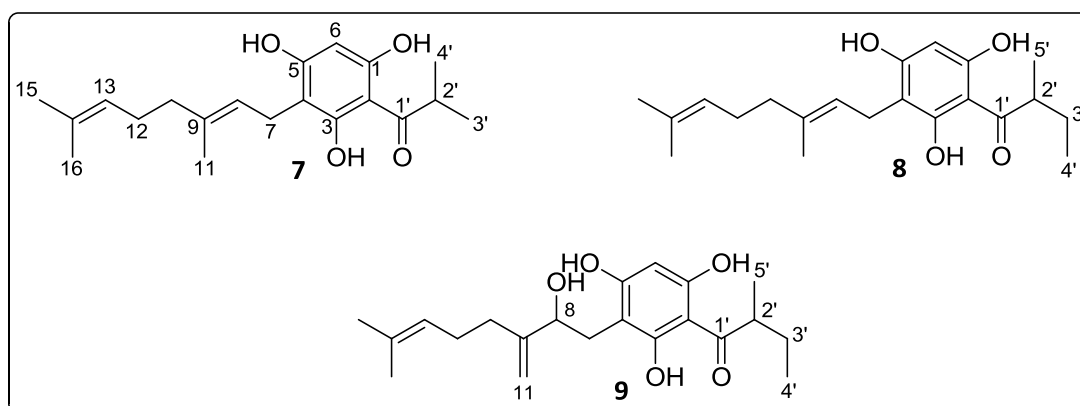


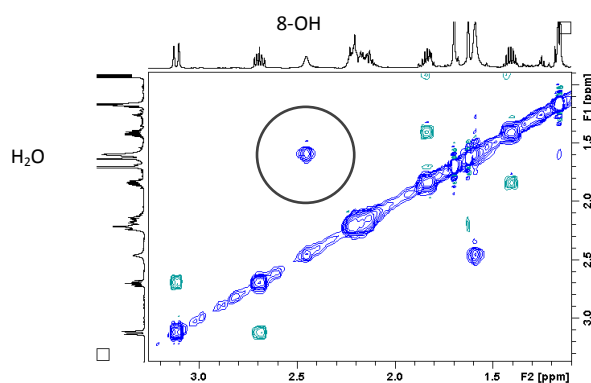
Abbildung 78: Substanzen 7, 8 und 9

Tabelle 26:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 7, 8 und 9 in  $\text{CDCl}_3$ 

| C/H  | 7                   |                                    | 8                   |                                    | 9                   |                                    |
|------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) |
| 1    | 159,9               |                                    | 159,9               |                                    | 160,3               |                                    |
| 2    | 104,1               |                                    | 104,8               |                                    | 104,8               |                                    |
| 3    | 162,6               |                                    | 162,6               |                                    | 163,5               |                                    |
| 4    | 105,6               |                                    | 105,6               |                                    | 105,5               |                                    |
| 5    | 160,6               |                                    | 160,7               |                                    | 161,7               |                                    |
| 6    | 95,4                | 5,83 (1H, s)                       | 95,4                | 5,82 (1H, s)                       | 95,5                | 5,86 (1H, s)                       |
| 7    | 21,6                | 3,38 (2H, d, 6,9)                  | 21,6                | 3,38 (1H, d, 7,0)                  | 29,1                | 2,69 (1H, m)<br>3,11 (1H, d, 7,1)  |
| 8    | 121,4               | 5,26 (1H, t, 7,1)                  | 121,4               | 5,26 (1H, t, 6,9)                  | 77,3                | 4,35 (1H, t, 7,1)                  |
| 9    | 140,1               |                                    | 140,1               |                                    | 151,0               |                                    |
| 10   | 39,6                | 2,09 (2H, m)                       | 39,6                | 2,09 (2H, m)                       | 32,1                | 2,13 (1H, m)<br>2,21 (1H, m)       |
| 11   | 16,2                | 1,81 (3H, s)                       | 16,2                | 1,82 (3H, s)                       | 109,2               | 4,91 (1H, s)<br>5,09 (1H, m)       |
| 12   | 26,2                | 2,11 (2H, m)                       | 26,2                | 2,11 (2H, m)                       | 26,4                | 2,18 (2H, m)                       |
| 13   | 123,5               | 5,05 (1H, t, 6,7)                  | 123,5               | 5,05 (1H, t, 6,6)                  | 123,7               | 5,14 (1H, t, 6,4)                  |
| 14   | 132,1               |                                    | 132,1               |                                    | 132,2               |                                    |
| 15   | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       | 25,6                | 1,68 (3H, s)                       | 25,6                | 1,69 (3H, s)                       |
| 16   | 17,6                | 1,59 (3H, s)                       | 17,7                | 1,60 (3H, s)                       | 17,7                | 1,62 (3H, s)                       |
| 1'   | 210,5               |                                    | 210,3               |                                    | 210,4               |                                    |
| 2'   | 39,2                | 3,87 (1H, sept, 6,7)               | 45,9                | 3,74 (1H, sext, 6,6)               | 45,9                | 3,77 (1H, sext, 6,6)               |
| 3'   | 19,2                | 1,17 (3H, d, 6,7)                  | 26,9                | 1,40 (m)<br>1,83 (m)               | 26,9                | 1,40 (m)<br>1,83 (m)               |
| 4'   | 19,2                | 1,17 (3H, d, 6,7)                  | 11,9                | 0,90 (3H, t, 7,3)                  | 11,9                | 0,91 (3H, t, 7,4)                  |
| 5'   |                     |                                    | 16,6                | 1,16 (3H, d, 6,7)                  | 16,6                | 1,16 (3H, d, 6,7)                  |
| 1-OH |                     | 8,31 (bs)                          |                     | 8,20 (bs)                          |                     | 7,73 (bs)                          |
| 3-OH |                     | 11,60 (bs)                         |                     | 11,75 (bs)                         |                     | 12,55 (bs)                         |
| 5-OH |                     | 5,97 (bs)                          |                     | 5,96 (bs)                          |                     | 7,73 (bs)                          |
| 8-OH |                     |                                    |                     |                                    |                     | 2,45 (s)                           |

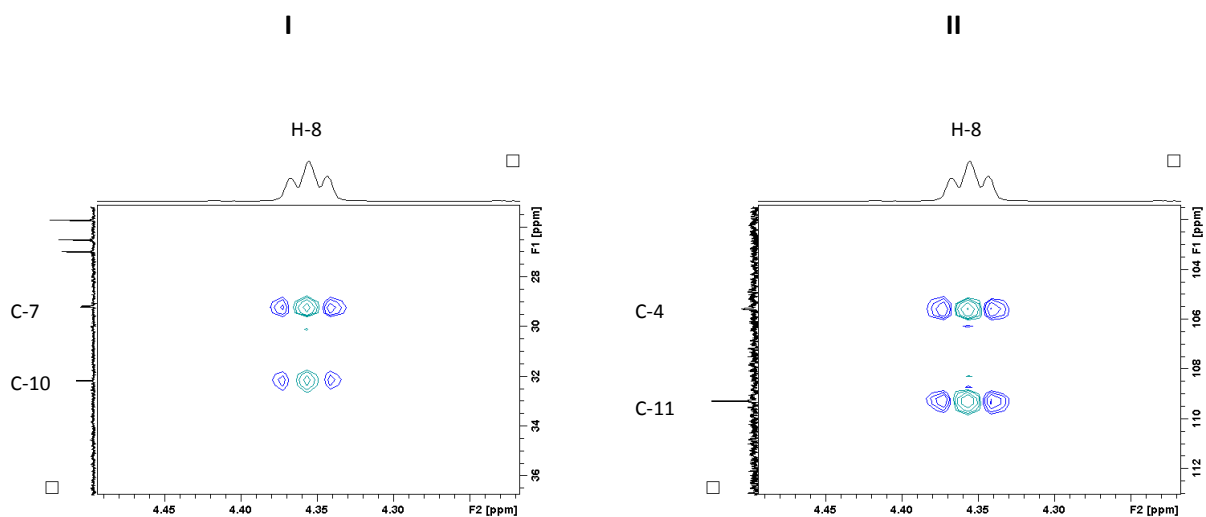
Die Substanzen **7** und **8** wurden bereits aus *Hypericum empetrifolium* isoliert (Crockett et al. 2008). Die NMR Daten stimmten mit den Literaturdaten überein und konnten somit eindeutig identifiziert werden.

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanz **9** zeigten Gemeinsamkeiten mit Substanz **8**, außer der Signale der Geranyl-Seitenkette in Position C-7 bis -11. Die Signale von C-8/H-8, deren Verschiebungen sich im Bereich einer Doppelbindung befanden ( $\delta_{\text{C}}$  121,4 ppm/ $\delta_{\text{H}}$  5,26 ppm) waren in den Bereich von hydroxylierten Methingruppen ( $\delta_{\text{C}}$  77,3/ $\delta_{\text{H}}$  4,35 ppm) hochfeldverschoben. Dies signalisierte eine OH-Gruppe in dieser Position, welche über den „Wasseraustauschpeak“ des Protons OH-8 ( $\delta_{\text{H}}$  2,45 ppm) mit dem  $\text{H}_2\text{O}$ -Signal ( $\delta_{\text{H}}$  1,59 ppm) im NOESY-Spektrum erkannt werden konnte (**Abbildung 79**).



**Abbildung 79:** Ausschnitt aus dem NOE-Spektrum von **9** mit der Korrelation 8-OH und dem  $\text{H}_2\text{O}$ . Das Kreuzsignal des „Wasseraustausches“ ist schwarz eingekreist.

Darüber hinaus waren die Signale der Methylgruppe von C-11/ $\text{H}_3$ -11 ( $\delta_{\text{C}}$  16,2 ppm/ $\delta_{\text{H}}$  1,82 ppm) durch charakteristische Signale einer Methylidin-Gruppe ( $\delta_{\text{C}}$  109,2 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  5,09 und 4,91 ppm) ersetzt. Der Kohlenstoff in C-9 war nach wie vor von quartärem Charakter, aber um  $\sim 11$  ppm ins Tieffeld verschoben ( $\delta_{\text{C}}$  140,1 ppm  $\rightarrow$  151,0 ppm), was den Beweis erbrachte, dass sich durch die Hydroxylierung in Position C-8, die Doppelbindung von C-8/C-9 nach C-9/C-11 verschob. In **Abbildung 80**, S. 95 sind die HMBC-Korrelationen von H-8 des hydroxylierten Kohlenstoffatoms zu den C-Atomen in Position C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  29,1 ppm) und C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  32,1 ppm, links) sowie zu C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  105,5 ppm) und C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  109,2 ppm) dargestellt.



**Abbildung 80:** Ausschnitte aus den HMBC-Spektren von **9** mit Korrelationen von H-8 zu **I**) C-7 und C-10 sowie **II**) C-4 und C-11

Die neue Verbindung **9** konnte anhand intensiver 2D NMR Analyse als 3-(2-Hydroxy-7-methyl-3-methyleneoct-6-enyl)-1-(2'-methylbutyryl)-phloroglucinol identifiziert und Empetrikathiforin benannt werden.

## 3.1.3.3 Bizyklische Acylphloroglucinole

## 3.1.3.3.1 Substanzen 10 und 11 (Empetrikarinen A und B)

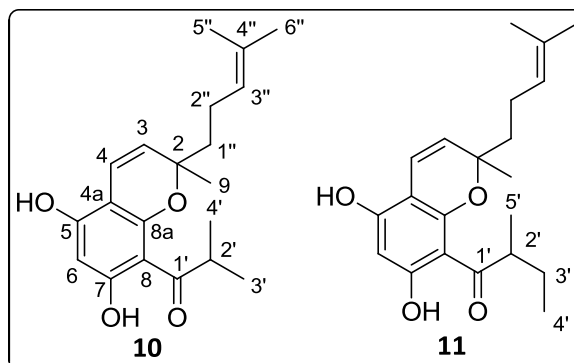


Abbildung 81: Substanzen 10 und 11

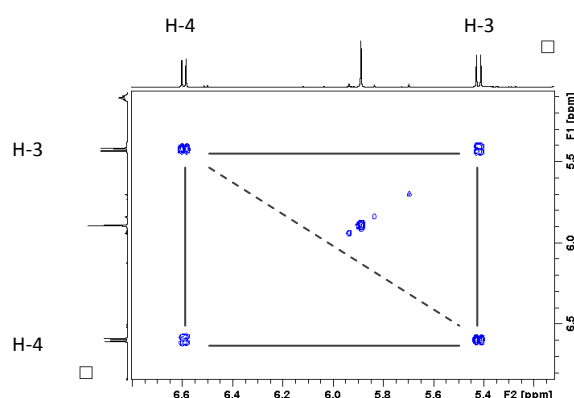
Tabelle 27:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 10 und 11 in  $\text{CDCl}_3$ 

| C/H  | 10                  |                                    | 11                  |                                    |
|------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) |
| 2    | 80,9                |                                    | 80,9                |                                    |
| 3    | 123,2               | 5,41 (1H, d, 10,0)                 | 123,3               | 5,41 (1H, d, 10,0)                 |
| 4    | 116,8               | 6,59 (1H, d, 10,0)                 | 116,8               | 6,59 (1H, d, 10,0)                 |
| 4a   | 101,5               |                                    | 101,5               |                                    |
| 5    | 157,2               |                                    | 157,1               |                                    |
| 6    | 96,1                | 5,88 (1H, s)                       | 96,1                | 5,88 (1H, s*)                      |
| 7    | 166,2               |                                    | 166,2               |                                    |
| 8    | 105,2               |                                    | 105,8               |                                    |
| 8a   | 156,8               |                                    | 156,8               |                                    |
| 9    | 26,5                | 1,44 (3H, s)                       | 26,5                | 1,44 (3H, s*)                      |
| 1'   | 210,4               |                                    | 210,3               |                                    |
| 2'   | 39,2                | 3,85 (1H, sept, 6,7)               | 46,0                | 3,75 (1H, sext*, 6,8)              |
| 3'   | 19,2                | 1,18 (3H, d, 6,7)                  | 26,8                | 1,41 (m)                           |
|      |                     |                                    |                     | 1,86 (m)                           |
| 4'   | 19,5                | 1,18 (3H, d, 6,7)                  | 11,8                | 0,91 (3H, t*, 7,4)                 |
| 5'   |                     |                                    | 17,1                | 1,16 (3H, d*, 6,9)                 |
| 1''  | 41,5                | 1,69 (m)                           | 41,6                | 1,68 (m)                           |
|      |                     | 1,86 (m)                           |                     | 1,87 (m)                           |
| 2''  | 23,1                | 2,07 (m)                           | 23,2                | 2,08 (m)                           |
|      |                     | 2,15 (m)                           |                     | 2,15 (m)                           |
| 3''  | 123,6               | 5,10 (1H, t, 7,2)                  | 123,6               | 5,09 (1H, t*, 7,1)                 |
| 4''  | 132,1               |                                    | 132,1               |                                    |
| 5''  | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       |
| 6''  | 17,5                | 1,57 (3H, s)                       | 17,6                | 1,57 (3H, s*)                      |
| 5-OH |                     | 5,38 (bs)                          |                     | 5,40 (bs)                          |
| 7-OH |                     | 13,83 (s)                          |                     | 13,87 (s*)                         |

\*Signale aufgrund von Epimeren verbreitert oder überlagert

Die Summenformel  $C_{20}H_{26}O_4$  der Substanz **10** wurde aus dem HRESI-Massenspektrum ermittelt, welches im negativen Ionisationsmodus ein Pseudomolekülion bei  $m/z$  von 329,1761  $[M - H]^-$  ergab. Mittels HSQC-Spektrum konnten acht quartäre C-Atome, fünf Methin, zwei Methylen und fünf Methylgruppen identifiziert werden. Die Anwesenheit einer aliphatischen Acylseitenkette konnte wie bei den monozyklischen Verbindungen aufgrund charakteristischer Signale im  $^{13}C$ -NMR Spektrum für C-1' ( $\delta_C$  210,4 ppm) und im  $^1H$ -NMR Spektrum für H-2' ( $\delta_H$  3,85 ppm, sept,  $J = 6,7$  Hz) vermutet werden. Im HMBC-Spektrum konnten Korrelationen einer Isobutyrylgruppe (C-1' bis C-4') gefunden werden, welche mit Position C-8 ( $\delta_C$  105,2 ppm) eines Phloroglucinolrings verknüpft war. Die Carbonylgruppe C-1' bildet eine Wasserstoffbrücke mit HO-7, was an der Tieffeldverschiebung des Singulett bei  $\delta_H$  13,83 ppm und des direkt gebundenen aromatischen C-7 ( $\delta_C$  166,2 ppm) deutlich wurde.

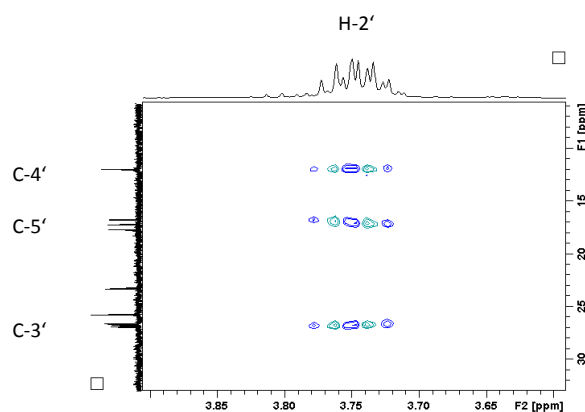
Eine zweite Hydroxylgruppe konnte in Position C-5 ( $\delta_C$  157,2 ppm) identifiziert werden, welche im  $^1H$ -NMR Spektrum ( $\delta_H$  5,38 ppm, bs) hochfeldverschoben war. Im Übrigen ähneln die NMR-Daten der bityklischen Verbindung 1-[5,7-dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)chroman-8-yl]-2-methylpropan-1-on (**16**), welche bereits aus *H. amblycalyx* (Winkelmann et al. 2003) isoliert werden konnte. Der Unterschied zwischen den beiden Verbindungen besteht lediglich in der zusätzlichen Doppelbindung C-3–C-4, mit den beiden Methin-Gruppen C-3 ( $\delta_C$  123,2 ppm,  $\delta_H$  5,41 ppm, d,  $J = 10,0$  Hz) und C-4 ( $\delta_C$  116,8 ppm,  $\delta_H$  6,59 ppm, d,  $J = 10,0$  Hz), deren Protonen (**Abbildung 82**) miteinander koppelten.



**Abbildung 82:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von **10** mit „Korrelationsquadrat“ der Kreuz- und Diagonalsignale von H-3 und H-4.

Substanz **10** wurde bestimmt als 1-[5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)chromen-8-yl]-2-methylpropan-1-on und Empetrikarinen A genannt.

Das HRESI-Massenspektrum von Substanz **11** zeigte ein Pseudomolekülion bei  $m/z$  343,1917  $[M - H]^-$ , was einer Summenformel von  $C_{21}H_{27}O_4$  (erfordert 343,1915) entsprach. Die Differenz von 14 Masseneinheiten war ein Hinweis auf die Anwesenheit auf eine zusätzliche Methylengruppe, was durch entsprechende Signale im  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR Spektrum ( $\delta_C$  26,8 ppm,  $\delta_H$  1,41 ppm, m/1,86 ppm, m) in Position C-3' sowie der Signalaufspaltung des H-2' ( $\delta_H$  3,75 ppm) in ein Sextett\* bestätigt werden konnte. Im HMBC-Spektrum (**Abbildung 83**) waren die Kopplungen zum C-3' aber auch zu den beiden Methylgruppen C-4' ( $\delta_C$  11,8 ppm) und C-5' ( $\delta_C$  17,1 ppm) zu finden.



**Abbildung 83:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **11** mit Korrelationen von H-2' mit C-3', C-4' und C-5'.

Substanz **11** wurde mittels spektroskopischer Analyse identifiziert als 1-[5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)chromen-8-yl]-2-methylbutan-1-on und Empetrikarinen B genannt.

## 3.1.3.3.2 Substanzen 12 und 13 (Empetrikarinol A und B)

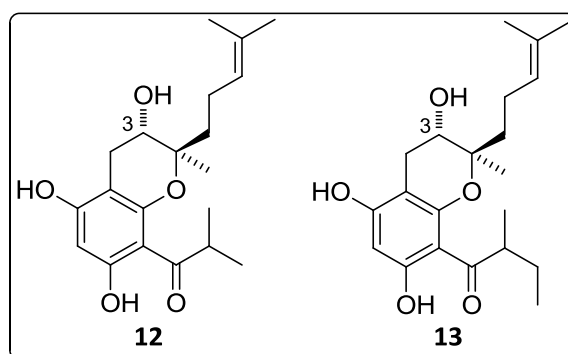


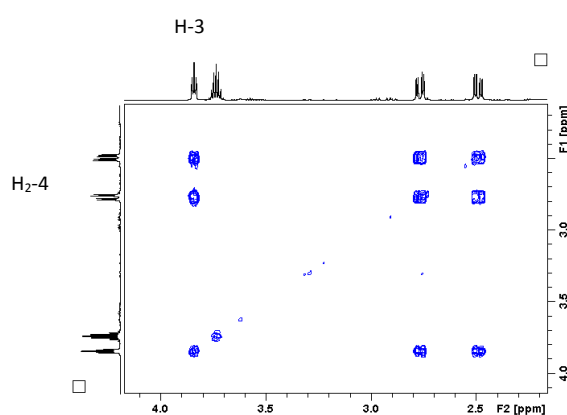
Abbildung 84: Substanzen 12 und 13

Tabelle 28:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 12 und 13 in  $\text{CDCl}_3$ 

| C/H  | 12                  |  | 13                  |  |
|------|---------------------|--|---------------------|--|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult ( <i>J</i> in Hz)           | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult ( <i>J</i> in Hz)             |
| 2    | 80,6                |  | 80,5                |  |
| 3    | 66,4                | 3,84 (1H, t, 5,8)                                    | 66,4                | 3,94 (1H, t*, 5,3)                                     |
| 4    | 25,5                | 2,48 (1H, dd, 16,5, 6,4)<br>2,76 (1H, dd, 16,5, 5,3) | 25,5                | 2,62 (1H, dd*, 16,6, 5,8)<br>2,86 (1H, dd*, 16,6, 5,3) |
| 4a   | 97,9                |  | 98,1                |  |
| 5    | 160,2               |  | 160,5               |  |
| 6    | 96,2                | 5,86 (1H, s)   | 96,2                | 5,96 (1H, s*)  |
| 7    | 165,5               |  | 165,3               |  |
| 8    | 105,2               |  | 105,7               |  |
| 8a   | 155,7               |  | 155,7               |  |
| 9    | 19,0                | 1,27 (3H, s)   | 19,3                | 1,39 (3H, s*)  |
| 1'   | 210,3               |  | 210,4               |  |
| 2'   | 39,3                | 3,73 (1H, sept, 6,7)                                 | 46,1                | 3,75 (1H, sext*, 6,6)                                  |
| 3'   | 19,2                | 1,06 (3H, 6,7)                                       | 26,9                | 1,40 (m)<br>1,80 (m)                                   |
| 4'   | 19,6                | 1,06 (3H, 6,7)                                       | 11,7                | 0,89 (3H, t*, 7,4)                                     |
| 5'   |                     |  | 16,5                | 1,15 (3H, d*, 6,6)                                     |
| 1''  | 37,4                | 1,58 (m)<br>1,66 (m)                                 | 37,3                | 1,68 (m)<br>1,75 (m)                                   |
| 2''  | 22,0                | 2,02 (m)   | 22,0                | 2,12 (m)   |
| 3''  | 123,4               | 4,97 (1H, t, 7,0)                                    | 123,3               | 5,08 (1H, t*, 7,0)                                     |
| 4''  | 132,5               |  | 132,5               |  |
| 5''  | 25,6                | 1,57 (3H, s)   | 25,6                | 1,67 (3H, s)   |
| 6''  | 17,6                | 1,48 (3H, s)   | 17,6                | 1,58 (3H, s*)  |
| 5-OH |                     | 5,91 (bs)  |                     | 6,48 (bs)  |
| 7-OH |                     | 13,78 (s)  |                     | 13,99 (s*)   |

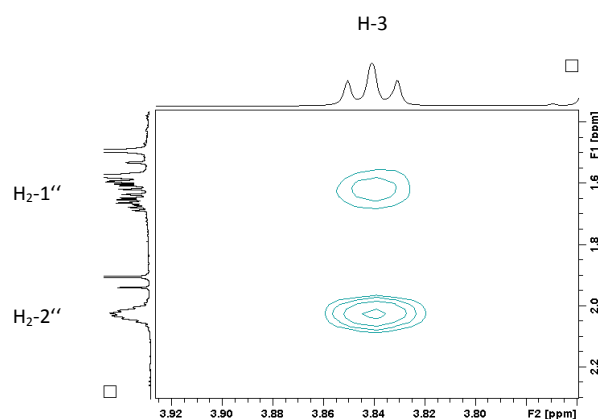
\*Signale aufgrund von Epimeren verbreitert oder überlagert

Das HREI-Massenspektrum von Substanz **12** ergab eine Summenformel von  $C_{20}H_{28}O_5$  (gefunden:  $m/z$  348,1938  $[M]^+$ , berechnet: 348,1937). Die  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR Daten waren denen von Substanz **16** sehr ähnlich, aber eine zusätzliche OH-Gruppe in Position C-3 ( $\delta_C$  66,4 ppm) bewirkte eine Verschiebung von C-2/C-4 ( $\delta_C$  80,6 ppm/25,5 ppm) ins Hochfeld. Im  $^{13}C$ -NMR Spektrum zeigten auch die Kohlenstoffatome C-1''/C-4a/C-9 ( $\delta_C$  37,4 ppm/97,9 ppm/19,0 ppm) eine geringe Hochfeldverschiebung. Im COSY Spektrum (**Abbildung 85**) sind die Kopplungen des H-3 mit der vicinalen Methylengruppe H<sub>2</sub>-4 sowie die Interaktionen deren geminalen Protonen anhand der Kreuzsignale deutlich zu erkennen.



**Abbildung 85:** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von **12**; H-3 zeigt je ein Kreuzsignale mit den beiden Protonen von H<sub>2</sub>-4

Die Bestimmung der relativen Konfiguration in C-2 und C-3 ergab sich aus den NOE-Interaktionen zwischen H-3 ( $\delta_H$  3,84 ppm, t,  $J = 5,8$  Hz) und H<sub>2</sub>-1'' ( $\delta_H$  1,58 ppm, m/1,66 ppm, m) sowie H<sub>2</sub>-2'' ( $\delta_H$  2,02 ppm, m, **Abbildung 86**).



**Abbildung 86:** Ausschnitt aus dem NOE-Spektrum von **12** mit Korrelationen von H-3 zu H<sub>2</sub>-1'' und H<sub>2</sub>-2''.

Aus den spektroskopischen Analysen konnte Substanz **12** als 1-[(2*R*\*,3*S*\*)-3,5,7-Trihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)chroman-8-yl]-2-methylpropano-1-on identifiziert und als Empetrikarinol A bezeichnet werden.

Die Summenformel von Substanz **13** konnte mittels HRESIMS als C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> bestimmt werden, wobei ein Pseudomolekülion bei  $m/z$  361,2024 [M - H]<sup>-</sup> (erfordert 361,2020) zur Berechnung diente. Die 1D- und 2D-NMR Daten sind denen von Substanz **12** ähnlich, bis auf eine zusätzliche Methylengruppe ( $\delta_C$  26,9 ppm,  $\delta_H$  1,40 ppm,  $m/1,80$  ppm,  $m$ ) in der aliphatischen Acyl-Seitenkette, welche die Differenz von 14 Masseneinheiten ausmachte.

Eindeutig bestätigt werden konnte die Variation zum 2-Methylbutyryl-Derivat durch die chemische Verschiebung von C-2' ( $\delta_C$  46,1 ppm) und die Multiplizität dessen korrespondierenden Protons ( $\delta_H$  3,75 ppm, sext,  $J = 6,6$  Hz).

Somit konnte die Struktur von Substanz **12** als 1-[(2*R*\*,3*S*\*)-3,5,7-Trihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)chroman-8-yl]-2-methylbutan-1-on aufgeklärt und fortlaufend als Empetrikarinol B bezeichnet werden.

## 3.1.3.3 Substanzen 14 und 15

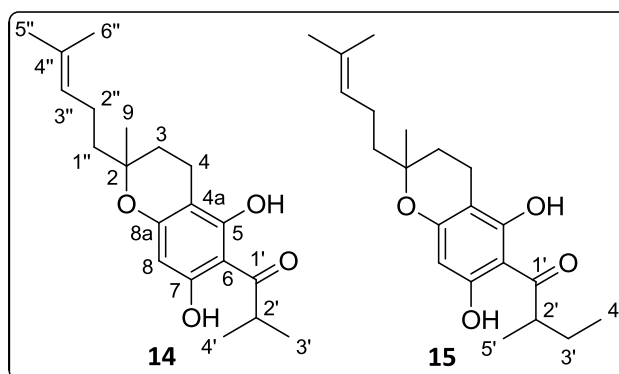


Abbildung 87: Substanzen 14 und 15

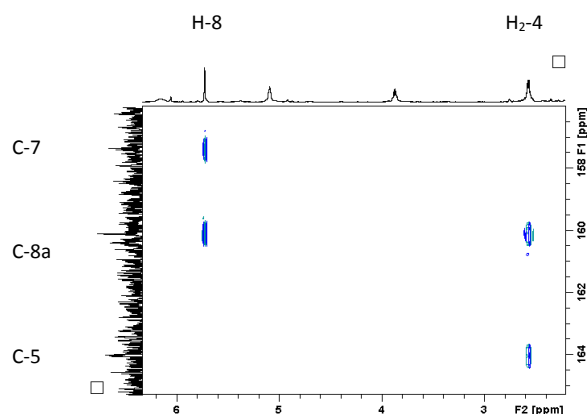
Tabelle 29:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 14 und 15 in  $\text{CDCl}_3$ 

| C/H  | 14                  |                                    | 15                  |                                    |
|------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) |
| 2    | 77,7                |                                    | 77,8                |                                    |
| 3    | 30,3                | 1,75 (m)<br>1,83 (m)               | 30,2                | 1,75 (m)<br>1,83 (m)               |
| 4    | 15,8                | 2,56 (2H, m)                       | 15,8                | 2,56 (m)                           |
| 4a   | 101,9               |                                    | 101,9               |                                    |
| 5    | 164,0               |                                    | 163,9               |                                    |
| 6    | 103,1               |                                    | 103,7               |                                    |
| 7    | 157,3               |                                    | 157,4               |                                    |
| 8    | 95,6                | 5,72 (1H, s)                       | 95,6                | 5,72 (1H, s)                       |
| 8a   | 160,1               |                                    | 160,0               |                                    |
| 9    | 24,0                | 1,28 (3H, s)                       | 24,0                | 1,29 (3H, s)                       |
| 1'   | 210,1               |                                    | 209,9               |                                    |
| 2'   | 39,1                | 3,86 (1H, sept, 6,7)               | 45,8                | 3,73 (1H, sext, 6,2)               |
| 3'   | 19,2                | 1,17 (3H, d, 6,4)                  | 26,9                | 1,40 (m)<br>1,84 (m)               |
| 4'   | 19,2                | 1,17 (3H, d, 6,4)                  | 11,9                | 0,91 (3H, t, 7,0)                  |
| 5'   |                     |                                    | 16,7                | 1,15 (3H, d, 6,3)                  |
| 1''  | 39,3                | 1,61 (m)                           | 39,4                | 1,61 (m)                           |
| 2''  | 22,2                | 2,06 (m)                           | 22,2                | 2,06 (m)                           |
| 3''  | 123,9               | 5,08 (1H, bt)                      | 123,9               | 5,08 (m)                           |
| 4''  | 131,8               |                                    | 131,8               |                                    |
| 5''  | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       | 25,6                | 1,67 (3H, s)                       |
| 6''  | 17,6                | 1,59 (3H, s)                       | 17,6                | 1,60 (3H, s)                       |
| 5-OH |                     | 13,55 (bs)                         |                     | 13,61 (bs)                         |
| 7-OH |                     | 6,14 (bs)                          |                     | 6,19 (bs)                          |

Die beiden bekannten Verbindungen **14** und **15** konnten durch den Vergleich ihrer  $^1\text{H-NMR}$  Daten mit den Literaturdaten identifiziert werden (Bohlmann und Zdero 1979). Für Substanz **14** wurden auch die  $^{13}\text{C-NMR}$  Daten bereits publiziert und konnten zur Strukturaufklärung herangezogen werden (Athanasas et al. 2004). Die fehlenden  $^{13}\text{C-NMR}$  und HRMS Daten, sowie das UV-Spektrum und die optische Drehung für Substanz **15** wurden in der vorliegenden Arbeit zur vollständigen Charakterisierung ermittelt. Darüber hinaus konnte das Vorkommen für Substanz **15** in der Gattung *Hypericum* zum ersten Mal beschrieben werden. Substanz **14** konnte schon in *Helichrysum*-Arten (Bohlmann und Zdero 1979), allerdings als synthetisches Derivat, nachgewiesen werden.

Die Strukturen der beiden Verbindungen unterscheiden sich im Vergleich zu denen von Substanz **1-4**, **7** und **8** nur in der Ringverknüpfung der Geranyl-Seitenkette zum Chroman-Ring, was zwei freie OH-Gruppen in ortho-Position zur Acyl-Seitenkette zur Folge hatte.

Dies konnte bei Substanz **14** durch die Wasserstoffbrücke des HO-5 ( $\delta_{\text{H}}$  13,55 ppm, bs) zur Carbonylgruppe C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  210,1 ppm) gezeigt werden, wohingegen bei Substanz **16** die entschirmte OH-Gruppe in Position C-7 ( $\delta_{\text{H}}$  13,83 ppm, s) mit dem C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  210,5 ppm) wasserstoffbrücken-gebunden war. Die Hochfeldverschiebung der zugehörigen Kohlenstoffatome ( $\delta_{\text{C}} \leq 164$  ppm anstatt  $> 165$  ppm) bestätigte die Vermutung. Das aromatische Proton an C-8 ( $\delta_{\text{H}}$  5,72 ppm, s) zeigte im HMBC-Spektrum Korrelationen mit dem quartären C-8a ( $\delta_{\text{C}}$  160,1 ppm), dem hydroxylierten C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  157,3 ppm) aber nicht mit dem zweiten hydroxylierten C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  164,0 ppm). Die Protonen der Methylengruppe H<sub>2</sub>-4 ( $\delta_{\text{H}}$  2,56 ppm, m) hingegen schon (**Abbildung 88**).



**Abbildung 88:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **14** mit Korrelationen von H-8 zu C-8a und C-7 sowie von H<sub>2</sub>-4 zu C-8a und C-5.

## 3.1.3.3.4 Substanzen 16 und 17

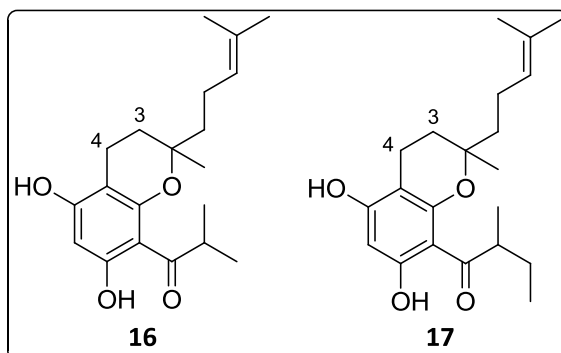


Abbildung 89: Substanzen 16 und 17

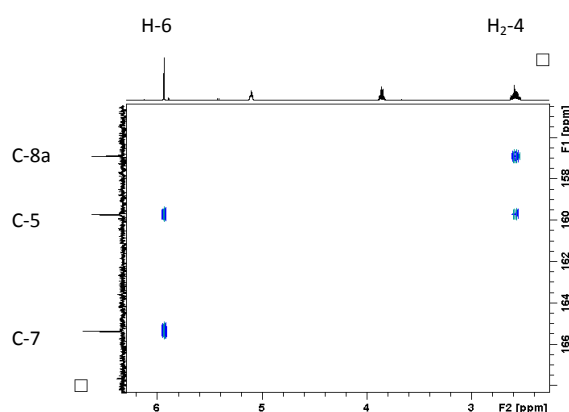
Tabelle 30:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 16 und 17

| C/H  | 16                  |                                    | 17                  |                                    |
|------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) |
| 2    | 78,3                |                                    | 78,3                |                                    |
| 3    | 29,1                | 1,77 (m)                           | 29,1                | 1,77 (m)                           |
|      |                     | 1,87 (m)                           |                     | 1,87 (m)                           |
| 4    | 16,0                | 2,58 (2H, m)                       | 16,5                | 2,58 (2H, m)                       |
| 4a   | 99,5                |                                    | 99,7                |                                    |
| 5    | 159,6               |                                    | 159,8               |                                    |
| 6    | 95,4                | 5,93 (1H, s)                       | 95,4                | 5,94 (1H, s*)                      |
| 7    | 165,3               |                                    | 165,1               |                                    |
| 8    | 105,5               |                                    | 106,0               |                                    |
| 8a   | 156,8               |                                    | 156,9               |                                    |
| 9    | 23,7                | 1,35 (3H, s)                       | 24,0                | 1,36 (3H, s*)                      |
| 1'   | 210,5               |                                    | 210,5               |                                    |
| 2'   | 39,2                | 3,85 (1H, sept, 6,7)               | 46,0                | 3,77 (1H, sext*, 6,8)              |
| 3'   | 19,1                | 1,16 (3H, d, 6,7)                  | 26,8                | 1,40 (m)                           |
|      |                     |                                    |                     | 1,80 (m)                           |
| 4'   | 19,7                | 1,16 (3H, d, 6,7)                  | 11,9                | 0,89 (3H, t*, 7,4)                 |
| 5'   |                     |                                    | 16,6                | 1,14 (3H, d*, 6,8)                 |
| 1''  | 39,8                | 1,71 (m)                           | 39,6                | 1,70 (m)                           |
| 2''  | 22,5                | 2,08 (m)                           | 22,5                | 2,09 (m)                           |
| 3''  | 123,6               | 5,10 (1H, t, 7,1)                  | 123,6               | 5,09 (1H, t*, 6,8)                 |
| 4''  | 132,1               |                                    | 132,1               |                                    |
| 5''  | 25,6                | 1,69 (3H, s)                       | 25,6                | 1,68 (3H, s)                       |
| 6''  | 17,5                | 1,61 (3H, s)                       | 17,6                | 1,60 (3H, s*)                      |
| 5-OH |                     | 5,37 (bs)                          |                     | 5,60 (bs)                          |
| 7-OH |                     | 13,83 (s)                          |                     | 13,92 (s*)                         |

\* Signale sind aufgrund von Epimeren verbreitert oder überlagert

Die beiden Substanzen **16** und **17** wurden bereits aus *H. amblycalyx* (Winkelmann et al. 2003), Verbindung **16** zusätzlich auch aus *H. jovis* (Athanasas et al. 2004) isoliert und charakterisiert. Die Literaturdaten der NMR- und MS-Experimente konnten somit verglichen und zur Identifizierung herangezogen werden.

Der entscheidende Unterschied zu Substanz **14** lag in den HMBC-Kopplungen des aromatischen H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  5,93 ppm, s) und der Methylengruppe in Position 4 ( $\delta_{\text{H}}$  2,58 ppm, m). Bei Substanz **16** koppelt C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  159,6 ppm) sowohl mit dem H<sub>2</sub>-4 als auch mit H-6, wohingegen C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  165,3 ppm) nur mit H-6 und C-8a ( $\delta_{\text{C}}$  156,8 ppm) nur mit H<sub>2</sub>-4 eine HMBC-Korrelation zeigte (**Abbildung 90**).



**Abbildung 90:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **16** mit Korrelationen von H-6 zu C-5 und C-7 sowie von H<sub>2</sub>-4 zu C-5 und C-8a.

Dies lieferte den Beweis dafür, dass Substanzen **14** und **16** sich nur in der Ringverknüpfung des Geranyl-Restes an C-4a unterscheiden.

## 3.1.3.4 Tri- und polyzyklische Acylphloroglucinole

## 3.1.3.4.1 Substanzen 18, 19 (Empetriferdinan A, B) und 20 (Empetriferdinol)

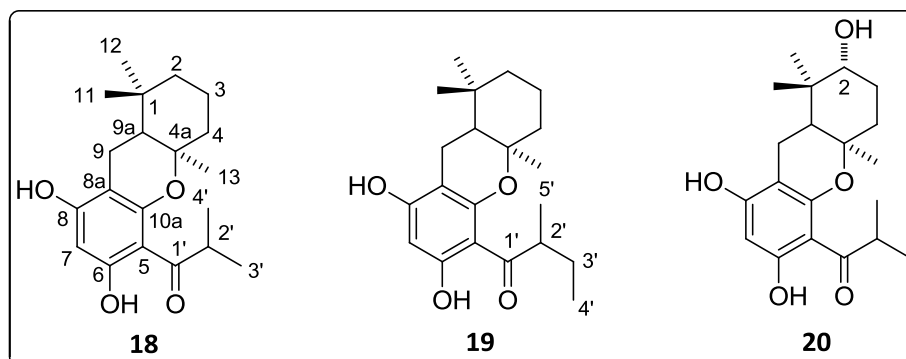


Abbildung 91: Substanzen 18, 19 und 20

Tabelle 31:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 18 - 20 in  $\text{CDCl}_3$ 

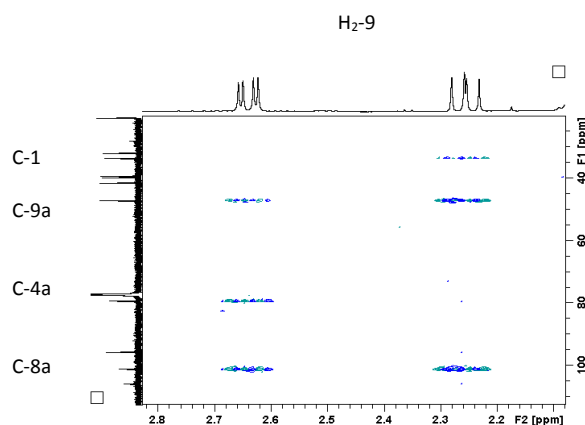
| C/H  | 18                  |   | 19                  |   | 20                  |   |
|------|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|---|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz)            | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz)              | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz)              |
| 1    | 33,4                |   | 33,4                |   | 38,4                |   |
| 2    | 41,3                | 1,35 (m)<br>1,53 (m)                          | 41,3                | 1,35 (m)<br>1,52 (m)                            | 77,9                | 3,45 (1H, t*, 4,5)                              |
| 3    | 19,6                | 1,58 (m)<br>1,69 (m)                          | 19,6                | 1,58 (m)<br>1,70 (m)                            | 28,1                | 1,64 (m)<br>1,90 (m)                            |
| 4    | 39,6                | 1,68 (m)<br>2,03 (m)                          | 39,7                | 1,68 (m)<br>2,03 (m)                            | 37,6                | 1,83 (m)<br>2,07 (m)                            |
| 4a   | 79,1                |   | 79,1                |   | 78,0                |   |
| 5    | 105,5               |   | 106,0               |   | 106,0               |   |
| 6    | 165,2               |   | 165,1               |   | 165,1               |   |
| 7    | 95,4                | 5,93 (1H, s)                                  | 95,4                | 5,94 (1H, s*)                                   | 95,7                | 5,94 (1H, s)                                    |
| 8    | 159,7               |   | 159,7               |   | 159,8               |   |
| 8a   | 100,8               |   | 101,0               |   | 100,5               |   |
| 9    | 17,3                | 2,25 (dd, 15,9, 13,3)<br>2,64 (dd, 15,9, 5,0) | 17,4                | 2,25 (dd*, 16,0, 13,4)<br>2,64 (dd*, 16,0, 4,9) | 17,3                | 2,35 (dd*, 15,5, 13,7)<br>2,67 (dd*, 16,0, 5,0) |
| 9a   | 47,0                | 1,63 (1H, dd, 13,3, 5,0)                      | 47,0                | 1,64 (m*)                                       | 45,8                | 1,64 (m*)                                       |
| 10a  | 156,2               |   | 156,3               |   | 156,0               |   |
| 11   | 31,9                | 1,02 (3H, s)                                  | 31,9                | 1,03 (3H, s)                                    | 27,2                | 1,13 (3H, s*)                                   |
| 12   | 20,5                | 0,93 (3H, s)                                  | 20,5                | 0,93 (3H, s)                                    | 14,2                | 0,90 (3H, s)                                    |
| 13   | 19,6                | 1,27 (3H, s)                                  | 19,7                | 1,38 (3H, s)                                    | 19,7                | 1,28 (3H, s)                                    |
| 1'   | 210,5               |   | 210,5               |   | 210,3               |   |
| 2'   | 39,2                | 3,80 (1H, sept, 6,7)                          | 45,9                | 3,69 (1H, sext*, 6,7)                           | 45,9                | 3,66 (1H, sext*, 6,6)                           |
| 3'   | 19,3                | 1,15 (3H, d, 6,7)                             | 26,8                | 1,38 (m)<br>1,82 (m)                            | 26,6                | 1,38 (m)<br>1,81 (m)                            |
| 4'   | 19,4                | 1,15 (3H, d, 6,7)                             | 11,8                | 0,88 (3H, t*, 7,4)                              | 11,9                | 0,88 (3H, t*, 7,4)                              |
| 5'   |                     |   | 16,9                | 1,13 (3H, d*, 6,7)                              | 16,7                | 1,12 (3H, d*, 6,5)                              |
| 6-OH |                     | 13,79 (s)                                     |                     | 13,82 (s*)                                      |                     | 13,82 (s*)                                      |
| 8-OH |                     | 5,42 (bs)                                     |                     | 5,48 (bs)                                       |                     | 5,61 (bs)                                       |

\*Signale sind aufgrund von Epimeren verbreitert oder überlagert

Die Summenformeln von Substanz **18** und **19** wurden als  $C_{20}H_{28}O_4$  und  $C_{21}H_{30}O_4$  aufgrund ihrer HRESIMS Daten berechnet.

Das  $^{13}C$ -NMR Spektrum von Substanz **18** zeigt 20 Signale, welche mittels HSQC in acht quartäre Kohlenstoffatome, drei Methin-, vier Methylen- und fünf Methylgruppen sortiert werden konnten. Die tieffeldverschobenen Signale von C-1' ( $\delta_C$  210,5 ppm) und C-6 ( $\delta_C$  165,2 ppm) waren ein Hinweis darauf, dass es sich um eine der Substanz **16** ähnlichen Chromanring-Verknüpfung handeln könnte. Die Verschiebungen der restlichen aromatischen C-Atome gleichen denen von Substanz **16**, mit Ausnahme der von C-8a ( $\delta_C$  100,8 ppm) welche im Vergleich zum entsprechenden C-4a ( $\delta_C$  99,5 ppm) der bicyklischen Verbindung leicht ins Tieffeld verschoben war. Aufgrund der Anwesenheit einer Methingruppe in Position C-9a an Stelle einer Methylengruppe in Position C-3 der Substanz **16**, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei Substanz **18** um ein trizyklisches Derivat handeln könnte.

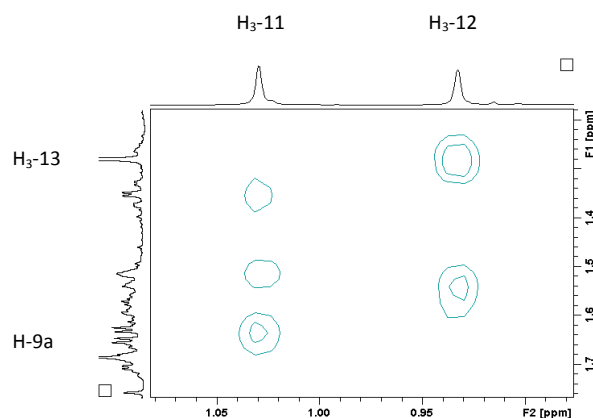
Das konnte mittels HMBC-Korrelationen (**Abbildung 92**) von der Methylen-Gruppe H<sub>2</sub>-9 ( $\delta_H$  2,25 ppm, dd,  $J = 13,3, 15,9$  Hz/2,64 ppm, dd,  $J = 5,0, 15,9$  Hz) zu C-8a ( $\delta_C$  100,8 ppm), C-4a ( $\delta_C$  79,1 ppm) und C-1 ( $\delta_C$  33,4 ppm) und C-9a ( $\delta_C$  47,0 ppm,  $\delta_H$  1,63 ppm, dd,  $J = 5,0, 13,3$  Hz) bestätigt werden.



**Abbildung 92:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **18** mit Korrelationen der beiden Protonen von H<sub>2</sub>-9 zu C-1, C-9a, C-4a und C-8a.

Des Weiteren zeigen die beiden Methylgruppen H<sub>3</sub>-11 ( $\delta_H$  1,02 ppm, s) und H<sub>3</sub>-12 ( $\delta_H$  0,93 ppm, s) long-range Kopplungen im HMBC Spektrum zum C-9a ( $\delta_C$  47,0 ppm) und C-2 ( $\delta_C$  41,3 ppm).

NO-Effekte zwischen H<sub>3</sub>-12 ( $\delta_{\text{H}}$  0,93 ppm, s) und H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1,27 ppm, s) machten deutlich, dass sich beide Methylgruppen auf der gleichen Seite des Moleküls befanden, was durch Korrelationen im NOE-Spektrum von H-9a ( $\delta_{\text{H}}$  1,63 ppm, dd,  $J = 5,0, 13,3$  Hz) zu H<sub>3</sub>-11 bestätigt werden konnte (**Abbildung 93**).



**Abbildung 93:** Ausschnitt aus dem NOE-Spektrum von Substanz **18** mit Korrelationen von H<sub>3</sub>-11 mit H-9a sowie H<sub>3</sub>-12 mit H<sub>3</sub>-13.

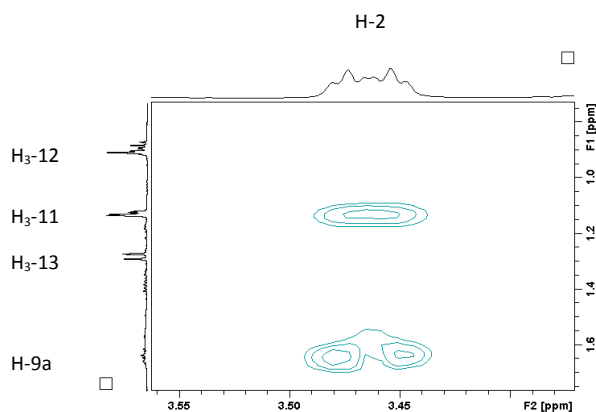
Somit war Verbindung **18** als 1-[(4a*R*\*,9a*R*\*)-6,8-Dihydroxy-1,1,4a-trimethyl-2,3,4,4a,9,9a-hexahydro-1*H*-xanthen-5-yl]-2-methylpropan-1-on eindeutig identifiziert und wurde als Empetriferdinan A bezeichnet.

Um die absolute Konfiguration von C-4a und C-9a zu bestimmen, wurde zum Einen ein ECD-Spektrum von **18** aufgenommen (**2.1.6.5.1**, S. 39) und zum Anderen ein Spektrum für die Verbindung mittels TD-DFT simuliert (**2.1.6.5.2**, S. 39). Weder das simulierte Spektrum für das 4a*R*,9a*R*-Enantiomer noch für das 4a*S*,9a*S*-Enantiomer passte zum jeweils experimentell ermittelten. Es scheint vielmehr ein Gleichgewicht der beiden Konformere im Verhältnis 1:1 vorzuliegen, was die Kombination der beiden simulierten Spektren andeutete.

Die Struktur der Substanz **19** konnte ebenfalls nur in der relativen Konfiguration als 1-[(4a*R*\*,9a*R*\*)-6,8-Dihydroxy-1,1,4a-trimethyl-2,3,4,4a,9,9a-hexahydro-1*H*-xanthen-5-yl]-2-methylbutan-1-on mit Hilfe der 2D-NMR Spektroskopie, insbesondere der HMBC-Korrelationen und der Massenspektrometrie aufgeklärt und Empetriferdinan B benannt werden.

Das HRESIMS von Substanz **20** ergab eine Summenformel von  $C_{21}H_{30}O_5$  (gefunden: 361,2019 [M - H]<sup>-</sup>, berechnet 361,2020) und unterschied sich von Empetriferdinan B (**19**) nur durch eine zusätzliche OH-Gruppe. Das  $^{13}C$ -NMR Spektrum zeigt das Signal eines entschirmten C-Atoms bei  $\delta_C$  77,9 ppm, welches im HSQC Spektrum als Methin-Gruppe in Position C-2 ( $\delta_H$  3,45 ppm, t,  $J = 4,5$  Hz) anstatt einer Methylengruppe identifiziert werden konnte. Der entschirmende Effekt der direkt gebundenen OH-Gruppe machte sich in einer Tieffeldverschiebung von C-1 ( $\delta_C$  38,4 ppm) und C-3 ( $\delta_C$  28,1 ppm) bemerkbar. Die Kohlenstoffatome C-4/C-9a/C-11/C-12 ( $\delta_C$  37,6/45,8/27,2/14,2 ppm) waren alle leicht ins Hochfeld verschoben, was durch die Nähe der Hydroxylgruppe bedingt ist. Im HMBC Spektrum waren die entsprechenden Korrelationen zu sehen.

Die relative Lage von H-2 ( $\delta_H$  3,45 ppm, t\*) konnte durch NOE Interaktionen zu H-9a ( $\delta_H$  1,64 ppm, m) und H<sub>3</sub>-11 ( $\delta_H$  1,13 ppm, s) bestimmt werden, wobei keine Korrelationen zu H<sub>3</sub>-12 ( $\delta_H$  0,90 ppm, s) und H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_H$  1,28 ppm, s) zu sehen waren (**Abbildung 94**).



**Abbildung 94:** Ausschnitt aus dem NOE-Spektrum von **20** mit Kreuzsignalen von H-2 mit H<sub>3</sub>-11 und H-9a.

Somit ergab sich für Substanz **20** die Bezeichnung 1-[(2R\*,4aR\*,9aR\*)-2,6,8-Trihydroxy-1,1,4a-trimethyl-2,3,4,4a,9,9a-hexahydro-1H-xanthen-5-yl]-2-methylbutan-1-on und der Name Empetriferdinol.

## 3.1.3.4.2 Substanzen 21/22 (Empetrifranzinan A/B) und 23 (Empetrifranzinan C)

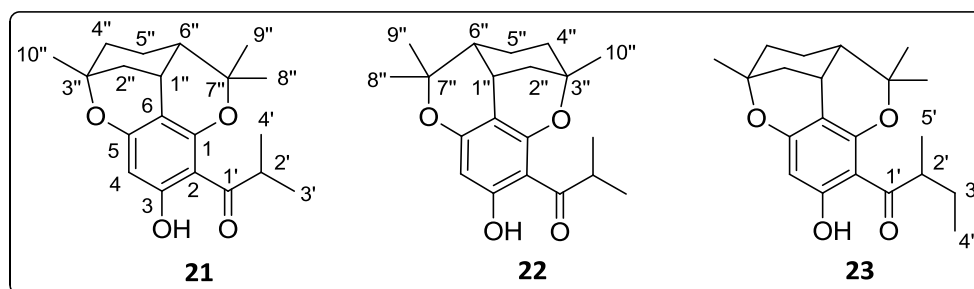


Abbildung 95: Substanzen 21, 22 und 23

Tabelle 32:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Substanzen 21 - 23 in  $\text{CDCl}_3$ 

| C/H  | 21                  |                                    | 22                  |                                    | 23                  |                                    |
|------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ mult (J in Hz) |
| 1    | 159,0               |                                    | 158,2               |                                    | 159,1               |                                    |
| 2    | 106,4               |                                    | 105,3               |                                    | 106,9               |                                    |
| 3    | 164,9               |                                    | 165,7               |                                    | 165,0               |                                    |
| 4    | 97,1                | 6,05 (1H, s)                       | 98,7                | 6,03 (1H, s*)                      | 97,1                | 6,05 (1H, s)                       |
| 5    | 162,2               |                                    | 162,9               |                                    | 162,3               |                                    |
| 6    | 107,4               |                                    | 106,5               |                                    | 107,5               |                                    |
| 1'   | 209,6               |                                    | 209,7               |                                    | 209,3               |                                    |
| 2'   | 38,1                | 3,93 (1H, sept, 6,7)               | 39,0                | 3,77 (1H, sept, 6,7)               | 45,1                | 3,78 (1H, sext*, 6,8)              |
| 3'   | 18,5                | 1,15 (3H, d, 6,7)                  | 19,1                | 1,18 (3H, d, 6,7)                  | 25,9                | 1,37 (m*)<br>1,85 (m*)             |
| 4'   | 20,1                | 1,18 (3H, d, 6,7)                  | 19,6                | 1,18 (3H, d, 6,7)                  | 12,2                | 0,94 (3H, t*, 7,4)                 |
| 5'   |                     |                                    |                     |                                    | 17,6                | 1,15 (3H, d*, 6,8)                 |
| 1''  | 27,6                | 2,75 (m)                           | 27,5                | 2,83 (m)                           | 27,6                | 2,75 (m*)                          |
| 2''  | 34,9                | 1,86 (m)<br>2,17 (m)               | 34,8                | 1,86 (m)<br>2,17 (m)               | 34,9                | 1,86 (m)<br>2,19 (m*)              |
| 3''  | 75,9                |                                    | 76,4                |                                    | 75,9                |                                    |
| 4''  | 37,5                | 1,45 (m)<br>1,83 (m)               | 37,4                | 1,45 (m)<br>1,83 (m)               | 37,5                | 1,45 (m)<br>1,85 (m)               |
| 5''  | 21,8                | 0,88 (m)<br>1,31 (m)               | 21,9                | 0,88 (m)<br>1,31 (m)               | 21,8                | 0,89 (m)<br>1,31 (m)               |
| 6''  | 46,2                | 2,08 (ddd, 11,6, 5,2,<br>2,8)      | 46,0                | 2,04 (ddd, 11,5, 5,2,<br>2,6)      | 46,3                | 2,08 (ddd*, 11,5, 4,9,<br>2,8)     |
| 7''  | 86,4                |                                    | 84,9                |                                    | 86,6                |                                    |
| 8''  | 24,4                | 1,11 (3H, s)                       | 24,2                | 1,09 (3H, s)                       | 24,4                | 1,11 (3H, s)                       |
| 9''  | 29,9                | 1,58 (3H, s)                       | 29,6                | 1,53 (3H, s)                       | 29,9                | 1,58 (3H, s)                       |
| 10'' | 28,7                | 1,39 (3H, s)                       | 28,7                | 1,44 (3H, s)                       | 28,7                | 1,39 (3H, s)                       |
| 3-OH |                     | 13,54 (s)                          |                     | 13,80 (s)                          |                     | 13,62 (s*)                         |

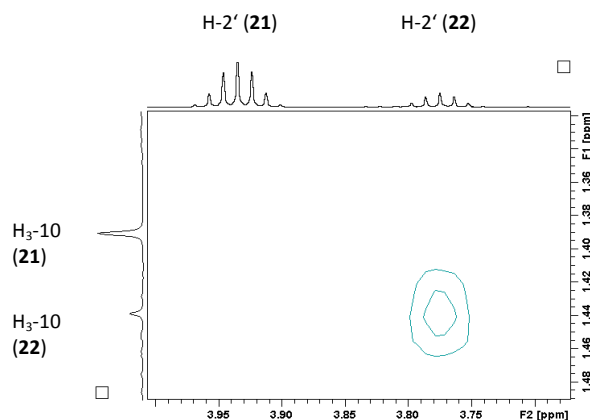
\*Signale sind aufgrund von Epimeren verbreitert oder überlagert

Die Intensitäten aller Signale im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum waren in einem Verhältnis von 1:3 vorhanden, was bei nur einem Pseudomolekülion bei  $m/z$  von 331,1911  $[\text{M} + \text{H}]^+$  im HRESIMS vermuten ließ, dass **21/22** als Mischung aus zwei isomeren Formen mit der gleichen Summenformel  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$  vorlagen.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum konnten die doppelten Signale jeweils als acht quartäre C-Atome, drei Methylen-, vier Methin und fünf Methylgruppen, unter Zuhilfenahme der HSQC und HMBC Spektren, bestimmt werden, wobei die chemischen Verschiebungen sich leicht unterscheiden. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten des Substanzgemisches **21/22** ähnelten denen von Petiolin K, einem Phloroglucinol, welches bereits aus *H. pseudopetiolum* var. *kusianum* isoliert wurde (Tanaka et al. 2010). In dieser Verbindung ist ein Menthan-Substituent über eine  $-\text{C}-\text{C}-$  und zwei  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  Brücken mit dem Phloroglucinol verknüpft, was einen Citran-Körper ergibt.

Der Unterschied zum Petiolin K besteht in der fehlenden Methylsubstitution am Aromaten, welche durch die Anwesenheit eines aromatischen Protons H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  6,03/6,05 ppm, beide s) bestätigt werden konnte. Interessanterweise konnten im HMBC und NOESY Spektrum nur für Substanz **22** Korrelationen gefunden werden, die denen des Petiolin K entsprachen. Daher konnte die Verbindung als 1-(1,9-Epoxy-3-hydroxy-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6H-benzo[c]chromen-2-yl)-2-methylpropan-1-on identifiziert werden. Als Name wurde Empetrifranzinan B gewählt.

Für Substanz **21** sind die charakteristischen NOE-Interaktionen zwischen H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  3,93 ppm, sept,  $J = 6,7$  Hz) der Acylseitenkette und dem H<sub>3</sub>-10'' ( $\delta_{\text{H}}$  1,39 ppm, s) nicht vorhanden, in Substanz **22** hingegen war ein Kreuzsignal für die Kopplung des H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  3,77 ppm, sept,  $J = 6,7$  Hz) mit dem H<sub>3</sub>-10'' ( $\delta_{\text{H}}$  1,44 ppm, s) zu sehen (**Abbildung 96**, S. 112).



**Abbildung 96:** Ausschnitt aus dem NOE-Spektrum der Substanz **21/22** mit Kreuzsignal von H-2' mit H<sub>3</sub>-10 (Substanz **22**); Das H-2' zeigt hingegen kein Kreuzsignal mit dem H<sub>3</sub>-10.

Dies ist der Beweis für dafür, dass in Substanz **21** der Substituent über die Etherbrücken C-1–O–C-7'' und C-5–O–C-3'' mit dem Acylphloroglucinol verbunden ist und nicht wie in Substanz **22** über C-1–O–C-3'' bzw. C-5–O–C-7''.

Daraus folgte, dass Substanz **21** als 1-(1,9-Epoxy-3-hydroxy-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6H-benzo[c]chromen-4-yl)-2-methylpropan-1-on identifiziert und mit Empetrifranzinan A bezeichnet wurde.

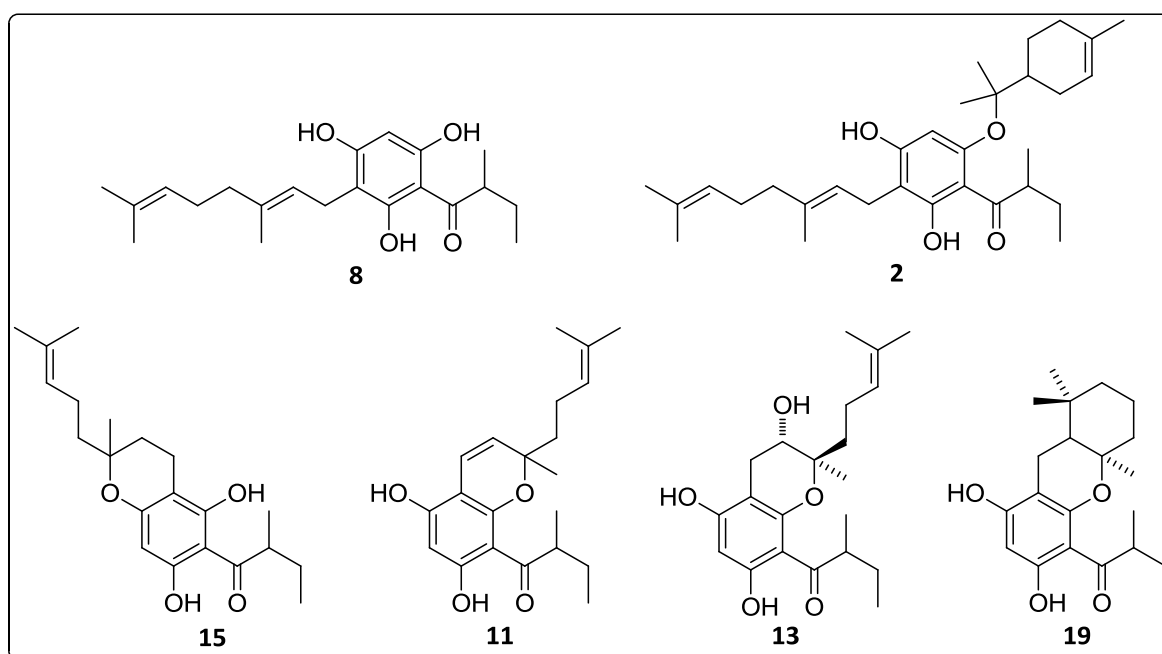
Für Substanz **23** konnte eine Summenformel von C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub> ermittelt werden, was auf den Pseudomolekülionenpeak bei  $m/z$  345,2050 [M + H]<sup>+</sup> (berechnet: 345,2060) basierte.

Sowohl die 1D als auch die 2D NMR Daten waren denen von Substanz **21** ähnlich. Der Unterschied im Massenspektrum zwischen Substanz **23** und **21/22** lag bei 14 Masseneinheiten, was wiederum einer zusätzlichen Methylengruppe C-3' ( $\delta_C$  25,9 ppm,  $\delta_H$  1,37 ppm,  $m/1,85$  ppm, m), also eines 2-Methylbutyryl- an Stelle eines 2-Methylpropionyl-Restes in der Acyl-Seitenkette entsprach.

Somit konnte die Struktur der Substanz **23** als 1-(1,9-Epoxy-3-hydroxy-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6H-benzo[c]chromen-4-yl)-2-methylbutan-1-on aufgeklärt werden. Die Benennung erfolgte in systematischer Reihenfolge und ergab Empetrifranzinan C.

### 3.1.4 Charakterisierung der Substanzen 2, 8, 11, 13, 15 und 19 per DC mit verschiedenen Sprühreagenzien

Zur dünnschichtchromatographischen Charakterisierung wurde eine monozyklische (**8**), eine monozyklisch-monoterpenoide (**2**), drei bityklische (**15**, **11**, **13**) und eine trityklische (**19**) Verbindung ausgewählt, um das Verhalten gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien zu untersuchen. Als reaktive Gruppen im Molekül sind bei allen Strukturen mindestens eine freie phenolische OH-Gruppe, ein aromatisches Proton und eine vinyloge Carbonsäure-Struktur vorhanden. Wie bei der Isolierung bereits mit dem AS-Reagenz zu erkennen war, unterscheiden sich die Methylbutyryl- nicht von den Methylpropionyl-Derivaten (**Abbildung 44**, S. 67), sondern jeweils die gleich-substituierten Strukturen untereinander. Deshalb wurden nur Methylbutyryl-substituierte Verbindungen ausgewählt (**Abbildung 97**).



**Abbildung 97:** Strukturformeln der für die DC-Untersuchung ausgewählten Substanzen.

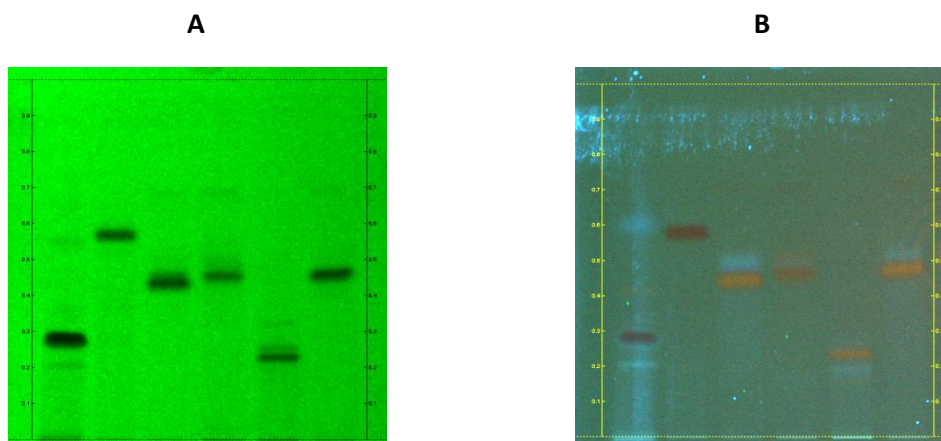
Es wurde ein Fließmittelsystem gewählt, bei dem sich alle für die DC-Untersuchung ausgewählten Verbindungen möglichst bei  $R_F$ -Werten zwischen 0,20 und 0,80 befinden. Nach dem Entwickeln der Chromatogramme in kammergesättigter Atmosphäre mit einem Gemisch aus Cyclohexan/EtOAc/Ameisensäure im Verhältnis 68:30:2 (= FM 9) wurden die Kieselgelplatten mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz, dem Naturstoffreagenz und der Macrogollösung (**Tabelle 12**, S. 34) sowie dem Eisen(III)chlorid-Reagenz, dem

## 114 Ergebnisse und Diskussion

Echtblausalz-Reagenz, dem Molybdat-Wolframat-Reagenz, dem „Cer-Molybdat-Reagenz“ und dem Reagenz nach Godin (**Tabelle 15**, S. 40) derivatisiert.

Zunächst wurden die underivatisierten Chromatogramme bei 254 und 365 nm betrachtet. Hier zeigte sich, dass alle untersuchten Phloroglucinole bei 254 nm eine Löschung der Fluoreszenz bewirken, was auf den aromatischen Phloroglucinolgrundkörper zurück zu führen ist. Anhand der dunklen Zonen konnten die  $R_F$ -Werte bestimmt werden (**Tabelle 33**).

Bei 365 nm zeigen die monozyklischen Derivate eine dunkelblaue (**8**) bis schwarz-blaue (**2**) Eigenfluoreszenz. Die bityklischen Verbindungen (**15**, **13**) sowie die trityklische Verbindung (**19**) erscheinen als hellbraune Banden, bei Substanz **11** scheint die konjugierte Doppelbindung im Chromen-Ring eine Intensivierung hin zu einem dunkelbraunen Farbton zu bewirken (**Abbildung 98**).



**Abbildung 98:** Underivatisierte Dünnschichtchromatogramme bei **A)** 254 nm und **B)** 365 nm; SiGel, FM 9

**Tabelle 33:** Zuordnung der Substanzen der entsprechenden Bahnen auf der DC-Platte unter Angabe des jeweiligen  $R_F$ -Wertes

| Bahn        | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |
|-------------|------|------|------|------|------|------|
| Substanz    | 8    | 2    | 15   | 11   | 13   | 19   |
| $R_F$ -Wert | 0,28 | 0,57 | 0,43 | 0,46 | 0,23 | 0,46 |

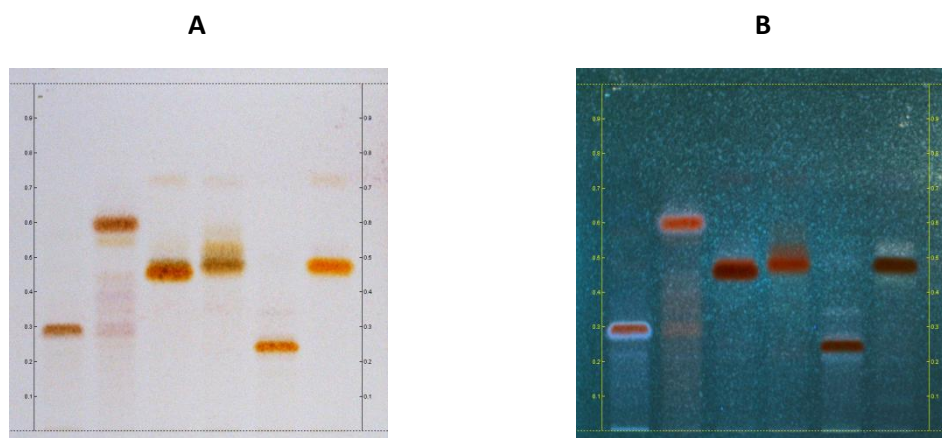
Die verschiedenfarbige Eigenfluoreszenz der Acylphloroglucinole bei 365 nm scheint eine Möglichkeit zur Unterscheidung der Phloroglucinole untereinander, aber auch als Abgrenzung zu anderen Naturstoffen, darzustellen.

### 3.1.4.1 Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz

Das Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz wird auch als Universalreagenz bezeichnet, weil sehr viele strukturell unterschiedliche Substanzklassen sich damit anfärben lassen, wie z.B. ätherische Öle, Scharfstoffe, Bitterstoffe und Saponine (Wagner et al. 1983).

Der Mechanismus ist bisher nicht geklärt, könnte aber über die Bildung von Triphenylmethanfarbstoffen ablaufen, wie im Arzneibuch-Kommentar in der Monographie Eucalyptusblätter für Ätherisch-Öl-Bestandteile angedeutet wird (Hartke 1997).

Nach dem Besprühen und Trocknen sind die Verbindungen bei Tageslicht orange-ockerartig gefärbt. Es lassen sich Unterschiede lediglich in der Intensität der Banden feststellen. Die Substanzen **15**, **13** und **19** erscheinen in einem in der angegebenen Reihenfolge heller werdenden Orange, die Verbindungen **8**, **2**, **11** etwas dunkler. Bei 365 nm ist die Farbgebung genau umgekehrt (**Abbildung 99**). Dies könnte auf das Vorhandensein von drei (**2**) und zwei (**8**, **11**) Doppelbindungen bzw. einer (**13**, **15**) und keiner (**19**) zusätzlichen Doppelbindung zum Aromaten hinweisen. Bei Verbindung **11** liegt sogar eine Konjugation mit dem Phloroglucin-Ring vor. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt üblicherweise bei Tageslicht, was bei den untersuchten Substanzen keine spezifische Farbe erkennen lässt.



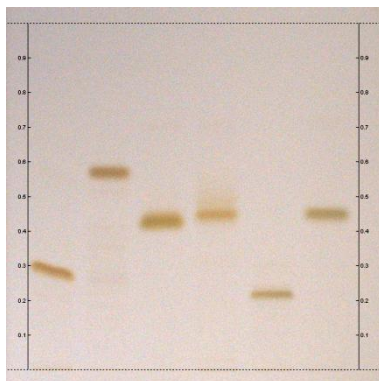
**Abbildung 99:** Dünnschichtchromatogramme nach Detektion mit dem AS-Reagenz bei **A)** vis und **B)** 365 nm; SiGel, FM 9

### 3.1.4.2 Detektion mit Eisen(III)chlorid-Reagenz

Das Eisen(III)chlorid Reagenz wurde zur Untersuchung herangezogen, weil damit auch die Hopfenbitterstoffe nachgewiesen werden können (Wagner et al. 1983). Dabei handelt es sich in erster Linie um die prenylierten Acylphloroglucinderivate Humulon und Lupulon. Es

findet eine Chelatbildung der Eisenatome mit den phenolischen OH-Gruppen sowie der vinylogenen Carbonsäurefunktion statt.

Die Banden aller untersuchten Verbindungen erscheinen bei Tageslicht durchweg in einem grünen Farbton (**Abbildung 100**). Auffällig ist, dass kaum Verunreinigungen bzw. Abbauprodukte detektiert werden, was für eine gewisse Selektivität des Sprühreagenzes für Acylphloroglucinole allgemein spricht.

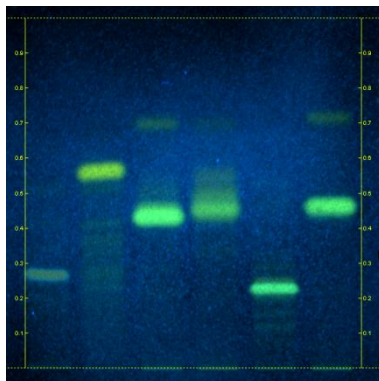


**Abbildung 100:** Dünnschichtchromatogramm nach Detektion mit dem Eisen(III)chlorid-Reagenz bei vis; SiGel, FM 9

### 3.1.4.3 Detektion mit Naturstoffreagenz

Das Naturstoffreagenz eignet sich zum Nachweis von Flavonoiden und dem Aloin (Wagner et al. 1983), aber auch Phloroglucinole reagieren mit dem Diphenylboryloxyethylamin aufgrund der konjugierten Carbonylgruppe. Die Reaktion läuft über eine Komplexbildung der vinylogenen Carbonsäurefunktion mit dem zentralen Bor-Atom ab (Adam und Becker 2000).

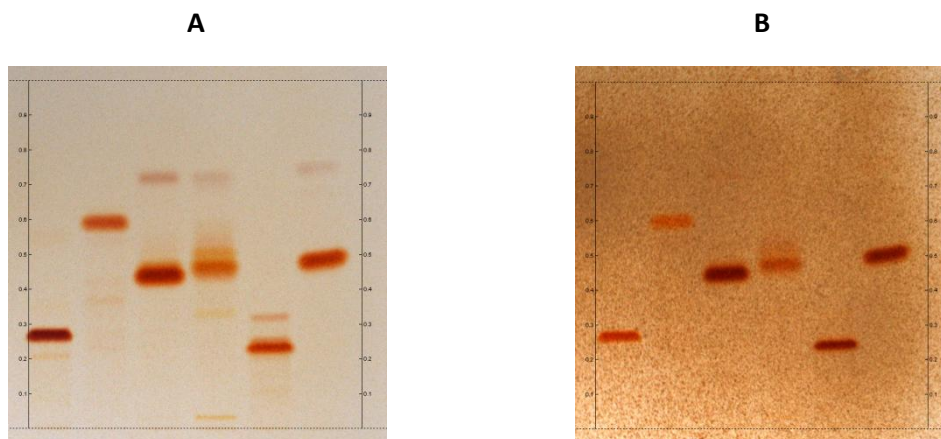
Die Substanzen sind durchweg als neon-grün leuchtende Banden zu sehen (**Abbildung 101**, S. 117). Verunreinigungen sind im Gegensatz zur Derivatisierung mit dem Eisen(III)chlorid-Reagenz etwas deutlicher im Chromatogramm zu erkennen. Vor allem bei den Substanzen **15** (Bahn 3) und **19** (Bahn 6) sind bei  $R_F = 0,72$  zusätzliche Banden zu sehen. Auf Bahn 4 (**11**) liegen im  $R_F$ -Bereich von 0,5 weitere Zonen möglicher Verunreinigungen. Alle untersuchten Acylphloroglucinole lassen sich mit dem NSR detektieren, unterscheiden sich allerdings farblich nicht untereinander.



**Abbildung 101:** Dünnschichtchromatogramm nach Detektion mit dem Naturstoffreagenz bei 365 nm; SiGel, FM 9

#### 3.1.4.4 Detektion mit Echtblausalz-Reagenz

Die Anwendung zur Detektion von Hopfenbitterstoffen und der allgemeine Nachweis von phenolischen Verbindungen (Wagner et al. 1983) sowie von Acylphloroglucin-Derivate aus *Dryopteris stenolepis*, Dryopteridaceae (Widén et al. 1992, Widén et al. 1993) gab Anlass für die Verwendung des Echtblausalz-Reagenzes (EBS). Direkt nach dem Besprühen und Antrocknen der Platte erscheinen im Chromatogramm orange-rote Banden. Die Reaktion des Echtblausalzes mit dem phenolischen Phloroglucinol-Teil der untersuchten Verbindungen erfolgt über eine Azokupplung und führt zu einem konjugierten System, was einen bathochromen Shift in den sichtbaren Bereich bewirkt. Auch hier werden Verunreinigungen erfasst, welche allerdings nach dem Bedampfen der DC-Platte mit Ammoniakgas nicht mehr zu sehen sind (**Abbildung 102**, S. 118). Die Platte wird hierfür einige Minuten bis zur Farbentwicklung in eine Doppeltrogkammer gestellt, in der sich in einem der beiden Tröge 10 ml konzentrierter Ammoniak befinden. Auffällig hierbei ist, dass die Banden auf Bahn 3 (**15**), 5 (**13**) und 6 (**19**) eine deutlich kräftigere Färbung annehmen als die Zonen auf Bahn 1 (**8**), 2 (**2**) und 4 (**11**), bei denen sich durch die Deprotonierung durch die Base eher in einer Farbaufhellung bemerkbar macht (**Abbildung 102**, **B**). Mit dem EBS steht ein recht unspezifisches Sprühreagenz zur Verfügung, was die Acylphloroglucinole allesamt gut anzufärben vermag.

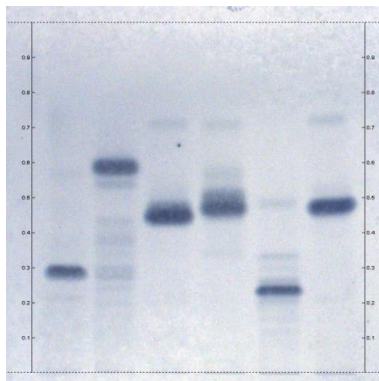


**Abbildung 102:** Dünnschichtchromatogramme nach Detektion mit dem Echtblausalzreagenz bei **A)** vis und **B)** vis nach Bedampfen der DC-Platte mit Ammoniak; SiGel, FM 9

### 3.1.4.5 Detektion mit Folin-Ciocalteus-Reagenz

Im Europäischen Arzneibuch wird in der Monographie Hopfenzapfen, *Lupuli flos* bei der Prüfung auf Identität C. auf die Anwesenheit der Humulone und Lupulone (jeweils ungetrennt als Gruppen) sowie Xanthohumol dünnschichtchromatographisch geprüft (Europäisches Arzneibuch 2011). Im DC-Atlas von Pachaly (2012) ist das entsprechende Chromatogramm abgebildet und die Banden sind anhand der unterschiedlichen Farben gut zu erkennen. Aufgrund der Tatsache, dass im ätherischen Öl der Blätter von *Hypericum mysorense*, einer in Indien heimischen und *H. perforatum* nahe verwandten Art per GC-MS das Lupulon in einem Anteil von 69,41% nachgewiesen worden ist, wurde das Folin-Ciocalteus-Reagenz zur Charakterisierung verwendet (Gopinath et al. 2013).

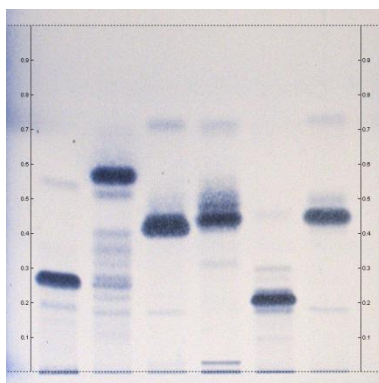
Bei der Untersuchung der isolierten Acylphloroglucinole wurde das Reagenz nicht wie bei der Identitätsprüfung der Hopfenzapfen 1+2 (V/V) mit Wasser verdünnt, sondern die Chromatogramme mit unverdünntem Reagenz besprüht und anschließend mit Ammoniakgas bedampft. Die Banden erscheinen allesamt blau-grau, was nicht auf die Acylphloroglucinole selbst, sondern auf das Detektionsreagenz zurückzuführen ist: durch die reduzierenden Eigenschaften der phenolischen Phloroglucinole erfolgt eine Reduktion der gelben Mo(VI)/W-Salze zu blauen Mo(V)/W-Mischoxiden (**Abbildung 103**, S. 119). Verunreinigungen bzw. Abbauprodukte sind auf allen Bahnen zusätzlich zu den Acylphloroglucinol-Banden zu erkennen, was auf eine mangelnde Selektivität, dafür auf eine hohe Sensitivität auf alles was reduzierende Eigenschaften besitzt, hinweist.



**Abbildung 103:** Dünnschichtchromatogramm nach Detektion mit dem Folin-Ciocalteus-Reagenz und anschließendem Bedampfen mit Ammoniakgas bei vis; SiGel, FM 9

### 3.1.4.6 Detektion mit dem „Cer-Molybdat-Reagenz“

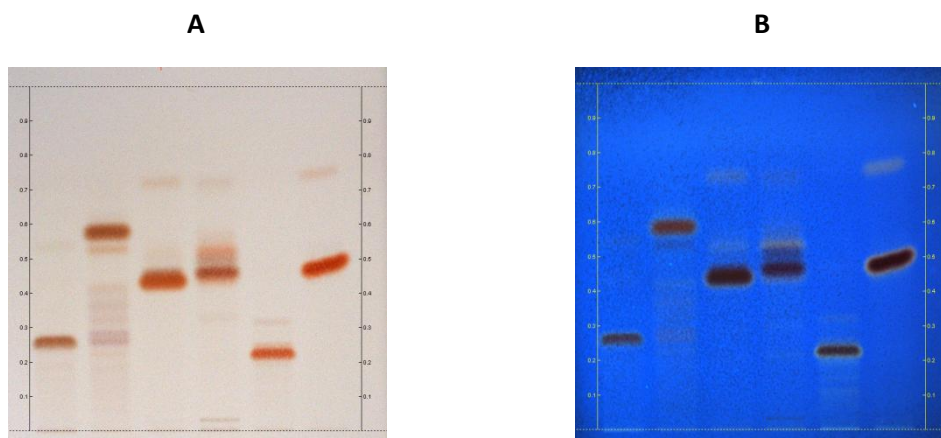
In der Monographie „Powdered St. John’s Wort Extract“ des USP 36 wird bei der Identitätsprüfung B. explizit auf die Anwesenheit von Hyperforin geprüft, welches als blaue Zone bei  $R_F = 0,54$  erscheint (The United States Pharmacopeia 36 2012). Hierbei handelt es sich wie beim Folin-Ciocalteus-Reagenz um eine Detektionsmethode, welche in einer unspezifischen Redoxreaktion auf reduzierende Verbindungen hin testet. Bei der Untersuchung der isolierten Acylphloroglucinole erscheinen im Chromatogramm bei Tageslicht ebenfalls blaue Zonen auf Höhe der in **Tabelle 33**, S. 114 angegebenen  $R_F$ -Werte, was den reduzierten Cer- und Molybdänsalzen entspricht. Weitere Banden ober- und unterhalb der Acylphloroglucinol-Banden sind deutlich zu sehen (**Abbildung 104**). Die Detektion mit dem „Cer-Molybdat-Reagenz“ erlaubt somit keinen spezifischen Nachweis auf Acylphloroglucinole, zeichnet sich aber durch eine hohe Sensitivität aus.



**Abbildung 104:** Dünnschichtchromatogramm nach Detektion mit dem Reagenz nach USP bei vis; SiGel, FM 9

### 3.1.4.7 Detektion mit dem Reagenz nach Godin

Die Detektion mit Godins Reagenz wurde ursprünglich in der Papierchromatographie zur Unterscheidung von „Polyolen und Ketosen“ verwendet. Außerdem war damit eine Abgrenzung zu den Aldosen möglich (Godin 1954). Acylphloroglucinole stellen ebenfalls Polyole mit aromatischem Charakter dar. Demzufolge wurde bei der Isolierung und Charakterisierung von verschiedenen aliphatischen bzw. aromatischen Acylphloroglucinolen das Reagenz nach Paul Godin genutzt, so auch bei ungewöhnlichen 5-Ring-Monoterpen-Addukten aus *H. calycinum*. Das Hypercalin A ergibt im DC eine Bande mit einer violett-karminroten Färbung, das Hypercalin C hingegen erscheint als dunkel violette Zone. Das Benzoyl-Derivat Hypercalin B färbt sich violett-braun an (Decosterd et al. 1989). Zwei aliphatische, bicyklische Derivate aus *H. revolutum* ergaben mit Godins Reagenz grau-braune Zonen (Decosterd et al. 1987). Im Prinzip stellt es ein, in der Zusammensetzung dem Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz ähnliches, Universalreagenz für die Detektion von Ätherischölbestandteilen, wie Terpenoiden, Phenylpropanen und Phenole dar (Wagner et al. 1983). Anstatt der Schwefelsäure enthält das Reagenz nach Godin die ebenfalls oxidierende Perchlorsäure. Im Chromatogramm erscheinen wie beim Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht orangefarbene Zonen und bei 365 nm dunkle Banden (**Abbildung 105**). Der Mechanismus der Reaktion ist nicht eindeutig geklärt, läuft aber wahrscheinlich nach dem gleichen Prinzip wie beim AS ab, da das Vanillin ebenfalls eine aromatische Aldehydverbindung darstellt. Godins Reagenz aus dem Jahre 1954 ist aus historischer Sicht durchaus interessant, wurde aber vom Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz abgelöst. Für die Detektion der Acylphloroglucinole ist es dennoch gut geeignet, wenn auch nicht selektiv.



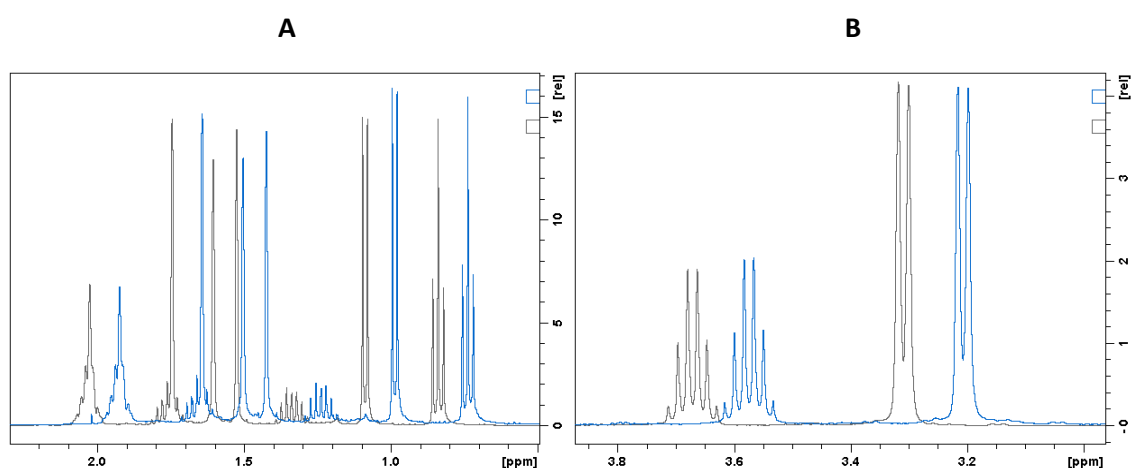
**Abbildung 105:** Dünnschichtchromatogramme nach Derivatisierung mit Godins Reagenz bei **A)** vis und **B)** 365 nm; SiGel, FM 9

### 3.1.5 Stabilitäts- und Reinheitsuntersuchungen von Substanz 8

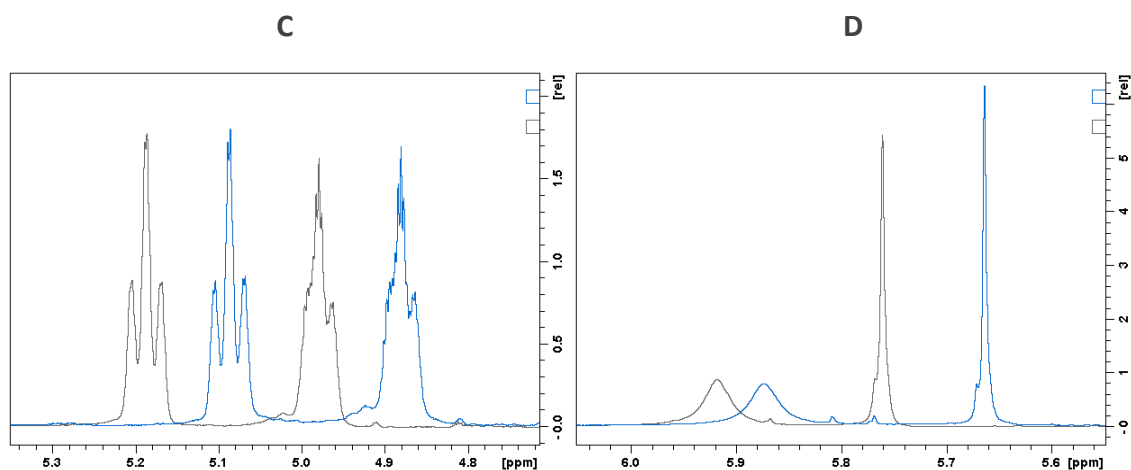
#### 3.1.5.1 Stabilitätsuntersuchung per $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie

Um die Stabilität von Substanz **8**, insbesondere des Geranyl-Restes zu untersuchen, wurde die Substanz in 0,5 ml deuteriertem Chloroform (pH = 5) gelöst ( $c = 10 \text{ mg/ml}$ ), in ein NMR-Röhrchen gefüllt und für 120 Stunden auf die Laborbank gestellt. Die Lösung war somit den normalen Laborbedingungen also auch den tageszeitlichen Schwankungen, was die direkte Sonneneinstrahlung, die Zimmerbeleuchtung und die Temperatur angeht, ausgesetzt. Direkt nach dem Abfüllen ( $t = 0$ ) und nach 5 Tagen ( $t = 5$ ) wurden jeweils  $^1\text{H}$ -NMR Spektren vermessen. Mit Hilfe der NMR-Software Topspin<sup>®</sup> wurden die Protonenspektren übereinandergelegt („multiple spectrum display“) und zur besseren Auswertung verschiedenfarbig dargestellt. Um die entsprechenden Signale direkt vergleichen zu können, wurde das Spektrum „t = 5“ um  $-0,1007 \text{ ppm}$  verschoben. Es sind weder bei den Signalen der gespreizten Spektren im Hochfeld (**Abbildung 106**) noch der im Tieffeld (**Abbildung 107**, S. 122) Unterschiede zwischen  $t = 0$  und  $t = 5$  augenscheinlich festzustellen.

Somit scheint Verbindung **8** unter den Versuchsbedingungen stabil gegenüber Licht- und Temperatureinflüssen zu sein. Allein der Einfluss von Sauerstoff wurde nicht bestimmt, da das NMR-Röhrchen während der fünf Tage dicht verschlossen war.



**Abbildung 106:** Gespreizte 400 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektren (295 K,  $\text{CDCl}_3$ ) von Substanz **8** im Hochfeld. Grau:  $t = 0$ ; Blau:  $t = 5$  Tage, shift:  $-0,1007 \text{ ppm}$ ; **A**) Signale bei  $\delta$  0-2,30 ppm, **B**) Signale bei  $\delta$  2,95-3,85 ppm.



**Abbildung 107:** Gespreizte 400 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektren (295 K,  $\text{CDCl}_3$ ) von Substanz **8** im Tieffeld. Grau:  $t = 0$ ; Blau:  $t = 5$  Tage, shift:  $-0,1007$  ppm; **C**) Signale bei  $\delta$  4,72-5,34 ppm, **D**) Signale bei  $\delta$  5,54 ppm-6,06 ppm.

### 3.1.5.2 Reinheitsuntersuchung per analytischer HPLC

Die chromatographische Reinheit der Substanz **8**, welche für die zellbiologischen Untersuchungen im Besonderen verwendet wurde, betrug 99,033%. Dieser Wert wurde mit der Software EZChromElite® bei 290 nm nach dem Prinzip der Normalisierung ermittelt.

## 3.1.6 Zusammenfassung und Diskussion der phytochemischen Untersuchungen

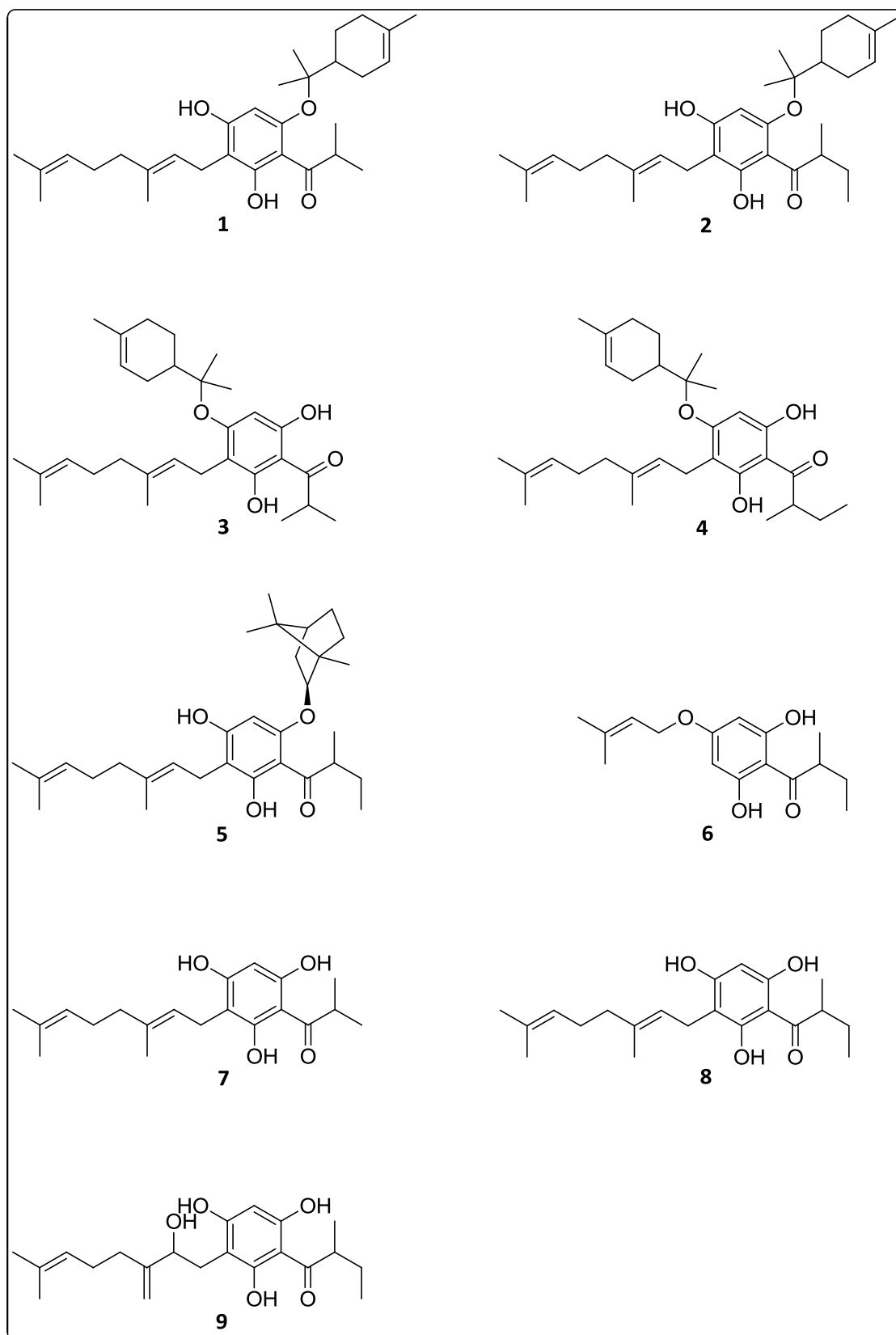
### 3.1.6.1 NMR-geleitete Fraktionierung und Isolierung

Im Isolierungsschema (**Abbildung 22**, S. 53) wird deutlich, dass eine zielgerichtete „NMR-geleitete“ Fraktionierung zu einer systematischen Isolierung der gesuchten Inhaltsstoffe führen kann. PE-4, PE-6, und PE-7 sowie alle anderen Fraktionen wurden anhand ihres  $^1\text{H}$ -NMR Spektrums auf charakteristische Signale hin untersucht. Der Vorteil gegenüber der DC-geleiteten Fraktionierung liegt in der höheren Selektivität der Messmethode. Die Signale bei  $\delta_{\text{H}} \sim 14$  ppm der wasserstoffbrücken-gebundenen Hydroxylgruppen des Phloroglucin-Grundgerüsts mit der Carbonyl-Funktion der aliphatischen Acyl-Seitenkette waren ein hilfreiches Strukturelement bei der Findung der Verbindungen.

Aus anderen Arten, wie z. B. *H. calycinum* wurden sowohl aliphatische Acyl-Derivate, nämlich Chinesin II, Hypercalin A und C als auch ein aromatischer Acyl-Abkömmling, das Hypercalin B isoliert. Der Einfluss des Acyl-Substituenten auf die chemische Verschiebung der HO-Brücke wird im direkten Vergleich zwischen Hypercalin B ( $\delta_{\text{H}}$  **18,17** ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) und Hypercalin C ( $\delta_{\text{H}}$  **19,21** ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) sichtbar (Decosterd et al. 1989). Noch etwas deutlicher wird die Differenz zwischen den Signalen bei Elegaphenone ( $\delta_{\text{H}}$  **12,24** ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz), einem O-geranylierten, monozyklischen Benzoyl-Derivat aus *H. elegans* (Nedialkov et al. 2011) und dem 2-Methylbutyryl-Derivat Olympicin A ( $\delta_{\text{H}}$  **14,02** ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) aus *H. olympicum* (Shiu et al. 2012). Auch bei dem bicyklischen Aryl-Derivat Cariphenone B ( $\delta_{\text{H}}$  **12,70** ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) aus *H. carinatum* (Bernardi et al. 2005) und dem entsprechenden Isobutyryl-Derivat ( $\delta_{\text{H}}$  **14,14** ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) aus *H. revolutum* (Decosterd et al. 1987) macht sich die Abschirmung durch den Aromaten in einer Hochfeldverschiebung bemerkbar. Der Unterschied bei den zwei Enol-Tautomeren Hyperibone L-a und L-b, welche als 2:1-Gemisch aus den oberirdischen Teilen von *H. scabrum* isolierten werden konnten, zeigt sich durch die Diskrepanz der tieffeldverschobenen Signale im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum bei  $\delta_{\text{H}}$  **17,70** ppm, und  $\delta_{\text{H}}$  **15,48** ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, Tanaka et al. 2004). Das Xanthohumol (XAN) beinhaltet aufgrund seiner Chalkon-Struktur eine mit der freien Hydroxylgruppe im A-ring fixierte HO-Brücke ( $\delta_{\text{H}}$  **14,64** ppm,  $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz, Zhao et al. 2005), was auch für das Xanthoflorianol ( $\delta_{\text{H}}$  **13,50** ppm,  $\text{Aceton-d}_6$ , 300 MHz), einem Stellungsisomer zum XAN, bei dem sich der Prenyl-Rest in 3'-Position und nicht wie beim XAN am C-5' befindet, gezeigt werden konnte (Vogel und Heilmann 2008). Der Grund für den Unterschied in der Signallage der beiden Protonen könnte auf den +I-Effekt des Prenylrestes zurück zu führen sein.

Allerdings ist es wichtig zu erwähnen, dass bei der Zuordnung von X-H-Signalen (X = Heteroatom) im Allgemeinen und den hier betrachteten OH-Signalen im Speziellen, die Abhängigkeit von Konzentration, Temperatur und Lösungsmittel berücksichtigt werden muss (Hesse et al. 2012). Auch bei Xanthonen können Wasserstoffbrücken zwischen der Carbonylfunktion des mittleren Ringes und einer Hydroxylgruppe, entweder in Position 1 oder 8 gebildet werden. Die chemische Verschiebung der HO-Gruppe liegt dann im Bereich von  $\delta_{\text{H}}$  12-13 ppm (Demirkiran 2007). Für das Primuletin, dem 5-Hydroxyflavon und dessen Derivate liegen die Werte für die tieffeldverschobenen Signale ebenfalls im Bereich zwischen  $\delta_{\text{H}}$  12 und 13 ppm (Park et al. 2007).

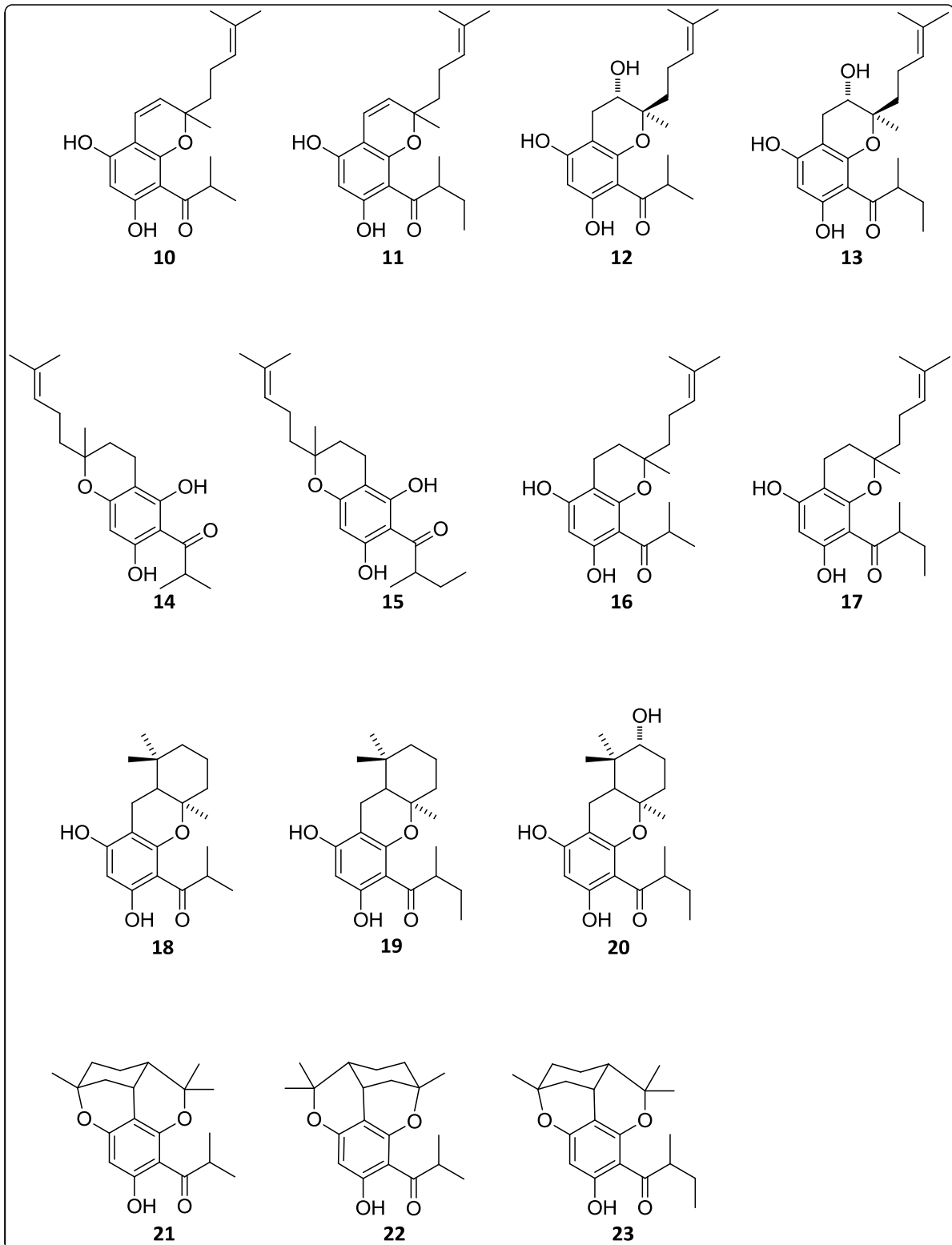
## 3.1.6.2 Übersicht über die isolierten Verbindungen



**Abbildung 108:** Strukturen der monozyklischen (1 bis 9) Acylphloroglucinole aus dem PE-Extrakt von *Hypericum empetrifolium*.

**Tabelle 34:** IUPAC-Bezeichnung (Trivialname); Aggregatzustand (isolierte Menge); spezifische Drehung (Konzentration, Lösungsmittel); UV-Maximum (Spezifischer Absorptionskoeffizient); <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten; Massendaten; **Status der monozyklischen Verbindungen**

| Monozyklische Verbindungen |  |
|----------------------------|--|
| <b>1</b>                   | <p><i>4-Geranyl-1-O-(p-menthen-8''-yl)-2-(2'-methylpropionyl)-phloroglucinol (Empetrifelixin A)</i><br/>           Gelbes Öl (4,4 mg); <math>[\alpha]_D^{20} = +8</math> (c 0,10, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 295 (4,01); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 23</b>; HREIMS <math>m/z</math> 468,3237 [M]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>, 468,3240)</p> <p><b>NEU</b></p>               |
| <b>2</b>                   | <p><i>4-Geranyl-1-O-(p-menthen-8''-yl)-2-(2'-methylbutyryl)-phloroglucinol (Empetrifelixin B)</i><br/>           Gelbes Öl (9,8 mg); <math>[\alpha]_D^{20} = -22</math> (c 0,10, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 295 (4,06); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 23</b>; HREIMS <math>m/z</math> 482,3389 [M]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>, 482,3396)</p> <p><b>NEU</b></p>                |
| <b>3</b>                   | <p><i>4-Geranyl-5-O-(p-menthen-8''-yl)-2-(2'-methylpropionyl)-phloroglucinol (Empetrifelixin C)</i><br/>           Gelbes Öl (2,5 mg); <math>[\alpha]_D^{21} = +26</math> (c 0,10, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 290 (4,08); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 24</b>; HREIMS <math>m/z</math> 468,3237 [M]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>, 468,3240)</p> <p><b>NEU</b></p>              |
| <b>4</b>                   | <p><i>4-Geranyl-5-O-(p-menthen-8''-yl)-2-(2'-methylbutyryl)-phloroglucinol (Empetrifelixin D)</i><br/>           Gelbes Öl (2,2 mg); <math>[\alpha]_D^{21} = +42</math> (c 0,10, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 290 (4,15); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 24</b>; HREIMS <math>m/z</math> 482,3399 [M]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>, 482,3396)</p> <p><b>NEU</b></p>                |
| <b>5</b>                   | <p><i>1-O-(Bornan-2''-yl)-4-geranyl-2-(2'-methylbutyryl)-phloroglucinol (Empetrikajaforin)</i><br/>           Gelbes Öl (0,5 mg); <math>[\alpha]_D^{20} = +128</math> (c 0,05, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 235 (3,82), 280 (3,19) sh; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 25</b>; HREIMS <math>m/z</math> 482,3396 [M]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>, 482,3396)</p> <p><b>NEU</b></p>   |
| <b>6</b>                   | <p><i>2,4,6-Trihydroxy-2-methyl-butyrophenon-4-O-3',3'-dimethylallylether</i><br/>           Gelbes Öl (0,5 mg); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 25</b></p> <p><b>NEU</b> für die Gattung <i>Hypericum</i> nachgewiesen<br/>           Bereits isoliert aus: siehe <b>Tabelle 37</b></p>  |
| <b>7</b>                   | <p><i>3-Geranyl-1-(2'-methylpropanoyl)-phloroglucinol</i><br/>           Gelbes Öl (19,5 mg); <sup>1</sup>H NMR und <sup>13</sup>C NMR Daten in <b>Tabelle 26</b></p> <p>Bereits isoliert aus: siehe <b>Tabelle 37</b></p>   |
| <b>8</b>                   | <p><i>3-Geranyl-1-(2'-methylbutanoyl)-phloroglucinol</i><br/>           Gelbes Öl (48,1 mg); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 26</b></p> <p>Bereits isoliert aus: siehe <b>Tabelle 37</b></p>  |
| <b>9</b>                   | <p><i>(3-(2-Hydroxy-7-methyl-3-methylenoct-6-enyl)-1-(2'-methylbutyryl)-phloroglucinol (Empetrikathiforin)</i><br/>           Gelbes Öl (2,0 mg); <math>[\alpha]_D^{22} = +90</math> (c 0,10, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 290 (4,25); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 26</b>; HREIMS <math>m/z</math> 363,2168 [M+H]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>, 363,2166)</p> <p><b>NEU</b></p> |



**Abbildung 109:** Strukturen der bi- (10 bis 17), tri- (18 bis 20) und polyzyklischen (21 bis 23) Acylphloroglucinole aus dem PE-Extrakt von *Hypericum empetrifolium*.

**Tabelle 35:** IUPAC-Bezeichnung (Trivialname); Aggregatzustand (isolierte Menge); spezifische Drehung (Konzentration, Lösungsmittel); UV-Maximum (Spezifischer Absorptionskoeffizient); <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten; Massendaten; **Status der bicyklischen Verbindungen**; [1] (Bohlmann und Zdero 1979)

| Bicyklische Verbindungen |   |
|--------------------------|---|
| <b>10</b>                | <p><i>1-[5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-chromen-8-yl]-2-methylpropan-1-on</i><br/>(Empetrikarinen A)<br/>Gelbes Öl (1,0 mg); <math>[\alpha]_D^{19} +34</math> (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 285 (4,29) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 27</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 329,1761 <math>[M - H]^-</math> (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>, 329,1758)</p> <p><b>NEU</b></p>  |
| <b>11</b>                | <p><i>1-[5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-chromen-8-yl]-2-methylbutan-1-on</i><br/>(Empetrikarinen B)<br/>Gelbes Öl (2,4 mg); <math>[\alpha]_D^{21} -8</math> (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 290 (4,34) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 27</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 343.1917 <math>[M - H]^-</math> (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>, 343.1915)</p> <p><b>NEU</b></p>  |
| <b>12</b>                | <p><i>(1-[(2R*,3S*)-3,5,7-Trihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-chroman-8-yl]-2-methylpropan-1-on</i><br/>(Empetrikarinol A)<br/>Gelbes Öl (6,9 mg); <math>[\alpha]_D^{21} -24</math> (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 290 (4,42) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 28</b>; HREIMS <math>m/z</math> 348,1938 <math>[M]^+</math> (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>, 348,1937)</p> <p><b>NEU</b></p>   |
| <b>13</b>                | <p><i>1-[(2R*,3S*)-3,5,7-Trihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-chroman-8-yl]-2-methylbutan-1-on</i><br/>(Empetrikarinol B)<br/>Gelbes Öl (14,3 mg); <math>[\alpha]_D^{21} +60</math> (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 295 (4,43) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 28</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 361,2024 <math>[M - H]^-</math> (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub>, 361.2020)</p> <p><b>NEU</b></p>   |
| <b>14</b>                | <p><i>1-[5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-chroman-6-yl]-2-methylpropan-1-on</i><br/>Gelbes Öl (0,8 mg); <math>[\alpha]_D^{19} -36</math> (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 295 (4,00) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 29</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 333,2065 <math>[M + H]^+</math> (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>, 333,2060)</p> <p>Bereits isoliert aus: siehe <b>Tabelle 37</b>, S. 129<br/>Bereits teilsynthetisiert aus: <i>Helichrysum natalitium</i> (1:1 mit <b>15</b>) [1]</p> |
| <b>15</b>                | <p><i>1-[5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-chroman-6-yl]-2-methylbutan-1-on</i><br/>Gelbes Öl (1,4 mg); <math>[\alpha]_D^{19} -24</math> (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 295 (3,66) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 29</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 347,2218 <math>[M + H]^+</math> (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>O<sub>4</sub>, 347,2217)</p> <p><b>NEU</b> für die Gattung <i>Hypericum</i> nachgewiesen<br/>Bereits teilsynthetisiert aus: <i>Helichrysum natalitium</i> [1]</p>                   |
| <b>16</b>                | <p><i>1-[5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)chroman-8-yl]-2-methylpropan-1-on</i><br/>Gelbes Öl (2,4 mg); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 30</b></p> <p>Bereits isoliert aus: siehe Tabelle 37<br/>Bereits teilsynthetisiert aus: <i>Helichrysum natalitium</i> (1:1 mit <b>17</b>) [1]</p>   |
| <b>17</b>                | <p><i>1-[5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)chroman-8-yl]-2-methylbutan-1-on</i><br/>Gelbes Öl (9,8 mg); <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 30</b></p> <p>Bereits isoliert aus: siehe <b>Tabelle 37</b>, S. 129<br/>Bereits teilsynthetisiert aus: <i>Helichrysum natalitium</i> [1]</p>   |

**Tabelle 36:** IUPAC-Bezeichnung (Trivialname); Aggregatzustand (isolierte Menge); spezifische Drehung (Konzentration, Lösungsmittel); UV-Maximum (Spezifischer Absorptionskoeffizient); <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten; Massendaten; **Status der tri- und polyzyklischen Verbindungen**

| Tri- und polyzyklische Verbindungen |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>18</b>                           | <p>1-((4aR*)-6,8-Dihydroxy-1,1,4a-trimethyl-2,3,4,4a,9,9a-hexahydro-1H-xanthen-5-yl)-2-methylpropan-1-on (Empetriferdinan A)</p> <p>Gelbes Öl (1,6 mg); <math>[\alpha]_D^{20} +40</math> (c 0,05, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 295 (4,19) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 31</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 333,2066 [M + H]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>, 333,2060)</p> <p><b>NEU</b></p>                    |
| <b>19</b>                           | <p>1-((4aR*)-6,8-Dihydroxy-1,1,4a-trimethyl-2,3,4,4a,9,9a-hexahydro-1H-xanthen-5-yl)-2-methylbutan-1-on (Empetriferdinan B)</p> <p>Gelbes Öl (4,2 mg); <math>[\alpha]_D^{21} +44</math> (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 295 (4,28) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 31</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 345,2074 [M-H]<sup>-</sup> (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>, 345,2071)</p> <p><b>NEU</b></p>                        |
| <b>20</b>                           | <p>1-((2R*,4aR*)-2,6,8-Trihydroxy-1,1,4a-trimethyl-2,3,4,4a,9,9a-hexahydro-1H-xanthen-5-yl)-2-methylbutan-1-on (Empetriferdinol)</p> <p>Gelbes Öl (3,0 mg); <math>[\alpha]_D^{21} +12</math> (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 295 (4,18) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 31</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 361,2019 [M-H]<sup>-</sup> (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub>, 361,2020).</p> <p><b>NEU</b></p>                  |
| <b>21*</b>                          | <p>1-(1,9-Epoxy-3-hydroxy-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6H-benzo[c]chromen-4-yl)-2-methylpropan-1-on (Empetrifranzinan A)</p> <p>Gelbes Öl (0,5 mg); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 230 (4,25) 295 (4,27) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 32</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 331,1911 [M + H]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>, 331,1904)</p> <p><b>NEU</b></p>   |
| <b>22*</b>                          | <p>1-(1,9-Epoxy-3-hydroxy-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6H-benzo[c]chromene-2-yl)-2-methylpropan-1-on (Empetrifranzinan B)</p> <p>siehe <b>21</b></p> <p><b>NEU</b></p>  |
| <b>23</b>                           | <p>1-(1,9-Epoxy-3-hydroxy-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6H-benzo[c]chromen-4-yl)-2-methylbutan-1-on (Empetrifranzinan C)</p> <p>Gelbes Öl (0,5 mg); <math>[\alpha]_D^{22} -48</math> (c 0,05, MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}(\log \epsilon)</math> 230 (4,37) 295 (4,42) nm; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR Daten in <b>Tabelle 32</b>; HRESIMS <math>m/z</math> 345,2050 [M + H]<sup>+</sup> (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>, 345,2060)</p> <p><b>NEU</b></p> |
| <b>*21/22 (3:1)</b>                 |  |

Die verschiedenen Strukturvarianten der aus *H. empetrifolium* isolierten Acylphloroglucinole lassen sich somit in aliphatische monozyklische Acylphloroglucinole (Schmidt et al. 2012a), sowie bi-, tri- und polyzyklische Derivate (Schmidt et al. 2012b) zusammenfassen.

Die Monozyklen (**1** bis **9**) sind durchweg C-geranyliert, nur Substanz **6** weist eine O-Prenylierung auf. Die Verbindungen **1** bis **5** können aufgrund des zusätzlich O-verknüpften Limonen- bzw. Borneol-Restes als „Aromat-O-Monoterpen-Addukte“ bezeichnet werden. Die bityklischen Acylphloroglucinole sind entweder vom Chromen- (**10** und **11**) oder

Chroman-Typ (**12** bis **17**). Bei den trizyklischen Verbindungen handelt es sich chemisch um Xanthan-Abkömmlinge (**18** bis **20**). Die Verbindungen mit polyzyklischem Ringgerüst können als Citran-Derivate aufgefasst werden (**21** bis **23**). Das Vorkommen der bereits bekannten Verbindungen **6**, **7**, **8**, **14**, **15**, **16** und **17** in anderen Pflanzen ist in **Tabelle 37** aufgelistet. Empetrikarinol A (**12**) und B (**13**) sowie **7** und **8** konnten ebenfalls aus dem PE-Extrakt der oberirdischen Teile von *H. amblycalyx* im Rahmen einer Masterarbeit isoliert werden (Mathioudaki 2013).

**Tabelle 37:** Vorkommen und Isolierung bekannter Verbindungen (Wu = Wurzel, OT = Oberirdische Teile, Bl = Blätter, Fr = Früchte, k.A. = keine Angabe) **[1]** (Bohlmann und Suwita 1978), **[2]** (Bohlmann und Suwita 1979), **[3]** (Bohlmann et al. 1980a), **[4]** (Bohlmann et al. 1980b), **[5]** (Bohlmann und Zdero 1979), **[6]** (Jakupovic et al. 1986), **[7]** (Jakupovic et al. 1989), **[8]** (Rios und Delgado 1992), **[9]** (Athanasas et al. 2004), **[10]** (Gamiotea-Turro et al. 2004); **[11]** (Crockett et al. 2008); **[12]** (Sarkisian et al. 2012); **[13]** (Winkelmann et al. 2003) **[14]** (Crockett et al. 2010) **[15]** (Mathioudaki 2013)

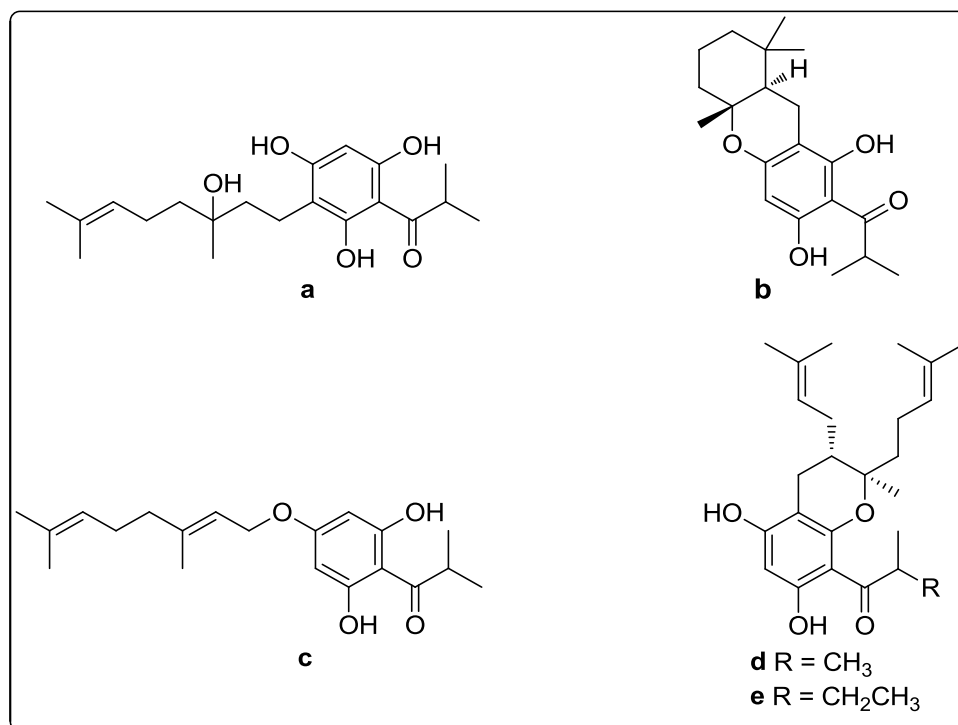
|           | Menge   | Pflanze                               | Herkunft                   | Teil | Pflanzenmaterial | Extrakt (Menge)        | Chromatographie                        | Lit. |
|-----------|---------|---------------------------------------|----------------------------|------|------------------|------------------------|--|------|
| <b>6</b>  | 3 mg    | <i>Leontonyx</i>                      | S-Afrika                   | Wu   | 6 g              | Ether-PE 1:2           | SC (SiGel),                            | [1]  |
|           | 15 mg   | <i>squarrosus</i>                     |                            | OT   | 120 g            |                        | DC (SiGel)                             |      |
|           | 30 mg   | <i>Helichrysum crispum</i>            | S-Afrika                   | OT   | 150 g            | Ether-PE 1:2           | SC (SiGel),<br>DC (SiGel)              | [2]  |
| <b>7</b>  | 3 mg    | <i>Helichrysum infaustum</i>          | S-Afrika                   | OT   | 56 g             | Ether-PE 1:2           | SC (SiGel),<br>DC (SiGel)              | [2]  |
|           | 30 mg   | <i>Achyrocline alata</i>              | NO-Brasilien               | OT   | 250 g            | Ether-PE 1:2           | SC (SiGel),<br>DC (SiGel)              | [3]  |
|           | 10 mg   | <i>Helichrysum stenopterum</i>        | S-Afrika                   | OT   | 100 g            | Ether-PE 1:2           | SC (SiGel),<br>DC (SiGel)              | [6]  |
|           | 30 mg   | <i>Helichrysum monticola</i>          | S-Afrika                   | OT   | 70 g             | MeOH-Ether-PE<br>1:1:1 | SC (SiGel),<br>DC (SiGel)              | [7]  |
|           | 1,2 g   | <b><i>Hypericum jovis</i></b>         | Zaros gorge,<br>Kreta (GR) | OT   | 300 g            | DCM<br>(33 g)          | VLC (SiGel),<br>flash (SiGel)          | [9]  |
|           | 7,8 mg  | <b><i>Hypericum styphelioides</i></b> | Kuba                       | Bl   | 500 g            | MeOH<br>(22,2 g)       | SC (Sephadex<br>LH-20), HPLC<br>(RP18) | [10] |
|           | 3 mg    | <b><i>Hypericum empetrifolium</i></b> | Bot. Garten<br>Graz (A)    | Fr   | 10 g             | DCM<br>(250 mg)        | VLC (RP18),<br>HPLC (RP18)             | [11] |
|           | 29,2 mg | <b><i>Hypericum amblycalyx</i></b>    | Kreta (GR)                 | OT   | 184 g            | PE<br>(8,9 g)          | Flash (SiGel,<br>RP18), HPLC<br>(RP18) | [15] |
|           | 40,2 mg | <b><i>Hypericum punctatum</i></b>     | Pennsylvania<br>(USA)      | OT   | 255 g            | Aceton<br>(15,5 g)     | SC (SiGel),<br>HPLC (RP18)             | [12] |
|           | k.A.    | <b><i>Hypericum linarioides</i></b>   | Bulgarien                  | OT   | 360 g            | DCM<br>(38,2 g)        | SC (Diaion HP-<br>20), HPLC<br>(RP18)  | [14] |
| <b>7/</b> | 30 mg   | <i>Helichrysum natalitium</i>         | S-Afrika                   | Wu   | 30 g             | Ether-PE 1:2           | SC (SiGel),                            | [5]  |
|           | 6 g     |                                       |                            | OT   | 200 g            |                        | DC (SiGel)                             |      |
| <b>8</b>  | 60 mg   | <i>Helichrysum krookii</i>            | S-Afrika                   | Wu   | 30 g             | Ether-PE 1:2           | SC (SiGel),                            | [4]  |
|           | 195 mg  |                                       |                            | OT   | 20 g             |                        | DC (SiGel)                             |      |
|           | 1,6 g   | <i>Esenbeckia nesiotica</i>           | Mexiko                     | OT   | 1,9 kg           | Aceton                 | VLC (SiGel)                            | [8]  |

Fortsetzung Tabelle 37

|           | Menge   | Pflanze                               | Herkunft                             | Teil | Pflanzenmaterial | Extrakt (Menge)            | Chromatographie                        | Lit. |
|-----------|---------|---------------------------------------|--------------------------------------|------|------------------|----------------------------|--|------|
| <b>8</b>  | 20 mg   | <i>Achyrocline alata</i>              | NO-Brasilien                         | OT   | 250 g            | Ether-PE 1:2               | SC (SiGel),<br>DC (SiGel)              | [3]  |
|           | 10 mg   | <i>Helichrysum stenopterum</i>        | S-Afrika                             | OT   | 100 g            | Ether-PE 1:2               | SC (SiGel),<br>DC (SiGel)              | [6]  |
|           | 20 mg   | <i>Helichrysum monticola</i>          | S- Afrika                            | OT   | 70 g             | MeOH-<br>Ether-PE<br>1:1:1 | SC (SiGel),<br>DC (SiGel)              | [7]  |
|           | 3 mg    | <b><i>Hypericum empetrifolium</i></b> | Bot. Garten<br>Graz (A)              | Fr   | 10 g             | DCM<br>(250 mg)            | VLC (RP18),<br>HPLC (RP18)             | [11] |
|           | 55,1 mg | <b><i>Hypericum punctatum</i></b>     | USA                                  | OT   | 255 g            | Aceton<br>(15,5 g)         | SC (SiGel),<br>HPLC (RP18)             | [12] |
|           | 84,4 mg | <b><i>Hypericum amblycalyx</i></b>    | Kreta (GR)                           | OT   | 184 g            | PE<br>(8,9 g)              | Flash (SiGel,<br>RP18), HPLC<br>(RP18) | [15] |
|           | k.A.    | <b><i>Hypericum linarioides</i></b>   | Bulgarien                            | OT   | 360 g            | DCM<br>(38,2 g)            | SC (Diaion HP-<br>20), HPLC<br>(RP18)  | [14] |
| <b>12</b> | 2,2 mg  | <b><i>Hypericum amblycalyx</i></b>    | Kreta (GR)                           | OT   | 184 g            | PE<br>(8,9 g)              | Flash (SiGel,<br>RP18), HPLC<br>(RP18) | [15] |
| <b>13</b> | 4,1 mg  |                                       |                                      |      |                  |                            |  |      |
| <b>14</b> | 56 mg   | <b><i>Hypericum jovis</i></b>         | Zaros gorge,<br>Kreta (GR)           | OT   | 300 g            | DCM<br>(33 g)              | VLC (SiGel),<br>Flash (SiGel)          | [9]  |
| <b>16</b> | 252 mg  | <b><i>Hypericum jovis</i></b>         | Zaros gorge,<br>Kreta (GR)           | OT   | 300 g            | DCM<br>(33 g)              | VLC (SiGel),<br>Flash (SiGel)          | [9]  |
|           | 6,4 mg  | <b><i>Hypericum amblycalyx</i></b>    | Kavousi<br>Hierapetra,<br>Kreta (GR) | OT   | 800 g            | PE<br>(10 g)               | VLC (SiGel),<br>HPLC (RP18)            | [13] |
| <b>17</b> | 17,2 mg | <b><i>Hypericum amblycalyx</i></b>    | Kavousi<br>Hierapetra,<br>Kreta (GR) | OT   | 800 g            | PE<br>(10 g)               | VLC (SiGel),<br>HPLC (RP18)            | [13] |

### 3.1.6.3 Weitere Acylphloroglucinole aus Sektion 19

Neben den in der vorliegenden Arbeit isolierten Verbindungen sind in der Sektion 19 *Coridium* bisher fünf weitere Acylphloroglucinole aus *H. amblycalyx* bzw. *H. jovis* isoliert worden. Dabei handelt es sich ebenfalls ausschließlich um aliphatische Derivate mit mono-, bi- und trizyklischem Charakter. Die Verbindungen **a** bis **e** (**Abbildung 110**, S. 131) sind den isolierten Verbindungen **6** bis **9** (**Abbildung 108**, S. 124) und **10** bis **20** (**Abbildung 109**, S. 126) strukturell sehr ähnlich und weisen nur partielle Modifikationen auf. Im Prinzip kann **a** als ein hydroxyliertes Derivat von **7** und **b** (4a-O-8-Verknüpfung des Geranylrestes) als Zyklisierungsvariante von **18** (4a-O-10a-Verknüpfung) angesehen werden. Bei **c** handelt es sich um die O-geranylierte Variante von **6**. Die beiden Bizyklen vom Chroman-Typ **d** und **e** weisen im Gegensatz zu **16** und **17** in Position 3 eine zusätzliche Prenylierung auf.



**Abbildung 110:** Strukturen der weiteren Acylphloroglucinole aus der Sektion 19. **a** (Hyperjovinol A), **b** (Hyperjovinol B) und **c** aus *H. jovis*; **d** (Hypercalyxone A) und **e** (Hypercalyxone B) aus *H. amblycalyx*.

Der Vollständigkeit halber ist in **Tabelle 38** das Vorkommen der weiteren Phloroglucinole aus der Sektion und weitere Informationen zum Pflanzenmaterial aufgelistet.

**Tabelle 38:** Vorkommen der weiteren Phloroglucinole aus Sekt. 19 *Coridium*. (OT = Oberirdische Teile); **[1]** (Athanasas et al. 2004), **[2]** (Winkelmann et al. 2003)

| Menge           | Pflanze           | Herkunft            | Teil | Pflanzenmaterial | Extrakt (Menge) | Chromatographie | Lit. |
|-----------------|-------------------|---------------------|------|------------------|-----------------|-----------------|------|
| <b>a</b> 34 mg  | <i>Hypericum</i>  | Zaros Gorge,        | OT   | 300 g            | DCM             | VLC (SiGel)     | [1]  |
| <b>b</b> 35 mg  | <i>jovis</i>      | Kreta (GR)          |      |                  | (33 g)          | Flash (SiGel)   |      |
| <b>c</b> 20 mg  |                   |                     |      |                  |                 |                 |      |
| <b>d</b> 4,5 mg | <i>Hypericum</i>  | Kavousi Hierapetra, | OT   | 800 g            | PE              | VLC (SiGel),    | [2]  |
| <b>e</b> 4,0 mg | <i>amblycalyx</i> | Kreta (GR)          |      |                  | (10 g)          | HPLC (RP18)     |      |

Die beiden Kreta-Endemiten *H. amblycalyx* und *H. jovis*, welche taxonomisch als Abkömmlinge der ebenfalls auf Kreta vorkommenden Art *H. empetrifolium* (= *H. empetrifolium* subsp. *empetrifolium*) anzusehen sind (**Abbildung 6**, S. 11), ähneln sich offensichtlich auch hinsichtlich des Spektrums an Acylphloroglucinolen. Ein interessanter Aspekt wäre auch der Vergleich mit den beiden anderen Subspezies *H. empetrifolium* subsp. *oliganthum* und *H. empetrifolium* subsp. *tortuosum*.

Die in der Sektion 19 *Coridium* gruppierten *Hypericum*-Arten scheinen neben geographischen und morphologischen auch chemotaxonomische Gemeinsamkeiten auf sich zu vereinen, was sich auch in anderen Substanzklassen widerspiegelt. So ist das Fehlen von Rutin in dieser Sektion im Vergleich zu anderen Sektionen auffällig (Crockett et al. 2005, Crockett und Robson 2011). Im Hinblick auf die Anwendung zur Behandlung depressiver Erkrankungen scheinen die Arten der Sektion als Alternative zur offiziellen Art *H. perforatum* keine Rolle zu spielen (Stojanovic et al. 2013). Die Zusammensetzung des ätherischen Öls wurde bisher für die Arten *H. coris* (Mathis und Ourisson 1964, Schwob et al. 2002), *H. ericoides* (Cardona et al. 1983) und *H. empetrifolium* (Petrakis et al. 2005) untersucht und sektio-spezifische Gemeinsamkeiten festgestellt (Crockett 2010).

Aufgrund der Tatsache, dass die drei weiteren Arten der Sektion *H. asperuloides*, *H. coris* und *H. ericoides* bisher noch nicht auf das Vorkommen von Acylphloroglucinolen hin untersucht worden sind, bedarf es systematischer phytochemischer Untersuchungen, um die auch in der vorliegenden Arbeit gefundenen Hinweise auf chemotaxonomische Zusammenhänge innerhalb von *Coridium* zu bestätigen.

Um eine mögliche Rolle der isolierten Verbindungen (**1-23**) und der weiteren Acylphloroglucinole aus der Sektion 19 (**a-e**) als ‚Biomarker‘ zu untersuchen, soll das Vorkommen dieser Verbindungen oder ähnlicher Derivate in anderen Sektionen der Gattung *Hypericum* diskutiert werden.

#### **3.1.6.4 Chemotaxonomische Einordnung der Acylphloroglucinole aus Sektion 19**

##### **3.1.6.4.1 C-geranylierte Monozyklen**

In der Gattung *Hypericum* kommen die beiden Substanzen **7** und **8** nebeneinander außer in *H. empetrifolium* noch in *H. amblycalyx* und *H. punctatum* (Sekt. 9) sowie *H. linarioides* (Sekt. 18) vor. Verbindung **7** konnte im Gegensatz zu **8** auch noch aus einem DCM-Extrakt der oberirdischen Teile von *H. jovis* isoliert werden. Außerdem kommt die Verbindung im MeOH-Extrakt aus den Blättern von *H. styphelioides* (Sekt. 29), einem Endemiten aus Kuba vor. Auffällig ist das Vorkommen der beiden C-geranylierten Verbindungen **7** und **8** in unpolaren Extrakten aus allen Pflanzenteilen. Es scheint darüber hinaus keiner besonderen Standortbedingungen zu bedürfen, da die beiden Verbindungen nur im asiatischen Raum

noch nicht gefunden wurden. In den Arten, welche bitykliche Verbindungen führen, sind **7** und **8** ebenfalls vorhanden, was für einen Zyklisierungsmechanismus bei der Biosynthese spricht (**Tabelle 37**, S. 129).

Das monozyklische, benzoylierte Derivat von **7** und **8** ist in der Gattung *Hypericum* für die Arten *H. nakamurai* (Sekt. 4, Cheng et al. 2013) und *H. sampsonii* (Sekt. 9c, Lin und Wu 2003) nachgewiesen worden. In der nahe verwandten Familie der Clusiaceae wurde aus der Rinde von *Garcinia vieillardii* die Verbindung isoliert und zeigte eine interessante Aktivität gegen die promastigote (geißeltragende) Form von *Leishmania mexicana* und *L. infantum* und gegen die amastigote (unbegeißelte) Form von *L. infantum* (Hay et al. 2008). Ein dimeres Kondensationsprodukt mit Filicinsäure (3,5-Dihydroxy-4,4-dimethyl-2,5-cyclohexadien-1-one) konnte aus *H. japonicum* (Sekt. 30) als Sarothralen A isoliert werden (Ishiguro et al. 1986). Strukturvarianten in der Geranylseitenkette wie sie Substanz **9** und **c** zeigen, konnten als benzoylierte Verbindungen aus *Hypericum nakamurai* (Sekt. 4) von Cheng et al. (2013) isoliert werden. Ein aus *Tovomita longifolia*, Clusiaceae isoliertes, ebenfalls modifiziertes Derivat zeigte zytotoxische Aktivität gegen humane Krebszelllinien (Pecchio et al. 2006).

C-geranylierte Verbindungen konnten bisher relativ unspezifisch in den Sektionen 4, 9, 9c, 18, 19, 29 und 30 nachgewiesen werden, was der unterschiedlichen geographischen Verteilung der Sektionen (**Tabelle 2**, S. 3) entspricht. Möglicherweise dienen die beiden Substanzen als Synthesestufen für komplexere Strukturen, die von der Pflanze als UV- und Fraßschutz benötigt werden (Gronquist et al. 2001).

#### 3.1.6.4.2 Acylphloroglucinol-Terpen-Addukte

Die C-geranylierten Verbindungen **1-5** (**Abbildung 108**, S. 124) stellen Addukte mit Monoterpenen über eine Etherbrücke („Aromat-O-Monoterpen“) dar, welche in *Hypericum* bisher noch nicht entdeckt wurden und deshalb als eigenständige Verbindungsklasse betrachtet werden sollen.

Für Spezies der Gattung *Eucalyptus* hingegen wurden ähnliche Monoterpen-Addukte in größerer Menge nachgewiesen (Pal Singh und Bharate 2006). Hierbei stellen die Euglobale formylierte Acylphloroglucinol-Limonen Addukte dar, die einen Chroman-Ring bilden (Ghisalberti 1996). Die Macrocarpale sind ebenfalls Terpen-Addukte, allerdings fehlt ihnen

der Chroman-Ring, weil der terpenoide Rest nicht über eine Sauerstofffunktion mit dem Phloroglucin-Grundkörper verlinkt ist (Yamakoshi et al. 1992, Pal Singh und Bharate 2006). In weiteren Arten der Familie der Myrtaceae konnten unter anderem das Addukt eines polymethylierten Phloroglucinols mit  $\beta$ -Pinen aus den Blättern von *Baeckea frutescens* (Fujimoto et al. 1996) und das Kunzeanon C, einem Phloroglucinol-Sesquiterpen Addukt aus den Blättern von *Kunzea ambigua*, isoliert werden (Ito et al. 2004).

In der Gattung *Hypericum* wurden bisher keine Monoterpen-Addukte nachgewiesen, welche über eine Etherbrücke mit dem Phloroglucinring verknüpft sind, somit können die isolierten Verbindungen **1** bis **5** als neu für die Gattung *Hypericum* und darüber hinaus auch für die Familie der Hypericaceae angesehen werden. In der Familie der Myrtaceae konnten hingegen bereits zahlreiche strukturell ähnliche Verbindungen gefunden werden, was wiederum möglicherweise mit dem Akkumulation von ätherischem Öl in den für die Familie typischen schizolysigene Ölbehältern zusammenhängt.

#### 3.1.6.4.3 O-prenylierte Monozyklen

War Substanz **6** bisher nur in der Familie der Asteraceae (Tabelle 37, S. 129) zu finden, so konnte die Verbindung in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal in der Gattung *Hypericum* und der Familie der Hypericaceae nachgewiesen werden. Nur aus einem Petrolether-Extrakt der oberirdischen Teile von *H. calycinum* (Sekt. 3) konnte ein monomethyliertes, ebenfalls O-prenyliertes Phloroglucin-Derivat mit einem Isovalerianyl-Rest als Acyl-Seitenkette isoliert werden. Dieses zeigt neben einer fungistatischen Aktivität gegen *Cladosporium cucumerinum* und eine interessante *in vitro*-Aktivität gegen *P. falciparum* (Decosterd et al. 1991). Auch Hyperforin und dessen Derivate zeigen anti-plasmodiale Aktivität in einer Struktur-Aktivitäts-Analyse von (Verotta et al. 2007).

Drummondin E als dimeres Derivat wurde aus *H. drummondii* (Sekt. 30) isoliert und zeigt antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus*, *B. subtilis* und *M. smegmatis* (Jayasuriya et al. 1991). Das Dimer Sarothralin = Sarothialen A konnte sowohl aus dem PE-Extrakt (Ishiguro et al. 1985) als auch einem ethanolischen Extrakt der Ganzdroge von *H. japonicum* (Sekt. 30) isoliert werden (Peng et al. 2006).

Die Sektionen 3 und 30 sind in SO-Asien (**Tabelle 2**, S. 3) weit verbreitet. Somit konnte eine O-Prenylierung zum ersten Mal in einer im Mittelmeerraum wachsenden *Hypericum*-Art nachgewiesen werden.

#### 3.1.6.4.4 O-Geranylierung und Modifikationen

Neben der Substanz **c** (**Abbildung 110**) aus *H. jovis* (Athanasas et al. 2004) und *H. linarioides* (Sekt. 18, Crockett et al. 2010) konnten verschiedene alkyl- bzw. aryl-substituierte Acylphloroglucinole aus den Arten *H. elegans* (Sekt. 9, Nedialkov et al. 2011), *H. erectum* (Sekt. 9, Tada et al. 1991), *H. sampsonii* (Sekt. 9c, Don et al. 2004), *H. olympicum* L. cf *uniflorum* (Sekt. 10, Shiu et al. 2012), *H. densiflorum* (Sekt. 20, Henry et al. 2009) sowie *H. japonicum* (Sekt. 30, Hu et al. 2000) isoliert werden.

Monozyklische, O-geranylierte aliphatische bzw. aromatische Verbindungen kommen in den Sektionen 9, 9c, 10, 18, 19, 20 und 30 vor. Es kann kein geographischer oder chemotaxonomischer Zusammenhang erkannt werden. Allerdings kommt die O-Geranylierung mit 15 Verbindungen deutlich häufiger in der Gattung vor als die O-Prenylierung mit bisher nur drei isolierten Derivaten.

#### 3.1.6.4.5 Bicyklische Verbindungen vom Chroman(CA) und Chromen(CE)-Typ

Bicyklische Acylphloroglucinole vom Chroman und Chromen-Typ können als Zyklisierungsprodukte von prenylierten- und geranylierten Verbindungen angesehen werden. Strukturvarianten von den in der vorliegenden Arbeit isolierten Bicyklen vom Chroman(CA)-Typ **12** bis **17** (**Abbildung 109**, S. 126) können auch in anderen *Hypericum*-Arten aus unterschiedlichen Sektionen gefunden werden, nämlich in *H. yojiroanum* (Sekt. 9, (Mamemura et al. 2011, Tanaka et al. 2011), *H. pseudopetiolatum* var. *kusianum* (Sekt. 9, Tanaka et al. 2010) sowie *H. erectum* (Sekt. 9, Ishida et al. 2010) als auch aus in *H. prolificum* (Sekt. 20, Henry et al. 2006). Dimere Varianten finden sich in *H. japonicum* (Sekt. 30, Ishiguro et al. 1994). Den isolierten Acylphloroglucinol-Derivaten vom Chromen(CE)-Typ **10** und **11** (**Abbildung 109**, S. 126) strukturell ähnliche Verbindungen wurden bisher aus *H. revolutum* (Sekt. 1, Decosterd et al. 1987), *H. acmosepium* (Sekt. 3, Li et al. 2004), *H.*

*pseudopetiolum* var. *kusianum* (Sekt. 9, Tanaka et al. 2008), *H. papuanum* (Sekt. 26, Winkelmann 2001), *H. carinatum* (Sekt. 30, Bernardi et al. 2005) und *H. polyanthemum* (Sekt. 30, Ferraz et al. 2001) isoliert. Dimere konnten wiederum aus mehreren Arten der Sektion 30, unter anderem *H. uliginosum* (Taylor und Brooker 1969), *H. caprifoliatum* (Viana et al. 2006), *H. connatum* (Fritz et al. 2007), *H. brasiliense* (Rocha et al. 1995, Rocha et al. 1996, França et al. 2009), *H. polyanthemum* (Stein et al. 2012), *H. drummondii* (Jayasuriya et al. 1989, Jayasuriya et al. 1991), *H. myrianthum* (Ferraz et al. 2002), *H. ternum* (Pinhatti et al. 2010) und *H. japonicum* (Ishiguro et al. 1986, Hu et al. 2000, Peng et al. 2006) isoliert und in *H. gentianoides* (Crispin et al. 2013) per ESI-MS nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die Einteilung nach Sektion ist in **Tabelle 39**, S. 138 zu finden.

Bizyklische Derivate vom CE- und CA-Typ sind sowohl geographisch als auch über viele Sektionen (1, 3, 5, 9, 19, 20, 26 und 30) hinweg verbreitet. Allerdings konnten im Gegensatz zu anderen Sektionen nur in allen bisher untersuchten Arten der Sektion 19 derartige Verbindungen gefunden werden.

#### 3.1.6.4.6 Trizyklische Verbindungen mit Xanthen-Struktur

Trizyklische Verbindungen mit einer Xanthen-Struktur, wie sie in den Substanzen **18-20** (**Abbildung 109**, S. 126) zu finden ist, wurden bisher nur aus *H. jovis* als Hyperjovinol B (**Abbildung 110**, S. 131) isoliert.

*Coridium* ist die einzige der insgesamt 36 Sektionen, die diese Art von Trizyklen enthält.

#### 3.1.6.4.7 Polyzyklische Verbindungen mit Citran-Struktur

Neben den in der vorliegenden Arbeit isolierten Verbindungen **21, 22, 23** (**Abbildung 95**, S. 110) konnten lediglich in Extrakten der oberirdischen Teilen von *Hypericum pseudopetiolum* var. *kusianum* (Sekt. 9) strukturell ähnliche Citran-Derivate gefunden werden (Kobayashi et al. 2009, Tanaka et al. 2010). Zwei Derivate mit einer aromatischen Acyl-Seitenkette konnten in der Familie der Clusiaceae aus den Früchten von *Clusia multiflora* (Gonzalez et al. 1995) sowie aus den Ästen von *Garcinia schomburgkiana* (Fun et al. 2006) isoliert werden.

In anderen Familien wurden Citran-Verbindungen unter anderem in den Samen von *Alpinia katsumadai*, Zingiberaceae (Hua et al. 2008, Hua et al. 2009) und *Aniba rosaeodora*, Lauraceae gefunden (Combes et al. 1970). Zwei monoterpenoide Phloroacetophenone aus *Euodia latifolia*, Rutaceae die genau wie **21/22** (Tabelle 36, S. 128) ebenfalls als Isomerenpaar isoliert worden sind, weisen das gleiche Grundgerüst auf (Goh et al. 1990).

Polyzyklische Verbindungen mit einem Citran-Gerüst konnten bisher nur aus den Sektionen 9 und 19 sowie der Familie der Clusiaceae isoliert werden. Es fällt auf, dass derartige Strukturen darüber hinaus in Arten aus Familien vorkommen, welche wie *Hypericum* das ätherische Öl in Exkretzellen (Zingiberaceae), einzelligen Idioblasten (Lauraceae) oder schizolysigenen Ölbehältern (Rutaceae, Frohne und Jensen 1998) akkumulieren.

### 3.1.6.5 Zusammenfassung der chemotaxonomischen Aspekte

**Tabelle 39:** Übersicht über die Sektionen der Gattung *Hypericum* und das Vorkommen der verschieden substituierten Mono- und Bizyklen; x = Isolierung erfolgt; alkyl = aliphatische Acyl-Seitenkette, aryl = aromatische Acyl-Seitenkette; \*dimere Verbindungen, CE = Chromen-Typ, CA = Chroman-Typ

| Sektion              | Art                   | Monozyklen  |      |              |      | Bizyklen (BPAP) |      |            |            |           |
|----------------------|-----------------------|---|------|--------------|------|-----------------|------|------------|------------|-----------|
|                      |                       | C-geranyliert                                       |      | O-prenyliert |      | O-geranyliert   |      | CE-/CA-Typ |            |           |
|                      |                       | alkyl   | aryl | alkyl        | aryl | alkyl           | aryl | alkyl      | aryl       |           |
| 1                    | <i>Campylosporus</i>  | <i>H. lanceolatum</i>                               |      |              |      |                 |      |            | x, CE      |           |
|                      |                       | <i>H. revolutum</i>                                 |      |              |      |                 |      |            | x, CE      |           |
| 3                    | <i>Ascyreia</i>       | <i>H. acmosepaium</i>                               |      |              |      |                 |      |            | x, CE      |           |
|                      |                       | <i>H. calycinum</i>                                 |      |              |      |                 |      |            | x          |           |
|                      |                       | <i>H. nakamurai</i>                                 |      |              |      |                 |      |            | x          |           |
| 7                    | <i>Roscyna</i>        | <i>H. ascyron</i>                                   |      |              |      |                 |      |            |            |           |
| 9                    | <i>Hypericum</i>      | <i>H. elegans</i>                                   |      |              |      |                 |      |            | x          |           |
|                      |                       | <i>H. erectum</i>                                   |      |              |      |                 |      | x          | x, CA      |           |
|                      |                       | <i>H. pseudopetiolatum</i><br>var. <i>kiusianum</i> |      |              |      |                 |      |            |            | x, CA, CE |
|                      |                       | <i>H. punctatum</i>                                 |      |              |      |                 |      |            |            | x         |
|                      |                       | <i>H. yojiroanum</i>                                |      |              |      |                 |      |            |            | x, CA     |
| 9c                   | <i>Sampsonia</i>      | <i>H. sampsonii</i>                                 |      |              |      |                 |      |            | x          |           |
| 10                   | <i>Olympia</i>        | <i>H. olympicum</i> cf<br><i>uniflorum</i>          |      |              |      |                 |      |            | x          |           |
| 18                   | <i>Taeniocarpium</i>  | <i>H. linarioides</i>                               |      |              |      |                 |      |            | x          |           |
| 19                   | <i>Coridium</i>       | <i>H. amblycalyx</i>                                |      |              |      |                 |      |            | x, CA      |           |
|                      |                       | <i>H. empetrifolium</i>                             |      |              |      |                 |      |            | x, CA, CE  |           |
|                      |                       | <i>H. jovis</i>                                     |      |              |      |                 |      |            | x, CA      |           |
| 20                   | <i>Myriandra</i>      | <i>H. prolificum</i>                                |      |              |      |                 |      |            | x, CA      |           |
|                      |                       | <i>H. densiflorum</i>                               |      |              |      |                 |      |            | x, x       |           |
| 26                   | <i>Humifusoideum</i>  | <i>H. papuanum</i>                                  |      |              |      |                 |      |            | x, CE      |           |
| 29                   | <i>Brathys</i>        | <i>H. styphelioides</i>                             |      |              |      |                 |      |            | x          |           |
| 30                   | <i>Trigynobrathys</i> | <i>H. brasiliense</i>                               |      |              |      |                 |      |            | x*, CE     |           |
|                      |                       | <i>H. caprifoliatum</i>                             |      |              |      |                 |      |            | x*, CE     |           |
|                      |                       | <i>H. carinatum</i>                                 |      |              |      |                 |      |            | x*, CE     |           |
|                      |                       | <i>H. connatum</i>                                  |      |              |      |                 |      |            | x*, CE     |           |
|                      |                       | <i>H. drummondii</i>                                |      |              |      |                 |      |            | x*         |           |
|                      |                       | <i>H. gentianoides</i>                              |      |              |      |                 |      |            | x*, CE     |           |
|                      |                       | <i>H. japonicum</i>                                 |      |              |      |                 |      |            | x*, CA, CE |           |
|                      |                       | <i>H. myrianthum</i>                                |      |              |      |                 |      |            | x*, CE     |           |
|                      |                       | <i>H. polyanthemum</i>                              |      |              |      |                 |      |            | x, x*, CE  |           |
|                      |                       | <i>H. ternum</i>                                    |      |              |      |                 |      |            | x*, CE     |           |
| <i>H. uliginosum</i> |                       |   |      |              |      |                 |      | x*, CE     |            |           |

Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll die unterschiedliche Klassifizierung der BPAPs vom CA- und CE-Typ in die entsprechenden ortho oder para-verknüpften Strukturvarianten (**Abbildung 9**, S. 15) nicht weiter diskutiert, aber dennoch angemerkt werden, dass bisher nur drei BPAPs vom CE-p-Typ aus der Gattung isoliert werden konnten, nämlich das dimere

Sarothralen D aus *H. japonicum* (Sekt. 30, Ishiguro, 1994) und die beiden in der vorliegenden Arbeit isolierten Verbindungen **14** und **15** (**Abbildung 109**, S. 126). Insgesamt kommt der CE-Typ häufiger als der CA-Typ vor, wobei nur in den Sektionen 9, 19 und 30 beide nebeneinander vorkommen (**Tabelle 39**, S. 138). Über die Sektionsgrenzen hinweg fällt auf, dass C- und O-Geranylierung häufiger vorkommt als O-Prenylierung wobei die C- und O-geranylierten, als auch die O-prenylierten monozyklischen Verbindungen der Gattung *Hypericum* weit weniger häufig aromatische Acyl-Seitenketten besitzen als es in der Familie der Clusiaceae der Fall ist (Cuesta-Rubio et al. 2005, Baggett et al. 2005). Außer in *Dryopteris*, *Myrtus*, *Mallotus*, *Eucalyptus* und *Helichrysum*, sind dimere Verbindungen häufig in der Gattung *Hypericum* zu finden (Pal Singh und Bharate 2006), wobei diese in der Sektion 30 alle dem CE-Typ angehören und überwiegend eine aliphatische Acyl-Seitenkette besitzen (**Tabelle 39**). Dies stellt aus chemotaxonomischer Sicht in dreierlei Hinsicht eine Besonderheit dar (Alkyl-Seitenkette, Dimer, CE-Typ), und somit könnten diese Verbindungen durchaus als ‚Biomarker‘ für die Sektion angesehen werden. Diese Rolle könnte für die Sektion 19 die BPAPs vom CA-Typ übernehmen, weil sie in allen drei bisher untersuchten Arten von *Coridium* vorkommen, was aber erst noch bestätigt werden müsste.

#### Chemotaxonomischer „Steckbrief“ der Sektion 19 *Coridium*

- + „Aromat-O-Monoterpen“-Addukte bisher nur in *H. empetrifolium* nachgewiesen
- + Trizyklische Verbindungen mit Xanthen-Struktur bisher nur in dieser Sektion gefunden
- ✓ Bicyklen vom Chroman(CE)- und Chromen(CA)-Typ
- ✓ Polyzyklen mit Citran-Struktur (außerdem nur in Sektion 9)
- ✓ O-Geranylierung und O-Prenylierung
- ✓ C-Prenylierung und C-Geranylierung
- bisher noch nicht nachgewiesen: monozyklische OGly und OCM, dimere Strukturen, C-C-Monoterpen-Addukte (5-Ring, Spiro), bicyklische Derivate vom Furano-Typ, PPAPs, polyzyklische Adamantan-Derivate, Substanzen mit aromatischer Acyl-Seitenkette

**Abbildung 111:** Zusammenfassung der chemotaxonomischen Gemeinsamkeiten oder Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens und der Beschaffenheit der bisher aus der Sektion 19 isolierten Acylphloroglucinole in Form eines Steckbriefes. Zeichenerklärung: „+“ = Besonderheit für die Sektion, „-“ = nicht für die Sektion nachgewiesen, „✓“ = für die Sektion nachgewiesen.

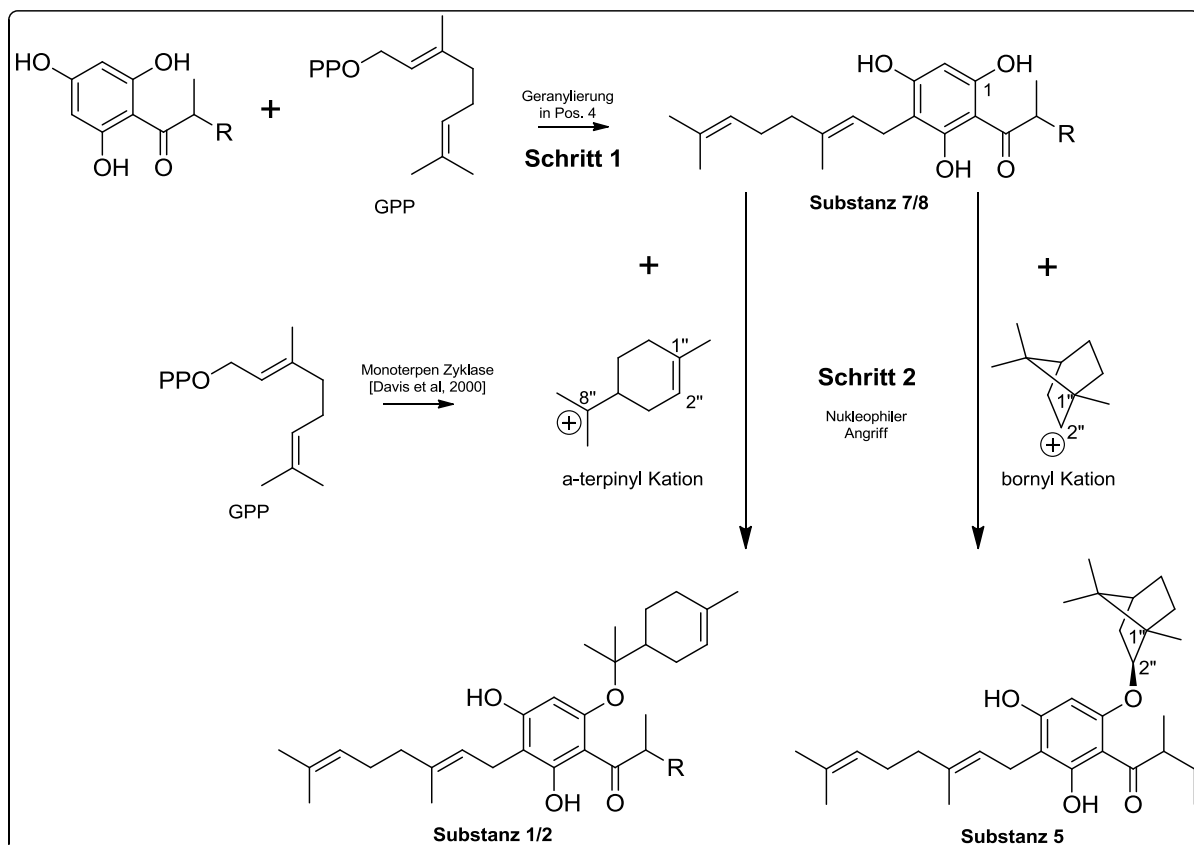
### 3.1.6.6 Biosynthetische Aspekte

Die Biosynthese des Phloroglucin-Grundgerüsts der in der vorliegenden Arbeit isolierten Verbindungen erfolgt im Polyketidweg aus drei Malonyl-CoA Einheiten und entweder einem Isobutyryl-CoA ( $R = \text{CH}_3$ ) oder 2-Methylbutyryl-CoA ( $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$ ) als Startereinheiten nach dem Prinzip einer Claisen-Esterkondensation (Dingermann 2004). Per q-NMR konnte die Bildung der Phloroglucin-Einheit über den Polyketid-Mechanismus während der Biosynthese des Hyperforins aus *H. perforatum*-Keimlingen nach Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose gezeigt werden (Adam et al. 2002). Anhand von Versuchen an einer *H. calycinum*-Zellkultur konnte die Beteiligung einer Isobutyrophenone-Synthase (BUS) an der Bildung der Phloroisobutyrophenons nachgewiesen werden. Wie die BUS zählen auch die Benzophenon-Synthase (BPS) und die Chalkon-Synthase (CHS) zu den Typ-III Polyketid-Synthasen (PKS). Die BPS katalysiert die Bildung des Phlorobenzophenons und die CHS die des Naringenin Chalkons. Beide können in einer intramolekularen Zyklisierungsreaktion zu Xanthonen bzw. Flavonoiden reagieren (Klingauf et al. 2005). In *H. perforatum* konnte die Biosynthese des Hyperforins und Adhyperforins ausgehend von den  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren L-[U- $^{13}\text{C}_5$ ]Valin und L-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]Isoleucin per HPLC-MS/MS nachgewiesen werden (Karppinen et al. 2007). Die Prenylierungsreaktionen bei der Biosynthese des Hyperforins laufen über Dimethylallyltransferasen, was mittels *H. calycinum* Zellkulturen gezeigt werden konnte. (Boubakir et al. 2005). Darüber hinaus konnten Synthesestufen aus *H. perforatum* per LC/SPE/NMR, nämlich Hyperfirin und Adhyperfirin detektiert werden, welche in einem letzten Prenylierungsschritt zum Hyperforin bzw. dem Adhyperforin fertig synthetisiert werden (Tatsis et al. 2007). Die C-Geranylierung des aromatischen Phloroglucin-Grundkörpers der isolierten Verbindungen könnte über einen ähnlichen Mechanismus ablaufen wie für die Shikonin-Biosynthese bei der die LePGT (*L. erythrorhizon* *p*-hydroxybenzoat-geranyltransferase) das GPP als Substrat akzeptiert und so zur Geranylierung eines aktivierten Aromaten beiträgt (Yazaki 2001). Der Mechanismus einer O-Prenylierung konnte in Xanthonen als enzymkatalysierte Kondensationsreaktion bei Anwesenheit von DMAPP gezeigt werden (Pockrandt et al. 2012). Entscheidend für die einzelnen Kondensations- und Zyklisierungsreaktionen ist die Enzymausstattung der Pflanze. Spontan ablaufende Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen sind allerdings immer möglich. Prenylierungsreaktionen laufen auch bei der Bildung von Cumarinen (Hamerski et al. 1990), Cannabinoiden (Fellermeier und Zenk 1998) und Hopfenbitterstoffen (Zuurbier et al. 1998)

enzymkatalysiert ab, wobei die Transferasen Substratspezifität aufweisen (Sasaki et al. 2008).

### 3.1.6.6.1 Monozyklische Acylphloroglucinole

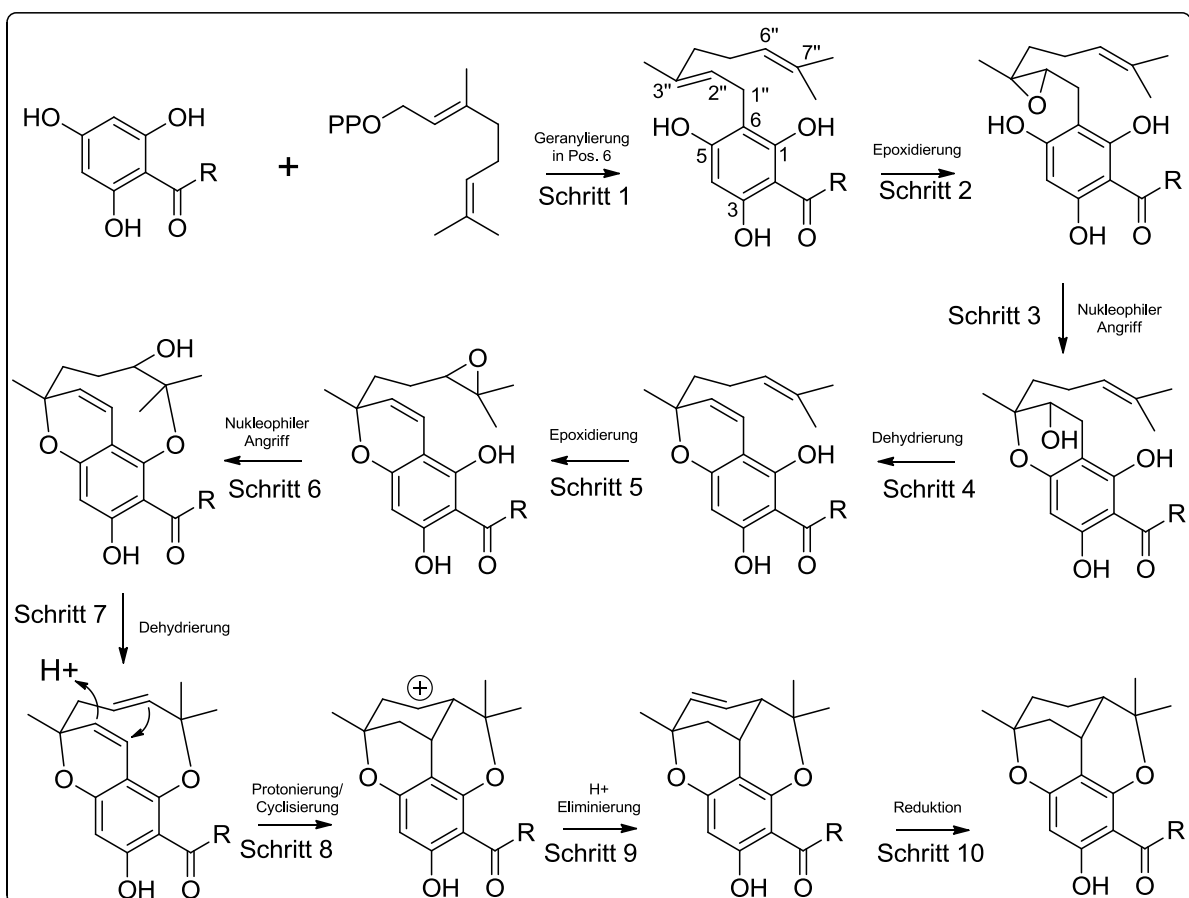
Aufgrund der Tatsache, dass im ätherischen Öl der oberirdischen Teile von *H. empetrifolium* die beiden Monoterpene Limonen (5,4%) und Borneol (1,6%) per GC-MS bestimmt werden konnten (Petrakis et al. 2005), liegt die Vermutung nahe, dass in der Pflanze **7** und **8** mit den entsprechenden kationischen Verbindungen (Davis und Croteau 2000) zu den Terpen-Addukten **1-5** (**Abbildung 108**, S. 124) reagieren (**Abbildung 112**). In Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung der Ölbehälter von *H. perforatum* konnte gezeigt werden, dass neben ätherischem Öl vor allem Hyperforin in den Kavitäten kummuliert, was zeigt, dass die Biosynthese der Monoterpene und die der Acylphloroglucinole räumlich sehr eng miteinander verknüpft ist (Soelberg et al. 2007).



**Abbildung 112:** Mögliche Biosynthese der Monozyklischen-Terpen-Addukte. **Schritt 1:** Geranylierung des Acylphloroglucinol-Rings via Geranyldiphosphat unter Bildung von **7/8**; **Schritt 2:** Nukleophiler Angriff der aromatischen Hydroxylgruppe (C-1) an C-8'' des  $\alpha$ -terpinyl Kations, bzw. an C-2'' des bornyl Kations führt zu **1** und **2** bzw. der Substanz **5**.

### 3.1.6.6.2 Bi-, tri- und polyzyklische Acylphloroglucinole

Die Verbindungen **7** und **8** stellen offensichtlich Synthesevorstufen für komplexere Strukturen dar. Die Biosynthese der bi- und trizyklischen Verbindungen **10** bis **20** läuft wahrscheinlich über eine bzw. zwei intra-molekulare Zyklisierungsreaktionen ab, wie von Crockett et al. (2008) bereits für Hyperjovinol B und Hypercalyxone A und B postuliert wurde (Stanjek et al. 1999). Die Synthese der isolierten Verbindungen Empetrifranzinan A-C (**21-23**) könnte nach einem ähnlichen Mechanismus ablaufen wie bereits für prenylierte und geranylierte Citran-Derivate beschrieben wurde (Begley et al. 1977, Wang und Lee 2011). Somit dürften wohl alle isolierten Verbindungen, außer Substanz **6**, als Derivate der beiden mono-geranylierten, monozyklischen Verbindungen angesehen werden. Aufgrund von bekannten, enzymkatalysierten Schlüsselmechanismen bei der Biosynthese von Terpenen (Davis und Croteau 2000, Degenhardt et al. 2009) wird eine mögliche Biosynthese für die bi-, tri- und polyzyklischen Verbindungen vorgeschlagen (**Abbildung 113**).



**Abbildung 113:** Mögliche Biosynthese der polyzyklischen Acylphloroglucinol-Derivate. Schritt 1: Geranylierung des Acylphloroglucinol-Ringes via Geranyldiphosphat; Schritt 2: Epoxidierung der 2'',3'' Doppelbindung und Faltung des Geranyl-Substituenten; Schritt 3: Nukleophiler Angriff der aromatischen Hydroxylgruppe (C-5) an C-3'' und Öffnung des Epoxids; Schritt 4: Wassereliminierung;

Schritt 5: Epoxidierung der 6'',7'' Doppelbindung; Schritt 6: Nukleophiler Angriff der zweiten aromatischen Hydroxylgruppe (C-1) an C-7'' und Öffnung des Epoxids; Schritt 7: Dehydrierung und Deprotonierung der 1'',2'' Doppelbindung; Schritt 8: Zyklisierungsreaktion und Generierung des korrespondierenden Kations; Schritt 9: Eliminierung des Protons; Schritt 10: Reduktion der Doppelbindung.

### 3.1.6.7 Diskussion der Charakterisierung per DC

Das Europäische Arzneibuch 7.0 prüft in allen drei offiziellen Monographien Johanniskraut, *Hyperici herba*, Quantifizierter Johanniskrauttrockenextrakt, *Hyperici herba extractum siccum quantificatum* und Johanniskraut für homöopathische Zubereitungen, *Hypericum perforatum ad praeparationes homoeopathicas per DC* bei der Prüfung auf Identität (Detektion mit NSR, Auswertung bei 365 nm) lediglich auf die Anwesenheit von Flavonoiden und Naphthodianthronen (Europäisches Arzneibuch 2011). Auch die aktuelle Auflage des DAC beschränkt sich bei den Alternativverfahren zur Identifizierung von Ausgangsstoffen in der Monographie Johanniskraut auf die Anwesenheit der Flavonoide Hyperosid und Rutosid (Referenzlösung I, Deutscher Arzneimittel-Codex 2009-2010). Im DAC 86, 3. Ergänzung 1991 waren es noch die Hypericine, welche mittels 0,5 N-ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung als Sprühreagenz bei 365 nm detektiert wurden (Deutscher Arzneimittel-Codex 1986).

Die DC-Prüfung auf Hyperforin, einem wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffe der offiziellen Droge ist nur im USP 36 explizit aufgeführt. Es wird das Verhalten bei 254 und 366 nm sowie nach Detektion mit Echtblausalz-B auf der DC-Platte beschrieben. Der DC-Nachweis von Hyperforin kann bei *Hyperici flos recens* (Frische Johanniskrautblüten) EB 6 zur Identitätsprüfung herangezogen werden (Schütt und Schulz 2007). Hierbei zeigt das Hyperforin auf Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, FM Heptan-Isopropanol-Ameisensäure (90:15:0,5, V/V/V) bei 254 nm eine starke Fluoreszenzminderung und bei 366 nm blaue Eigenfluoreszenz bei R<sub>F</sub> = 0,4 bis 0,5. Nach dem Besprühen mit Echtblausalz B erscheinen die Banden gelb (Maisenbacher 1991, Maisenbacher und Kovar 1992).

Beim DC zum Nachweis von Blüteninhaltsstoffen (Biapigenin und Hyperforin, Schütt und Schulz 2007) an Kieselgel, FM: Heptan-Aceton-tert.-Butylmethylether-Ameisensäure 85% (33:35:30:2, V/V/V/V) zeigt das Hyperforin bei R<sub>F</sub> = 0,8 bei 254 nm eine stark fluoreszierende Zone. Eine zweite schwache Zone (R<sub>F</sub> = 0,55) reagiert mit oranger Farbe. Hierbei könnte es sich um Adhyperforin handeln (Maisenbacher 1991).

Bei der Isolierung von Hyperforin wurden einzelne Fraktionen auf Kieselgel-DC-Platten mit einem FM-Gemisch aus Hexan-EtOAc (9:1; V/V) aufgetragen und mit einer Mischung aus Anisaldehyd-Schwefelsäure-Essigsäure (1:2:100; V/V) besprüht. Bei  $R_F = 0,42$  ergibt das Hyperforin eine blaue Bande (Adam et al. 2002).

Die isolierten Acylphloroglucinole können mit allen eingesetzten Sprühreagenzien auf der DC-Platte detektiert werden. Die meisten Reagenzien reagieren allerdings relativ unselektiv, d.h. es konnte kein spezifisches Sprühreagenz für die unterschiedlichen mono-, bi- und trizyklischen Verbindungen gefunden werden.

### 3.1.6.8 Diskussion der Stabilität gegenüber Temperatur und Licht

Substanz **8** ist im Besonderen in den verschiedenen zellbiologischen Assays eingesetzt worden. Deshalb wurde ein Stabilitätsversuch auf eine mögliche Zyklisierungsneigung des Geranylrestes per  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie durchgeführt. Es zeigten sich nach 120 Stunden in deuteriertem Chloroform (pH 5) keinerlei Hinweise im Protonenspektrum (**Abbildung 106**, S. 121 und **Abbildung 107**, S. 122) auf Abbauprodukte. Die Verbindung ist somit gegenüber Temperatur und Lichteinfluss in einem aprotischen, mittelpolarem Lösungsmittel unter Laborbedingungen stabil.

In Hexan gelöstes Hyperforin hingegen wird innerhalb von 3 Tagen bei der Lagerung (Zimmertemperatur) in Furohyperforin und verschiedene isomere Formen umgewandelt. In protischen Lösungsmitteln, wie Methanol oder Ethanol scheint die Verbindung relativ stabil zu sein (Hänsel und Sticher 2010). In weiteren Stabilitätsversuchen konnte per HPLC-UV (290 nm) gezeigt werden, dass in einem methanolischen Johanniskraut-Trockenextrakt, welcher in gepufferter Lösung und verschiedenen pH-Werten bei Raumtemperatur und normalem Laborlicht über einen Zeitraum von 0, 4, 24, 48 und 144 Stunden inkubiert wurde, nach 4 h kein Hyperforin mehr vorhanden war. Der entsprechende Peak war im Chromatogramm komplett verschwunden, dafür aber Peaks zu sehen, welche den entstandenen Furohyperforin-Derivaten entsprachen (Ang et al. 2004, Liu et al. 2005). In öligen Johanniskraut-Zubereitungen nimmt der Gehalt an Hyperforin und Adhyperforin zugunsten des Hauptabbauproduktes Furohyperforin ebenfalls ab (Isacchi et al. 2007).

Das Europäische Arzneibuch schreibt für den Quantifizierten Johanniskrautrockenextrakt, bei dessen Herstellung die Inhaltsstoffe thermisch belastet und oxidativen Einflüssen ausgesetzt sind, keinen Zusatz an Antioxidantien vor. Als Extraktionsmittel dürfen nur Ethanol 50-80% (V/V) oder Methanol 50-80% (V/V) verwendet werden. In einer Reihe von Fertigarzneimitteln konnten keine Zersetzungsprodukte nachgewiesen werden, was an den ebenfalls im Extrakt enthaltenen polyphenolischen Verbindungen, wie z. B. den Flavonoiden liegen dürfte (Hartke 1997). Eine Langzeitstabilität von nicht stabilisiertem Hyperforin scheint nur bei Temperaturen von -70 °C unter Schutzgas gewährleistet (Orth et al. 1999, Orth 1999).

Substanz **8** wurde vom Zeitpunkt der Isolierung im November 2010 bis zur Stabilitätsmessung im März 2013 bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert was im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum zu keinen zusätzlichen Signalen geführt hat (siehe t = 5). Auch gelegentliches Auftauen und Lösen der Substanz, um sie für die zellbiologischen Untersuchungen, die Stabilitäts- und Reinheitsuntersuchungen bzw. den Versuchen zur Charakterisierung per DC zu verwenden und den damit verbundenem Einfluss von Sauerstoff auf die Substanz ließ keinen Effekt auf die Stabilität erkennen.

Das Hyperforin wird in neueren Arbeiten zur pharmakologischen Aktivitätsbestimmung überwiegend als stabiles DCHA-Salz eingesetzt. Gerade in unpolaren, aprotischen Lösungsmitteln entstehen Zyklisierungsprodukte, welche die Enol-Struktur im Cyclohexandion-Grundgerüst zerstören. Dieses Strukturmerkmal scheint für die Reuptake-Hemmung von Neurotransmittern essentiell (Verotta et al. 2002), aber auch für die antibakterielle Aktivität wichtig zu sein (Vajs et al. 2003).

Substanz **8** hingegen scheint sowohl bei der Lagerung bei -20 °C über mehrere Jahre als auch beim Umgang im Laboralltag stabil zu sein, d.h. dass die Geranyl-Seitenkette keine Zyklisierung unter den Versuchsbedingungen eingeht. Ob dies einen Einfluss auf die pharmakologische Aktivität der Substanz hätte, wie für das Hyperforin bzw. dessen Abbauprodukte gezeigt wurde, muss noch geklärt werden.

## 3.2 Zellbiologische Untersuchungen

### 3.2.1 Proliferations-Assay

Bis auf die Substanzen **5**, **6** und **9**, welche nicht in ausreichender Menge für die pharmakologischen Tests isoliert werden konnten, wurden alle Verbindungen im Proliferations-Assay mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) getestet, wobei sich die IC<sub>50</sub>-Werte in einem Bereich von 6-30 µM bewegten. Als Positiv-Kontrolle wurde Xanthohumol (XAN) verwendet (**Tabelle 40**). Die Durchführung des Assays und die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte samt Standardabweichung sind unter **2.2.6**, S. 48 zu finden.

**Tabelle 40: Anti-proliferative Aktivität der isolierten Acylphloroglucinole auf HMEC-1**

IC<sub>50</sub>-Wert (Mittelwert ± Standardabweichung); \*mit Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2013 ACD/Labs) bei 25° C berechnete Log P-Werte. Die Werte sind unter [www.cas.org/products/scifinder](http://www.cas.org/products/scifinder) zu finden.

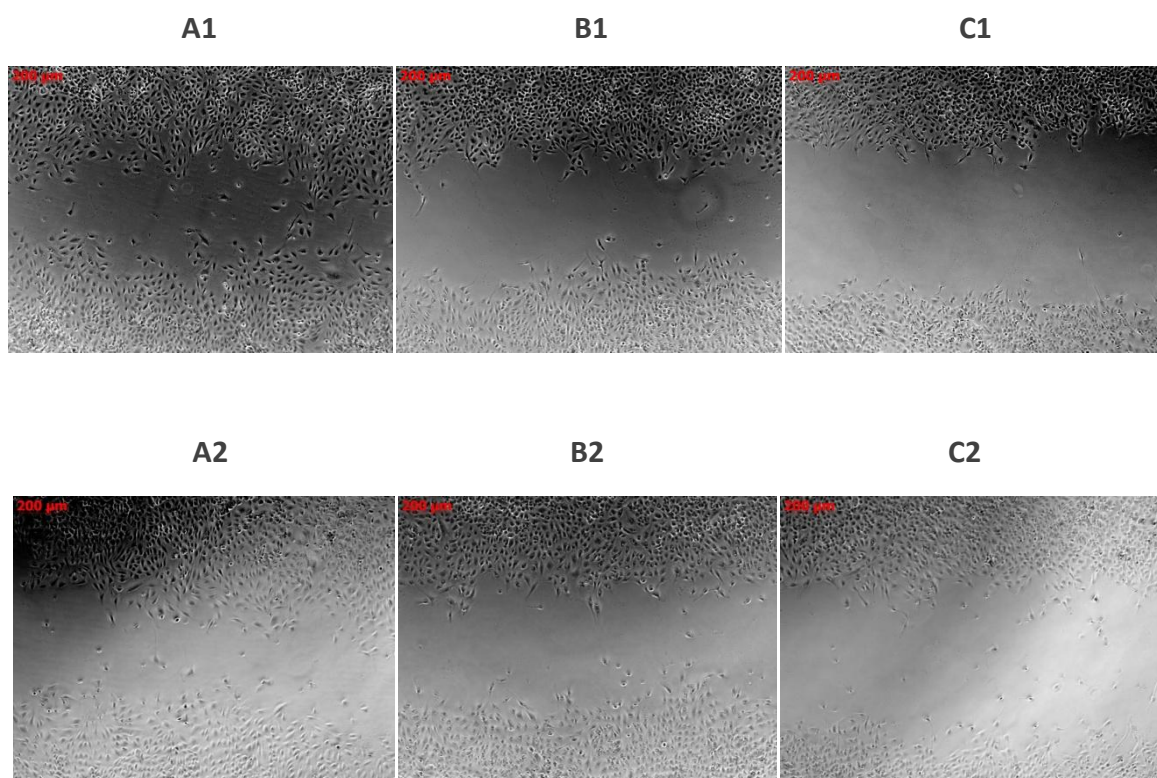
|                 | Substanz                 | IC <sub>50</sub> [µM] | Log P*         | Substanz               | IC <sub>50</sub> [µM] | Log P*         |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|----------------|------------------------|-----------------------|----------------|
|                 | Methylpropionyl-Derivate |                       |                | Methylbutyryl-Derivate |                       |                |
| Mono-<br>zyklen | <b>1</b>                 | 6,5 ± 0,1             | 9,555 ± 0,443  | <b>2</b>               | 8,2 ± 0,3             | 10,064 ± 0,443 |
|                 | <b>3</b>                 | 11,0 ± 1,2            | 10,106 ± 0,464 | <b>4</b>               | 7,3 ± 0,4             | 10,616 ± 0,464 |
|                 | <b>7</b>                 | 21,0 ± 0,4            | 5,486 ± 0,425  | <b>8</b>               | 11,0 ± 1,2            | 5,995 ± 0,425  |
| Bi-             | <b>10</b>                | 24,4 ± 2,2            | 5,866 ± 0,556  | <b>11</b>              | 15,0 ± 1,4            | 6,376 ± 0,556  |
|                 | <b>12</b>                | 23,4 ± 1,0            | 4,726 ± 0,602  | <b>13</b>              | 18,4 ± 1,7            | 5,235 ± 0,602  |
|                 | <b>14</b>                | 29,6 ± 3,5            | 5,521 ± 0,547  | <b>15</b>              | 21,1 ± 0,3            | 6,031 ± 0,547  |
|                 | <b>16</b>                | 16,5 ± 1,4            | 5,079 ± 0,527  | <b>17</b>              | 13,3 ± 3,8            | 5,588 ± 0,527  |
| Tri-            | <b>18</b>                | 24,4 ± 0,3            | 4,874 ± 0,523  | <b>19</b>              | 16,6 ± 1,6            | 5,383 ± 0,523  |
|                 |                          |                       |                | <b>20</b>              | 29,2 ± 1,3            | 3,559 ± 0,534  |
| Poly-           | <b>21/22</b>             | 11,7 ± 1,8            | 3,960 ± 0,623  | <b>23</b>              | 9,2 ± 2,0             | 4,469 ± 0,623  |
|                 | <b>Xan</b>               | 11,4 ± 1,1            | 4,821 ± 0,416  |                        |                       |                |

Die getesteten Verbindungen zeigten strukturabhängige Unterschiede in ihrer Aktivität. So scheinen die monozyklischen Verbindungen (IC<sub>50</sub>-Werte 6-21 µM) und polyzyklischen Derivate (IC<sub>50</sub>-Werte ~10 µM), welche als monozyklische, monoterpenoide Verbindungen angesehen werden können, tendenziell aktiver zu sein als die Bi- und Trizyklen (IC<sub>50</sub>-Werte 13-29 µM, **Tabelle 40**). Im direkten Vergleich der Monoterpen-Addukte, welche mit ca. 10 die höchsten Log P-Werte besitzen, mit den Polyzyklen (Log P = ca. 4) lässt sich kein Unterschied in der anti-proliferativen Aktivität feststellen. Allerdings liegen die IC<sub>50</sub>-Werte

der Methylpropionyl-Derivate bis auf Substanz **1** und **2** durchweg höher als die der Methylbutyryl-Derivate, was wiederum mit dem Log P-Wert der jeweiligen Substanzpaare korreliert.

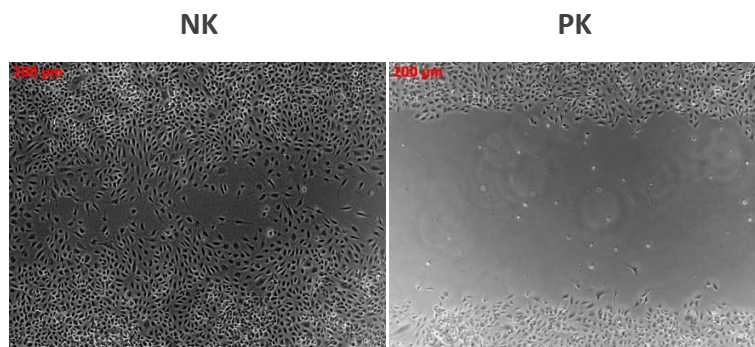
### 3.2.2 Migrations-Assay

Für Substanz **1** konnte im Proliferations-Assay mit HMEC-1 die höchste Aktivität aller isolierten Verbindungen ermittelt werden ( $IC_{50} 6,5 \pm 0,1 \mu M$ ). In einem weiteren *in vitro*-Test sollte der Effekt von **1** auf die Migration der Endothelzellen in dem Migrations-Assay (2.2.7, S. 49) im Vergleich mit **2**, dem 2-Methylbutyryl-Derivat getestet werden. Beide Substanzen waren in der Lage die Migration der HMEC-1 in die freie Fläche zwischen den Zellrasen nach 19 Stunden Inkubation mit 1, 10 und 20  $\mu M$  konzentrationsabhängig zu hemmen (**Abbildung 114**).



**Abbildung 114: Migrations-Assay mit HMEC-1.** Aufnahmen nach 19 Stunden Inkubation in Konzentrationen von 1 bis 20  $\mu M$  mit **1** (A1-C1) und **2** (A2-C2).

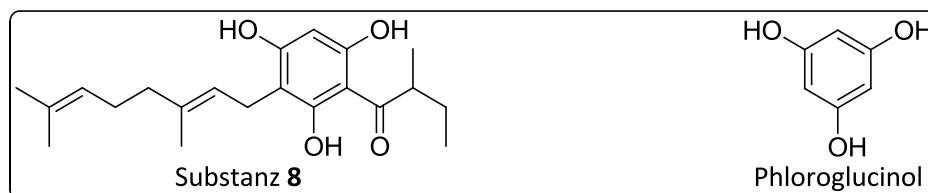
Waren die Zellen in der „Negativ“-Kontrolle in der Lage den Spalt fast vollständig auszufüllen, so fand bei der „Positiv“-Kontrolle keine Migration der Endothelzellen statt, was gut an der zellfreien Fläche zwischen den Zellrasen zu sehen war (**Abbildung 115**, S. 148).



**Abbildung 115: Migration-Assay mit HMEC-1.** Negativ-Kontrolle (NK) und Positiv-Kontrolle (PK = M199, s. Tabelle 18, S. 43).

Trotz der guten Ergebnisse für die beiden Substanzen mussten aufgrund der geringen isolierten Menge die weiteren *in vitro*-Versuche mit einer anderen ähnlich aktiven Substanz durchgeführt werden. Die Verbindung **8**, welche in der höchsten Ausbeute isoliert werden konnte, zeigte zwar im gleichen Konzentrationsbereich keine Hemmung der Migration, allerdings war in Vorversuchen in einem komplexeren Testsystem, dem Tube-formation Assay, (siehe Material und Methoden) eine Aktivität zu beobachten.

### 3.2.3 Vergleich von Substanz 8 mit Phloroglucinol



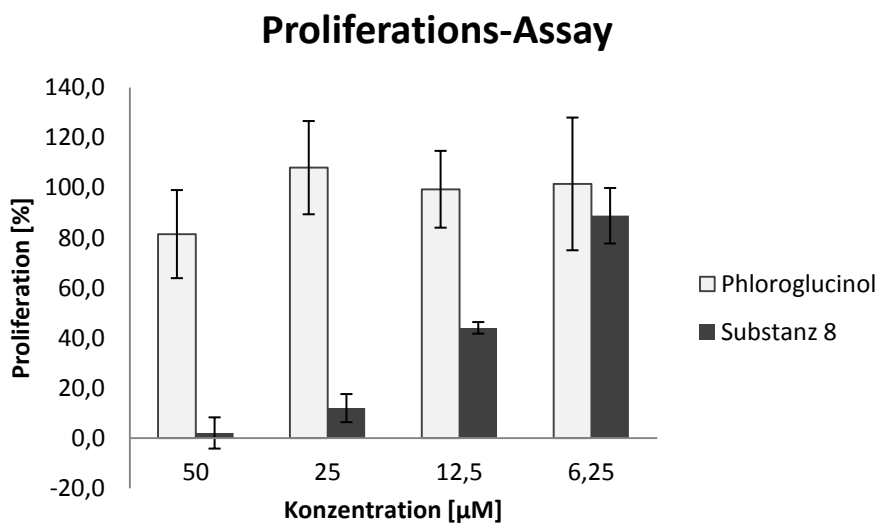
**Abbildung 116:** Substanz **8** und Phloroglucinol.

#### 3.2.3.1 Proliferations-Assay

Das Phloroglucinol (**Abbildung 116**) sollte als Kontrolle für die weiteren pharmakologischen Testungen herangezogen werden, weil es in der Literatur Hinweise auf eine potentielle anti-angiogene Aktivität gibt (Kwon et al. 2012).

Zunächst wurde ein Proliferations-Assay (**2.2.6**, S. 48) mit den beiden Verbindungen in vier verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, um den Effekt beider Phloroglucin-Derivate auf die Fähigkeit der Endothelzellen zu proliferieren im direkten Vergleich zu beobachten.

Bereits in diesem Versuch zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Proliferationshemmung der Substanz **8** und Phloroglucinol (**Abbildung 117**).



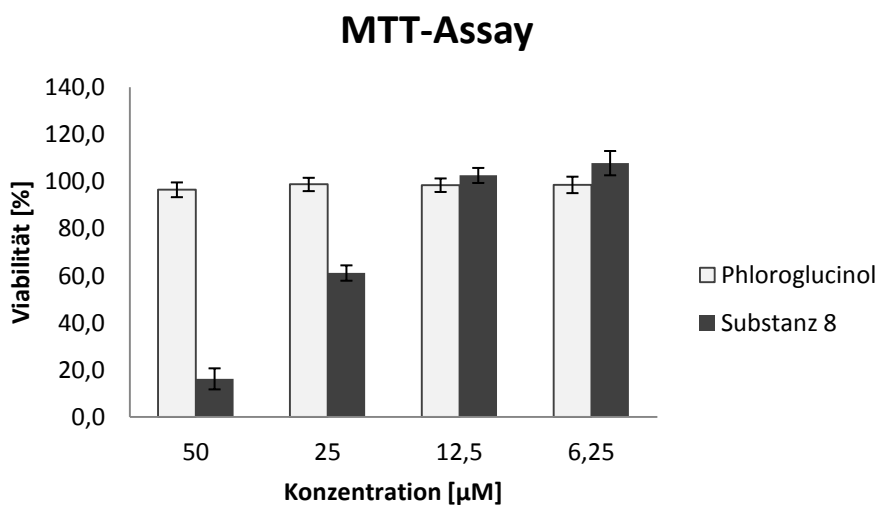
**Abbildung 117:** Proliferation von HMEC-1 nach 72 Stunden in Abhängigkeit von der Konzentration von **8** und Phloroglucinol.

Ein antiproliferativer Effekt des Phloroglucinols auf die Endothelzellen ist in den Konzentrationen 6,25, 12,5 und 25  $\mu\text{M}$  nicht festzustellen, weil sich die Zellzahl der behandelten Zellen nach den 72 Stunden Inkubationszeit nicht von der Zellzahl der unbehandelten Kontrollzellen unterscheidet. Die Proliferation liegt im Bereich von 100%. Nur bei der höchsten Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) ist eine Reduktion der Proliferation auf ca. 80% zu erkennen. Substanz **8** hingegen zeigt nach der Inkubation ( $t = 72$  Stunden) bei 50  $\mu\text{M}$  eine deutliche Hemmung der Zellzahl auf fast 0%, das entspricht der Zellzahl zum Zeitpunkt der Zugabe der Substanzen ( $t = 0$  Stunden), also 24 Stunden nach dem Aussäen. Mit geringerer werdender Konzentration steigt die Proliferation entsprechend bis zu einem Wert von 90% ( $c = 6,25$   $\mu\text{M}$ ) an. Hier beträgt der anti-proliferative-Effekt also lediglich 10%, bei einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  liegt die Proliferationshemmung allerdings bereits bei knapp 60% (**Abbildung 117**). Diese Ergebnisse decken sich mit dem bereits ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $11,0 \pm 1,2$   $\mu\text{M}$ .

### 3.2.3.2 MTT-Assay

Der MTT-Assay (2.2.8, S. 49) gibt Hinweise auf die Vitalität bzw. Viabilität von Zellen, welche sich mit Hilfe der mitochondrialen Aktivität bestimmen lässt. Die Zellen wurden über 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen (6,25, 12,5, 25 und 50  $\mu\text{M}$ ) beider Substanzen inkubiert, um anschließend für drei Stunden mit der MTT-Lösung überschichtet zu werden. Die Mitochondrien sezernieren eine Reduktase, die in dieser Zeit das zunächst gelbe MTT in ein blaues Formazan zu reduzieren vermag. Die Intensität des entstandenen blauen Farbstoffs wird anschließend photometrisch vermessen und der Wert der unbehandelten Zellen gleich 100% gesetzt.

Bei allen vier getesteten Konzentrationen des Phloroglucinols ist keine Beeinträchtigung der Viabilität der HMEC-1 festzustellen. Die Viabilität der Zellen, die mit Substanz **8** in den Konzentrationen 6,25 und 12,5  $\mu\text{M}$  inkubiert wurden, beträgt ebenfalls 100%, wohingegen die Konzentrationen 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  eine Reduktion der Aktivität der mitochondrialen Reduktase auf 60% bzw. auf unter 20% bewirkt haben (**Abbildung 118**).



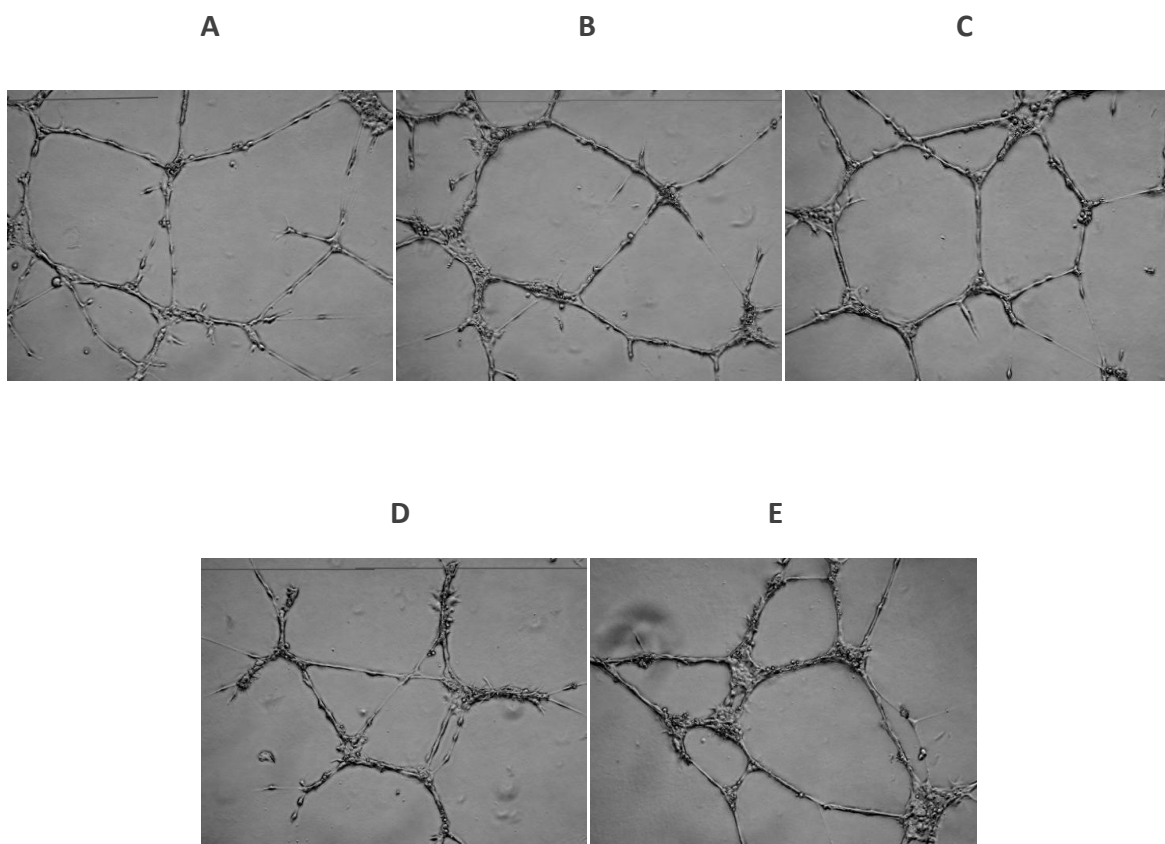
**Abbildung 118:** Viabilität der HMEC-1 in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanz **8** und Phloroglucinol.

### 3.2.3.3 Tube-formation-Assay

Der Tube-formation-Assay (2.2.9, S. 50) stellt den komplexesten pharmakologischen Versuch in der vorliegenden *in vitro* Testreihe dar. In diesem Assay, der seit über 20 Jahren Verwendung findet, wird das Vermögen von Endothelzellen gezeigt, auf einer extrazellulären

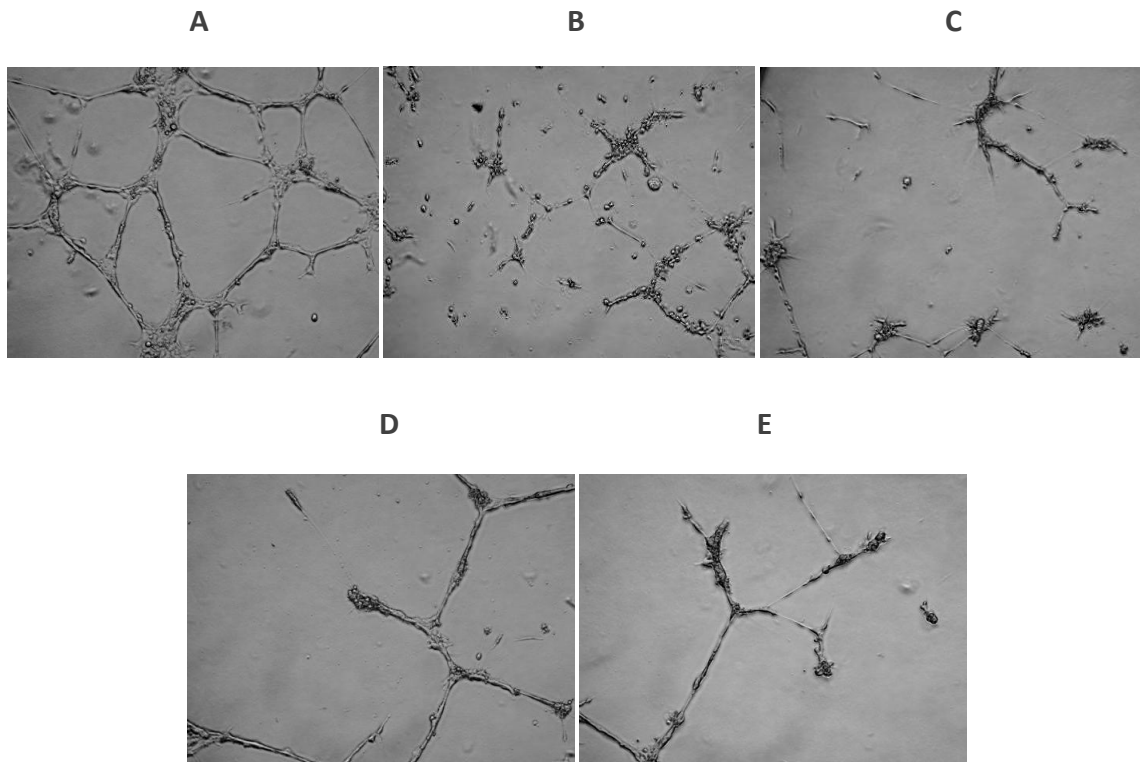
Matrix kapillarähnliche Strukturen auszubilden (Arnaoutova et al. 2009). Dies zu verhindern bzw. zu reduzieren, konnte in der vorliegenden Arbeit zumindest für Substanz **8** gezeigt werden.

Obwohl für Substanz **8** die beiden Konzentrationen 25 und 50  $\mu\text{M}$  im MTT-Assay zu einer Reduktion der Viabilität geführt haben, wurden das Phloroglucinol und **8** in den Konzentrationen 6,25, 12,5, 25 und 50  $\mu\text{M}$  getestet. Für das Phloroglucinol ist in allen vier Konzentrationen keine sichtbare Hemmung der Tube-formation im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle (A) zu sehen (**Abbildung 119**).



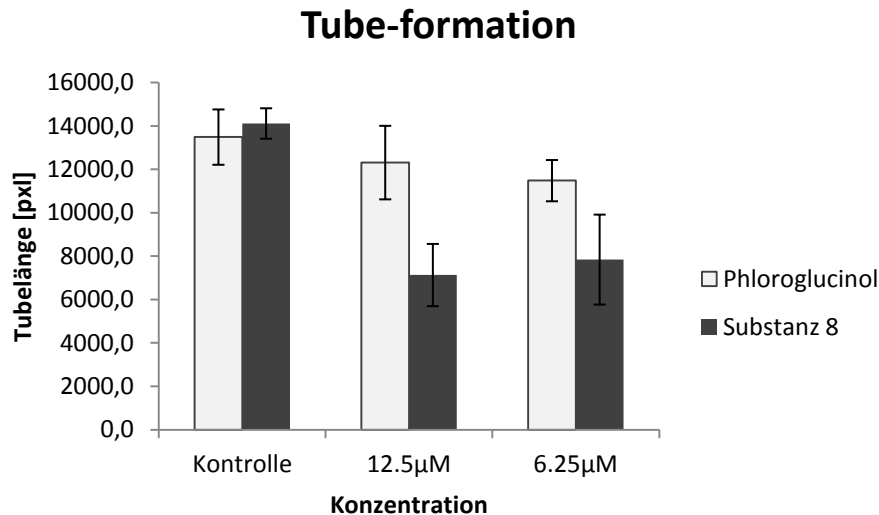
**Abbildung 119:** Tube-formation-Assay mit HMEC-1 mit Phloroglucinol. **A)** Negativ-Kontrolle (unbehandelte Zellen), **B)-E)** Inkubation mit Phloroglucinol in 50, 25, 12,5 und 6,25  $\mu\text{M}$  (jeweils ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten abgebildet).

Im Gegensatz dazu wirken sich die schon im MTT-Assay auffälligen Konzentrationen 25 und 50  $\mu\text{M}$  der Substanz **8** auch sichtbar auf die Morphologie der HMEC-1 aus. In den Konzentrationen 12,5  $\mu\text{M}$  und 6,25  $\mu\text{M}$  konnte im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle eine Reduzierung der Tube-formation anhand der reduzierten bzw. gar nicht vorhandenen kapillarähnlichen Struktur festgestellt werden (**Abbildung 120**, S.152).



**Abbildung 120:** Tube-formation-Assay mit HMEC-1 mit Substanz **8**. **A)** Negativ-Kontrolle (unbehandelte Zellen), **B)-E)** Inkubation mit 50, 25, 12,5 und 6,25  $\mu\text{M}$  von Substanz **8** (jeweils ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten abgebildet); In **B)** und **C)** erscheinen die Zellen kugelig, weichen also von der physiologischen Form ab.

Aufgrund der bereits beschriebenen Eindrücke aus den Werten des MTT-Assays und den Aufnahmen beim Tube-formation-Assay, dass die Konzentrationen 25 und 50  $\mu\text{M}$  das normale Wachstum der Endothelzellen beeinträchtigen, wurden zur Quantifizierung der Tube-Länge nur die Bilder der beiden geringsten Konzentrationen ausgewertet. Dies wurde händisch mit Hilfe einer Streckenmessung mit dem Programm AxioVision® durchgeführt und die so ermittelte Länge der zusammenhängenden Tubes in Pixel gegen die Konzentration aufgetragen (**Abbildung 121**, S. 153). Im Vergleich zu den Werten der unbehandelten Kontrolle als auch zu denen des Phloroglucinols, kann eine deutliche Reduktion der Tubelänge durch Substanz **8** im untersuchten Konzentrationsbereich festgestellt werden. Bei der Konzentration 12,5  $\mu\text{M}$  waren die Endothelzellen zwar noch in der Lage ein Tube auszubilden, allerdings betrug dessen Länge nur 50% der Kontrolle. Bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 6,25  $\mu\text{M}$  lag die Hemmung der Tubelänge etwas über dem Wert von 12,5  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 121:** Tubellänge in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen 12,5 und 6,25 µM von Substanz **8** und Phloroglucinol.

Die Zellen scheinen die Fähigkeit, tubes auszubilden, nicht verloren zu haben aber es sind doch deutlich weniger zu sehen. Eine mögliche reduzierte Zellzahl nach 19 Stunden kann nicht als Grund angeführt werden, weil sich im Proliferations-Assay gezeigt hat, dass nach 72 Stunden bei 6,25 µM die Proliferation nicht beeinträchtigt wird und der unbehandelten Kontrolle entspricht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Substanz **8** im einstelligen µM-Bereich die Proliferation und die Viabilität der mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) nicht beeinträchtigt, wohl aber die Fähigkeit, kapillarähnliche Strukturen auf Matrigel™ auszubilden sichtbar reduziert.

### 3.2.4 Zusammenfassung und Diskussion der zellbiologischen Untersuchungen

Die isolierten Verbindungen zeigten im Proliferations-Assay mit HMEC-1 eine gute bis moderate anti-proliferative Aktivität. Darüber hinaus konnte für Substanzen **1** und **2** eine Hemmung der Migration und für Substanz **8** ein inhibitorischer Effekt auf die Tube-formation der mikrovaskulären Endothelzellen im einstelligen  $\mu\text{M}$ -Bereich ermittelt werden. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse anhand von Strukturmerkmalen aber auch im Vergleich mit anderen Naturstoffen diskutiert werden.

#### 3.2.4.1 Mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Der Einfluss der Acyl-Seitenkette auf die anti-proliferative Aktivität macht sich bei den isolierten Verbindungen in der Hemmung der Proliferation bemerkbar, wobei eine höhere Lipophilie der Seitenkette wohl für die kleineren  $\text{IC}_{50}$ -Werte verantwortlich zu sein scheint, wenn man die Werte der Isobutyryl- direkt mit denen der entsprechenden 2-Methylbutyryl-Derivaten vergleicht. Diese Tendenz ist im Hinblick auf eine anti-oxidative Aktivität auch für das Hyperguinone A und B gezeigt worden (Heilmann et al. 2003). Zudem erwies sich Substanz **8** im direkten Vergleich mit **7** als diejenige Verbindung mit der höheren antibakteriellen Aktivität gegen verschiedene *Staphylococcus epidermidis* und *S. aureus* Stämme (Sarkisian et al. 2012). Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Verbindungen **7** und **8** in COX-1 und -2 sowie LOX-Assays ein völlig konträres Verhalten (Crockett et al. 2008). Zwei O-geranylierte Verbindungen aus *H. densiflorum* zeigen die gleiche gegenläufige Tendenz hinsichtlich der Acyl-Seitenkette in Bezug auf die Hemmung der COX-1 und -2 Aktivität (Henry et al. 2009).

Es lässt sich keine eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehung, aber eine Tendenz hinsichtlich der anti-proliferativen Aktivität auf HMEC-1 der isolierten Verbindungen ableiten: Die Methylbutyryl-Derivate sind im direkten Vergleich mit den strukturell sonst gleichen Isobutyryl-Derivaten aktiver.

### 3.2.4.2 Vergleich mit anderen anti-angiogen aktiven Naturstoffen

Hyperforin und das Aristoforin hemmen die Proliferation von HUVEC, dermalen LEC (lymphatic endothelial cells) und Lungen LEC im einstelligen  $\mu\text{M}$ -Bereich (Rothley et al. 2009). Es konnte außerdem eine Hemmung der Tube-formation von HBMEC (human bone marrow endothelial cells) bei  $c = 0,1$  und  $1 \mu\text{g/ml}$  ermittelt werden (Quiney et al. 2006a). Aktiv zeigte sich das Hyperforin auch gegen HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) im Tube-formation assay bei  $5 \mu\text{g/ml}$  (Schempp et al. 2005). Die Hemmung der Proliferation ( $\text{IC}_{50} 7 \pm 3 \mu\text{M}$ ) und der Tube-formation an BAEC (bovine aorta endothelial cells) wurde bereits von Martínez-Poveda et al. (2005) für Hyperforin gezeigt, was einige Jahre später mit dem DCHA-stabilisierten Hyperforin-Salz und verschiedenen Hyperforin-Derivaten in beiden Assays bestätigt werden konnte ( $\text{IC}_{50} 2,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ , Martínez-Poveda et al. 2010). Hyperatomarin, ebenfalls ein Acylphloroglucinol-Derivat, zeigt auch anti-proliferative Aktivität gegenüber HUVEC ( $\text{IC}_{50} 6,09 \pm 2,20 \mu\text{M}$ , Biljali et al. 2012).

Das Humulon hemmt in Konzentrationen von 3 bis  $30 \mu\text{M}$  im Tube-formation-Assay mit RLE (Rattenlungenendothel) sowie im Proliferations-Assay mit KOP2.16 (murinem Endothel, Shimamura et al. 2001). Auch Lupulon zeigt sowohl im Tube-formation-Assay als auch im Migrations-Assay mit HUVEC anti-angiogene Aktivität (Siegel et al. 2008). Das XAN wurde in der vorliegenden Arbeit im Proliferations-Assay als Positiv-Kontrolle eingesetzt ( $\text{IC}_{50} 11,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ), weil eine Hemmung der Migration ( $\text{IC}_{50} = 0,03 \mu\text{M}$ ) als auch der Tube-formation ( $1, 5, 10 \mu\text{M}$ ) an HMEC-1 gezeigt werden konnte (Mojzis et al. 2008). Isoxanthohumol, das Flavanon-Derivat des XAN zeigt in allen drei beschriebenen *in vitro*- Assays (Proliferation, Migration, Tube-formation) mit HMEC-1 eine gute Aktivität (Bertl et al. 2004).

Verschiedene Flavonoide hemmen die Proliferation von BBCE (bovine brain capillary endothelial), BAE (bovine aorta endothelial), ACE (adrenal cortex endothelial) und HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Zwei Flavone, nämlich das 3',4'-Dihydroxyflavon und das Luteolin waren die potentesten Verbindungen im Proliferations-Assay mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $1,4$  bzw.  $1,9 \mu\text{M}$  gegenüber BBCE. Die Aktivität gegenüber den anderen Endothelzellen war vergleichbar (Fotsis et al. 1997). Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Verbindungen auf eine anti-proliferative Aktivität zeigen eine ähnliche Potenz wie andere phenolische Naturstoffe, was eventuell auf den phenolischen bzw. polyphenolischen Charakter der Substanzen hindeutet. Allerdings waren sehr viele

verschiedene sowohl primäre makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen als auch immortalisierte Zelllinien Gegenstand der diversen Untersuchungen. Für den Einsatz von Zelllinien spricht, dass sie oft besser charakterisiert werden können und stabiler sind (Bouis et al. 2001).

Der anti-angiogene Effekt des Phloroglucinols auf endotheliale Vorläuferzellen (EPC, Kwon et al. 2012) konnte zumindest im Tube-formation-Assay mit HMEC-1 nicht bestätigt werden (**Abbildung 119**, S. 151). Ein entscheidender Grund liegt möglicherweise in der Zellart. Neben HUVEC, welche Endothelzellen aus großen Gefäßen darstellen und HMVEC, also humanen mikrovaskulären Endothelzellen sollen vor allem die EPCs die entscheidende Rolle bei der Tumor-Angiogenese spielen (Bagley et al. 2003, Nikitenko und Boshoff 2006). In einer Untersuchung von Mukai et al. (2008) wird die Beteiligung von Früh- und Spät-Formen von EPCs in Zusammenhang mit HUVEC in verschiedenen *in vitro* und *in vivo*-Modellen diskutiert, wobei wohl nur die Spät-Form an der Ausbildung neuer Blutgefäße beteiligt ist.

Es sind weitere Untersuchungen in *in vivo*-Assays notwendig, um die anti-angiogene *in vitro*-Aktivität für Substanz **8** zu bestätigen. Gerade weil die beiden Substanzen **7** und **8**, wie bereits unter **3.2.4.1** angedeutet, sowohl anti-proliferative (**Tabelle 40**, S. 146) als auch antioxidative Aktivitäten zeigen (Crockett et al. 2008), sollte dem prinzipiellen Zusammenhang zwischen angiopräventiven und auch anti-angiogenen Effekten nachgegangen werden, was für das Celecoxib von Masferrer et al. (2000) bereits *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte. Ansatzpunkte für die Inhibierung verschiedener Signaltransduktionswege, die bei dem komplexen Vorgang der Angiogenese eine Rolle spielen könnten, sind bei Albini et al. (2007) zu finden.

## 4 Zusammenfassung

*Hypericum* gehört mit etwa 450 Arten zu einer der größten Gattungen innerhalb der Ordnung der Malpighiales. Verschiedene Botaniker, darunter auch N.K.B. Robson, haben eine Einteilung der Arten in insgesamt 36 Sektionen vorgenommen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Art *Hypericum empetrifolium* gehört neben fünf weiteren Arten zur Sektion 19 *Coridium* und wird in Griechenland und der Türkei volksmedizinisch unter anderem gegen Magengeschwüre und zur Wundheilung eingesetzt. Es konnten bereits antioxidative, anti-inflammatorische als auch zytotoxische sowie anti-bakterielle Aktivitäten für vorwiegend methanolische Extrakte nachgewiesen werden. Neben einigen analytischen Arbeiten zur Zusammensetzung des ätherischen Öls sowie dem Gehalt an Flavonoiden bzw. den Naphthodianthronen Hypericin und Pseudohypericin ist die Art phytochemisch kaum untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnten 23 Acylphloroglucinolderivate per DC- aber insbesondere NMR-geleiteter Fraktionierung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel und RP-18, sowie präparativer HPLC an RP-18 aus einem Petrolether-Extrakt aus den oberirdischen Teilen von *H. empetrifolium* isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe von 1D und 2D-NMR-spektroskopischen als auch hochaufgelösten massenspektrometrischen Daten. Bei den Verbindungen handelt es sich um mono-, bi-, tri- und polyzyklische Phloroglucinole, die durchweg eine aliphatische Acyl-Seitenkette besitzen. Die Monozyklen (**1-9**) waren bis auf die O-prenylierte Substanz **6** allesamt C-geranyliert, wobei Empetrifelixin A-D (**1-4**) und Empetrikajaforin (**5**) ungewöhnliche Terpen-Addukte darstellen, bei denen ein Limonen bzw. Bornan-Rest mit einer Sauerstofffunktion des Phloroglucinol-Gerüsts verknüpft ist. Darüber hinaus konnten drei trizyklische Verbindungen mit einer Xanthen-Struktur (Empetriferdinan A und B, Empetriferdinol, **18-20**) sowie drei polyzyklische Acylphloroglucinole (Empetrifranzinan A-C, **21-23**) mit einem Citran-Grundgerüst isoliert werden. Den bizyklischen Chroman- und Chromen-Derivaten (**10-17**) könnte für die Sektion 19 eine Rolle als ‚Biomarker‘ zukommen, da ähnliche Verbindungen in allen der bisher untersuchten Arten von *Coridium* nachgewiesen werden konnten.

Hyperforin, das wohl bekannteste polyprenylierte Acylphloroglucinol aus *Hypericum perforatum* kann als einer der wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffe im Hinblick auf die antidepressive Wirkung des Johanniskrautes angesehen werden. Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren anti-angiogene Effekte auf humane Endothelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben werden. Die Hemmung der Angiogenese spielt mittlerweile eine wichtige Rolle in der Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen sowie in der Therapie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD).

In der vorliegenden Arbeit wurden die in ausreichender Menge isolierten Verbindungen zunächst auf eine mögliche anti-proliferative *in vitro* Aktivität gegen humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) getestet. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte lagen im Konzentrationsbereich von 6 bis 30 µM. Die beiden aktivsten Verbindungen, Empetrifelixin A (**1**) und Empetrifelixin B (**2**) zeigten in einem weiteren *in vitro*-Assay einen hemmenden Effekt auf die Migration der HMEC in den Konzentrationen 1, 10 und 20 µM.

Für die weitere Testung wurde Substanz **8** verwendet, welche in wesentlich höherer Menge aus dem Extrakt isoliert werden konnte und im Proliferations-Assay eine ähnlich gute Aktivität wie **1** und **2** zeigte. In einem Tube-formation Assay hemmte die Verbindung in den Konzentrationen 6,25 und 12,5 µM die Fähigkeit der Endothelzellen, sogenannte ‚Tubes‘ auf einer extrazellulären Matrix (Matrigel™) auszubilden. Die Ausformung kapillarähnlicher Strukturen war bis auf 50% reduziert, wobei die Viabilität der Zellen in einem MTT-Assay überprüft und offensichtlich nicht beeinflusst wurde. Als Kontrolle diente Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol), welches die Bioaktivität von endothelialen Vorläuferzellen zu hemmen in der Lage war (Kwon et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit allerdings konnte im Konzentrationsbereich von 6,25 bis 50 µM keine Auswirkung weder auf die Proliferation noch die Tube-formation von HMEC-1 festgestellt werden.

In weiteren *in vivo*-Assays müssen diese ersten Ergebnisse der Acylphloroglucinolderivate aus *Hypericum empetrifolium* bestätigt werden, um anschließend den Mechanismus der anti-angiogenen Aktivität der Substanzen näher zu beleuchten.

Darüber hinaus sind systematische phytochemische Untersuchungen, insbesondere der Arten der Sektion 19 notwendig, um die in der vorliegenden Arbeit angedeuteten chemotaxonomischen Zusammenhänge zu bestätigen.

## 5 Summary

The genus *Hypericum* nearly comprises 450 species and is one of the largest genera of the order Malpighiales. Several botanists, including N.K.B. Robson, have structured the genus into 36 sections. Together with five other species, *Hypericum empetrifolium*, the object of the present study, belongs to section 19 *Coridium* and is part of the traditional medicine in Greece and Turkey for healing gastric ulcers and to speed wound-healing. Methanolic extracts show antioxidative, antiinflammatory as well as cytotoxic and antibacterial activity. Furthermore, very little is known about the species, only the composition of the essential oil and the content of flavonoids and naphthodianthrones, namely hypericin and pseudohypericin have been investigated yet.

In this study, TLC- and, in particular, NMR-guided fractionation of the petroleum ether extract of the aerial parts of *H. empetrifolium* led to the isolation of 23 acylphloroglucinol derivatives via flash chromatography on silicagel and RP-18, as well as semi-preparative HPLC (RP-18). The structure elucidation was performed with 1D, 2D NMR and MS techniques. The isolated molecules show mono-, bi-, tri- and polycyclic structures with an aliphatic side chain in general. All monocyclic compounds (**1-9**) contain a geranyl moiety, except **6** which is O-prenylated. Empetrifelixin A-D (**1-4**) and Empetrikajaforin (**5**) represent uncommon, hitherto unknown terpene adducts of limonene- and bornane-bearing acylphloroglucinols. In addition to three tricyclic xanthen derivatives (Empetriferdinan A and B, Empetriferdinol, **18-20**), three polycyclic compounds (Empetrifranzinan A-C, **21-23**) with an unusual citran skeleton were isolated. The bicyclic chromane and chromene derivatives (**10-17**) might act as 'biomarkers' for section 19 due to the fact that in every other species of *Coridium*, which has been investigated yet, similar compounds were found.

Hyperforin, one of the most common polyprenylated acylphloroglucinol, is a major antidepressant component of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). Moreover, antiangiogenic effects on human endothelial cells *in vitro* and *in vivo* have been unveiled in the last decades. The inhibition of angiogenesis meanwhile plays an important role in the therapy of tumors and age-related macular degeneration.

In this study, the compounds isolated in sufficient amounts showed antiproliferative *in vitro* activity on human microvascular endothelial cells (HMEC-1) with IC<sub>50</sub> values in the range 6 to 30 μM. Empetrifelixin A (**1**) and B (**2**) also inhibited the migration of endothelial cells in low micromolar concentrations.

For further testing, compound **8** was used due to higher quantity and its similar anti-proliferative activity in comparison with **1** and **2**. In the tube formation assay, **8** showed inhibitory effects at 6.25 and 12.5 μM on endothelial cells concerning their capability to build capillary structures on extracellular matrix (Matrigel™). Capillary-like tube formation of HMEC-1 was reduced to 50%, whereas the viability was not influenced. Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) served as control, since inhibition of bioactivity of endothelial progenitor cells (EPCs) was reported (Kwon et al. 2012). However, in this study, phloroglucinol did not show any effect on human microvascular endothelial cells from 6,25 to 50 μM neither in proliferation assay nor in tube formation assay.

These first hints of antiangiogenic activity of acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* on endothelial cells have to be confirmed in further *in vivo* assays as well as the need to highlight the influence on cell signaling pathways.

To furnish proof for the chemotaxonomic correlation between sections of the genus *Hypericum*, as indicated in this study, all other species of section 19 should be subjected to further systematic phytochemical investigations.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>AMD</b>             | Altersbedingte Makuladegeneration   |
| <b>AS</b>              | Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz   |
| <b>BAEC</b>            | Bovine aorta endothelial cells  |
| <b>BBCE</b>            | Bovine brain capillary endothelial  |
| <b>BPAP</b>            | Bizyklische polyprenylierte Acylphloroglucinole                                   |
| <b>CAM</b>             | Chorio-allantoic membrane   |
| <b>CD</b>              | Circular dichroism, Zirkulardichroismus   |
| <b>COSY</b>            | Correlated spectroscopy   |
| <b>DAC</b>             | Deutscher Arzneimittel Codex  |
| <b>DAD</b>             | Diodenarraydetektor   |
| <b>DBÄ</b>             | Doppelbindungsäquivalente   |
| <b>DC</b>              | Dünnschichtchromatographie/Dünnschichtchromatogramm                               |
| <b>DCHA</b>            | Dicyclohexylammonium  |
| <b>DCM</b>             | Dichlormethan   |
| <b>DMAPP</b>           | Dimethylallylpyrophosphat   |
| <b>DMSO</b>            | Dimethylsulfoxid  |
| <b>EB6</b>             | Ergänzungsbuch 6 zum Deutschen Arzneibuch   |
| <b>EBS</b>             | Echtblausalz-Reagenz  |
| <b>ECGM</b>            | Endothelial growth medium   |
| <b>EDTA</b>            | Ethylendiammintetraessigsäure   |
| <b>EPC</b>             | Endothelial progenitor cells, endotheliale Vorläuferzellen                        |
| <b>EtOAc</b>           | Ethylacetat   |
| <b>EZM</b>             | Extrazelluläre Matrix   |
| <b>FA</b>              | Formic acid, Ameisensäure   |
| <b>FCS</b>             | Fetal calf serum  |
| <b>FM</b>              | Fließmittel   |
| <b>GPP</b>             | Geranyldiphosphat   |
| <b>HBMEC</b>           | Human bone marrow endothelial cells   |
| <b>HCMEC</b>           | Human dermal microvascular endothelial cells                                      |
| <b>HMBC</b>            | Heteronuclear multiple bond correlation   |
| <b>HMEC-1</b>          | Human microvascular endothelial cells   |
| <b>HMVEC</b>           | Human dermal microvascular endothelial cells                                      |
| <b>HOAc</b>            | Essigsäure  |
| <b>HPLC</b>            | High pressure liquid chromatography   |
| <b>HPV</b>             | Humane Papillomaviren   |
| <b>HREI</b>            | High resolution electron ionization   |
| <b>HRESI</b>           | High resolution electrospray ionization   |
| <b>HSQC</b>            | Heteronuclear single quantum coherence  |
| <b>HUVEC</b>           | human umbilical vein endothelial cells  |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | Konzentration eines Inhibitors bei dem eine halbmaximale Inhibition erreicht wird |
| <b>K</b>               | Kelvin  |
| <b>LEC</b>             | Lymphatic endothelial cells   |
| <b>MeCN</b>            | Acetonitril   |
| <b>MeOH</b>            | Methanol  |
| <b>MHz</b>             | Megahertz   |
| <b>ML</b>              | Macrogol-Lösung   |
| <b>MS</b>              | Massenspektrometrie   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>MTT</b>           | [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid]          |
| <b>mult</b>          | Multiplizität   |
| <b>n</b>             | Number  |
| <b>NFκB</b>          | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells  |
| <b>NMR</b>           | Nuclear magnetic resonance  |
| <b>NOE</b>           | Nuclear Overhauser effect, Kern-Overhauser-Effekt                 |
| <b>NOESY</b>         | Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy                       |
| <b>NSR</b>           | Naturstoff-Reagenz  |
| <b>P.a.</b>          | Pro analysis, zur Analyse   |
| <b>PBS</b>           | Phosphate buffered saline   |
| <b>PDA</b>           | Photodiodenarray  |
| <b>PDT</b>           | Photodynamische Therapie  |
| <b>PE</b>            | Petrolether   |
| <b>PPAP</b>          | Polyzyklische polyprenylierte Acylphloroglucinole                 |
| <b>ppm</b>           | Parts per million   |
| <b>Q-TOF</b>         | Quadrupole time-of-flight   |
| <b>R<sub>f</sub></b> | Retentionsfaktor  |
| <b>ROESY</b>         | Rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy |
| <b>RP</b>            | Reversed phase, Umkehrphase                                       |
| <b>RP-18e</b>        | Reversed-phase-18 endcapped                                       |
| <b>SDS</b>           | Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat                      |
| <b>Sekt.</b>         | Sektion   |
| <b>SiGel</b>         | Silica Gel, Kieselgel   |
| <b>SPE</b>           | Solid phase extraction, Festphasenextraktion                      |
| <b>TDDFT</b>         | Time-dependent density functional theory                          |
| <b>TLC</b>           | Thin layer chromatography, Dünnschichtchromatographie             |
| <b>t<sub>R</sub></b> | Retentionszeit  |
| <b>U/min</b>         | Umdrehungen pro Minute  |
| <b>UHD</b>           | Ultra High Definition   |
| <b>USP</b>           | United States Pharmacopoeia                                       |
| <b>UV</b>            | Ultraviolett  |
| <b>VEGF</b>          | Vascular endothelial growth factor                                |
| <b>vis</b>           | Visible, hier Tageslicht  |
| <b>XAN</b>           | Xanthohumol   |

## 7 Literaturverzeichnis

### A

- Abe, S.; Tanaka, N.; Kobayashi, J. (2012): Prenylated acylphloroglucinols, chipericumins A–D, from *Hypericum chinense*. In: *J. Nat. Prod.* 75 (3), S. 484–488.
- Abraham, R. J.; Barlow, A. P.; Rowan, A. E. (1989): Substituent chemical shifts in NMR. Part 4-<sup>1</sup>H SCS in some 2-substituted norbornanes and bornanes. In: *Magn. Reson. Chem.* 27 (11), S. 1074–1084.
- Adam, K. P.; Becker, H. (2000): Analytik biogener Arzneistoffe. Pharmazeutische Biologie, Band 4. 1. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Adam, P.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W. (2002): Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. In: *J. Med. Chem.* 45 (21), S. 4786–4793.
- Ades, E. W.; Candal, F. J.; Swerlick, R. A.; George, V. G.; Summers, S.; Bosse, D. C.; Lawley, T. J. (1992): HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. In: *J. Invest. Dermatol.* 99 (6), S. 683–690.
- Aggarwal, K. K.; Khanuja, S. P. S.; Ahmad, A.; Santha Kumar, T. R.; Gupta, V. K.; Kumar, S. (2002): Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. In: *Flavour Fragr. J.* 17 (1), S. 59–63.
- Alali, F. Q.; Tawaha, K.; Gharaibeh, M. (2009): LC-MS and LC-PDA analysis of *Hypericum empetrifolium* and *Hypericum sinaicum*. In: *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 64 (7-8), S. 476–482.
- Albini, A.; Dell'Eva, R.; Vené, R.; Ferrari, N.; Buhler, D. R.; Noonan, D. M.; Fassina, G. (2006): Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. In: *FASEB J.* 20 (3), S. 527–529.
- Albini, A.; Noonan, D. M.; Ferrari, N. (2007): Molecular pathways for cancer angioprevention. In: *Clin. Cancer Res.* 13 (15), S. 4320–4325.
- Ang, C. W.; Hu, L.; Heinze, T.; Cui, Y.; Freeman, J.; Kozak, K.; Luo, W.; Liu, F. F.; Mattia, A.; DiNovi, M. (2004): Instability of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and degradation of hyperforin in aqueous solutions and functional beverage. In: *J. Agric. Food Chem.* 52 (20), S. 6156–6164.
- Arnautova, I.; George, J.; Kleinman, H. K.; Benton, G. (2009): The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. In: *Angiogenesis* 12 (3), S. 267–274.
- Arznei-telegramm (2013): Neu auf dem Markt. Aflibercept (Eylea) bei feuchter Makuladegeneration 44 (2), S. 19–21.
- Athanasas, K.; Magiatis, P.; Fokialakis, N.; Skaltsounis, A.-L.; Pratsinis, H.; Kletsas, D. (2004): Hyperjovinols A and B: Two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. In: *J. Nat. Prod.* 67 (6), S. 973–977.
- Avato, P. (2005): A survey on the *Hypericum* genus: Secondary metabolites and bioactivity. In: *Bioactive Natural Products* (Part K), Bd. 30: Elsevier (Studies in Natural Products Chemistry), S. 603–634.

Ayräs, P.; Lötjönen, S.; Widén, C. J. (1981): NMR spectroscopy of naturally occurring phloroglucinol derivatives. In: *Planta Med.* 42 (6), S. 187–194.

## B

Baggett, S.; Mazzola, E. P.; Kennelly, E. J. (2005): The benzophenones: Isolation, structural elucidation and biological activities. In: *Bioactive Natural Products* (Part L), Bd. 32: Elsevier (Studies in Natural Products Chemistry), S. 721–771.

Bagley, R. G.; Walter-Yohrling, J.; Cao, X.; Weber, W.; Simons, B.; Cook, B. P.; Chartrand, S. D.; Wang, C.; Madden, S. L.; Teicher, B. A. (2003): Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. In: *Cancer Res.* 63 (18), S. 5866–5873.

Begley, M. J.; Crombie, L.; King, R. W.; Slack, D. A.; Whiting, D. A. (1977): Chromens and citrans derived from phloroacetophenone and phloroglucinaldehyde by citral condensation: regioselectivity, mechanism, and X-ray crystal structures. In: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (21), S. 2393.

Bendas, G. (2009): Antiangiogenese. Dem Tumor den Lebenssaft abdrehen. In: *Pharmazeutische Zeitung* 154 (21), S. 18 ff.

Bernardi, A. P. M.; Ferraz, A. B. F.; Albring, D. V.; Bordignon, S. A. L.; Schripsema, J.; Bridi, R.; Dutra-Filho, C. S.; Henriques, A. T.; Poser, G. L. von (2005): Benzophenones from *Hypericum carinatum*. In: *J. Nat. Prod.* 68 (5), S. 784–786.

Bertl, E.; Becker, H.; Eicher, T.; Herhaus, C.; Kapadia, G.; Bartsch, H.; Gerhäuser, C. (2004): Inhibition of endothelial cell functions by novel potential cancer chemopreventive agents. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (1), S. 287–295.

Bertoli, A.; Cirak, C.; Silva, J. A. T. da (2011): *Hypericum* species as sources of valuable essential oils. In: *Med. Aromat. Plant. Sci. Biotechnol.* 5 (Special Issue 1), S. 29–47.

Biljali, S.; Momekov, G.; Nedialkov, P.; Zheleva-Dimitrova, D.; Kitanov, G.; Momekova, D.; Stoyanov, N.; Guenova, M.; Michova, A.; Karaivanova, M. (2012): *In vitro* investigation of the antiproliferative and proapoptotic effects of hyperatomarin – a bicyclic prenylated acylphloroglucinol from *Hypericum annulatum* MORIS subsp. *annulatum* against human tumor and endothelial cells. In: *J. Pharm. Technol. Drug Res.* 1 (1), S. 6.

Bohlmann, F.; Suwita, A. (1978): Neue Phloroglucin-Derivate aus *Leontonyx*-Arten sowie weitere Verbindungen aus Vertretern der Tribus Inuleae. In: *Phytochemistry* 17 (11), S. 1929–1934.

Bohlmann, F.; Suwita, A. (1979): Weitere Phloroglucin-Derivate aus *Helichrysum*-Arten. In: *Phytochemistry* 18 (12), S. 2046–2049.

Bohlmann, F.; Zdero, C. (1979): Neue Phloroglucin-Derivate aus *Helichrysum natalitium* und *Helichrysum bellum*. In: *Phytochemistry* 18 (4), S. 641–644.

Bohlmann, F.; Abraham, W.-R.; Robinson, H.; King, R. M. (1980a): A new labdane derivative and geranylphloroglucinols from *Achyrocline alata*. In: *Phytochemistry* 19 (11), S. 2475–2477.

Bohlmann, F.; Zdero, C.; Abraham, W.-R.; Suwita, A.; Grenz, M. (1980b): Neue Diterpene und neue Dihydrochalkon-Derivate sowie weitere Inhaltsstoffe aus *Helichrysum*-Arten. In: *Phytochemistry* 19 (5), S. 873–879.

Borremans, F.; Potter, M. de; Keukeleire, D. de (1975): Carbon-13 NMR spectroscopy of hop bitter substances. In: *Org. Magn. Reson.* 7 (9), S. 415–417.

Boubakir, Z.; Beuerle, T.; Liu, B.; Beerhues, L. (2005): The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. In: *Phytochemistry* 66 (1), S. 51–57.

Bouřs, D.; Hospers, G. A.; Meijer, C.; Molema, G.; Mulder, N. H. (2001): Endothelium *in vitro*: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. In: *Angiogenesis* 4 (2), S. 91–102.

Boxberger, H. J. (2007): Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur. Einführung in Grundlagen und Techniken. Weinheim: Wiley-VCH.

Budzikiewicz, H.; Schäfer, M. (2012): Massenspektrometrie. Eine Einführung. 6., vollst. überarb. u. aktualis. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH.

## C

Candolle, A. P. de (1816): Essai sur les propriétés médicales des plantes. comparées avec leurs formes extérieures et leur classification naturelle. In: *Chrochard, Paris*.

Cao, Y. (2010): Angiogenesis: What can it offer for future medicine? In: *Exp. Cell Res.* 316 (8), S. 1304–1308.

Cardona, M. L.; Marco, J. A.; Sendra, J. M.; Seoane, E.; Ibañez, J. T. (1983): Waxes and volatile oils in *Hypericum ericoides* (Guttiferae). In: *Lipids* 18 (6), S. 439–442.

Carmeliet, P. (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. In: *Nat. Med.* 6 (4), S. 389–395.

Carmeliet, P.; Jain, R. K. (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. In: *Nature* 407 (6801), S. 249–257.

Carmeliet, P. (2005): Angiogenesis in life, disease and medicine. In: *Nature* 438 (7070), S. 932–936.

Cheng, Y.-B.; Fazary, A. E.; Lin, Y.-C.; Lo, I.-W.; Ong, S.-C.; Chen, S.-Y.; Chien, C.-T.; Lin, Y.-J.; Lin, W.-W.; Shen, Y.-C. (2013): Hyperinakin, a new anti-inflammatory phloroglucinol derivative from *Hypericum nakamurai*. In: *Nat. Prod. Res.* 27 (8), S. 727–734.

Combes, G.; Vassort, P.; Winternitz, F. (1970): Structure de la rubranine, chalcone isolee de l'*Aniba rosaeodora* ducke. In: *Tetrahedron* 26 (24), S. 5981–5992.

Couladis, M.; Badisa, R. B.; Baziou, P.; Chaudhuri, S. K.; Pilarinou, E.; Verykokidou, E.; Harvala, C. (2002): Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum* sp. on brine shrimps and human cancer cell lines. In: *Phytother. Res.* 16 (8), S. 719–722.

Crispin, M. C.; Hur, M.; Park, T.; Kim, Y. H.; Wurtele, E. S. (2013): Identification and biosynthesis of acylphloroglucinols in *Hypericum gentianoides*. In: *Physiol. Plant.* 148 (3), S. 354–370.

Crockett, S. L.; Schaneberg, B.; Khan, I. A. (2005): Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's Wort) species. In: *Phytochem. Anal.* 16 (6), S. 479–485.

Crockett, S. L.; Wenzig, E.-M.; Kunert, O.; Bauer, R. (2008): Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. In: *Phytochem. Lett.* 1 (1), S. 37–43.

Crockett, S. L. (2010): Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). In: *Nat. Prod. Commun.* 5 (9), S. 1493–1506.

Crockett, S. L.; Kunert, O.; Jacob, M.; Bauer, R.; Nedialkov, P. (2010): Antimicrobial acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum linarioides* (Hypericaceae). In: *Planta Med.* (76) - P430.

Crockett, S. L.; Robson, N. K. B. (2011): Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. In: *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 5 (Special Issue 1), S. 1–13.

Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. (2005): Chemistry and biological activity of polyisoprenylated benzophenone derivatives. In: *Bioactive Natural Products* (Part L), Bd. 32: Elsevier (Studies in Natural Products Chemistry), S. 671–720.

Czygan, F.-C. (2003): Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrauts: Vom 2500 Jahre alten Apotropaikum zum aktuellen Antidepressivum. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 32 (3), S. 184–190.

## D

Dakanali, M.; Theodorakis, E. A. (2011): Polyprenylated phloroglucinols and xanthenes. In: Erwan Poupon und Bastien Nay (Hg.): *Biomimetic organic synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH, S. 433–467.

Davis, E. M.; Croteau, R. (2000): Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: Finian J. Leeper und John C. Vederas (Hg.): *Biosynthesis*, Bd. 209. Berlin, Heidelberg: Springer (Topics in Current Chemistry), S. 53–95.

Decosterd, L. A.; Hostettmann, K.; Stoeckli-Evans, H.; Msonthi, J. D. (1987): New antifungal chromenyl ketones and their pentacyclic dimers from *Hypericum revolutum* VAHL. In: *Helv. Chim. Acta* 70 (7), S. 1694–1702.

Decosterd, L. A.; Stoeckli-Evans, H.; Chapuis, J.-C.; Sordat, B.; Hostettmann, K. (1989): New cell growth-inhibitory cyclohexadienone derivatives from *Hypericum calycinum* L. In: *Helv. Chim. Acta* 72 (8), S. 1833–1845.

Decosterd, L. A.; Hoffmann, E.; Kyburz, R.; Bray, D.; Hostettmann, K. (1991): A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and *in vitro* antimalarial activity. In: *Planta Med.* 57 (6), S. 548–551.

Degenhardt, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J. (2009): Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. In: *Phytochemistry* 70 (15-16), S. 1621–1637.

Demirkiran, O. (2007): Xanthenes in *Hypericum*: Synthesis and biological activities. In: Mahmud Tareq Hassan Khan (Hg.): *Bioactive Heterocycles III*, Bd. 9. Berlin, Heidelberg: Springer (Topics in Heterocyclic Chemistry), S. 139–178.

Deutscher Arzneimittel-Codex. Ergänzungsbuch zum Arzneibuch (1986). 3. Ergänzung 1991. Eschborn, Stuttgart: Govi; Deutscher Apotheker Verlag.

Deutscher Arzneimittel-Codex. Ergänzungsbuch zum Arzneibuch : Neues Rezeptur Formularium (2009-2010). Frankfurt am Main: Govi-Verlag.

Dilek, Y.; Oguz, B. (2009): Screening of some plant-derived alkaloids and phenolics for catechol-O-methyltransferase inhibition. In: *Int. J. Nat. Eng. Sci.* 3 (2), S. 23–27.

Dingermann, T. (2004): Schneider, Arzneidroge. 5. Aufl. München: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.

Don, M.-J.; Huang, Y.-J.; Huang, R.-L.; Lin, Y.-L. (2004): New phenolic principles from *Hypericum sampsonii*. In: *Chem. Pharm. Bull.* 52 (7), S. 866–869.

## E

Elgin, G.; Konyalioglu, S.; Kilinc, E. (2008): Development and validation of a multidetector HPLC method for the determination of antioxidant flavonoids of some *Hypericum* L. species. In: *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (3), S. 432–448.

Endress, P. K.; Davis, C. C.; Matthews, M. L. (2013): Advances in the floral structural characterization of the major subclades of Malpighiales, one of the largest orders of flowering plants. In: *Annals of Botany* 111 (5), S. 969–985.

Erhardt, W.; Götz, E.; Bödeker, N.; Seybold, S.; Zander, R. (op. 2002): Handwörterbuch der Pflanzennamen. Dictionary of plant names = Dictionnaire des noms des plantes. 17. Aufl. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.

Ernst, E. (2003): *Hypericum*. The genus *Hypericum*. London, New York: Taylor and Francis.

Europäisches Arzneibuch (2011). 7. Ausg., Grundwerk 2011. Stuttgart, Eschborn: Dt. Apotheker-Verl., Govi-Verlag (7.2011, Bd. 1).

## F

Fellermeier, M.; Zenk, M. H. (1998): Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. In: *FEBS Lett.* 427 (2), S. 283–285.

Ferraz, A. B.; Bordignon, S. A.; Staats, C.; Schripsema, J.; Poser, G. L. von (2001): Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. In: *Phytochemistry* 57 (8), S. 1227–1230.

Ferraz, A. B.; Schripsema, J.; Pohlmann, A. R.; Poser, G. L. von (2002): Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. In: *Biochem. Syst. Ecol.* 30 (10), S. 989–991.

Finger, R. P.; Fleckenstein, M.; Scholl, H. P.; Holz, F. G. (2007): Pathophysiologie und Therapie der AMD: Therapeutischer Anti-VEGF-Einsatz in der Augenheilkunde. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 36 (6), S. 424–430.

Fotsis, T.; Pepper, M. S.; Aktas, E.; Breit, S.; Rasku, S.; Adlercreutz, H.; Wähälä, K.; Montesano, R.; Schweigerer, L. (1997): Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. In: *Cancer Res.* 57 (14), S. 2916–2921.

França, H. S.; Kuster, R. M.; Rito, P. N. da; Oliveira, A. P. d.; Teixeira, L. A.; Rocha, L. (2009): Atividade antibacteriana de floroglucinosídeos e do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* CHOYSI. In: *Quím. Nova* 32 (5), S. 1103–1106.

Freund, K. B.; Mrejen, S.; Gallego-Pinazo, R. (2013): An update on the pharmacotherapy of neovascular age-related macular degeneration. In: *Expert Opin. Pharmacother.* 14 (8), S. 1017–1028.

Friebolin, H. (2013): Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung. 5., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.

Fritz, D.; Venturi, C. R.; Cargnin, S.; Schripsema, J.; Roehe, P. M.; Montanha, J. A.; Poser, G. L. von (2007): Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. In: *J. Ethnopharmacol.* 113 (3), S. 517–520.

Frohne, D.; Jensen, U. (1998): Systematik des Pflanzenreichs. Unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. 5., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.

Fujimoto, Y.; Usui, S.; Makino, M.; Sumatra, M. (1996): Phloroglucinols from *Baeckea frutescens*. In: *Phytochemistry* 41 (3), S. 923–925.

Fun, H.-K.; Koysoomboon, S.; Chantrapromma, K.; Chantrapromma, S. (2006): A cocrystal of clusiacitrin A, clusiacitrin B, fluorinated clusiacitrin A and fluorinated clusiacitrin B (0.45:0.45:0.05:0.05). In: *Acta Cryst.* 62 (8), S. o3228–o3230.

## G

Gamiotea-Turro, D.; Cuesta-Rubio, O.; Prieto-González, S.; Simone, F. de; Passi, S.; Rastrelli, L. (2004): Antioxidative constituents from the leaves of *Hypericum styphelioides*. In: *J. Nat. Prod.* 67 (5), S. 869–871.

Gartner, M.; Müller, T.; Simon, J. C.; Giannis, A.; Sleeman, J. P. (2005): Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin, is a potent anticancer agent. In: *ChemBiochem.* 6 (1), S. 171–177.

Genauß, H. (1996): Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen. 3., vollständig überarbeitete und erw. Aufl. Basel, Boston: Birkhäuser.

Ghisalberti, E. L. (1996): Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species. In: *Phytochemistry* 41 (1), S. 7–22.

Gibbons, S.; Moser, E.; Hausmann, S.; Stavri, M.; Smith, E.; Clennett, C. (2005): An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. In: *Phytochemistry* 66 (12), S. 1472–1475.

Godin, P. (1954): A new spray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses. In: *Nature* 174 (4420), S. 134.

Goese, M.; Kamhuber, K.; Bacher, A.; Zenk, M. H.; Eisenreich, W. (1999): Biosynthesis of bitter acids in hops. A <sup>13</sup>C-NMR and <sup>2</sup>H-NMR study on the building blocks of humulone. In: *Eur. J. Biochem.* 263 (2), S. 447–454.

Goh, S.; Chung, V.; Sha, C.; Mak, T. (1990): Monoterpenoid phloracetophenones from *Euodia latifolia*. In: *Phytochemistry* 29 (5), S. 1704–1706.

Gonzalez, J. G.; Olivares, E. M.; Monache, F. D. (1995): Citrans and cyclols from *Clusia multiflora*. In: *Phytochemistry* 38 (2), S. 485–489.

Gopinath, S.; Sakthidevi, G.; Muthukumaraswamy, S.; Mohan, V. R. (2013): GC-MS analysis of bioactive constituents of *Hypericum mysorense* (Hypericaceae). In: *J. Curr. Chem. Pharm. Sci.* 3 (1), S. 6–15.

Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. (1997): NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. In: *J. Org. Chem.* 62 (21), S. 7512–7515.

Gräter, C. (1971): Der Würzbüschel im Frankenland. In: *Jahrbuch für das Badische Land*, S. 202–203.

Greuter, W.; Matthäs, U.; Risse, H. (1984): Additions to the Flora of Crete, 1973-1983 (1984) - II. In: *Willdenowia* 14, S. 269–297.

Gronquist, M.; Bezzerides, A.; Attygalle, A.; Meinwald, J.; Eisner, M.; Eisner, T. (2001): Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (24), S. 13745–13750.

Guedes, A. P.; Franklin, G.; Fernandes-Ferreira, M. (2012): *Hypericum* sp.: Essential oil composition and biological activities. In: *Phytochem. Rev.* 11 (1), S. 127–152.

Gurevich, A. I.; Dobrynin, V. N.; Kolosov, M. N.; Popravko, S. A.; Riabova, I. D. (1971): Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L. In: *Antibiotiki* 16 (6), S. 510–3.

## H

Hagemann, I. (1987): On subspecific taxa of *Hypericum empetrifolium* (Hypericaceae) from Crete. In: *Pl. Syst. Evol.* 155 (1-4), S. 165–187.

Hamerski, D.; Schmitt, D.; Matern, U. (1990): Induction of two prenyltransferases for the accumulation of coumarin phytoalexins in elicitor-treated *Ammi majus* cell suspension cultures. In: *Phytochemistry* 29 (4), S. 1131–1135.

Hänsel, R.; Sticher, O. (Hrsg.) (2010): *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 9. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin.

Hartke, K. (1997): *Arzneibuch-Kommentar. Wissenschaftliche Erläuterungen zum Europäischen und zum Deutschen Arzneibuch*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.

Hay, A.-E.; Merza, J.; Landreau, A.; Litaudon, M.; Pagniez, F.; Le Pape, P.; Richomme, P. (2008): Antileishmanial polyphenols from *Garcinia vieillardii*. In: *Fitoterapia* 79 (1), S. 42–46.

Hazler Pilepić, K.; Morović, M.; Orač, F.; Šantor, M.; Vejnović, V. (2010): RFLP analysis of cpDNA in the genus *Hypericum*. In: *Biologia* 65 (5), S. 805–812.

Hegnauer, R. (1966): *Chemotaxonomie der Pflanzen. Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe*. Basel: Birkhäuser.

Heil, M.; Eitenmüller, I.; Schmitz-Rixen, T.; Schaper, W. (2006): Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. In: *J. Cellular. Mol. Med.* 10 (1), S. 45–55.

Heilmann, J.; Winkelmann, K.; Sticher, O. (2003): Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from *Hypericum* species. In: *Planta Med.* 69 (3), S. 202–206.

Henry, G. E.; Raithore, S.; Zhang, Y.; Jayaprakasam, B.; Nair, M. G.; Heber, D.; Seeram, N. P. (2006): Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum prolificum*. In: *J. Nat. Prod.* 69 (11), S. 1645–1648.

Henry, G. E.; Campbell, M. S.; Zelinsky, A. A.; Liu, Y.; Bowen-Forbes, C. S.; Li, L.; Nair, M. G.; Rowley, D. C.; Seeram, N. P. (2009): Bioactive acylphloroglucinols from *Hypericum densiflorum*. In: *Phytother. Res.* 23 (12), S. 1759–1762.

Hesse, M.; Bienz, S.; Meier, H.; Zeeh, B. (2012): *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 114 Tabellen. 8., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Hiddemann, W.; Bartram, C. R. (2010): Die Onkologie. 2., aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin.

Hoffmann, P. (2001): Malpighiales. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Hu, L.-H.; Sim, K.-Y. (2000): Sampsoniones A–M, a unique family of caged polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives, from *Hypericum sampsonii*. In: *Tetrahedron* 56 (10), S. 1379–1386.

Hu, L.-H.; Khoo, C.-W.; Vittal, J. J.; Sim, K.-Y. (2000): Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. In: *Phytochemistry* 53 (6), S. 705–709.

Hua, S.-Z.; Wang, X.-B.; Luo, J.-G.; Wang, J.-S.; Kong, L.-Y. (2008): A pair of unique sesquiterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. In: *Tetrahedron Lett.* 49 (39), S. 5658–5661.

Hua, S.-Z.; Luo, J.-G.; Wang, X.-B.; Wang, J.-S.; Kong, L.-Y. (2009): Two novel monoterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (10), S. 2728–2730.

## I

Isacchi, B.; Bergonzi, M.; Carnevali, F.; Esch, S. van der; Vincieri, F.; Bilia, A. (2007): Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. In: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (5), S. 756–761.

Ishida, Y.; Shiota, O.; Sekita, S.; Someya, K.; Tokita, F.; Nakane, T.; Kuroyanagi, M. (2010): Polyprenylated benzoylphloroglucinol-type derivatives including novel cage compounds from *Hypericum erectum*. In: *Chem. Pharm. Bull.* 58 (3), S. 336–343.

Ishiguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S.; Yamagata, Y.; Tomita, K.-i. (1985): X-Ray crystal structure of sarothralin, a novel antibiotic compound from *Hypericum japonicum*. In: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1), S. 26.

Ishiguro, K.; Yamaki, M.; Kashihara, M.; Takagi, S. (1986): Sarothralen A and B, new antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. In: *Planta Med.* 52 (04), S. 288–290.

Ishiguro, K.; Nagata, S.; Fukumoto, H.; Yamaki, M.; Isoi, K. (1994): Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. In: *Phytochemistry* 35 (2), S. 469–471.

Ito, H.; Iwamori, H.; Kasajima, N.; Kaneda, M.; Yoshida, T. (2004): Kunzeanones A, B, and C: novel alkylated phloroglucinol metabolites from *Kunzea ambigua*. In: *Tetrahedron* 60 (44), S. 9971–9976.

## J

Jakupovic, J.; Kuhnke, J.; Schuster, A.; Metwally, M.; Bohlmann, F. (1986): Phloroglucinol derivatives and other constituents from south african *Helichrysum* species. In: *Phytochemistry* 25 (5), S. 1133–1142.

Jakupovic, J.; Zdero, C.; Grenz, M.; Tschritzis, F.; Lehmann, L.; Hashemi-Nejad, S.; Bohlmann, F. (1989): Twenty-one acylphloroglucinol derivatives and further constituents from south african *Helichrysum* species. In: *Phytochemistry* 28 (4), S. 1119–1131.

Jayasuriya, H.; McChesney, J. D.; Swanson, S. M.; Pezzuto, J. M. (1989): Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from *Hypericum drummondii*. In: *J. Nat. Prod.* 52 (2), S. 325–331.

Jayasuriya, H.; Clark, A. M.; McChesney, J. D. (1991): New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. In: *J. Nat. Prod.* 54 (5), S. 1314–1320.

Jeong, S.-J.; Koh, W.; Lee, E.-O.; Lee, H.-J.; Lee, H.-J.; Bae, H.; Lü, J.; Kim, S.-H. (2011): Antiangiogenic phytochemicals and medicinal herbs. In: *Phytother. Res.* 25 (1), S. 1–10.

Joussen, A.; Kirchhof, B.; Gottstein, C. (2003): Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. In: *Der Ophthalmologe* 100 (4), S. 284–291.

## K

Karppinen, K.; Hokkanen, J.; Tolonen, A.; Mattila, S.; Hohtola, A. (2007): Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. In: *Phytochemistry* 68 (7), S. 1038–1045.

Kaul, R. (2000): Johanniskraut. Botanik, Inhaltsstoffe, Qualitätskontrolle, Pharmakologie, Toxikologie und Klinik. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.

Kim, M.-M.; Kim, S.-K. (2010): Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. In: *Food Chem. Toxicol.* 48 (10), S. 2925–2933.

Kitanov, G. M.; Nedialkov, P. T. (1998): Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. In: *Biochem. Syst. Ecol.* 26 (6), S. 647–653.

Kitanov, G. M. (2001): Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. In: *Biochem. Syst. Ecol.* 29 (2), S. 171–178.

Klingauf, P.; Beuerle, T.; Mellenthin, A.; El-Moghazy, S. A. M.; Boubakir, Z.; Beerhues, L. (2005): Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. In: *Phytochemistry* 66 (2), S. 139–145.

Kobayashi, J.; Tanaka, N.; Kubota, T.; Ishiyama, H.; Kashiwada, Y.; Takaishi, Y.; Ito, J.; Mikami, Y.; Shiro, M. (2009): Petiolins D and E, phloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. In: *Heterocycles* 79 (1), S. 917.

Koltermann, A. (2008): Influence of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 on signaling pathways in endothelial cells. Dissertation. LMU, München.

Konyalioglu, S.; Meral, G. E.; Kilinc, E. (2002): Effects of three *Hypericum* species on broiler erythrocyte antioxidant enzyme activities in nitric oxide exposure. In: *Türkiye Klinikleri* 20 (1), S. 32–36.

Kosasi, S.; Sluis, W. G. van der; Labadie, R. (1989): Multifidol and multifidol glucoside from the latex of *Jatropha multifida*. In: *Phytochemistry* 28 (9), S. 2439–2441.

Kwon, Y.-H.; Jung, S.-Y.; Kim, J.-W.; Lee, S.-H.; Lee, J.-H.; Lee, B.-Y.; Kwon, S.-M. (2012): Phloroglucinol inhibits the bioactivities of endothelial progenitor cells and suppresses tumor angiogenesis in LLC-tumor-bearing mice. In: *PLoS One* 7 (4), S. e33618.

## L

- Lee, J.-y.; Duke, R. K.; Tran, H. van; Hook, J. M.; Duke, C. C. (2006): Hyperforin and its analogues inhibit CYP3A4 enzyme activity. In: *Phytochemistry* 67 (23), S. 2550–2560.
- Leonhardt, H. (1990): Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie, Band 3. 8., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme
- Li, Z.; Luo, L.; Ma, G.; Chen, X. (2004): Phloroglucinol and flavonoid constituents of *Hypericum acmosepaium*. In: *J. Yunnan Univ. (Natural Sciences)* 26 (2), S. 162–167.
- Lin, Y.-L.; Wu, Y.-S. (2003): Polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. In: *Helv. Chim. Acta* 86 (6), S. 2156–2163.
- Liu, F.; Pan, C.; Drumm, P.; Ang, C. Y. W. (2005): Liquid chromatography-mass spectrometry studies of St. John's wort methanol extraction: active constituents and their transformation. In: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2), S. 303–312.
- Liu, X.; Yang, X.-W.; Chen, C.-Q.; Wu, C.-Y.; Zhang, J.-J.; Ma, J.-Z.; Wang, H.; Yang, L.-X.; Xu, G. (2013): Bioactive polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum cohaerens*. In: *J. Nat. Prod.* 10.1021/np400287r.
- Lorusso, G.; Vannini, N.; Sogno, I.; Generoso, L.; Garbisa, S.; Noonan, D. M.; Albini, A. (2009): Mechanisms of hyperforin as an anti-angiogenic angioprevention agent. In: *Eur. J. Cancer* 45 (8), S. 1474–1484.
- Lüder, R. (2013): Grundkurs Pflanzenbestimmung. Eine Praxisanleitung für Anfänger und Fortgeschrittene. 6., korr. und aktualisierte Aufl. Wiebelsheim: Quelle & Meyer.

## M

- Ma, J.; Waxman, D. J. (2008): Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. In: *Mol. Cancer Ther.* 7 (12), S. 3670–3684.
- Maisenbacher, P. (1991): Untersuchungen zur Analytik von Johanniskrautöl. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Maisenbacher, P.; Kovar, K. A. (1992): Analysis and stability of *Hyperici oleum*. In: *Planta Med.* 58 (4), S. 351–354.
- Mamemura, T.; Tanaka, N.; Shibazaki, A.; Gono, T.; Kobayashi, J. (2011): Yojironins A–D, meroterpenoids and prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum*. In: *Tetrahedron Lett.* 52 (28), S. 3575–3578.
- Mammino, L.; Kabanda, M. M. (2009): A study of the intramolecular hydrogen bond in acylphloroglucinols. In: *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 901 (1–3), S. 210–219.
- Martínez-Poveda, B.; Verotta, L.; Bombardelli, E.; Quesada, A. R.; Medina, M. Á.; Bauer, J. A. (2010): Tetrahydrohyperforin and octahydrohyperforin are two new potent inhibitors of angiogenesis. In: *PLoS One* 5 (3), S. e9558.
- Masferrer, J. L.; Leahy, K. M.; Koki, A. T.; Zweifel, B. S.; Settle, S. L.; Woerner, B. M.; Edwards, D. A.; Flickinger, A. G.; Moore, R. J.; Seibert, K. (2000): Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. In: *Cancer Res.* 60 (5), S. 1306–1311.

- Mathioudaki, A. (2013): Isolation & structure elucidation of lipophilic secondary metabolites from *Hypericum amblycalyx*. Diploma thesis. Universität Regensburg.
- Mathis, C.; Ourisson, G. (1964): Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*. In: *Phytochemistry* 3 (1), S. 133–141.
- Medina, M. A.; Martínez-Poveda, B.; Amores-Sánchez, M. I.; Quesada, A. R. (2006): Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? In: *Life Sci.* 79 (2), S. 105–111.
- Meral, G. E.; Karabay, N. Ü. (2002): *In vitro* antibacterial activities of three *Hypericum* species from West Anatolia. In: *Turkish Electronic J. Biotech.* (Special Issue), S. 6–10.
- Meral, G. E.; Konyahoglu, S. (2003): Comparison of total flavonoid and phenol contents and antioxidant capacities of three *Hypericum* L. species growing in Turkey. In: *Acta Pharm. Turc.* 45 (3), S. 183–185.
- Meseguer, A. S.; Sanmartín, I. (2012): Paleobiology of the genus *Hypericum* (Hypericaceae): a survey of the fossil record and its palaeogeographic implications. In: *Anal. Jard. Bot. Madr.* 69 (1), S. 97–106.
- Meusinger, R. (2010): NMR-Spektren richtig ausgewertet. 100 Übungen für Studium und Beruf. Heidelberg: Springer.
- Mojzis, J.; Varinzka, L.; Mojziso,va, G.; Kostova, I.; Mirossay, L. (2008): Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. In: *Pharmacol. Res.* 57 (4), S. 259–265.
- Mukai, N.; Akahori, T.; Komaki, M.; Li, Q.; Kanayasu-Toyoda, T.; Ishii-Watabe, A.; Kobayashi, A.; Yamaguchi, T.; Abe, M.; Amagasa, T.; Morita, I. (2008): A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. In: *Exp. Cell Res.* 314 (3), S. 430–440.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B. da; Kent, J. (2000): Biodiversity hotspots for conservation priorities. In: *Nature* 403, S. 853–858.

## N

- Nagai, M.; Tada, M. (1987): Antimicrobial compounds, chinesin I and II from flowers of *Hypericum chinense* L. In: *Chem. Lett.* 16, S. 1337–40.
- Nedialkov, P. T.; Zheleva-Dimitrova, D.; Momekov, G.; Karlov, K.; Girreser, U.; Kitanov, G. M. (2011): Elegaphenone and 7-epi-clusianone, the major cytotoxic constituents of *Hypericum elegans*. In: *Nat. Prod. Res.* 25 (18), S. 1743–1750.
- Nikitenko, L.; Boshoff, C. (2006): Endothelial cells and cancer. In: Salvador Moncada und Annie Higgs (Hg.): *The Vascular Endothelium II*, 176/II: Springer. (Handbook of Experimental Pharmacology), S. 307–334.
- Nürk, N. M. (2011): Phylogenetic analyses in St. John's wort (*Hypericum*). Inferring character evolution and historical biogeography. Dissertation. Freie Universität, Bonn.
- Nürk, N. M.; Crockett, S. L. (2011): Morphological and phytochemical diversity among *Hypericum* species of the Mediterranean Basin. In: *Med. Aromat. Plant. Sci. Biotechnol.* 5 (Special Issue 1), S. 14–28.

Nürk, N. M.; Madriñán, S.; Carine, M. A.; Chase, M. W.; Blattner, F. R. (2013): Molecular phylogenetics and morphological evolution of St. John's wort (*Hypericum*; Hypericaceae). In: *Mol. Phylogenet. Evol.* 66 (1), S. 1–16.

## O

Orihara, Y.; Furuya, T. (1993): Biotransformation of (–)-borneol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. In: *Phytochemistry* 34 (4), S. 1045–1048.

Orth, H. C. (1999): Isolierung, Stabilität und Stabilisierung von Hyperforin und Identifizierung seines Hauptabbauproduktes aus *Hypericum perforatum* L: Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Orth, H. C.; Rentel, C.; Schmidt, P. C. (1999): Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (2), S. 193–200.

## P

Pabuçuoğlu, A.; Konyalıoğlu, S.; Baş, M.; Meral, G. E. (2003): The *in vitro* effects of *Hypericum* species on human leukocyte myeloperoxidase activity. In: *J. Ethnopharmacol.* 87 (1), S. 89–92.

Pachaly, P. (2012): DC-Atlas. Dünnschicht-Chromatographie in der Apotheke. Mit 288 Drogen- und Arzneistoff-Monographien. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.

Pal Singh, I.; Bharate, S. B. (2006): Phloroglucinol compounds of natural origin. In: *Nat. Prod. Rep.* 23 (4), S. 558.

Park, Y.; Moon, B.-H.; Lee, E.; Lee, Y.; Yoon, Y.; Ahn, J.-H.; Lim, Y. (2007): <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR data of hydroxyflavone derivatives. In: *Magn. Reson. Chem.* 45 (8), S. 674–679.

Pecchio, M.; Solís, P. N.; López-Pérez, J. L.; Vasquez, Y.; Rodríguez, N.; Olmedo, D.; Correa, M.; San Feliciano, A.; Gupta, M. P. (2006): Cytotoxic and antimicrobial benzophenones from the leaves of *Tovomita longifolia*. In: *J. Nat. Prod.* 69 (3), S. 410–413.

Peng, J.; Fan, G.; Wu, Y. (2006): Preparative separation and isolation of three flavonoids and three phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum* Thumb. using High-Speed Countercurrent Chromatography by stepwise increasing the flow rate of the mobile phase. In: *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 29 (11), S. 1619–1632.

Penttilä, A.; Sundman, J.; Pedersen, C. T.; Kvande, P. C.; Meisingseth, E. (1963): The structures of filixic acids. In: *Acta Chem. Scand.* 17, S. 191–198.

Petrakis, P. V.; Couladis, M.; Roussis, V. (2005): A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: The case of five hellenic *Hypericum* L. species. In: *Biochem. Syst. Ecol.* 33 (9), S. 873–898.

Pinhatti, A. V.; Matos Nunes, J.; Rosa, L. M. G.; Poser, G. L. von; Rech, S. B.; Maurmann, N. (2010): Phenolic compounds accumulation in *Hypericum ternum* propagated *in vitro* and during plant development acclimatization. In: *Acta Physiol. Plant.* 32 (4), S. 675–681.

Pockrandt, D.; Ludwig, L.; Fan, A.; König, G. M.; Li, S.-M. (2012): New insights into the biosynthesis of prenylated xanthenes: Xptb from *Aspergillus nidulans* catalyses an O-prenylation of xanthenes. In: *Chembiochem*. 13 (18), S. 2764–2771.

Pollio, A.; Natale, A. de; Appetiti, E.; Aliotta, G.; Touwaide, A. (2008): Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. In: *J. Ethnopharmacol.* 116 (3), S. 469–482.

## Q

Quiney, C.; Billard, C.; Mirshahi, P.; Fourneron, J.-D.; Kolb, J.-P. (2006a): Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells. In: *Leukemia* 20 (4), S. 583–589.

Quiney, C.; Billard, C.; Salanoubat, C.; Fourneron, J. D.; Kolb, J. P. (2006b): Hyperforin, a new lead compound against the progression of cancer and leukemia? In: *Leukemia* 20 (9), S. 1519–1525.

## R

Ribatti, D. (2008): Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. In: *Angiogenesis* 11 (1), S. 3–10.

Rios, M. Y.; Delgado, G. (1992): Polyprenols and acylphloroglucinols from *Esenbeckia nesiotica*. In: *Phytochemistry* 31 (10), S. 3491–3494.

Robson, N. K. B. (1977): Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 1. Infrageneric classification. In: *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Botany)* (5), S. 291–355.

Robson, N. K. B. (1981): Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 2. Characters of the genus. In: *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Botany)* (8), S. 55–236.

Robson, N. K. B. (2010): Studies in the genus *Hypericum* L (Hypericaceae) 5(2). Sections 17. *Hirtella* to 19. *Coridium*. In: *Phytotaxa* 4 (1), S. 127–258.

Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M. C.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K. (1995): Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. In: *Phytochemistry* 40 (5), S. 1447–1452.

Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Hostettmann, K. (1996): More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. In: *Phytochemistry* 42 (1), S. 185–188.

Rothley, M.; Schmid, A.; Thiele, W.; Schacht, V.; Plaumann, D.; Gartner, M.; Yektaoglu, A.; Bruyère, F.; Noël, A.; Giannis, A.; Sleeman, J. P. (2009): Hyperforin and aristoforin inhibit lymphatic endothelial cell proliferation *in vitro* and suppress tumor-induced lymphangiogenesis *in vivo*. In: *Int. J. Cancer* 125 (1), S. 34–42.

Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G. G. (2008): Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten. Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden. 4., durchges. u. aktualis. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.

## S

- Saadat, N.; Gupta, S. V. (2012): Potential role of garcinol as an anticancer agent. In: *J. Oncol.* 2012 (4), S. 1–8.
- Sarkisian, S. A.; Janssen, M. J.; Matta, H.; Henry, G. E.; Laplante, K. L.; Rowley, D. C. (2012): Inhibition of bacterial growth and biofilm production by constituents from *Hypericum* spp. In: *Phytother. Res.* 26 (7), S. 1012–1016.
- Sasaki, K.; Mito, K.; Ohara, K.; Yamamoto, H.; Yazaki, K. (2008): Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. In: *Plant Physiol.* 146 (3), S. 1075–1084.
- Schempp, C. M.; Kirkin, V.; Simon-Haarhaus, B.; Kersten, A.; Kiss, J.; Termeer, C. C.; Gilb, B.; Kaufmann, T.; Borner, C.; Sleeman, J. P.; Simon, J. C. (2002): Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. In: *Oncogene* 21 (8), S. 1242–1250.
- Schempp, C. M.; Kiss, J.; Kirkin, V.; Averbeck, M.; Simon-Haarhaus, B.; Kremer, B.; Termeer, C. C.; Sleeman, J.; Simon, J. C. (2005): Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor *in vitro* and *in vivo*. In: *Planta Med.* 71 (11), S. 999–1004.
- Schmidt, S.; Jürgenliemk, G.; Skaltsa, H.; Heilmann, J. (2012a): Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. In: *Phytochemistry* 77, S. 218–225.
- Schmidt, S.; Jürgenliemk, G.; Schmidt, T. J.; Skaltsa, H.; Heilmann, J. (2012b): Bi-, tri-, and polycyclic acylphloroglucinols from *Hypericum empetrifolium*. In: *J. Nat. Prod.* 75 (10), S. 1697–1705.
- Schönfelder, I.; Schönfelder, P. (2011): Kosmos-Atlas Mittelmeer- und Kanarenflora. Über 1600 Pflanzenarten. Aktualisierte Sonderausg. der 2. Aufl. Stuttgart: Kosmos.
- Schooltink, H. (2012): Bakterien und Viren als Auslöser. In: *Pharmazeutische Zeitung* 36.
- Schütt, H.; Schulz, V. (2007): *Hypericum*. In: Blaschek, W.; Ebel, S.; Hackenthal, E.; Holzgrabe, U.; Keller, K.; Reichling J.; Schulz V. (Hg.): Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Band. 8. 6., neu bearb. und erg. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., S. 742–780.
- Schwob, I.; Bessiere, J. M.; Dherbomez, M.; Viano, J. (2002): Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum coris*. In: *Fitoterapia* 73 (6), S. 511–513.
- Shan, M.-d.; Hu, L.-H.; Chen, Z.-L. (2000): Pyrohyperforin, a new prenylated phloroglucinol from *Hypericum perforatum*. In: *Chin. Chem. Lett.* 11 (8), S. 701–704.
- Shimamura, M.; Hazato, T.; Ashino, H.; Yamamoto, Y.; Iwasaki, E.; Tobe, H.; Yamamoto, K.; Yamamoto, S. (2001): Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (1), S. 220–224.
- Shiu, W. K. P.; Rahman, M. M.; Curry, J.; Stapleton, P.; Zloh, M.; Malkinson, J. P.; Gibbons, S. (2012): Antibacterial acylphloroglucinols from *Hypericum olympicum*. In: *J. Nat. Prod.* 75 (3), S. 336–343.
- Siegel, L.; Miternique-Grosse, A.; Griffon, C.; Klein-Soyer, C.; Lobstein, A.; Raul, F.; Stephan, D. (2008): Antiangiogenic properties of lupulone, a bitter acid of hop cones. In: *Anticancer Res.* 28 (1A), S. 289–294.

Soelberg, J.; Jørgensen, L. B.; Jäger, A. K. (2007): Hyperforin accumulates in the translucent glands of *Hypericum perforatum*. In: *Ann. Bot.* 99 (6), S. 1097–1100.

Stanjek, V.; Miksch, M.; Lueer, P.; Matern, U.; Boland, W. (1999): Biosynthesis of psoralen: Mechanism of a cytochrome P450 catalyzed oxidative bond cleavage. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (3), S. 400–402.

Stein, A. C.; Viana, A. F.; Müller, L. G.; Nunes, J. M.; Stolz, E. D.; Do Rego, J.-C.; Costentin, J.; Poser, G. L. von; Rates, S. M. K. (2012): Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. In: *Behav. Brain Res.* 228 (1), S. 66–73.

Stevens, P. F. (2007): Hypericaceae. In: Klaus Kubitzki (Hg.): Flowering Plants · Eudicots, Bd. 9. Berlin, Heidelberg: Springer (The Families and Genera of Vascular Plants), S. 194–201.

Stojanovic, G.; Dordevic, A.; Smelcerovic, A. (2013): Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)? In: *Curr. Med. Chem.* 20 (18), S. 2273–2295.

Strasburger, E. (2012): Lehrbuch der Botanik. 36. Aufl., neu bearb.; Nachdr. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.

## T

Tada, M.; Chiba, K.; Yamada, H.; Maruyama, H. (1991): Phloroglucinol derivatives as competitive inhibitors against thromboxane A<sub>2</sub> and leukotriene D<sub>4</sub> from *Hypericum erectum*. In: *Phytochemistry* 30 (8), S. 2559–2562.

Tahergorabi, Z.; Khazaei, M. (2012): A review on angiogenesis and its assays. In: *Iran J. Basic Med. Sci.* 15 (6), S. 1110–1126.

Tanaka, N.; Takaishi, Y.; Shikishima, Y.; Nakanishi, Y.; Bastow, K.; Lee, K.-H.; Honda, G.; Ito, M.; Takeda, Y.; Kodzhimatov, O. K.; Ashurmetov, O. (2004): Prenylated benzophenones and xanthenes from *Hypericum scabrum*. In: *J. Nat. Prod.* 67 (11), S. 1870–1875.

Tanaka, N.; Kubota, T.; Ishiyama, H.; Araki, A.; Kashiwada, Y.; Takaishi, Y.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. (2008): Petiolins A–C, phloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. In: *Bioorg. Med. Chem.* 16 (10), S. 5619–5623.

Tanaka, N.; Otani, M.; Kashiwada, Y.; Takaishi, Y.; Shibazaki, A.; Gonoi, T.; Shiro, M.; Kobayashi, J. (2010): Petiolins J–M, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (15), S. 4451–4455.

Tanaka, N.; Mamemura, T.; Shibazaki, A.; Gonoi, T.; Kobayashi, J. (2011): Yojironins E–I, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum*. In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (18), S. 5393–5397.

Tatsis, E. C.; Boeren, S.; Exarchou, V.; Troganis, A. N.; Vervoort, J.; Gerothanassis, I. P. (2007): Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. In: *Phytochemistry* 68 (3), S. 383–393.

Tawaha, K.; Gharaibeh, M.; El-Elimat, T.; Alali, F. Q. (2010): Determination of hypericin and hyperforin content in selected Jordanian *Hypericum* species. In: *Ind. Crops Prod.* 32 (3), S. 241–245.

Taylor, H. L.; Brooker, R. M. (1969): The isolation of uliginosin A and uliginosin B from *Hypericum uliginosum*. In: *Lloydia* 32 (2), S. 217–219.

The United States Pharmacopeia 36. Official from May 1, 2013 : The national formulary 31 (2012). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.

Tori, K.; Hamashima, Y.; Takamizawa, A. (1964): Nuclear magnetic resonance studies of bridged ring systems. V. Signals of methyl groups in bornane derivatives. In: *Chem. Pharm. Bull.* 12 (8), S. 924–937.

Trovato, A.; Raneri, E.; Kouladis, M.; Tzakou, O.; Taviano, M. F.; Galati, E. M. (2001): Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* WILLD. (Guttiferae). In: *Farmaco* 56 (5-7), S. 455–457.

Tuzlacy, E. (2006): Turkiye'nin Bitkisel Halk Ylaclary (Herbal folk medicines) Alfa Basymyaym Daoytym Pirketi, Istanbul.

## V

Vajs, V.; Vugdelija, S.; Trifunović, S.; Karadžić, I.; Juranić, N.; Macura, S.; Milosavljević, S. (2003): Further degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* (St John's Wort). In: *Fitoterapia* 74 (5), S. 439–444.

Verotta, L.; Appendino, G.; Belloro, E.; Bianchi, F.; Sterner, O.; Lovati, M.; Bombardelli, E. (2002): Synthesis and biological evaluation of hyperforin analogues. Part I. Modification of the enolized cyclohexanedione moiety. In: *J. Nat. Prod.* 65 (4), S. 433–438.

Verotta, L.; Appendino, G.; Bombardelli, E.; Brun, R. (2007): *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study. In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (6), S. 1544–1548.

Viana, A. F.; Rego, J.-C. do; Munari, L.; Dourmap, N.; Heckler, A. P.; Costa, T. D.; Poser, G. L. von; Costentin, J.; Rates, S. M. (2006): *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) CHAM. & SCHLTDL.: A species native to South Brazil with antidepressant-like activity. In: *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20 (6), S. 507–514.

Vogel, S.; Heilmann, J. (2008): Synthesis, cytotoxicity, and antioxidative activity of minor prenylated chalcones from *Humulus lupulus*. In: *J. Nat. Prod.* 71 (7), S. 1237–1241.

Vokou, D.; Katradi, K.; Kokkini, S. (1993): Ethnobotanical survey of Zagori (Epirus, Greece), a renowned centre of folk medicine in the past. In: *J. Ethnopharmacol.* 39 (3), S. 187–196.

## W

Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M. (1983): Drogenanalyse. Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Berlin, New York: Springer.

Wang, W.; Zeng, Y. H.; Osman, K.; Shinde, K.; Rahman, M.; Gibbons, S.; Mu, Q. (2010): Norlignans, acylphloroglucinols, and a dimeric xanthone from *Hypericum chinense*. In: *J. Nat. Prod.* 73 (11), S. 1815–1820.

Wang, X.; Lee, Y. R. (2011): Efficient synthesis of polycycles bearing prenylated, geranylated, and farnesylated citrans: application to 3'-prenylrubranine and petiolin D regioisomer. In: *Tetrahedron* 67 (47), S. 9179–9184.

- Wang, X. W.; Mao, Y.; Wang, N.-L.; Yao, X. S. (2008): A new phloroglucinol diglycoside derivative from *Hypericum japonicum* Thunb. In: *Molecules* 13 (11), S. 2796–2803.
- Widén, C. J.; Ayräs, P.; Reichstein, T. (1992): The phloroglucinols of *Dryopteris stenolepis* (Pteridophyta, Dryopteridaceae). In: *Ann. Bot. Fennici* 29, S. 41–54.
- Widén, C. J.; Ayräs, P.; Neuvonen, K.; Reichstein, T. (1993): New phloroglucinol derivatives in *Dryopteris pulvinulifera* and *D. subtriangularis* (Pteridophyta, Dryopteridaceae). In: *Ann. Bot. Fennici* 30, S. 285–297.
- Willdenow, C. L. von (1802). In: *Sp. Pl. Ed. 4 3* (2), S. 1452.
- Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O. (2000): New phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. In: *J. Nat. Prod.* 63 (1), S. 104–108.
- Winkelmann, K. (2001): Phytochemical and biological investigations on *Hypericum papuanum*, emphasizing on structure elucidation of acylphloroglucinol derivatives by NMR spectroscopy. Dissertation. ETH, Zürich.
- Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O. (2001a): Further prenylated bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. In: *Helv. Chim. Acta* 84 (11), S. 3380–3392.
- Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O. (2001b): New prenylated bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. In: *J. Nat. Prod.* 64 (6), S. 701–706.
- Winkelmann, K.; San, M.; Kypriotakis, Z.; Skaltsa, H.; Bosilij, B.; Heilmann, J. (2003): Antibacterial and cytotoxic activity of prenylated bicyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum amblycalyx*. In: *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 58 (7-8), S. 527–532.
- Wurdack, K. J.; Davis, C. C. (2009): Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. In: *Am. J. Bot.* 96 (8), S. 1551–1570.

## X

- Xenophontos, M.; Stavropoulos, E.; Avramakis, E.; Navakoudis, E.; Dörnemann, D.; Kotzabasis, K. (2007): Influence of the developmental stage on the (proto)-hypericin and (proto)pseudohypericin levels of *Hypericum* plants from Crete. In: *Planta Med.* 73 (12), S. 1309–1315.
- Xenophontos, M.; Stavropoulos, I.; Avramakis, E.; Navakoudis, E.; Dörnemann, D.; Kotzabasis, K. (2008): Influence of the habitat altitude on the (proto)hypericin and (proto)pseudohypericin levels of *Hypericum* plants from Crete. In: *Planta Med.* 74 (12), S. 1496–1503.

## Y

- Yamakoshi, Y.; Murata, M.; Shimizu, A.; Homma, S. (1992): Isolation and characterization of macrocarpals B-G antibacterial compounds from *Eucalyptus macrocarpa*. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (10), S. 1570–1576.

Yazaki, K. (2001): Geranyl diphosphate: 4-Hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. In: *J. Biol. Chem.* 277 (8), S. 6240–6246.

## Z

Zhao, F.; Watanabe, Y.; Nozawa, H.; Daikonnya, A.; Kondo, K.; Kitanaka, S. (2005): Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). In: *J. Nat. Prod.* 68 (1), S. 43–49.

Zündorf, I.; Dingermann, T. (2007): Angiogenese-Inhibitoren der Zukunft. Getreu dem Motto: Von der Versorgung abschnüren! In: *Pharmazie in unserer Zeit* 36 (6), S. 452–461.

Zuurbier, K. W.; Fung, S.-Y.; Scheffer, J. J.; Verpoorte, R. (1998): *In vitro* prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. In: *Phytochemistry* 49 (8), S. 2315–2322.

## 8 Anhang

### *Curriculum Vitae*

**Sebastian Schmidt**, Apotheker

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Anschrift:                     | Mälzereiweg 5<br>D-93053 Regensburg  |
| Telefon:                       | 0941 – 46522825<br>0175 – 7770232  |
| e-mail:                        | apo-schmidt@web.de   |
| Geburtsdatum:                  | 07. 09. 1981   |
| Geburtsort:                    | Bamberg  |
| Staatsangehörigkeit:           | deutsch  |
| <b>Seit 01. Sept. 2009</b>     | Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter<br>Universität Regensburg,<br>Fakultät für Chemie und Pharmazie,<br>Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie,<br>Prof. Dr. Jörg Heilmann |
| 01. April 2009 – 31. Juli 2009 | Anstellung als Apotheker, Anthemis Apotheke Herrieden  |
| 01. Dez. 2006 – 31. März 2009  | Anstellung als Apotheker, ArcadenApotheke Regensburg   |
| Nov. 2006                      | 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  |
| 01. Mai 2006 – 31. Okt. 2006   | Pharmaziepraktikum, Arcaden Apotheke Regensburg  |
| 01. Nov. 2005 – 30. April 2006 | Pharmaziepraktikum, Universität Würzburg   |
| Okt. 2001 – Okt. 2005          | Studium der Pharmazie, Universität Würzburg  |
| Juni 2001                      | Abitur; <i>Sonderpreis für soziales Engagement</i>   |
| Sept. 1992 – Juni 2001         | Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern  |
| Sept. 1989 – Juli 1992         | Grundschule Baunach  |
| Sept. 1988 – Juli 1989         | Einschulung, Grundschule Oberhaid  |
| Sprachkenntnisse:              | Englisch, Französisch  |
| EDV-Kenntnisse:                | ADG, Asys, CSE, MS-Office  |
| Mitgliedschaften:              | Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (GA)<br>Gesellschaft für Phytotherapie (GPT)<br>Förderverein Deutsches Apothekenmuseum e.V.   |
| Hobbys:                        | Lesen, Theater, Wandern, Fahrradfahren, Fotografieren  |

*Erklärung zur Eigenständigkeit*

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Textstellen aus der Literatur bzw. dem Internet habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den \_\_\_\_\_ Unterschrift \_\_\_\_\_