

# **Insektizide Rocaglamid-Derivate und verwandte Verbindungen aus *Aglaia*-Arten (Meliaceae)**

**Isolierung, Strukturaufklärung und Evaluierung  
der insektiziden Aktivität**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Chaidir  
aus Cimahi, Indonesien**

**Würzburg, 2002**

Eingereicht am :

Vorsitzender : .....

1. Gutachter : Prof. Dr. P. Proksch

2. Gutachter : Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquims :

Doktorurkunde ausgehändigt am :

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Des weiteren erkläre ich, daß ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 12. 02. 2002

Chaidir

*Meinem Vater*

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P. Proksch, für die interessante Themenstellung und seine wissenschaftliche Betreuung mit großen Möglichkeiten zum selbständigen Experimentieren sowie für Hilfe bei der Realisierung von eigenen Ideen bedanken. Es ist mir auf verpflichtet, Ihm zu danken für alle seine Verständigung und Unterstützung mit Tat und Rat an meine menschliche Probleme.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. F.-C. Czygan für die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und Herrn Prof. Dr. R. Benz vom Institut für Biotechnologie für seine Bereitschaft diese Arbeit als Gutachter zu betreuen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem Chef, Herr Dr. Wahono Sumaryono, bedanken, der mich dieses Studium motiviert und immer unterstützt hat.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) habe ich für die Gewährung eines Stipendiums und weitere große Unterstützung für meine Forschungsaufenthalt in Deutschland und Anfertigung meine Doktorarbeit zu danken.

Gerade zu Beginn meiner Zeit im Labor hat mich vor allem Dr. Bambang W. Nugroho und Dr. Frank Bohnenstengel mit den Techniken der Naturstoffisolierung und der Kultur von *Spodoptera littoralis* vertraut gemacht. Auch für die vielen anregenden Diskussion über den Gattung *Aglaia* und über die Rocaglamide im Speziellen sei hier an dieser Stelle herzlich gedankt. Dr. Frank Bohnenstengel und Dr. Wen Han Lin danke ich für die Überlassung des Pflanzenmaterials.

Herrn Dr. V. Wray (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren und für seine freundliche und geduldige Unterstützung bei der Interpretation der Spektren, seine Anregungen bei Schreiben des Publikationen und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei allen Problemen in der Strukturaufklärung. Dr. Wen Han Lin, Dr. Rainer Ebel, Dr.

RuAngelie Edrada und Raquel danke ich für die vielen interessanten Diskussionen und ihre wertvollen Ratschläge bei der Interpretation von NMR-Spektren.

Bei Herrn Dr. L. Witte (Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig) bedanke ich mich für die Aufnahme der Massenspektren. Herrn Dr. M. Nimitz (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) bedanke ich mich für die Aufnahme der HRQTOF-Massenspektren. Herrn Dr. U. Matthiesen danke ich für die Aufnahme CI- und EI-Massenspektren. Herrn Prof. G. Bringmann (Organische Chemie der Universität Würzburg) und Herrn P.D. Dr. Herderich (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg) danke ich mich für die Überlassung von Messzeit am Polarimeter bzw. an der HPLC-MS.

Herrn Prof. Dr. Walter Frank vom Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie / Lehrstuhl II, der Universität Düsseldorf danke ich für die Einkristall-Röntgenstrukturanalyse.

Vielen Dank auch Herrn Prof. Dr. August-Wilhelm Alfermann und seinen Mitarbeitern vom Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, der Universität Düsseldorf für die Einführung in die Arbeit mit Pflanzenzellkulturen und die Möglichkeit zur Züchtung der Kalluskulturen.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie danke ich herzlich für das angenehme Arbeitsklima und die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen. Weiterhin danke ich allen, die beim Korrekturlesen dieser Arbeit beteiligt waren. Es war bestimmt nicht immer leicht meine „der, die, das“ Fehler zu ertragen. Herrn Dr. Rainer Ebel und Frau Dr. RuAngelie Edrada danke ich für die konstruktive Diskussion und das kritische Korrekturlesen meiner Artikel und dieser Arbeit. Jan, Gero und Carsten danke ich, dass sie mich während des Zusammenschreibens immer bestärkt haben und noch Geduld hatten, sich diese aufmerksam durchlesen.

Ganz zum Schluß bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie für ihre Hilfe und Unterstützung während des Studiums und Anfertigung des Dissertation.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>v</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Summary</b>	<b>x</b>
<b>Kapitel 1</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
1.1. Pflanzliche Naturstoffe; Suche nach Leitstrukturen	1
1.2. Insektizide aus der Familie Meliaceae	3
1.3. Gattung <i>Aglaia</i> ; Biologie und Phytochemie	6
1.4. Rocaglamide und verwandte Verbindungen	9
1.4.1. Chemie und Biosynthesewege	9
1.4.2. Biologische Aktivität der Rocaglamide	14
1.4.3. Struktur-Wirkungs-Beziehung der Rocaglamid-Derivate	19
1.5. <i>Spodoptera littoralis</i> als Modellinsekt zur Untersuchung insektizider Sekundärstoffe	21
1.6. Pflanzenzellkulturen als Modellsysteme zur Untersuchung der Sekundärstoffbiosynthese	23
1.7. Problemstellung	24
<b>Kapitel 2</b>	<b>27</b>
<hr/>	
<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
2.1. Screening-Tests mit den Rohextrakten	27
2.2. Isolierung und Strukturaufklärung	29
2.2.1. Isolierung und Strukturaufklärung der Sekundärstoffe aus Blüten von <i>A. duperreana</i>	29
2.2.1.1. Isolierung der insektizid aktiven Inhaltsstoffe	29
2.2.1.2. Zusammenstellung der spektralen Daten für Rocaglamid	32
2.2.1.3. Bekannte isolierte Rocaglamid-Derivate	36
2.2.1.4. Neue Rocaglamid-Derivate	43
2.2.2. Isolierung und Strukturaufklärung der untersuchten Verbindungen aus Blättern von <i>A. duperreana</i>	50

2.2.3. Isolierung und Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen aus Blättern von <i>A. dasyclada</i>	55
2.2.3.1. Bekannte isolierte Rocaglamid-Derivate	57
2.2.3.2. Neue Rocaglamid-Derivate	62
2.2.3.3. Strukturell verwandte Verbindungen des Rocaglamids	65
2.2.3.4. Cumarin und Flavonoid	85
2.3. Biotest der isolierten Verbindungen gegenüber dem Modellinsekt <i>Spodoptera littoralis</i>	94
2.4. Züchtung einer Kalluskultur von <i>Aglaia</i>	96
2.4.1. Sterilisationsdauer	96
2.4.2. Screening des Kallusmediums	96
2.4.3. Anzucht der sterilen Keimlinge aus Samen von <i>A. elliptica</i>	98
2.4.4. Phytochemische Voruntersuchung des Kallus	99
<b>Kapitel 3</b>	<b>101</b>
<b>Diskussion</b>	<b>101</b>
3.1. Chemie und Taxonomie ; Rocaglamid und seine verwandten Verbindungen als phytochemisches Merkmal der Gattung <i>Aglaia</i>	102
3.1.1. <i>Aglaia duperreana</i>	102
3.1.2. <i>Aglaia dasyclada</i>	109
3.2. Biologische Aktivität	117
3.3. Bildung von Zimtsäure-Derivaten in der Primärkalluskultur von <i>Aglaia elliptica</i>	121
<b>Kapitel 4</b>	<b>123</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
<b>Kapitel 5</b>	<b>129</b>
<b>Experimenteller Teil</b>	<b>129</b>
5.1. Pflanzenmaterial	129
5.2. Bearbeitung des Pflanzenmaterials	129
5.3. Versuchstiere <i>Spodoptera littoralis</i>	131

5.3.1. Kultivierung von <i>S. littoralis</i> im Labor	131
5.3.2. Herstellung des Kunstfutters	133
5.4. Isolierung der Inhaltsstoffe	133
5.4.1. Chromatographische Methoden	134
5.4.2. Biotest begleitete Fraktionierung	140
5.5. Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Reinsubstanzen	141
5.6. Ermittlung der Insektizid-Werte der isolierten Verbindungen	146
5.7. Vorversuch zur Züchtung von Zellkulturen aus <i>Aglaia</i>	148
5.7.1. Pflanzenmaterial	148
5.7.2. Kulturmedium	149
5.7.3. Sterile Anzucht von <i>Aglaia elliptica</i>	149
5.7.4 Kalluskultur	151
5.7.5. Phytochemische Voruntersuchung des Kallus	151
5.8. Chemikalien	152
5.9. Chromatographie-Zubehör	153
5.10. Geräte	154
<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>155</b>
<b><u>Anhang A : Strukturdaten</u></b>	<b>171</b>
<b><u>Anhang B : Kulturmedien</u></b>	<b>202</b>
<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b>203</b>
<b><u>Publikationsliste</u></b>	<b>205</b>

## Summary

Genus *Aglaia* (Meliaceae) is widely distributed in the tropical forest of Indo-Malaysia, South China and the Pacific Islands. Insectidal activity of crude-methanol extracts of *Aglaia odorata* against various pest insects motivated the phytochemical investigation of this genus. Previous studies on *Aglaia spp.* showed the presence of bisamides, lignans, triterpenoids and benzofurans. The new class of compounds named rocaglamides, represents aromatic compounds with a cyclopenta[*b*]-benzofuran skeleton that are responsible for the pronounced insecticidal activity. The present study has revealed that rocaglamide derivatives are also highly potent cytotoxic compounds when tested against a panel of human cancer cell lines. The occurrence of rocaglamide-related compounds, such as aglain, aglaforbesin (benzopyran) and forbaglin (benzoxepine) has also been reported from this genus.

In search for novel naturally bioactive compounds, a screening program was performed on ten methanol extracts from different organs of six *Aglaia spp.*, namely, *odorata*, *tsangii*, *polystachia*, *taiwanensis*, *duperreana* and *dasyclada*, collected in Vietnam and China, using a well established insecticide-bioassay system with the polyphagous pest insect *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). Only extracts of *A. duperreana* showed strong activity against *A. odorata* as control, whereas extracts of *A. dasyclada* showed moderate activity. The extracts from flowers and leaves of *Aglaia duperreana* as well as leaves of *Aglaia dasyclada* were chosen for further phytochemical investigation

Bioassay-guided fractionation of those extracts using the same bioassay system, led to the isolation of twenty-nine natural compounds, eleven of which are new natural products. Six new rocaglamide derivatives along with another twelve congeners were isolated and identified. Three cinammoyl bisamide derivatives, possessing either a 2-aminopyrrolidine ring or a putrescine moiety, were obtained together with four rocaglamide-related compounds (aglain-, aglaforbesin- and forbaglin type compounds) which also possess putrescine. In addition, *A. dasyclada* also yielded two interesting

flavonoid derivatives, flavanocoumarin and a phenylpropanoid derivative of catechin, together with catechin and scopoletin (coumarin). The structures were established on the basis of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and 2D (COSY, HMBC, ROESY) NMR spectroscopic methods and mass spectrometry.

In both *A. duperreana* and *A. dasyclada*, rocaglamide derivatives were isolated as the insecticidal principle as previously reported in another species of *Aglaia*. The insecticidal activities of the new rocaglamide derivatives against the larvae of *S. litto-ralis* in a chronic feeding assay were calculated as  $\text{LC}_{50}$  and  $\text{EC}_{50}$ -values and exhibited values ranging from 2.0 – 6.6 ppm and 0.1 – 1.0 ppm, respectively. An interesting finding however showed that two rocaglamide derivatives, both with ethyloxy-substituent at C-8b of the furan ring instead of the usual hydroxy group, were devoid of insecticidal activity. This indicates that aside from the benzofuran nucleus, the nature of the substituent at position C-8b seems to be an important structural feature influencing insecticidal activity. This shows a new aspect of the structure-activity relationship of this class of compounds.

The co-occurrence of cinnamoyl putrescine bisamide-, rocaglamide-, aglain-, aglaforbesine- and forbagline- type of compounds confirmed their biogenetical relationship as previously postulated.

Rocaglamide and related compounds, which have been so far only found in *Aglaia* spp., can be used as chemotaxonomical marker for this genus. This is particularly useful in resolving the classical taxonomical problem involving the genus *Aglaia*. It can be reasoned, for example, that *Aglaia dasyclada*, which in some instances has been assigned as *Amoora dasyclada*, is the right taxonomical name for this species due to the presence of the rocaglamide derivatives and their structurally related compounds (putrescine bisamide, aglain, aglaforbesin and forbaglin type). Likewise, the common occurrence of the major components cinnamoyl pyrrolidine bisamide-, as well as the rocaglamide derivatives in both *A. duperreana* and *A. odorata* supports the morphologically-postulated close relationship between these two taxons.

In the course of the preliminary study to establish a callus culture of *Aglaia* sp., Riser and White medium supplemented with 1.0 mg/l 2,4-D, 0.2 mg/l BAP, 0.5 g/l ca

sein hydrolysate and 0.1 g/l ascorbic acid was found as the best medium for induction of callus derived from the leaf, twig, hypocotyl and cotyledon explants. In this study through LC-MS experiment, the present of odorinol was also observed in the callus of *A. elliptica*. Odorinol is a cinnamoyl pyrrolidine bisamide postulated to be one of the precursors in the biosynthesis of the rocaglamide and its related compounds.

# Kapitel 1

## Einleitung und Problemstellung

### 1.1. Pflanzliche Naturstoffe; Suche nach Leitstrukturen

Die chemische Evolution kann als eine natürliche, über Millionen von Jahren aktive chemische Fabrik zur Herstellung verschiedener Verbindungsklassen bezeichnet werden. Sie repräsentiert ein riesiges Reservoir an biologisch aktiven Verbindungen, die für die Menschen z. B. in der medizinischen Anwendung gegen Krankheiten eine wichtige Rolle spielen. Vor allem die Pflanzen, die von den Menschen bereits seit mehreren tausend Jahren weltweit eingesetzt werden, haben für uns bis heute noch eine große Bedeutung und liefern verschiedene wertvolle Verbindungen (Harvey, 1993; Newman *et al.*, 2000).

Neben ihrer Verwendung als traditionelle Arzneimittel werden Pflanzenextrakte von den Bauern in der Landwirtschaft auch zur Bekämpfung von Insekten eingesetzt. Pyrethrum und Rotenon sind beispielsweise seit der römischen Zeit bis Mitte des 20. Jahrhunderts angewendet worden. Sie werden jetzt allerdings nur noch in beschränktem Maß verwendet (Jacobson, 1989). Solche Bekämpfungsmittel sind auch wichtig im Bereich der Medizin, weil einige Insekten Vektoren für Krankheiten wie Schistosomiasis, Malaria und Gelbfieber darstellen (Maillard *et al.*, 1993). Viele solcher Vektoren zeigen heutzutage eine Resistenz gegen Insektizide (Brogdon und McAllister, 1998). Die Tatsache, daß die Pflanzen in ihrer Evolution verschiedene aktive Inhaltsstoffe gegen Insektenbefall entwickelt haben, stimuliert die weitere Suche nach umweltfreundlichen Insektiziden pflanzlichen Ursprungs (Bell, 2001; Schröder, 1998; Rice *et al.*, 1998).

Weiterhin dienen solche aktiven Naturstoffe als Ideengeber zur Synthese neuer Arzneimittel bzw. Insektizide. Durch Derivatisierung verbessert man ihre chemischen

und biologischen Eigenschaften. Das war die Geburt des Konzepts der Leitstruktur (*lead substance*), wobei man die Naturstoffe als Modell für die Produktion neuer Verbindungen mit sowohl optimierten Aktivitäten als auch verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften verwendet (Shu, 1998).

Heutzutage wird die Suche nach neuen biologisch aktiven Verbindungen durch modernere Ansätze durchgeführt (Potier, 1997). Zum einen gibt es den computerunterstützten Entwurf von neuen Medikamenten (*Computer-aided Drug Design*), zum anderen die kombinatorische Chemie (Bugg *et al.*, 1994; Folker und Kubinyi, 1997; Plunkett und Elman, 1997). Trotz dieser Entwicklung - vor allem mit dem Einzug des *High-Throughput-Screenings* (HTS) sowie der kombinatorischen Chemie in den Wirkstofffindungsprozess - wird die zukünftige Rolle der Naturstoffforschung als Ideengeber für Wirkstoffe weiterhin sehr wichtig bleiben. Naturstoffe bilden einen strukturell einzigartigen Ideenpool, der durch Sytheseanstrengungen nicht einfach ersetzbar ist, und repräsentieren eine einmalige Quelle für die Wirkstofffindung und -entwicklung (Shu, 1998; Cragg *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 2000).

Tropische Pflanzen sind ohne Zweifel ein riesige Quelle an wertvollen Naturstoffen. Schätzungsweise die Hälfte bis zwei Drittel der Biodiversität aller höheren Pflanzen findet sich in tropischen Gebieten. Außerdem konzentrieren sich durch den ökologischen Druck die biologisch aktiven Verbindungen als chemische Verteidigung gegen Befall von andere Organismus in Pflanzen (Gentry, 1993). Wie durch natürliche kombinatorische Synthese liefern uns die Pflanzen daher immer mehr Verbindungen mit hervorragenden pharmakologischen Aktivitäten. Diese zeigen vielfältige neue Strukturen und einzigartige Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationships*). Sie haben immer noch einen bedeutenden Anteil an der Erforschung und Entwicklung neuer Arzneimittel und Pflanzenschutzprodukten (Cragg *et al.*, 1997; Shu, 1998).

## 1.2. Insektizide aus der Familie Meliaceae

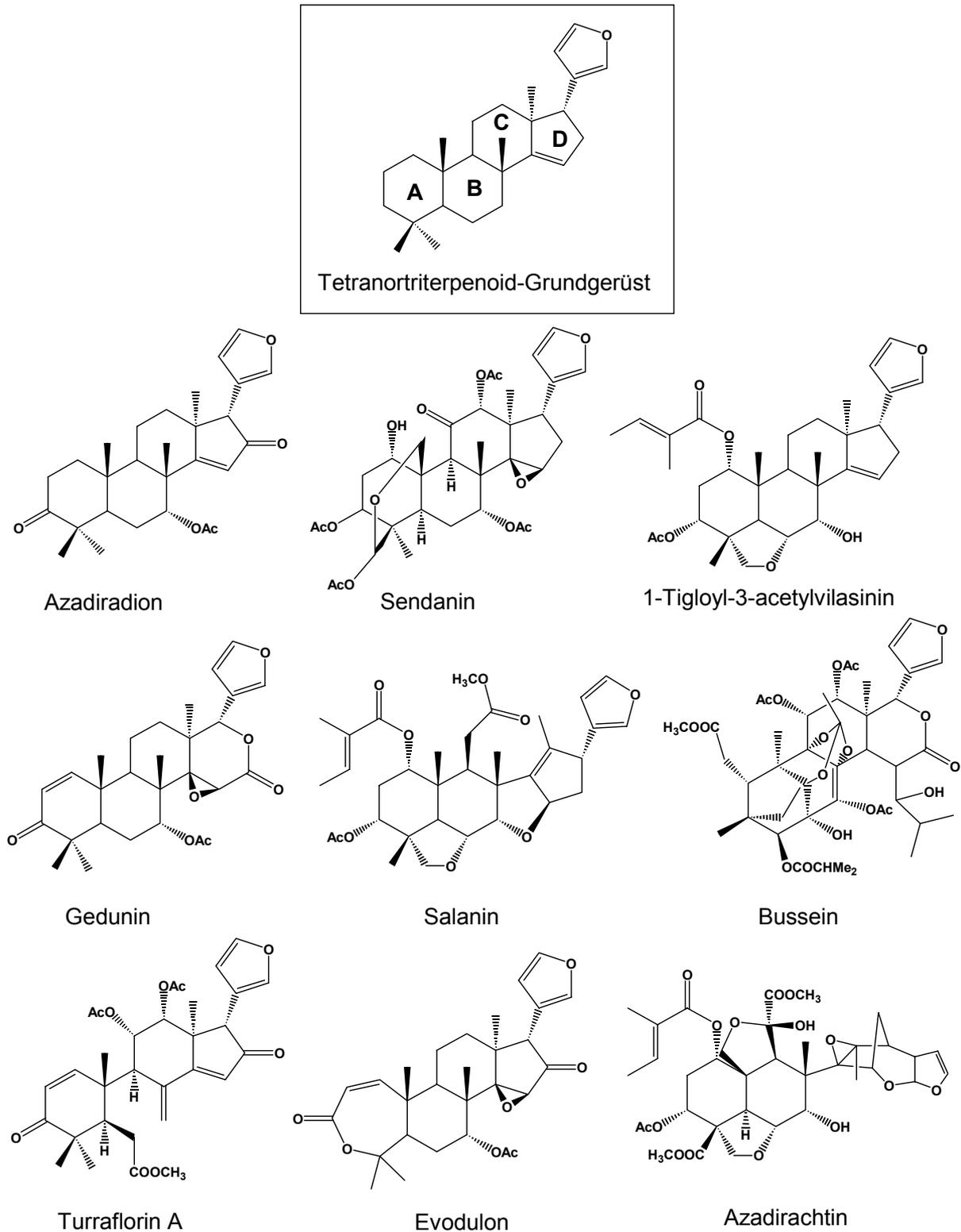
Die Familie Meliaceae (Mahagonigewächse) repräsentiert ein Spektrum von prächtigen Waldbäumen bis hin zu kleinen Büschen oder Sträuchern. Sie besteht aus ungefähr 50 Gattungen und enthält 500 bis 550 Arten. Ihr Verbreitungsgebiet ist sowohl in den tropischen als auch in den subtropischen Regionen der Erde (Pennington *et al.*, 1975). Einige Gattungen dieser Familie wie *Swietenia* (Mahagoni) und *Khaya* (Afrikanische Mahagoni) sind wichtige Nutzhölzer bei der Möbelherstellung oder im Hausbau, weil sie nicht nur gute physikalische Eigenschaften, sondern auch eine Resistenz gegen Insektenbefall besitzen (Isman *et al.*, 1997).

Schon seit langem ist die Familie Meliaceae (v.a. die Gattungen *Swietenia*, *Khaya*, *Cedrela*, *Entandophragma* sowie der Neembaum, *Azadirachta indica*) als Quelle für potente pflanzliche Insektizide bekannt. Extrakte aus dieser Gruppe sind biologisch aktiv gegen Insekten oder besitzen zumindest eine fraßhemmende Aktivität, d.h. sie wirken als sogenannte Repellents. Deswegen wurden viele Gattungen aus dieser Familie von vielen Forschungsgruppen intensiv untersucht (Isman *et al.*, 1997). Einige Extrakte der Pflanzen aus diesen Gattungen werden schon kommerziell vermarktet. Der verfeinerte Samenextrakt des Neembauums *Azadirachta indica*, der schon vor 1000 Jahren in Indien traditionell als Schädlingsbekämpfungsmittel eingesetzt wurde, ist auf dem US-Markt unter verschiedenen Handelsnamen vertreten (Saxena, 1988). In China wurden auch Extrakte der Rinde von *Melia toosendan* als botanische Insektizide entwickelt (Isman, 1995). Diese beiden Gattungen, *Azadirachta* und *Melia* sind auch diejenigen, aus denen bisher die am stärksten aktiven insektiziden Inhaltsstoffe isoliert wurden.

Das phytochemische Hauptmerkmal dieser Familie ist die Synthese und Akkumulation bitterer Terpenoide, der sogenannten Limonoide, auf die ihre Bioaktivität gegen Insekten zurückzuführen ist. Bei den Limonoiden handelt es sich um modifizierte Tetranortriterpenoide, die sich von einer Vorstufe mit einem 4,4,8-Trimethyl-17-furanylsteroid-Grundkörper ableiten (Connolly, 1983). Bisher wurden mehr als 300 Limonoide aus Pflanzen innerhalb der Ordnung Rutales isoliert, die meistens in der Familie der Meliaceae vorkommen (Champagne *et al.*, 1992).

Bei den Limonoiden gibt es viele mögliche Oxidationsstufen und Variationen des Kohlenstoffgrundgerüsts. Dies führt zu sehr verschiedenen Typen von Verbindungen (s. Abb. 1.1). Grundsätzlich können alle vier Ringe oxidativ zu entsprechenden *seco*-Verbindungen gespalten werden, wobei oft Epoxide als Zwischenstufen beobachtet werden. Allerdings sind nur die C-*seco* Typen biologisch sehr aktiv - ein Beispiel dafür ist der bekannte insektizide Naturstoff Azadirachtin aus *Azadirachta indica*. Trotz ihrer schwachen oder nicht vorhandenen fraßhemmenden Aktivität haben Azadirachtin und seine Analoga, die Azadirachtole und Meliacarpine, eine starke wachstumsregulierende Aktivität gegen Insekten, z. B. den mexikanischen Bohnenkäfer *Epilachna varivestis*, d. h. sie beeinträchtigen ihre Metamorphose (Kraus *et al.*, 1993). Sie stören sehr effektiv die Ausbildung der einzelnen Larvalstadien und sind sehr aktiv mit LC<sub>50</sub>-Werten von 0.3 bis 2.8 ppm (Rembold und Puhlmann, 1995). Sie kommen nur im Tribus Melieae vor und sind dort begrenzt auf die Gattungen *Azadirachta* und *Melia* (Isman *et al.*, 1996). Andere Limonoide zeigen in realistischen Konzentrationen nur fraßhemmende Aktivität (Kraus *et al.*, 1993).

In einem Bioscreening mit mehr als 100 Arten der Meliaceae wurde die Gattung *Aglaiia* mit prinzipiell andersartigen insektiziden Inhaltsstoffen entdeckt. In dieser Untersuchung zeigten etwa ein Drittel der 19 eingesetzten *Aglaiia*-Extrakte eine signifikante Aktivität gegenüber Raupen von *Peridroma saucia*. Vor allem Extrakte aus *Aglaiia odorata* waren sehr aktiv (Champagne *et al.*, 1989). Ihre Aktivität war vergleichbar mit den Extrakten aus *Azadirachta* und *Melia*. Interessanterweise stellen die aktiven Verbindungen aus *Aglaiia*-Arten keine Limonoide dar, sondern es handelt sich hierbei um insektizide Benzofuran-Derivate, deren Stammverbindung als Rocaglamid bezeichnet wird (King *et al.*, 1982; Janprasert *et al.*, 1993). Bis heute sind mehr als 15 *Aglaiia*-Arten weltweit intensiv pythochemisch untersucht worden (Proksch *et al.*, 2001).



**Abb. 1.1 : Verschiedene Gruppen von Limonoiden aus Meliaceae, entstanden durch Oxidation und Variation des Kohlenstoffgrundgerüsts eines (hypothetischen) Tetranortriterpenoids**

### 1.3. Gattung *Aglai*a; Biologie und Phytochemie



**Abb. 1.2 : Die traditionell verwendete und insektizid aktivste *Aglai*a-Art, *Aglai*a *odorata* (Foto von B.W. Nugroho, Indonesien)**

Bei den *Aglai*a-Arten handelt es sich um holzige, diözische Pflanzen, die als Sträucher von geringer Höhe oder als kleine Bäume vorkommen. Der Name der Gattung *Aglai*a wurde von Loureiro im Jahr 1790 von *Aglai*a *odorata* abgeleitet. Diese Spezies ist in Asien (China, Indien, Vietnam, Thailand und Indonesien) schon lange bekannt und wird dort wegen ihres ornamentalen Wertes kultiviert (Pannell, 1992). Das Verbreitungsgebiet der aus etwa 130 Arten bestehenden Gattung *Aglai*a umfaßt das gesamte Südostasien, Südchina, die Pazifikinseln und Nordaustralien (Ridley, 1992; Li, 1997; Pannell, 1992).

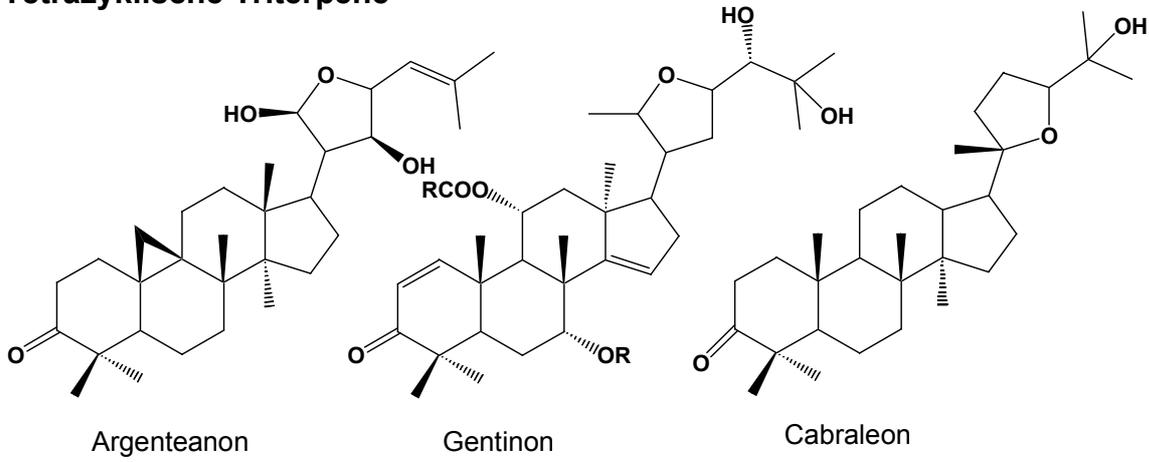
Im taxonomischen Kontext bildet *Aglai*a wegen der Samen-Verteilung durch Vögel nicht nur die größte Gattung in der Familie Meliaceae sondern zeigt auch eine breite Variation. Die daraus und aus dem weiten Verbreitungsgebiet resultierenden unterschiedlichen Erscheinungsbilder führten zur größeren taxonomischen Problemen als bei anderen Gattungen innerhalb der Familie. Es existieren verschiedene Arten-Bezeichnungen und es ist noch unklar, ob es sich um Synonyme für dieselbe Art oder um verschiedene Arten handelt (Pannell, 1992).

In den traditionellen Arzneibüchern Südostasiens spielen *Aglaia*-Arten eine Rolle bei der Behandlung von Husten, Entzündungen und traumatischen Beschwerden, sowie als Herzstimulanz, Fiebermittel und Expectorans (Phaetthanesuan, 1972; Hayashi *et al.*, 1982; Heyne, 1987). Die Blüten von *A. odorata* werden in China und in Vietnam auch als Duftbestandteil im Tee verwendet, während sie in Java als Parfüm für Kleidung eingesetzt werden (Corner, 1951; Mabberley *et al.*, 1995).

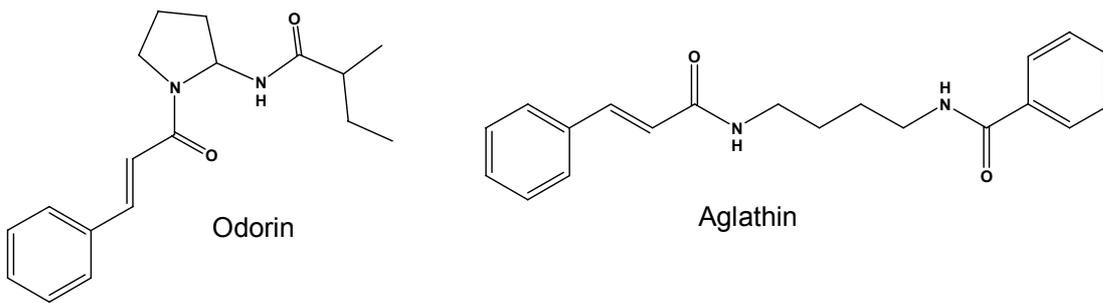
Verschiedene Untersuchungen von *Aglaia*-Extrakten zeigten ein breites Spektrum der biologischen Aktivitäten. Wie schon erwähnt, besitzen sie starke insektizide Aktivität gegen das weit verbreitete Schadinsekt *Peridroma saucia* (Champagne *et al.*, 1989; Satasook *et al.*, 1994). Außerdem wirkten sie auch antiprotozoisch gegen Chloroquin-sensitive oder -resistente Stämme von *Plasmodium falciparum* (Horgen *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungsberichte belegen eine fungizide Wirkung von *Aglaia*-Extrakten (Fuzzati *et al.*, 1996), eine Inhibition der Lipid-Peroxidation (Kumar und Müller, 1999) sowie eine zytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Tumorzell-Linien (Dhar *et al.*, 1973; Dhawan *et al.*, 1980; Murakami *et al.*, 1995; Horgen *et al.*, 2001). Der Extrakt von *A. roxburghiana* var. *beddomei* besitzt eine moderate hypoglykämische (Tripathi *et al.*, 1979), eine antivirale (Babbar *et al.*, 1983), Antitumor- (Singh *et al.*, 1981) und eine antiinflammatorische Wirkung (Janaki *et al.*, 1999).

Trotz intensiver phytochemischer Untersuchungen auf der Suche nach aktiven Verbindungen aus *Aglaia*-Arten konnten bislang keine Limonoide nachgewiesen werden. Statt dessen wurden zytotoxische tetrazyklische Triterpene gefunden, die zur Cycloartan- (Inada *et al.*, 1995; Omobuwajo *et al.*, 1996a), Dammaran- (Fuzzati *et al.*, 1996) und Tirucallan-Reihe (Omobuwajo *et al.*, 1996b; Benosman *et al.*, 1995) gehören. Daneben wurden einfache aus Zimtsäure abgeleitete Bisamide isoliert, die entweder Pyrrolidin oder Putrescin enthalten (Shiengthong *et al.*, 1979; Hayashi *et al.*, 1982; Saifah und Jongbunprasert, 1988; Saifah und Puripattanavong, 1993). Verschiedentlich wurde auch über das Vorkommen von Lignanen berichtet (Brader *et al.*, 1998; Nugroho *et al.*, 1999) (s. Abb. 1.3).

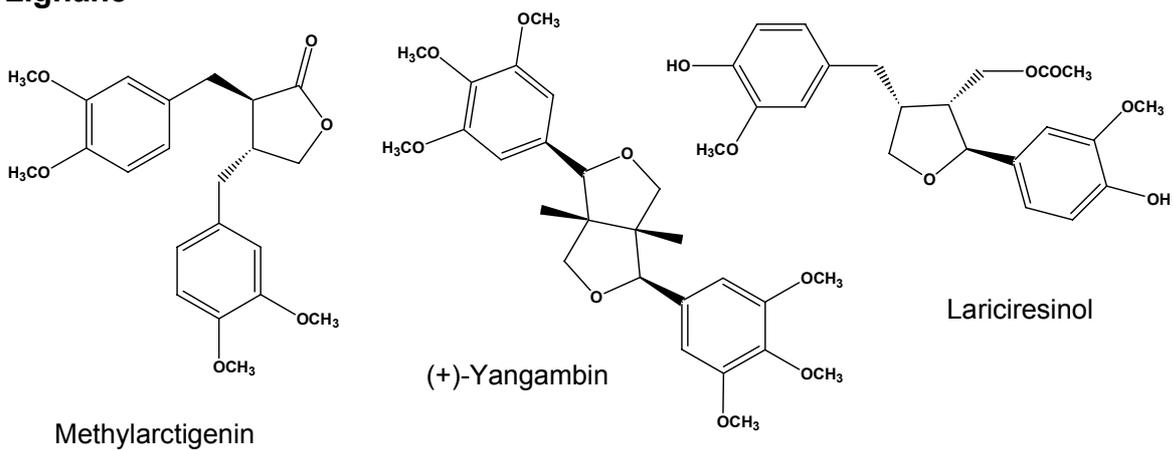
**Tetrazyklische Triterpene**



**Bisamide**



**Lignane**



**Abb. 1.3 : Bereits beschriebene Vertreter verschiedener Naturstoffklassen aus *Aglaia*-Arten.**

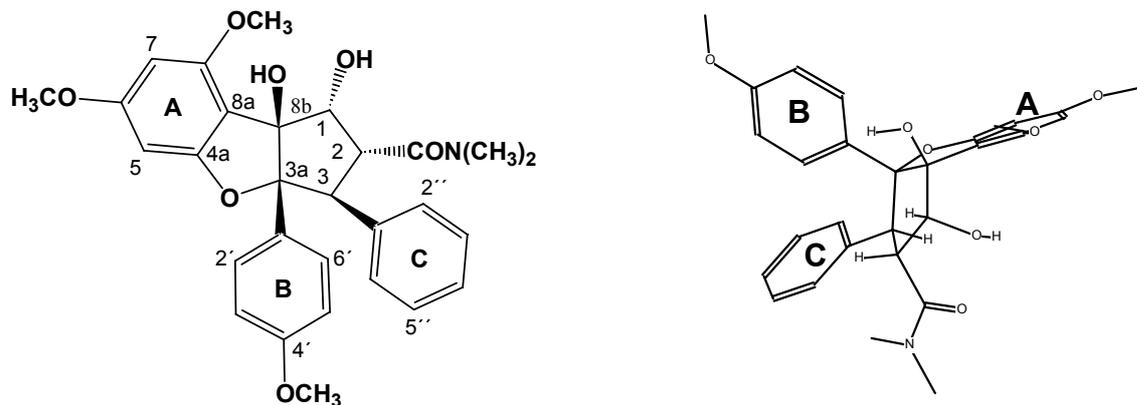
Die prinzipielle insektizide Verbindung aus *Aglaia*-Arten wurde in der späteren Zeit identifiziert (Janprasert *et al.*, 1993; Nugroho, *et al.*, 1997a; Nugroho, *et al.*, 1997b). Es handelt sich um Benzofuran-Derivate, die sogenannten Rocaglamide, deren Stammverbindung zum ersten Mal als antileukämischer Inhaltsstoff aus *A. elliptifolia* berichtet wurde (s. Abb. 1.4, King *et al.*, 1982).

## 1.4. Rocaglamide und verwandte Verbindungen

### 1.4.1. Chemie und Biosynthesewege

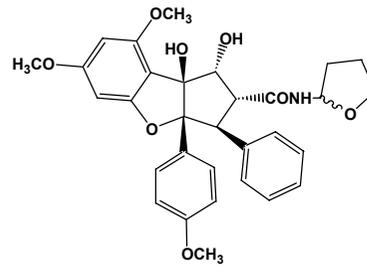
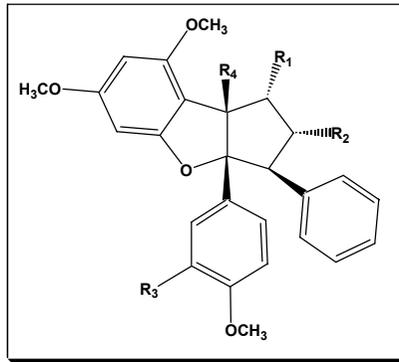
Trotz der verschiedenen ethnobotanischen Anwendungen sind chemische Untersuchungen von *Aglaia*-Arten zur Zeit mehr durch ihre insektizide und zytotoxische Wirkung motiviert. Wie schon erwähnt, ist dies besonders interessant, weil die insektizide oder fraßhemmende Wirkung von *Aglaia*-Arten nicht auf Limonoide wie bei anderen Gattungen der Meliaceae sondern auf Benzofuran-Derivate (Rocaglamid-Derivate) zurückzuführen ist.

Untersuchungen der Bioaktivität von einigen *Aglaia*-Arten durch verschiedene Forschungsgruppen zeigten, daß Extrakte von *Aglaia*-Arten eine ausgeprägte insektizide Wirkung haben (Chiu, 1985; Mikolajczak und Reed, 1987; Champagne *et al.*, 1989). Für diese Bioaktivität sind die aus dem Extrakt von *A. odorata* isolierten Rocaglamide verantwortlich, wie eine Untersuchung der toxischen Wirkung von Rocaglamiden gegenüber Raupen von *Peridroma saucia* belegte (Janprasert *et al.*, 1993; Ishibashi *et al.*, 1993; Ewete *et al.*, 1996). Mit LD<sub>50</sub>- bzw. LD<sub>90</sub>-Werten von 0.32 und 0.85 µg pro Insekt bei topischer Applikation bzw. 0.34 und 0.70 µg pro Insekt bei oraler Applikation war die insektizide Aktivität des Rocaglamids sogar vergleichbar mit dem bekannten pflanzlichen Insektizid Azadirachtin (Janprasert *et al.*, 1993). Durch von Biotests begleitete Fraktionierung des Extrakts von verschiedenen *Aglaia*-Arten wurden weitere Rocaglamid-Derivate isoliert. Deren insektizide Aktivität bestätigte ihre Rolle bei der wachstumshemmenden bzw. insektiziden Wirkung von Pflanzen-Extrakten aus dieser Gattung (Güssregen *et al.*, 1997; Nugroho *et al.*, 1997a; Nugroho *et al.*, 1997b).

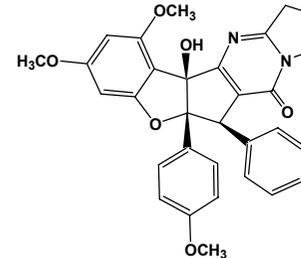


**Abb. 1.4 : Rocaglamid, Stammverbindung der Tetrahydrocyclopenta[*b*]benzofuran aus *Aglaia elliptifolia*. Planare Struktur (links) und dreidimensionale Struktur (rechts)**

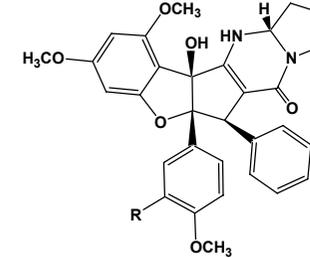
Rocaglamid als Stammverbindung der Cyclopentabenzofuran aus *Aglaia*-Arten wurde erstmals 1982 aus dem methanolischen Extrakt der Wurzel und der Stengel von *A. elliptifolia* als Inhaltsstoff mit antileukämischer Aktivität isoliert. Seine Struktur wurde mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt und zusammen mit der relativen Konfiguration durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt (King *et al.*, 1982). Durch enantioselective Synthese des nichtnatürlichen (–)-Enantiomer konnte später seine absolute Konfiguration festgelegt werden (Trost *et al.*, 1990). Diese ist gekennzeichnet durch einen Tetrahydrocyclopenta[*b*]benzofuran-Grundkörper mit zwei *cis*-ständigen Phenyl-Substituenten an C-3 und C-3a (Ring B bzw. Ring C) und besitzt eine  $1\alpha,2\alpha,3\beta$ -Konfiguration (s. Abb. 1.4). Bis zum Jahr 2000 wurden mehr als 40 Rocaglamid-Derivate isoliert. Ihre Strukturen variieren vor allem in den Substituenten am C-1 und C-2 mit verschiedenen Oxidationstufen. Andere Substitution-Muster beinhalten Methylendioxy-Substituenten am Ring A oder Ring B. Selten kommen Rocaglamid-Derivate mit einer Pyrrolidin-Bisamid-Seitenkette, die von Odorin abgeleitet ist, vor. In Abb. 1.5 sind die bisher beschriebenen Rocaglamid-Derivate aufgeführt.



25. *R*-isomer  
26. *S*-isomer

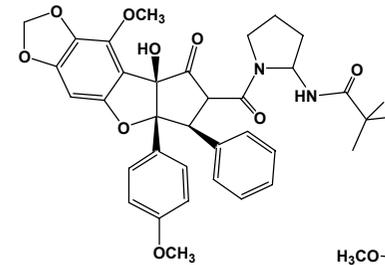


27

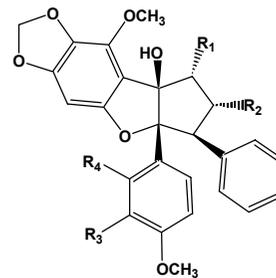


28

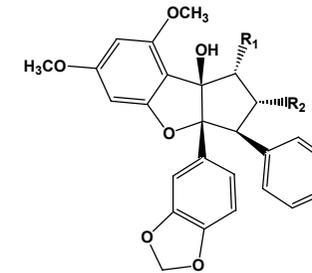
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1.	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	OH
2.	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH
3.	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
4.	OCOCH <sub>3</sub>	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	OH
5.	OCOCH <sub>3</sub>	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH
6.	OH	CONHCH <sub>3</sub>	H	OH
7.	OH	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OH
8.	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	H	OH
9.	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OH
10.	OH	CONH <sub>2</sub>	H	OH
11.	OH	CONH <sub>2</sub>	OH	OH
12.	OH	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OH	H	OH
13.	OCOCH <sub>3</sub>	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OH	H	OH
14.	OH	COOCH <sub>3</sub>	H	OH
15.	OH	COOCH <sub>3</sub>	OH	OH
16.	OH	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
17.	OCOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	OH	OH
18.	OCHO	COOCH <sub>3</sub>	H	OH
19.	OCHO	COOCH <sub>3</sub>	OH	OH
20.	NOH	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
21.	OH	H	H	OH
22.	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH
23.	OH	H	O-Rham	OH
24.	OH	H	H	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>



29



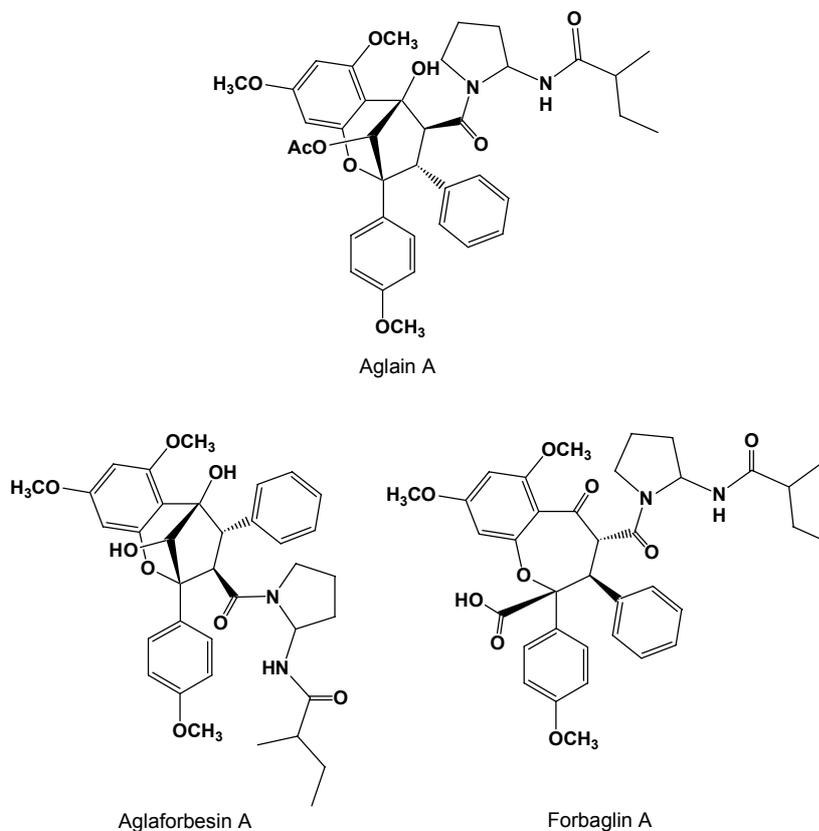
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
30.	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
31.	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
32.	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
33.	OH	CONHCH <sub>3</sub>	H	H
34.	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	O	H
35.	OH	CONHCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
36.	OH	COOCH <sub>3</sub>
37.	OH	H
38.	OCHO	COOCH <sub>3</sub>
39.	OCOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>
40.	=O	H

Abb. 1.5 : Rocaglamid (1) und Derivate aus der Gattung *Aglaia*

Neben Rocaglamid-Derivaten sind auch verwandte Verbindungsklassen aus *Aglaia*-Arten bekannt, nämlich Aglaine, Aglaforbesine und Forbagline, die erstmals aus *A. argentea* und *A. forbesii* isoliert wurden (Dumontet *et al.*, 1996). Im Unterschied zu den Rocaglamiden besitzen sie kein Benzofurangerüst, sondern sie sind gekennzeichnet durch einen Benzopyran- (Aglaine und Aglaforbesine) bzw. Benzoxepin-Grundkörper (Forbagline), der jeweils mit einem aus Odorin abgeleiteten 2-Aminopyrrolidin-Rest verbunden ist (s. Abb. 1.6).



**Abb. 1.6 : Verwandte Strukturen zu den Rocaglamiden aus der Gattung *Aglaia***

Das gleichzeitige Vorkommen der Cyclopenta[*b*]benzofurane (Rocaglamide) und der mit ihnen verwandten Cyclopenta[*b*]benzopyrane (Aglaine und Aglaforbesine) sowie Benzo[*b*]oxepine (Forbagline) mit ähnlichen oder sogar gleichen Substituentenmustern in der Gattung *Aglaia* spricht für einen gemeinsamen biogenetischen Ursprung (Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1999; Bacher *et al.*, 1999).

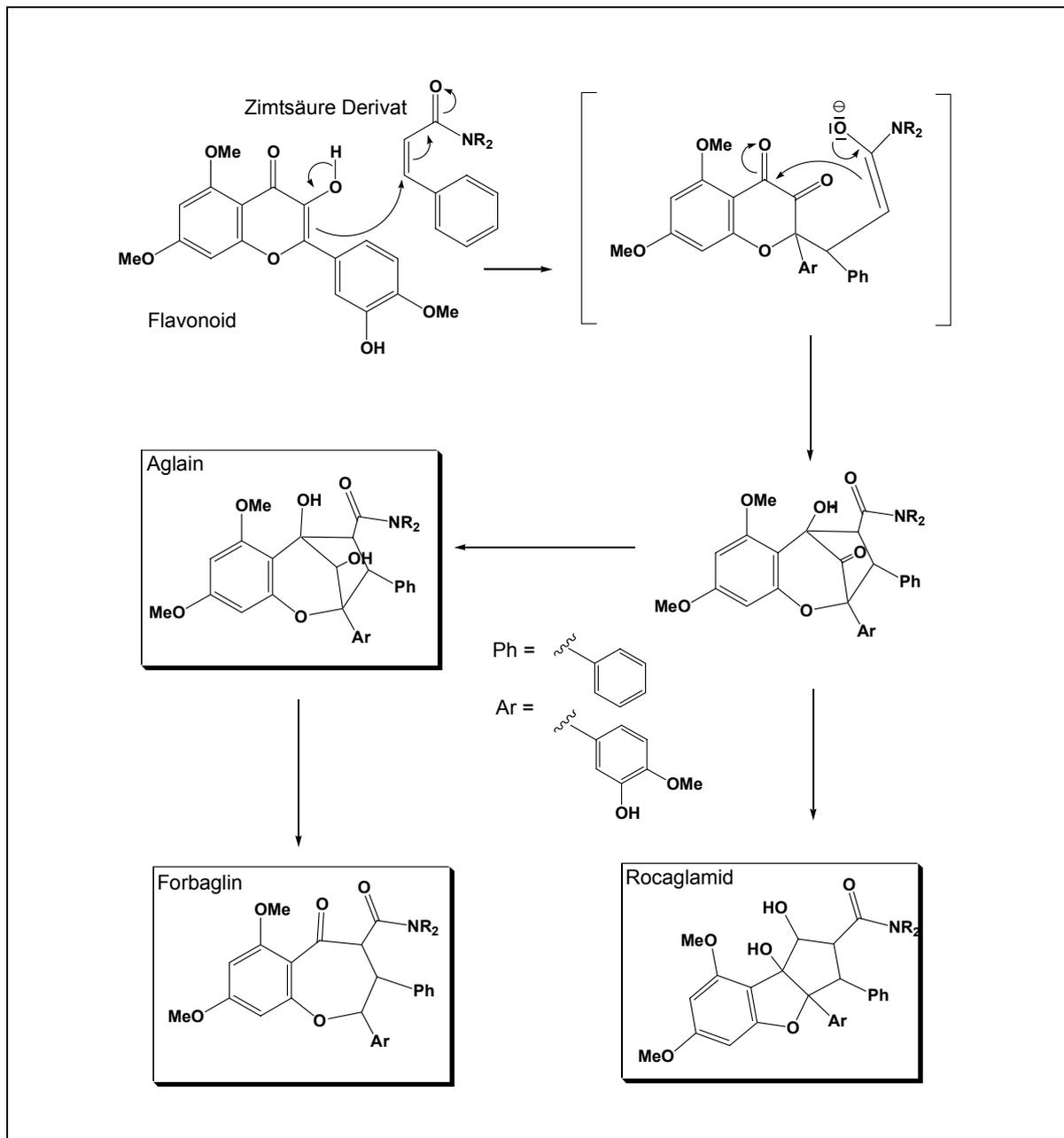


Abb. 1.7 : Hypothetische gemeinsame biosynthetische Herkunft der Rocaglamide und verwandter Verbindungen (modifiziert nach Nugroho *et al.*, 1999).

Es wird vermutet, daß der Cyclopenta[bc]benzopyran-Grundkörper der Aglaine und Aglaforbesine durch Cycloaddition eines Flavonoids und eines Bisamids, z. B. Odorin, gebildet wird (s. Abb. 1.7). Des weiteren führt die Ringöffnung zwischen C-5 und C-10 mit anschließender Oxidation zur Bildung des Benzo[b]oxepine-Grundkörpers der Forbagline, während die Transformation zum entsprechenden Rocaglamid durch Öffnung der Bindung C-5, C-5a und Verknüpfung von C-10, C-5a stattfinden könnte (Nugroho *et al.*, 1999).

### 1.4.2. Biologische Aktivität der Rocaglamide

#### Antiproliferative Wirkung

In einem Screening auf biologische Aktivität mehrerer Pflanzenextrakte zeigte der Rohextrakt der Blüten von *A. odoratissima* zytotoxische Eigenschaften an mit P388 infizierten CDF<sub>1</sub>-Mäusen (Dhar *et al.*, 1973). Dies wurde sieben Jahre später durch die zytotoxische Eigenschaften des Rohextraktes von *A. elaeagnoidea* (Juss.) Benth. var. *beddomei* Gamble (= *A. roxburghiana* Miq. ssp. *beddomei* Gamble) gegenüber der P388-Zell-Linie bestätigt (Dhawan *et al.*, 1980). Weitere Untersuchungen von Rohextrakten von *A. odorata* zeigten Wachstumshemmung der P338 Zell-Linie (Hayashi *et al.*, 1982) und eine Antitumor-Aktivität im Raji-Zell-Linien-System (Murakami *et al.*, 1995). Außerdem zeigte der Chloroform-Extrakt von *A. formosana* eine signifikante zytotoxische Aktivität gegen verschiedene Zellkulturen (Duh *et al.*, 1993).

Allerdings führte die durch Biotest begleitete Fraktionierung des oben genannten Rohextraktes von *A. odorata* nicht zur Isolierung von Rocaglamiden, sondern eines Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamids, (-)-Odorinol, als aktiver Verbindung (Hayashi *et al.*, 1982). Zehn Jahre danach wurde nach demselben Prinzip aus *A. formosana* ein anderes Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamid-Derivat, Dehydroodorin, als aktive Verbindung isoliert (Duh *et al.*, 1993). Bei der weiteren Suche nach aktiven Bisamid-Derivaten aus *Aglaia*-Arten in einem Bioscreening mit elf Zell-Linien fiel die signifikante zytotoxische Aktivität (ED<sub>50</sub>-Werte > 20 µg/ml) von vier ausgewerteten Verbindungen auf. Gegenüber der KB-V1-Zellkultur (Vinblastin-resistente KB-Zellen) besaß das gete

stete Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamid Piriferin eine relativ schwache zytotoxische Wirkung mit einem ED<sub>50</sub>-Wert von 10 µg/ml (zum Vergleich Vinblastin: ED<sub>50</sub> = 2.6 µg/ml), während Odorin und 5'-*epi*-Odorin eine Überwindung der Resistenz mit einem ED<sub>50</sub>-Werte von 6.4 bzw. 4.2 µg/ml verursachten (Saifah und Puripattanavong, 1993).

Nach einem Bericht über die antileukämischen und zytotoxischen Aktivitäten des methanolischen Extraktes der Wurzel und der Stengel von *A. elliptifolia* auf die P388 bzw. die KB-Zell-Linie (epidermale Zellen des Nasopharynx) wurde dann letztendlich die prinzipiell antileukämische Verbindung als Reinsubstanz aus diesem Roheextrakt isoliert. Dies war der erste Bericht über Rocaglamid, dessen antileukämische Aktivität gegenüber der P388-Zell-Linie auch *in vivo* nachgewiesen wurde (King *et al.*, 1982).

Diese Ergebnisse führten zur weiteren Isolierung und Untersuchung der zytotoxischen Aktivität anderer Rocaglamid-Derivate aus *Aglaia*-Arten. Zwölf Jahre später wurden aus *A. argentea* verschiedene Stickstoff enthaltende Verbindungen isoliert. Darunter waren Rocaglamid-, Aglain-, Aglaforbesin- und Forbaglin-Derivate bzw. deren Vorstufe, das Odorin. Interessant war, daß nur für Rocaglamid-Derivate eine starke zytotoxische Wirkung gegenüber KB-Zellen nachgewiesen werden konnte, während die anderen Verbindungen keine Aktivität besaßen (Dumontet *et al.*, 1996).

Weitere Untersuchungen zeigten für einige Rocaglamide-Derivate die Fähigkeit zur Hemmung sowohl der Protein-Synthese als auch des Wachstums von K-*ras*-NRK Zell-Linien (Ohse *et al.*, 1996). Wu führte ein Jahr danach Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung des Rocaglamids und des Methylrocaglats (Aglafolin) auf eine Reihe von Krebs-Zell-Linien durch (Wu *et al.*, 1997). Die getesteten Substanzen zeigten eine breite und potente zytotoxische Wirkung gegenüber allen Zell-Linien (KB: epidermale Zellen des Nasopharynx, A-549: menschliches Lungen-Karzinom, HCT-8: menschliches Dünndarm-Karzinom, P-388: murine Leukämie, RPMI-7951: menschliches Melanom und TE-671: menschliches Medulloblastom) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert in ng/ml-Bereich (<0.001 bis 0.006 µg/ml) und damit eine stärkere Aktivität als die verwendeten Kontrollsubstanzen (Etoposid, Vinblastinsulfat und Doxorubicin-HCl). Dabei zeigte Methylrocaglat eine 2- bis 6-fach stärkere Aktivität als Rocaglamid. Im gleichem Jahr berichtete Cui über vier neue Rocaglamid-Derivate aus

*A. elliptica* und über ihre zytotoxische Wirkung auf zwölf Zell-Linien. Die Ergebnisse bestätigten die starke zytotoxische Wirkung der Rocaglamid-Derivate im Bereich von 1-30 ng/ml und zeigten auch die Auswirkung von Änderungen der Substituenten an C-1 und C-2 auf die biologische Aktivität. Beispielsweise führt der Verlust der Carbonsäuremethylester-Gruppe an C-2 oder der Hydroxylgruppe an C-1 zu einer dramatischen Reduzierung der antiproliferativen Eigenschaften (Cui *et al.*, 1997).

Aufgrund ihrer potenten zytotoxischen Wirkung wurden weitere Untersuchungen über den Wirkmechanismus von Rocaglamiden mit 4'-Demethoxy-3',4'-Methylenedioxy-Methylrocaglat in Lul-Zellen (menschlicher Lungen-Krebs) als Test-Modell durchgeführt (Lee *et al.*, 1997). Die getestete Substanz zeigte keine zytotoxische Wirkung (weder induzierte Nekrose noch Apoptose), sondern eine zytostatische Wirkung, d. h. die Viabilität der Zellen blieb konstant, und die Hemmwirkung war reversibel. Außerdem induzierte die Substanz vorübergehend (nach 24 oder 32 Stunden) die Akkumulation der Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus. Im Anschluß daran kehrten die Zellen zum normalen Zellzyklus zurück. Durch Einbau von [<sup>3</sup>H]Leucin wurde zudem bewiesen, daß der Wirkmechanismus dieser zytostatischen Wirkung in der Hemmung der Proteinbiosynthese besteht (Lee *et al.*, 1998).

Bei *in vivo*-Untersuchungen von Mäusen mit subkutan implantierten BCI-Zellen Mäusen (menschliches Mamma-Karzinom) wurde das Wachstum des Tumors während der ersten 23 Testtage gehemmt, ohne daß toxische Wirkungen beim Versuchstier zu beobachten waren. Anschließend zeigte der Tumor jedoch wieder ein mit den Kontrollen vergleichbares Wachstum. Damit wurde bestätigt, daß Rocaglamide keine zytotoxische Wirkung haben, sondern statt dessen als antiproliferatives Agentien wirken (Lee *et al.*, 1998)

## Insektizide Wirkung

In einem ausgedehnten Bericht über das Bioscreening auf insektizide Wirkung mit Pflanzen-Extrakten von verschiedenen Vertretern der Familie Meliaceae zeigte der methanolische Extrakt von *A. odorata* eine signifikante insektizide Wirkung gegenüber *Peridroma saucia* („variegated cutworms“) (Champagne *et al.*, 1989). Die Isolierung des verantwortlichen Inhaltsstoffes zeigte, daß dieser identisch ist mit Rocaglamid, das auch das antileukämische Prinzip darstellt (Janprasert *et al.*, 1993). Die Substanz wurde aus dem Aceton-Extrakt der Zweige von *A. odorata* isoliert und war aktiv gegen Raupen von *Peridroma saucia* und *Spodoptera litura* („asian armyworm“). Bei topischer sowie oraler Applikation erwies sich Rocaglamid als potentes Insektizid mit einer Dosis-abhängigen Aktivität ( $LD_{50}$  : 0.32  $\mu\text{g}$ /Raupe bzw. 0.34  $\mu\text{g}$ /Raupe). Andere isolierte Verbindungen wie Dammaran-Triterpene und Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamide besaßen dagegen keine insektizide Wirkung (Janprasert *et al.*, 1993). Im gleichen Jahr wurden aus der gleichen Pflanze drei weitere Rocaglamid-Derivate isoliert, nämlich Desmethylocaglamid, Methylocaglat und Rocaglaol, die allesamt eine signifikante insektizide Aktivität zeigten (Ishibashi *et al.*, 1993).

Weitere Versuche zur Isolierung von Rocaglamid-Derivaten aus anderen *Aglaia*-Arten sind mit Hilfe von durch Biotests begleiteten Fraktionierungen im Fraßversuch mit Neonates von *Spodoptera littoralis* als Versuchstieren durchgeführt worden. Alleine im Jahr 1997 wurde über die insektizide Aktivität von siebzehn verschiedenen Rocaglamid-Derivaten mit verschiedenen Substitutions-Mustern an C-1, C-2 bzw. C-3' berichtet. Sie wurden aus *A. duperreana*, *A. odorata*, *A. elliptica* und *A. harmsiana* isoliert (Nugroho *et al.*, 1997a; Güssregen *et al.*, 1997; Nugroho *et al.*, 1997b). Alle Verbindungen verursachten in Fraßversuchen das vollständige Absterben der Versuchstiere. Die meisten der getesteten Rocaglamide waren sehr aktiv mit  $LC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werten zwischen 0.9 – 2.1 ppm bzw. 0.08 – 0.40 ppm. Diese Werte zeigten, daß Rocaglamide dem Azadirachtin, das im verwendeten Biotestsystem als positive Kontrolle eingesetzt wurde ( $LC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werte: 0.9 ppm bzw. 0.04 ppm), vergleichbar sind.

Die Rocaglamid-Derivate, die relative geringe Aktivität besaßen ( $LC_{50}$  : 6.7 - 53.4 ppm), lieferten Informationen über die Wirkung der Substituenten an C-1, C-2 und C-3'. Beispielsweise führt eine Acetylierung am C-1 (statt einer Hydroxygruppe) zur Reduzierung der Aktivität um ungefähr das 4fache (Nugroho *et al.*, 1997a). Dagegen hat eine Substituenten-Änderung an C-2 nur geringen Einfluß auf die Aktivität (Nugroho *et al.*, 1997b).

Die weitere Suche nach Rocaglamid-Derivaten durch von Insektizid-Biotests begleitete Fraktionierung bestätigte, daß Rocaglamide die prinzipiell insektiziden Verbindungen in der Gattung *Aglaia* sind und lieferte gleichzeitig viele Informationen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Brader *et al.*, 1998; Nugroho *et al.*, 1999; Bacher *et al.*, 1999; Molleyres *et al.*, 1999; Hiort *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2000).

#### Andere biologische Aktivitäten

Einige Arbeitsgruppen haben auch über andere biologische Aktivitäten der Rocaglamid-Derivate berichtet. Im Jahr 1992 wurde Methylrocaglat als ein selektiver und effektiver Hemmer des PAF (*platelet activating factor*), d.h. der induzierten Plättchen-Aggregation *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Ko *et al.*, 1992). Diese Ergebnisse führten zur Untersuchung der Hemm-Aktivität des Rocaglamids und des Methylrocaglats auf die Plättchen-Aggregation. Es wurde bewiesen, daß die durch PAF und Arachidonsäure induzierte Plättchen-Aggregation durch Methylrocaglat bei 2 ng/ml bzw. 100  $\mu$ M vollständig gehemmt wurde (Wu *et al.*, 1997).

Ein Bericht über die antifungale Aktivität von Methylrocaglat stammt aus dem Jahr 1996. Die Testung erfolgte durch Bioautographie auf DC-Platten mit *Cladosporium cucumerinum* und *Candida albicans* als getesteten Pilzen. Von allen isolierten Verbindungen aus *A. elaeagnoidea*, darunter Lignanen, Limonoiden und Dammaran-Triterpenen, zeigte nur Methylrocaglat eine Aktivität gegen *C. cucumerinum* bei 2.5  $\mu$ g pro Platte (Fuzzati *et al.*, 1996). Im Jahr 2000 berichtete Engelmeier über die Wirkung von Rocaglamid-Derivaten gegenüber den pflanzlichen Pathogenen *Pyricularia grisea*, *Fusarium avenaceum* und *Alternaria citri* (Engelmeier *et al.*, 2000).

### 1.4.3. Struktur-Wirkungs-Beziehung der Rocaglamid-Derivate

Auf der Basis der Substituenten-Variabilität der Rocaglamide, vor allem an den Positionen C-1, C-2 und C-3', wurden Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen an einer Reihe von Rocaglamid-Derivaten bezogen auf ihre antiproliferative Wirkung gegen menschliche Krebszell-Linien durchgeführt (Bohnenstengel *et al.*, 1999a; Bohnenstengel *et al.*, 1999b).

Mit dem verwendeten Testsystem (humane monozytäre Leukämie-Zell-Linie MONO-MAC-6 bzw. humane Melanom-Zell-Linie MEL-JUSO) wurde die Hemmung der Zellproliferation mit Hilfe des MTT-Tests nachgewiesen. Die Hemmung der Zellproliferation erfolgte dosis- und substanzabhängig. Die aktivsten Rocaglamid-Derivate im Testsystem MONO-MAC-6 waren Didesmethylocaglamid und Methylocaglat mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.006 µg/ml (0.013 µM) bzw. einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.008 µg/ml (0.016 µM). Diese Aktivität war vergleichbar mit der des bekannten Antitumormittels Vinblastin-Sulfat (0.0085 µg/ml oder 0.009 µM). Die Studie zeigte auch, daß die Amidgruppe an C-2 des Rocaglamids mit einer Methylestergruppe ausgetauscht werden kann, ohne daß es zu einer signifikanten Änderung der Aktivität kommt.

Allerdings führt eine Substitution an C-2 mit einem größeren Aminoacyl-Substituenten zu einer erkennbar schwächeren Wirkung. Eine noch stärkere Senkung der Aktivität trat bei einem unsubstituierten C-2-Derivat ein. Dies zeigte die Bedeutung des polaren Substituenten an C-2 (s. Abb. 1.8). Ebenfalls eine Senkung der antiproliferativen Wirkung bewirkte die Anwesenheit eines Substituenten an C-3' (z. B. Hydroxy- oder Methoxygruppe), sowie eine Acetylierung statt einer Hydroxylierung an C-1. Außerdem wurde ein Methylenedioxy-Substituent an C-6 und C-7 (Ring A) bzw. C-3' und C-4' (Ring B) getestet. Die antiproliferative Wirkung im MONO-MAC-6-Test-System solcher Rocaglamid-Derivate war erkennbar schwächer im Vergleich mit Rocaglamid-Derivaten, die keinen Methylenedioxy-Substituenten aufwiesen.

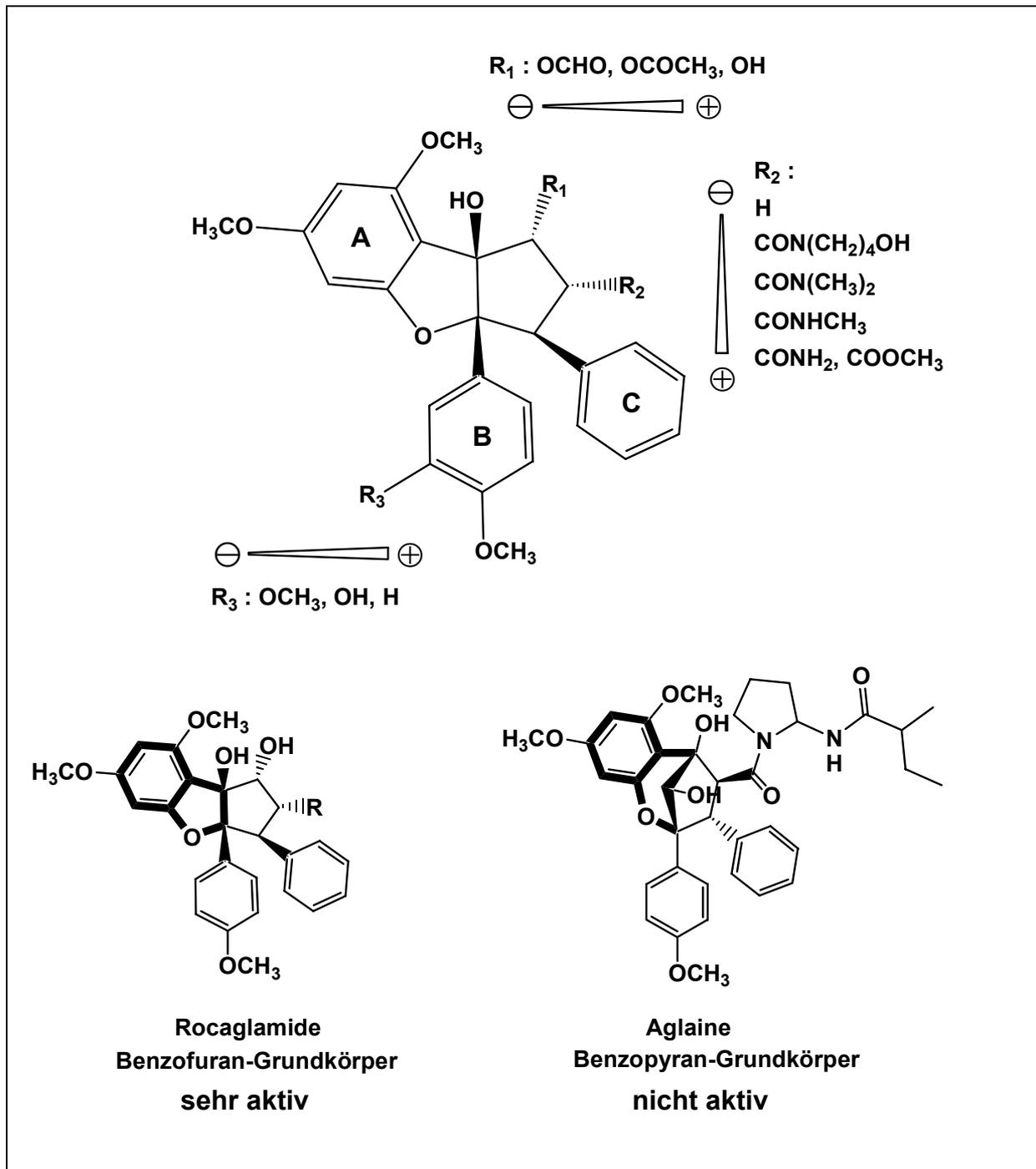


Abb. 1.8 : Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Rocaglamid-Derivate

Besonders hervorzuheben war jedoch die Tatsache, daß sich die strukturell verwandte Verbindung Aglain als völlig inaktiv erwies, wie auch im Insekten-Biotest gezeigt wurde (Bacher *et al.*, 1999; Nugroho *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte man davon ausgehen, daß der Benzofuran-Grundkörper eindeutig für die Bioaktivität der Rocaglamid-Derivate eine wichtige, wenn nicht die entscheidende Rolle spielt.

### **1.5. *Spodoptera littoralis* als Modellinsekt zur Untersuchung insektizider Sekundärstoffe**

*Spodoptera littoralis* Boisd. (Noctuidae; Lepidoptera), ein Nachtfalter, ist ein destruktiver Schädling in der subtropischen und tropischen Landwirtschaft, vor allem im Mittelmeerraum und in Afrika. Als Nahrungsgeneralisten, d. h. polyphage Insekten fressen die Raupen eine großen Auswahl an verschiedenen Wild- und Kulturpflanzen. Schätzungsweise über 122 Pflanzenarten aus 44 Familien werden von diesem Insekt als Nahrung akzeptiert (Moussa *et al.*, 1960). Unter den kultivierten Pflanzen sind z. B. Solanaceen, wie Tomate, Kartoffel, Tabak, daneben auch Pfeffer, Mais, Luzerne, Erdnuss, Baumwolle und Kakao. Von besonderer Bedeutung ist, daß die Raupen extrem widerstandsfähig gegenüber Pestiziden sind.

*Spodoptera littoralis* hat eine kurze Generationsfolge; der Lebenszyklus vom Ei bis zum Imago beträgt ca. 4 Wochen. Jedes Falterweibchen kann bis zu mehreren tausend Eier produzieren. Sie werden an der Blattunterseite der Wirtspflanze in Form von Eipaketen abgelegt. Nach 3 - 5 Tagen schlüpfen die jungen Raupen (Neonates). Im ersten Stadium sind die Raupen gesellig, aber später im zweiten oder dritten Stadium werden sie solitär. Sie sind wie die meisten Noctuiden (Nachtfalter) nachtaktiv. Während des Tages verbergen sie sich am Boden. Die jungen Raupen fressen das Blatt und verursachen meistens „Fensterfraß“ in den Blättern, während ältere Raupen die gesamten Blätter fressen können. Die Raupen beginnen sich nach ungefähr 2 Wochen (insgesamt sechs Larvalstadien) im Erdboden zur verpuppen. Bis zum Schlüpfen der Falter dauert die Puppenphase etwa eine Woche (Rivani, 1961; Gawaad und El-Gayar, 1974).

Die Eigenschaften der Raupen als Nahrungsgeneralisten erklärt ihre Fähigkeit, die verschiedenen Inhaltsstoffe ihrer jeweiligen Futterpflanzen zu tolerieren. Aufgrund dieser Robustheit sind sie ideal als Modell für insektizide Biotests. Ein weiterer Vorteil ist, daß man den Nachfalter *Spodoptera littoralis* unter Laborbedingungen mit künstlicher Nahrung kultivieren kann (Srivastava und Proksch, 1991).



**Abb. 1.9 : Modell-Insekt zur Untersuchung der insektiziden Aktivität: *Spodoptera littoralis*. Falter (links), Eier und frischgeschlüpfte Raupen (oben rechts), adulte Raupen (unten rechts) (Foto von Claudia Schneider).**

## 1.6. Pflanzenzellkulturen als Modellsysteme zur Untersuchung der Sekundärstoffbiosynthese

Voraussetzung für die Gewinnung von Naturstoffe aus kultivierten Pflanzenzellen war die Herstellung von Pflanzenzellkulturen im großen Maßstab, die Ende der fünfziger Jahre erstmals gelang (Tulecke und Nickell, 1959). Für die Kultivierung werden dabei sogenannte Kallus- und Suspensionskulturen eingesetzt, die zur gezielten Produktion von Sekundärstoffen unter exakt definierte Bedingungen gezüchtet werden müssen (Alfermann, 1983). Durch Selektion von besonders produktiven Zellpopulationen oder Einzelzellen (Zelllinien) kann dann eine hohe Sekundärstoffproduktion erhalten werden (Zenk, 1978). Auch eine Optimierung des Kulturmediums kann zu verstärkter Stoffproduktion führen. Hat man auf diese Weise hochproduktive Zellkulturen erhalten, so können diese zur Synthese von Sekundärstoffen in großem Maßstab eingesetzt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Produktion von Shikonin aus Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon*. Bei optimaler Zweiphasenkultur (Wachstums- und Produktionsmedium) kann jedoch ein Shikonin-Gehalt von bis zu 21 % in den Kultur erreicht werden (Takashi und Fujita, 1991).

Aus unterschiedliche Gründen werden diese Pflanzkulturen jedoch weit weniger zur Synthese von Sekundärstoffe genutzt als theoretisch möglich wäre. Ein wesentliche Aspekt ist dabei die stark schwankende Biosynthesekapazität von Zellkulturen. Während einige Kulturen bestimmte Sekundärstoffe in großen Mengen synthetisieren und akkumulieren, produzieren andere Kulturen ihre wertvollen Naturstoffe nur in geringem Maße oder gar nicht. Häufig kommt es auch vor, daß in den Zellkulturen Sekundärstoffe produziert werden, die in den Gasmpflanzen zuvor nicht nachweisbar waren (Berlin, 1986).

Heute haben Pflanzenzellkulturen vor allem in der Forschung eine große Bedeutung. Kulturen, deren Sekundärstoffproduktion weitaus höher als die der entsprechenden intakten Pflanzen liegt, stellen erfolgreiche Modellsysteme zur Untersuchung der Sekundärstoffbiosynthese dar. Auf diese Weise können verschiedene Aspekte des Sekundärstoffwechsels studiert werden (Zenk, 1991).

## 1.7. Problemstellung

Die insektiziden und antiproliferativen Inhaltsstoffe aus *Aglaia*-Arten, die sogenannten Rocaglamide, werden in der Literatur als sehr aktive Inhaltsstoffe beschrieben. Es handelt sich hierbei nicht um die üblicherweise in der Familie Meliaceae vorkommenden Limonoide, sondern um Benzofuran-Derivate (Janprasert *et al.*, 1993; Nugroho *et al.*, 1999; Bohnenstengel *et al.*, 1999b). Außerdem wurden auch biosynthetisch verwandte Verbindungen des Rocaglamids beschrieben, die keine insektizide Aktivität besitzen (Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1999; Brader *et al.*, 1999). Sie repräsentieren zusammen eine interessante Verbindungs-Klasse, die bislang nur innerhalb der Gattung *Aglaia* bekannt ist. Trotz ihrer interessanten Inhaltsstoffe wurden von mehr als 105 *Aglaia*-Arten bisher noch relativ wenige Arten phytochemisch untersucht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich aus diesem Grunde vor allem mit der Suche nach neuen insektiziden Rocaglamid-Derivaten und verwandten Strukturen, wie Aglainen, Aglaforbesinen und Forbaglinen, aus der Gattung *Aglaia*. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt :

1. **Bioscreening** der Rohextrakte verschiedener *Aglaia*-Arten bzw. Extrakten aus unterschiedlichen Pflanzenorganen durch einen Biotest (Untersuchung auf insektizide Wirkung)
2. **Isolierung** der insektiziden Inhaltsstoffe und verwandter Verbindungen durch eine von Biotests begleitete Isolierung mit Hilfe chromatographischer Methoden (VLC, SC und HPLC)
3. **Identifizierung** der bereits bekannten isolierten Verbindungen anhand der publizierten Daten
4. **Strukturaufklärung** der neuen isolierten Verbindungen mit Hilfe physikalisch-chemischer Analyse, vor allem der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie

Im taxonomischen Kontext bildet *Aglaia* nicht nur die größte Gattung innerhalb der Familie Meliaceae, sondern zeigt auch eine breite Variation morphologischer Merkmale innerhalb einer Art (Pannell, 1992). Dies führt zu größeren taxonomischen Pro

blemen als bei anderen Gattungen der Familie Meliaceae. Es existieren verschiedene Artbezeichnungen, und es ist noch unklar, ob es sich um Synonyme für ein- und dieselbe Art handelt, oder um verschiedene Arten. Diese phytochemischen Untersuchungen könnten einen Beitrag zur Identifizierung spezifischer phytochemischer Merkmale von *Aglaia*-Arten leisten. So ließen sich unter Umständen chemotaxonomische Fragen bezüglich der Position von Arten innerhalb der Gattung lösen.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit ist die Klärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Rocaglamid-Derivate. Sicher ist, daß der Benzofuran-Grundkörper sehr wichtig für die Bioaktivität der Rocaglamide ist (Nugroho *et al.*, 1999; Bohnenstengel *et al.*, 1999a). Ferner beeinflussen verschiedene Substituenten am C-1, C-2 und C-3' die Wirkung der Rocaglamid-Derivate im entsprechenden Biotestsystem.

Zur Ergänzung der bereits vorliegenden Ergebnisse zur Ermittlung der Aktivitätswerte von Rocaglamid-Derivaten sollte die Prüfung der insektiziden Wirkung gegen Raupen von *Spodoptera littoralis* zur Klärung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der neuen Rocaglamid-Derivate durchgeführt werden. Dafür stand für die Untersuchung der insektiziden Aktivität in der Arbeitsgruppe ein bereits etabliertes Testsystem zur Verfügung. Die insektizide Aktivität jeder isolierten Verbindungen wird als LC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte berechnet. Diese Ergebnisse könnten einen Beitrag zur Ermittlung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Rocaglamid-Derivate leisten. Letztere könnten schließlich als Modell für die Entwicklung neuer Pestizide bzw. von Verbindungen für Medizin angewendet werden.

Aus biogenetischer Sicht stellen die Rocaglamide (und die nah verwandten Aglaine, Aglaforbesine sowie Forbagline) eine interessante Naturstoffklasse dar, da an ihrer Bildung vermutlich sowohl Flavonoide als auch Zimtsäure-Bisamide beteiligt sind. In unserer Arbeitsgruppe wurde hierfür ein hypothetisches Biosyntheschema entwickelt. Um die Biosynthesewege interessanter Sekundärstoffe aus *Aglaia*-Arten zu studieren, sollten nur in einem Vorversuch zunächst Zellkulturen dieser Pflanzen gezüchtet werden. Durch eine Reihe von Versuchen mit verschiedenen Nähmedien wie z. B. MS (Murashige Skoog), RW (Risser und White) und WPM (*Woody Plant Medium*) in Kombination mit Phytohormonen, wie Auxinen und Cytokininen, sollten die Bedingungen zur Induktion der Kallusbildung ermittelt werden. Interessant war es

dabei vor allem, ob aus *Aglaia*-Pflanzen bekannte Verbindungen wie Odorine, Rocaglamide, Aglaforbesine und Aglaforbagline auch in Zellkultur gebildet würden.

## Kapitel 2

# Ergebnisse

### 2.1. Screening-Tests mit den Rohextrakten

Verschiedene Pflanzenmaterialien aus der Gattung *Aglaia* aus Vietnam und China wurden jeweils pulverisiert und mit Methanol extrahiert. Die gewonnenen Extrakte wurden für ein Screening auf insektizide Aktivität verwendet. Anhand der Ergebnisse der Screening-Tests wurden diejenigen Pflanzenmaterialien, die insektizide Wirkung zeigten, als Ausgangsmaterial für diese Arbeit ausgewählt.

Tabelle 2.1 : Ergebnisse des Screening-Tests des Pflanzenmaterials

Pflanzenmaterial	Überlebens- rate [ÜB] (%)	Wachstums- rate [WB] (%)	Aktivität
<i>Aglaia odorata</i> Blätter (Kontrolle)	0	0	sehr aktiv
<i>A. tsangii</i> Blätter	100	100	inaktiv
<i>A. tsangii</i> Rinde	100	100	inaktiv
<i>A. dasyclada</i> Blätter	100	5	aktiv
<i>A. polystachya</i> Blätter	100	100	inaktiv
<i>A. polystachya</i> Rinde	100	100	inaktiv
<i>A. taiwanensis</i> Holz	100	100	inaktiv
<i>A. duperreana</i> Blätter + Zweige	0	0	sehr aktiv
<i>A. duperreana</i> Blüten	0	0	sehr aktiv

Die Methanol-Rohextrakte wurden jeweils in einem Fraßversuch an frischgeschlüpften Raupen von *Spodotera littoralis* getestet (vgl. 5.4.2). In diesem Biotest wurde 5 mg des entsprechenden Extrakts in künstliches Futter inkorporiert und 20 frischgeschlüpfte Raupen wurden eingesetzt. Nach 6 Tagen wurden die überlebenden Raupen gezählt und ihr Gewicht ermittelt, um die Überlebens- und Wachstumsrate - jeweils im Vergleich mit den Kontrollen - zu bestimmen.

Nach dieser Auswertung zeigten die Extrakte von *A. odorata* (Kontrolle) und *A. duperreana* eine sehr starke Aktivität, während der Extrakt von *A. dasyclada* schwacher Aktivität zeigte (s. Tab. 2.1). Die anderen Extrakte besaßen keine oder eine geringe insektizide Aktivität. Aufgrund ihrer Aktivität wurden *A. duperreana* und *A. dasyclada* als Ausgangsmaterial zur weiteren Bearbeitung ausgewählt. Der Extrakt aus den Blättern von *A. odorata* wurde bereits phytochemisch mehrmals untersucht (Janprasert, 1993; Ishibashi *et al.*, 1993; Ohse *et al.*, 1996; Güssregen *et al.*, 1997; Nugroho *et al.*, 1999).

## 2.2. Isolierung und Strukturaufklärung

### 2.2.1. Isolierung und Strukturaufklärung der Sekundärstoffe aus Blüten von *A. duperreana*

#### 2.2.1.1. Isolierung der insektizid aktiven Inhaltsstoffe

Von den drei Phasen (Hexan-, EtOAc-, und Wasser-Phase), die durch Flüssig-Flüssig-Verteilung des Methanolextraktes gewonnen wurden, zeigte nur die EtOAc-Phase (5 mg pro Kunstfutterstück) insektizide Aktivität im Biotest gegen Raupen von *S. littoralis*. Als erster Trennschritt wurde eine VLC-Trennung der EtOAc-Phase an Kiesel-Gel als stationärer Phase eingesetzt. Von den erhaltenen Fraktionen besaß nur die relativ unpolare Fraktion II eine starke insektizide Aktivität, während die anderen Fraktionen keine oder nur geringe insektizide Wirkung gegenüber *S. littoralis* zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Fraktion II zur weiteren Bearbeitung anschließend einem säulenchromatographischen Trennungsschritt an Sephadex-LH20 als stationärer Phase und Methanol als mobiler Phase unterworfen. Hierbei wurden 17 Fraktionen gesammelt (s. Abb. 2.1), die auf insektizide Wirkung getestet und mittels analytischer HPLC bezüglich ihrer qualitativen Zusammensetzung ausgewertet wurden. Aufgrund ihrer Bioaktivität und der im HPLC-Chromatogramm identifizierten UV-Spektren der Rocaglamid-Derivate wurden Fraktionen 5 bis 7 zur weiteren Bearbeitung ausgewählt.

Je nach Zusammensetzung der Fraktionen wurden verschiedene Säulenmaterialien ausgewählt, um die aktiven Verbindungen zu isolieren. In dieser Phase der Trennung erwiesen sich RP-18-Lobar-Fertigsäulen als besonders gut geeignet zur Gewinnung von mit Rocaglamiden angereicherten Fraktionen (s. Abb. 2.2). Anschließend wurden die Rocaglamid-Derivate aus allen Fraktionen, die Peaks mit einem für Rocaglamid-Derivate charakteristischen UV-Spektrum zeigten, mittels präparativer HPLC isoliert. Die Isolierung erfolgte vor allem mit Hilfe einer mit RP-18-Material gefüllten Säule, wobei geeignete Trennbedingungen zuvor mit analytischer HPLC ermittelt wurden. Es resultierten insgesamt 13 Rocaglamid-Derivate, von denen fünf Derivate neue Naturstoffe waren.

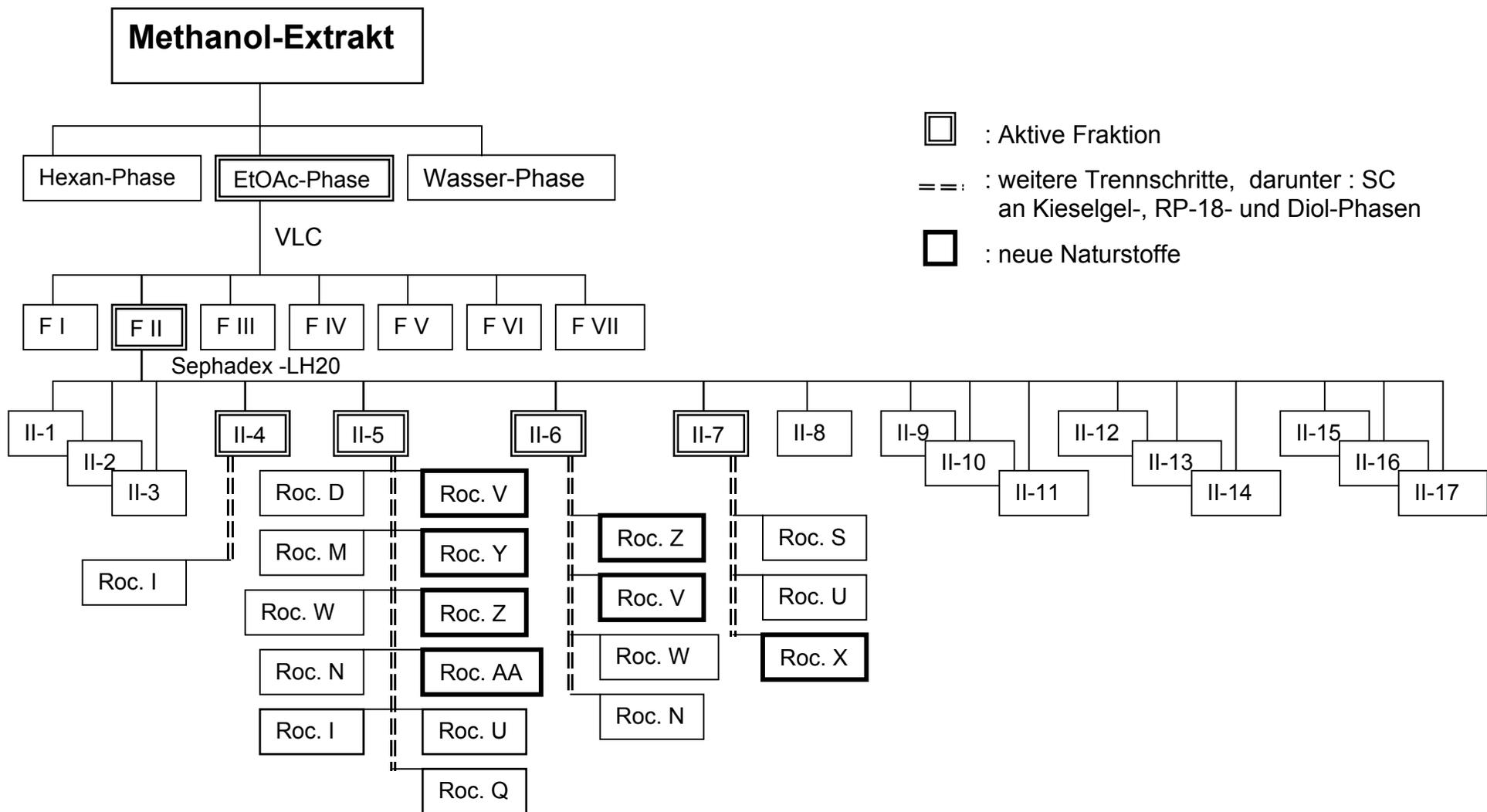
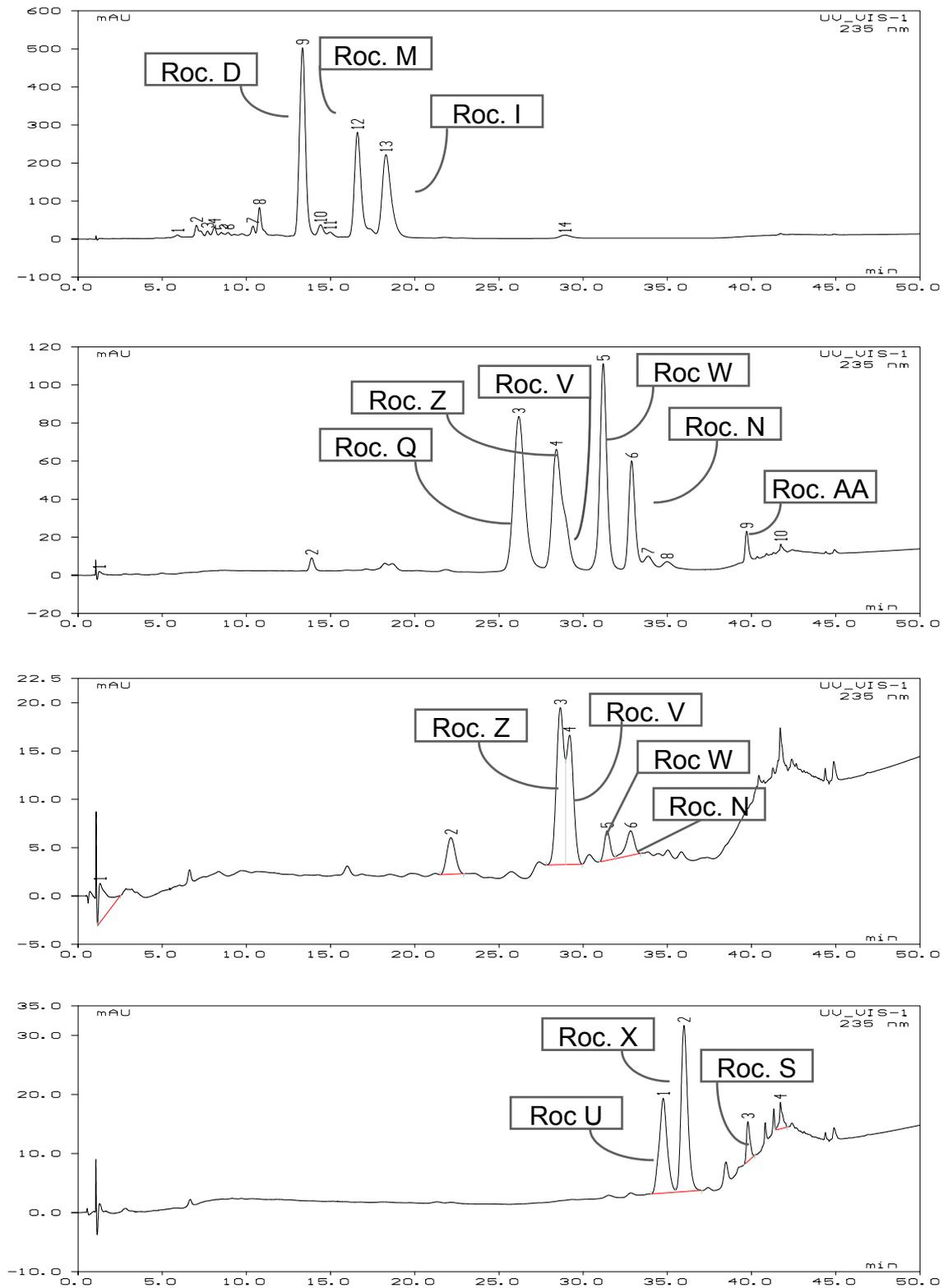


Abb. 2.1 : Die Trennungsschritte der Isolierung von Rocaglamid-Derivaten aus *Aglaia duperreana*



**Abb. 2.2 : HPLC-Chromatogramme der Rocaglamid-haltigen Fraktionen, die durch RP-18-Lobar-Fertigsäulen gewonnen wurden.**

### 2.2.1.2. Zusammenstellung der spektralen Daten für Rocaglamid

Da für die Strukturaufklärung der isolierten Rocaglamid-Derivate der Vergleich mit den Originaldaten der Stammverbindung, dem Rocaglamid, von ausschlaggebender Bedeutung ist, sollen an dieser Stelle zunächst das EI-Massenspektrum sowie die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren des Rocaglamids diskutiert werden.

Die Strukturaufklärung des Rocaglamids inklusive seiner relativen Konfiguration erfolgte mittels Einzelkristall-Röntgenstrukturanalyse, während die absolute Konfiguration durch Totalsynthese bestimmt wurde (King *et al.*, 1982; Trost *et al.*, 1990). Anhand der Kristallstrukturdaten nimmt der Cyclopentanring des Rocaglamids eine Halbsesselkonformation ein und ist annähernd rechtwinklig verknüpft mit dem planaren Benzofuranring. Die beiden aromatischen Ringe B und C stehen in *cis*-Stellung zueinander jeweils in einer pseudoaxialen Position. Am Cyclopentanring liegt die Hydroxygruppe pseudoäquatorial, während der Amid-Substituent eine pseudoaxiale Position einnimmt. Diese beiden Substituenten befinden sich in *cis*-Stellung zueinander und sind in der in Abb. 2.3 gewählten Darstellung  $\alpha$ -ständig, während die beiden Phenylringe in  $\beta$ -ständig sind.

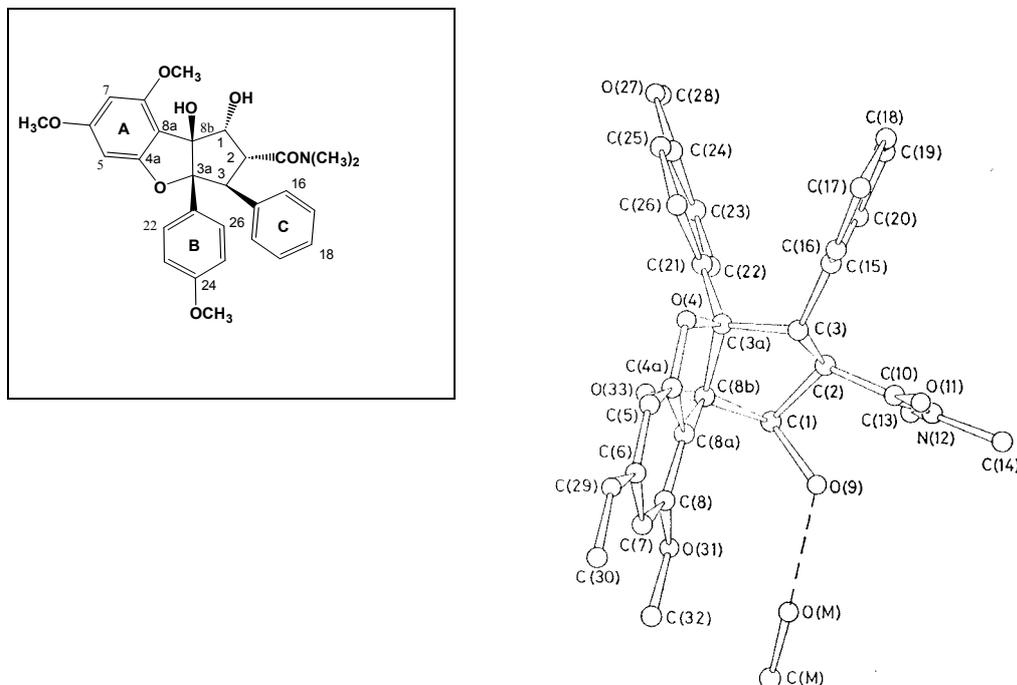
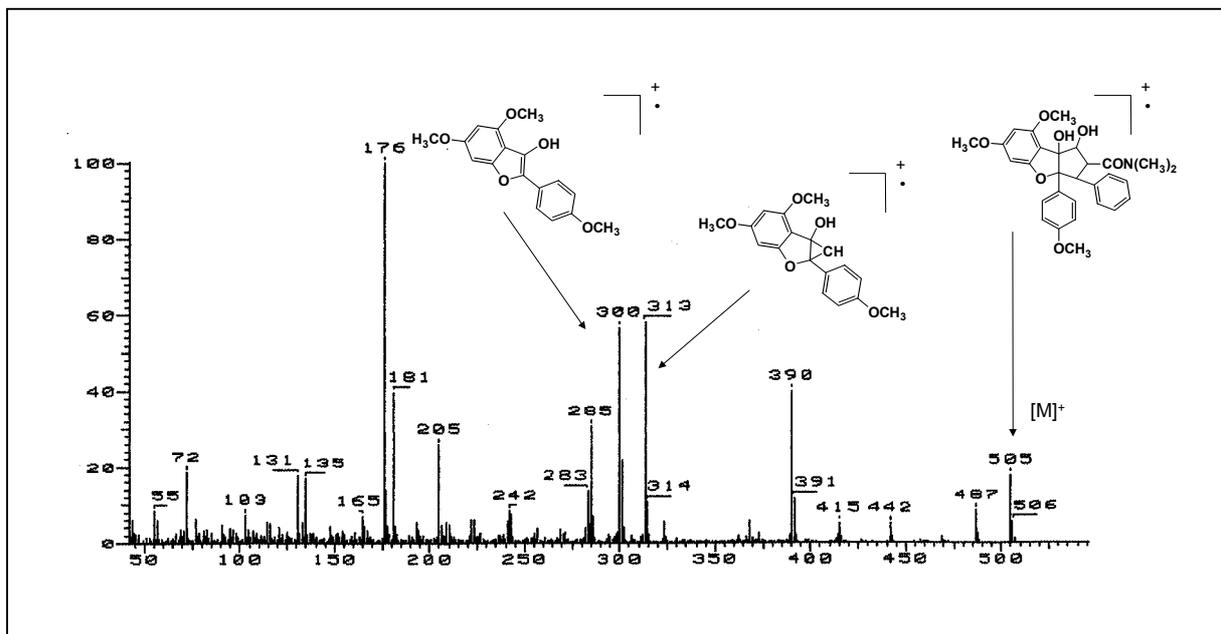


Abb. 2.3 : Kristallstruktur des Rocaglamids (King *et al.*, 1982)

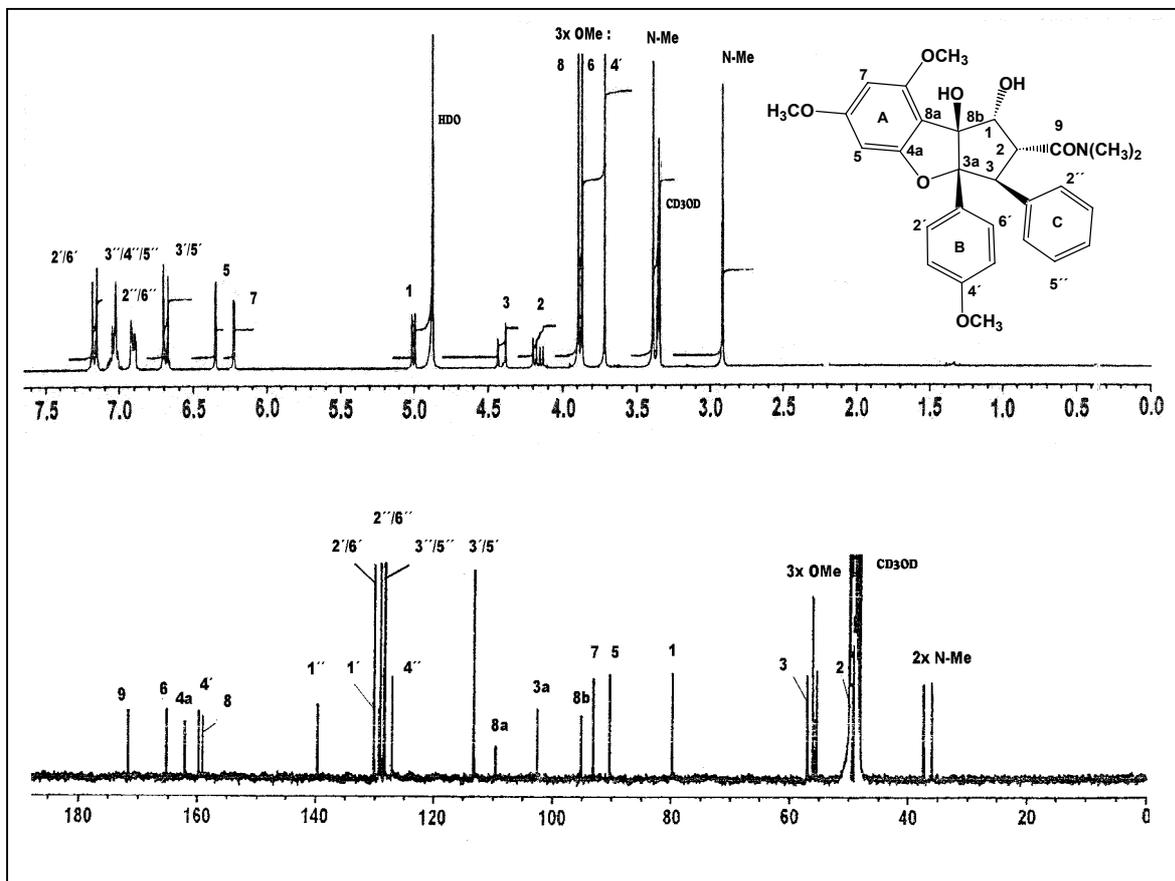
Das EI-Massenspektrum des Rocaglamids zeigt den Molekülion-Peak bei  $m/z = 505$  (s. Abb. 2.4). Besonders wichtig als Hinweis auf strukturelle Übereinstimmung in Teilen der Rocaglamid-Grundstruktur ist das Auftreten von charakteristischen Fragmentierungen. Im Falle des Rocaglamids sind dies die Peaks großer Intensität bei  $m/z = 300$  und  $m/z = 313$  als wichtigste Fragmente, aus denen das Substitutionsmuster der Ringe A und B abgeleitet werden kann (Nugroho *et al.*, 1997b). Die plausible Struktur dieser Fragmentationen, deren Summenformeln durch hochauflösende EI-Massenspektrometrie bestätigt wurden, sind in Abb. 2.4 dargestellt.



**Abb. 2.4 : EI-Massenspektrum des Rocaglamids und die plausible Struktur der Fragmentationen bei  $m/z = 300$  und  $m/z = 313$  (Nugroho *et al.*, 1997b)**

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Rocaglamid (s. Abb. 2.5) zeigt drei Singulett-Signale der drei Methoxygruppen mit einer chemischen Verschiebung ( $\delta$ ) von 3.71, 3.87 bzw. 3.89 ppm. Außerdem erscheinen drei Spinsysteme von aromatischen Protonen, nämlich zwei *meta*-gekoppelte Protonen im Ring A bei 6.23 und 6.35 ppm mit einer Kopplungskonstante ( $J$ ) von 1.4 Hz; ein charakteristisches AA'BB'-System für den *para*-disubstituierten Benzolring (Ring B) bei 6.69 und 7.17 ppm ( $d$ ,  $J = 9.0$  Hz); und Signale für einen monosubstituierten Benzolring (Ring C) zwischen 6.90 bis 7.10 ppm (5 H,  $m$ ). Weiterhin ist im mittleren Feld das Spinsystem der drei Methin-Protonen

H-1, H-2 und H-3 bei 5.01, 4.17 bzw. 4.41 ppm zu beobachten. Die Signale von H-1 und H-3 erscheinen als Dubletts, während H-2 ein Doppeldublett (Dublett vom Dublett) aufweist. Anhand der Kopplungskonstanten  $^3J_{1,2} = 6.8$  Hz und  $^3J_{2,3} = 13.6$  Hz lässt sich die relative  $1\alpha$ ,  $2\alpha$ ,  $3\beta$ -Konfiguration und damit die *cis*-Stellung der Ringe B und C ableiten. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Amidbindung befindet sich eine Methylgruppe in *cis*-, die andere in *trans*-Stellung relativ zur Carbonyl-Gruppe; beide ergeben somit sowohl im  $^1\text{H}$ - als auch im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zwei deutlich getrennte Signale.



**Abb. 2.5 :**  $^1\text{H}$  (oben)- und  $^{13}\text{C}$ (unten)-NMR-Spektrum des Rocaglamids (Nugroho *et al.*, 1997c)

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (s. Abb. 2.5) erscheinen im tiefen Feld die Signale des tetra-substituierten, disubstituierten und monosubstituierten Benzolrings von 113 bis 140

ppm sowie die Signale der sauerstofftragenden aromatischen Kohlenstoffe C-4a, C-6, C-8 und C-4' bei 162.2, 165.3, 159.2 bzw. 159.8 ppm. Im höheren Feld treten bei 109.5, 102.6 und 95.2 ppm die charakteristischen quaternären Kohlenstoffe des Furanrings auf (C-8a, C-3a bzw. C-8b). Bei 79.8, 47.4 und 57.0 befinden sich die Signale für C-1, C-2 und C-3, während die drei Signale bei 55.0, 56.0 und 56.1 ppm den drei Methoxygruppen zuzuordnen sind. Schließlich erscheinen im hohen Feld des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums bei 30.7 und 36.0 ppm 2 Signale für die beiden Methylgruppen des tertiären Amids.

Die absolute Konfiguration der isolierten Rocaglamid-Derivate läßt sich durch den Vergleich der Drehwerte bzw. CD-Spektren (s. Anhang; Struktur-Daten) mit denen des Rocaglamids ermitteln. Der Drehwert des synthetischen Rocaglamids beträgt  $[\alpha]_D^{20} = -88.8^\circ$ ;  $c=1.03$ ,  $\text{CHCl}_3$  (Troost *et al.*, 1990) und das CD-Spektrum des aus Blättern von *A. duperreana* isolierten Rocaglamids weist einen negativen Cotton-Effekt bei 217 nm ( $\Delta\varepsilon=17$ ) auf (Nugroho *et al.*, 1997a). Vor allem liefert das CD-Spektrum Informationen über die relative Konfiguration an den Stereozentren C-3, C-3a, C-8b, und C-1, die den Cyclopenta[*b*]tetrahydrobenzofuran-Grundkörper bilden und in der Nähe der wichtigen Chromophore des Moleküls (die drei aromatischen Ringe) liegen. Es ist ein ausgeprägter negativer Cotton-Effekt im Bereich zwischen 215 bis 220 nm zu sehen. Das asymmetrische C-2 hat kaum einen Einfluß auf das CD-Spektrum, wobei der Verlust des Stereozentrums am C-2 (bei Rocaglamid AK, Güssregen *et al.*, 1997) keinen Einfluß auf das CD-Spektrum der entsprechenden Rocaglamid-Derivate hat. Die relative Konfiguration an C-1 und C-2 läßt sich aus der Größe der Kopplungskonstanten von H-1 und H-2 im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ableiten.

Die meisten der bisher isolierten Rocaglamid-Derivate unterscheiden sich in den Substituenten an C-1, C-2 und C-3'. Nur einige wenige Derivate enthalten Substituenten an C-7 und C-8b. Die in der Literatur verwendeten Trivialnamen für Rocaglamid-Derivate werden aus Gründen der Praktikabilität sowohl für alle im Rahmen dieser Arbeit isolierten Rocaglamid-Derivate als auch für neue Derivate bekannter Verbindungen beibehalten.

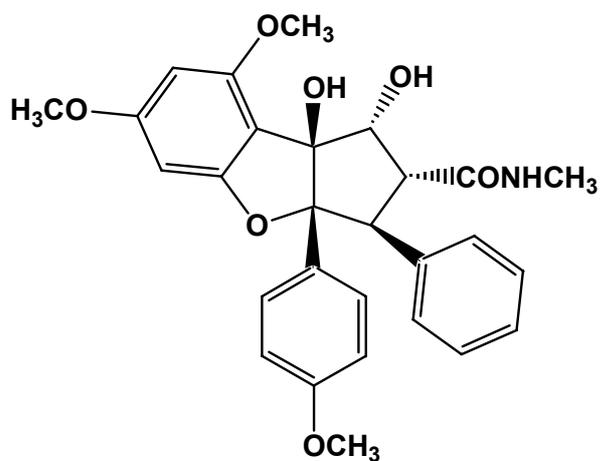
### 2.2.1.3. Bekannte isolierte Rocaglamid-Derivate

In unserer Arbeitsgruppe ist *A. duperreana* bereits intensiv auf das Vorkommen von Rocaglamiden hin untersucht worden. So wurden aus Blättern und Stengeln insgesamt sieben Rocaglamid-Derivate isoliert (Nugroho *et al.*, 1997a), während in den Wurzeln achtzehn Rocaglamide gefunden wurden (Hiort *et al.*, 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden dreizehn Verbindungen aus den Blüten isoliert, von denen fünf neue Naturstoffe sind. Die Identifizierung sowohl der neuen als auch der acht bekannten Rocaglamid-Derivate erfolgte durch Vergleich der NMR-Spektren und der EI-Massenspektren aller isolierten Verbindungen mit den beiden genannten Arbeiten sowie anhand der in der weiteren Literatur publizierten Daten, vor allem mit denen der Stammverbindung, Rocaglamid (s. 2.2.1.2).

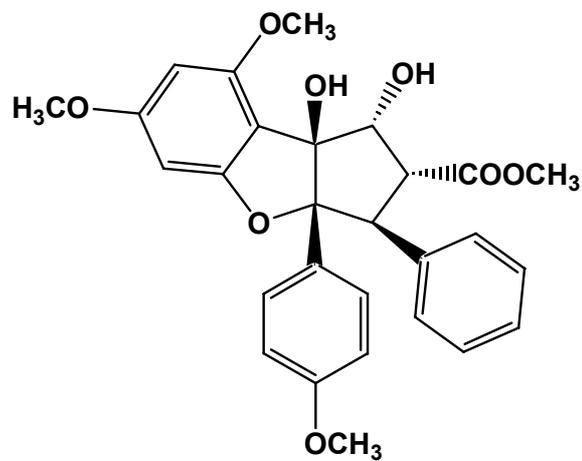
Verbindungen **1** - **3** (s. Abb. 2.6) zeigen im EI-Massenspektrum jeweils den Molekülion-Peak bei  $m/z = 491$ ,  $m/z = 492$ , bzw.  $m/z = 533$  (s. Anhang, Abb. A.1, A.2 bzw. A.3). Alle EI-Massenspektren dieser Verbindungen liefern die Fragmentationen bei  $m/z = 300$  (Basis-Peak) und  $m/z = 313$ , was darauf hindeutet, daß das Substitutionsmuster der Ringe A und B mit dem von Rocaglamid übereinstimmt. Außerdem deutet das ungeradzahlige Molekulargewicht von Verbindung **1** und **3** auf das Vorkommen von Stickstoff im Molekül hin.

Der Molekülion-Peak der Verbindung **1** ist 14 Masseneinheiten kleiner als der des Rocaglamids. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (s. Anhang, Abb. A.1) erscheint nur eine Methylgruppe der Amid-Gruppe, was zusammen mit den EIMS-Daten belegt, daß Verbindung **1** identisch ist mit Desmethylrocaglamid (Rocaglamid Q), das bereits für Blätter von *A. odorata* beschrieben wurde (Ishibashi *et al.*, 1993).

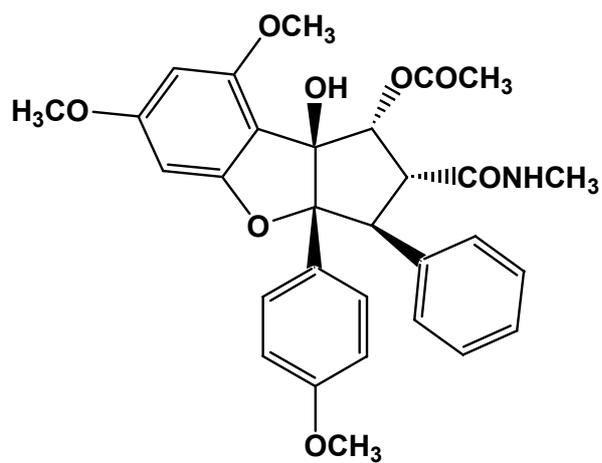
Verbindung **2** zeigt anstelle der Signale für die beiden Methylgruppen der Amid-Gruppe im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (s. Anhang, Abb. A.2) ein Signal bei 3.66 ppm für eine Methoxygruppe. Die gerade Zahl des Molekülion-Peaks im EI-Massenspektrum bestätigt auch die Abwesenheit des Stickstoffs der Amid-Gruppe, die im Rocaglamid mit C-2 verknüpft ist. Damit ist Verbindung **2** als Methylrocaglat (Rocaglamid U) identifiziert, das ebenfalls bereits aus Blättern von *A. odorata* bekannt ist (Ishibashi *et al.*, 1993).



[1] Rocaglamid Q



[2] Rocaglamid U



[3] Rocaglamid W

Abb. 2.6 : Strukturen der Rocaglamide Q, U und W

Tabelle 2.2 :  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Rocaglamid Q, U und W (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Rocaglamid Q [1]	U [2]	W [3]
1	4.81 ( <i>d</i> , 6.0)	4.91 ( <i>d</i> , 6.2)	6.04 ( <i>d</i> , 5.7)
2	3.86 ( <i>dd</i> , 6.0, 14.2)	4.01 ( <i>dd</i> , 6.2, 14.2)	3.99 ( <i>dd</i> , 5.7, 14.9)
3	4.32 ( <i>d</i> , 14.2)	4.28 ( <i>d</i> , 14.2)	4.25 ( <i>d</i> , 14.4)
5	6.32 ( <i>d</i> , 2.0)	6.32 ( <i>d</i> , 2.0)	6.32 ( <i>d</i> , 2.0)
7	6.21 ( <i>d</i> , 2.0)	6.21 ( <i>d</i> , 2.0)	6.17 ( <i>d</i> , 2.0)
2'/6'	7.18 ( <i>d</i> , 9.0)	7.15 ( <i>d</i> , 9.0)	7.23 ( <i>d</i> , 9.0)
3'/5'	6.66 ( <i>d</i> , 9.0)	6.66 ( <i>d</i> , 9.0)	6.67 ( <i>d</i> , 9.0)
2''/6''	6.97 ( <i>m</i> )	6.93 ( <i>m</i> )	6.96 ( <i>m</i> )
3'', 4'', 5''	7.04 ( <i>m</i> )	7.06 ( <i>m</i> )	7.05 ( <i>m</i> )
OCH <sub>3</sub> -6	3.86 ( <i>s</i> )	3.86 ( <i>s</i> )	3.86 ( <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -8	3.88 ( <i>s</i> )	3.87 ( <i>s</i> )	3.78 ( <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -4'	3.70 ( <i>s</i> )	3.70 ( <i>s</i> )	3.70 ( <i>s</i> )
CO-OCH <sub>3</sub>		3.66 ( <i>s</i> )	
N-CH <sub>3</sub>	2.69 ( <i>s</i> )		2.62 ( <i>s</i> )
OCO-CH <sub>3</sub>			1.89 ( <i>s</i> )

Im Vergleich mit Verbindung **1** zeigt sich im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **3** einen Tieffeldverschiebung der Signale für H-1 bei 6.04 ppm und eine zusätzliche Methylgruppe einer Acetoxy-Gruppe bei 1.89 ppm (s. Tab. 2.2 bzw. Anhang, Abb. A.3), wobei letztere durch Verlust von 60 Masseneinheiten ( $m/z = 473$ ) im EI-Massenspektrum ebenfalls nachgewiesen wird. Verbindung **3** ist damit als C-1-O-Acetyl-Desmethylocaglamid (Rocaglamid W) identifiziert, das bereits aus Wurzeln von *A. duperreana* isoliert wurde (Hiort *et al.*, 1999).

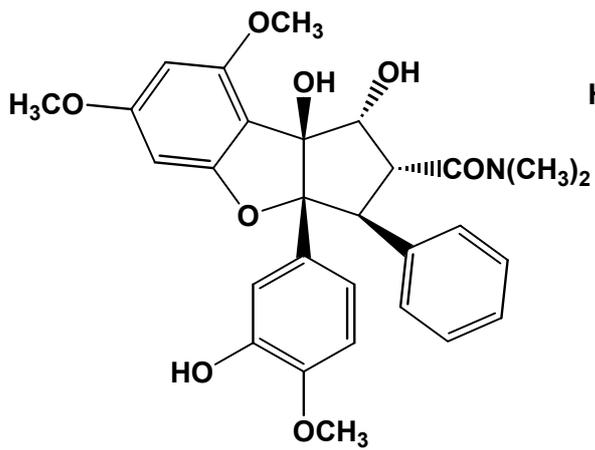
Die Verbindungen **4** – **7** (s. Abb. 2.7) zeigen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein anderes Spinsystem für Ring B. Aus den Signalmultiplizitäten - ein Dublett bei 6.66 ppm (H-5',  $J = 8.6$  Hz), ein Doppeldublett (Dublett vom Dublett) mit charakteristischer *ortho*- und *meta*-Kopplung bei 6.71 ppm (H-6',  $J = 2.0, 8.6$  Hz) sowie ein Dublett bei 6.79 ppm (H-2',  $J = 2.0$  Hz, alle am Beispiel von Verbindung **4**, s. Tab. 2.3) – läßt sich ableiten, daß Ring B ein trisubstituierter Benzolring ist.

Verbindung **4** zeigt den Molekülion-Peak im EI-Massenspektrum bei  $m/z = 521$  (s. Anhang, Abb. A.4). Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist – mit Ausnahme der Signale für Ring B – fast identisch mit dem von Rocaglamid. Der Unterschied von 16 Masseneinheiten im Vergleich mit Rocaglamid ( $m/z = 505$ ), der auch bei den beiden charakteristischen Fragmenten bei  $m/z = 316$  und  $m/z = 329$  auftritt (vgl. Abb. 2.4), zeigt die Anwesenheit einer Hydroxygruppe als Substituent an C-3' (Ring B). Damit ist Verbindung **4** als C-3'-Hydroxyrocaglamid (Rocaglamid D) identifiziert, das vorher bereits aus den Zweigen von *A. duperreana* isoliert wurde (Nugroho *et al.*, 1997a).

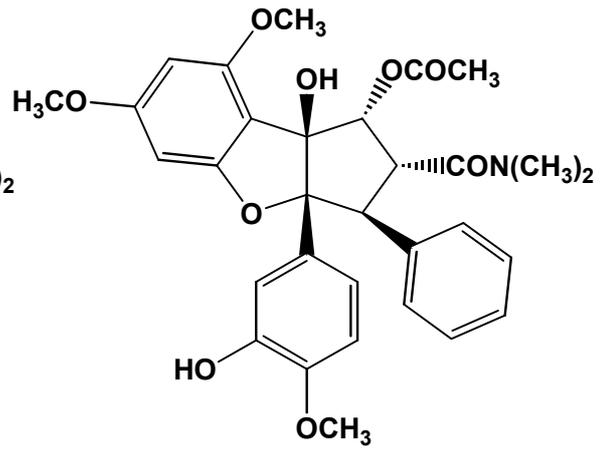
Die Verbindungen **5** – **7** zeigen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum im Vergleich mit dem der Verbindung **4** eine Tieffeldverschiebung des H-1-Signals wie in Verbindung **3** (s. Tab. 2.3). Verbindung **5** zeigt im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (s. Anhang, Abb. A.5) sowohl ein Signal für eine Methylgruppe der Acetoxy-Gruppe als auch zwei Signale für Methylprotonen der Amid-Gruppe. Der Molekülion-Peak bei  $m/z = 563$  beweist, daß es sich bei Verbindung **5** um C-1-O-Acetyl-3'-Hydroxyrocaglamid (Rocaglamid I) handelt, das bereits für Zweige von *A. duperreana* beschrieben wurde (Nugroho *et al.*, 1997a).

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **6** ist fast identisch mit dem von Verbindung **5** (s. Anhang, Abb. A.6), mit der Ausnahme, daß bei Verbindung **6** nur ein Methyl-Signal der Amid-Gruppe zu erkennen ist. Der Molekülion-Peak ( $m/z = 549$ ) ist 14 Masseneinheiten kleiner als der der Verbindung **5**. Damit ist Verbindung **6** C-1-O-Acetyl-3'-Hydroxydesmethyloccaglamid (Rocaglamid M), das zuvor aus Blüten von *A. odorata* isoliert wurde (Güssregen *et al.*, 1997).

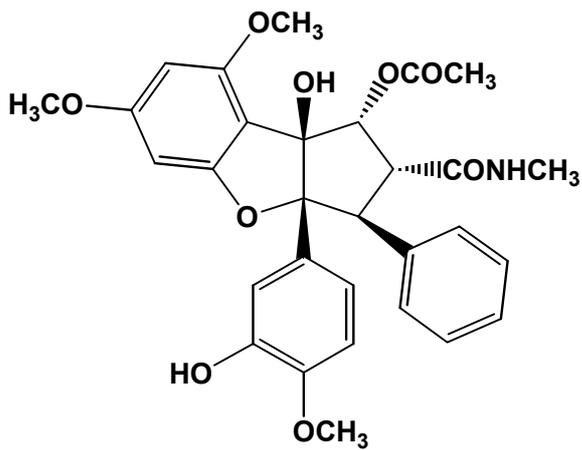
Im Vergleich mit Verbindung **5** fehlen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **7** beide Methyl-Signale der Säureamid-Gruppe. Ferner taucht bei 3.61 ppm das Methyl-Signal einer Carbonsäuremethylester-Gruppe wie bei Verbindung **2** auf (s. Tab. 2.3). Das EI-Massenspektrum zeigt den Molekülion-Peak bei  $m/z = 550$  (s. Anhang, Abb. A.7), und damit erweist sich die Verbindung **7** als C-1-O-Acetyl-3'-Hydroxymethyloccaglat (Rocaglamid N), das vorher bereits für Blüten von *A. odorata* beschrieben wurde (Güssregen *et al.*, 1997).



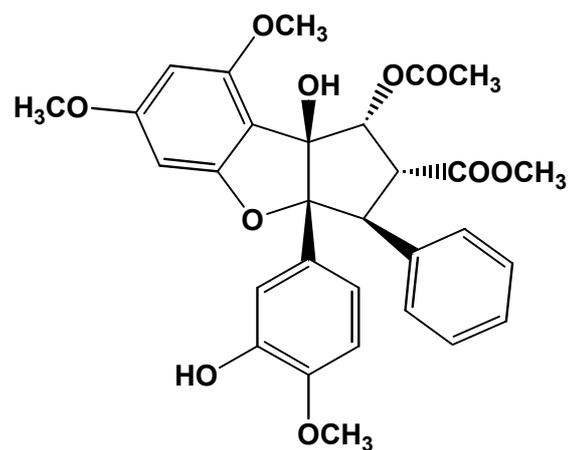
[4] Rocaglamid D



[5] Rocaglamid I



[6] Rocaglamid M



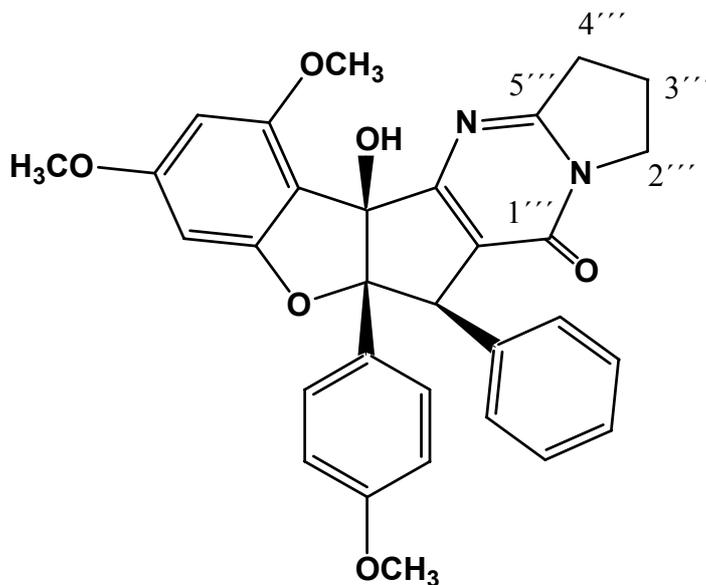
[7] Rocaglamid N

Abb. 2.7 : Strukturen der Rocaglamide D, I, M und N

Tabelle 2.3 :  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Rocaglamid D, I, M und N (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Rocaglamid D [4]	I [5]	M [6]	N [7]
1	4.79 ( <i>d</i> , 6.1)	6.08 ( <i>m</i> )	6.02 ( <i>d</i> , 5.8)	6.05 ( <i>d</i> , 5.3)
2	4.18 ( <i>d</i> , 6.1, 14.2)	4.34 ( <i>m</i> )	4.00 ( <i>dd</i> , 5.8, 14.4)	4.12 ( <i>dd</i> , 5.3, 14.4)
3	4.31 ( <i>d</i> , 14.2)	4.34 ( <i>m</i> )	4.24 ( <i>d</i> , 14.4)	4.18 ( <i>d</i> , 14.4)
5	6.31 ( <i>d</i> , 2.0)	6.31 ( <i>d</i> , 1.9)	6.30 ( <i>d</i> , 2.0)	6.31 ( <i>d</i> , 1.9)
7	6.20 ( <i>d</i> , 2.0)	6.17 ( <i>d</i> , 1.9)	6.16 ( <i>d</i> , 2.0)	6.17 ( <i>d</i> , 1.9)
2'	6.79 ( <i>d</i> , 2.0)	6.83 ( <i>d</i> , 2.2)	6.83 ( <i>d</i> , 2.2)	6.76 ( <i>d</i> , 2.1)
5'	6.66 ( <i>d</i> , 8.6)	6.68 ( <i>d</i> , 8.6)	6.68 ( <i>d</i> , 8.5)	6.68 ( <i>d</i> , 8.6)
6'	6.71 ( <i>d</i> , 2.0, 8.6)	6.77 ( <i>dd</i> , 2.2, 8.6)	6.79 ( <i>dd</i> , 2.2, 8.5)	6.75 ( <i>dd</i> , 2.1, 8.6)
2''/6''	6.97 ( <i>m</i> )	6.96 ( <i>m</i> )	6.99 ( <i>m</i> )	6.97 ( <i>m</i> )
3'', 4'', 5''	7.05 ( <i>m</i> )	7.07 ( <i>m</i> )	7.05 ( <i>m</i> )	7.08 ( <i>m</i> )
OCH <sub>3</sub> -6	3.86 ( <i>s</i> )	3.87 ( <i>s</i> )	3.86 ( <i>s</i> )	3.87 ( <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -8	3.87 ( <i>s</i> )	3.78 ( <i>s</i> )	3.78 ( <i>s</i> )	3.79 ( <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -4'	3.76 ( <i>s</i> )	3.76 ( <i>s</i> )	3.76 ( <i>s</i> )	3.76 ( <i>s</i> )
CO-OCH <sub>3</sub>				3.61 ( <i>s</i> )
N-CH <sub>3</sub>	3.40 ( <i>s</i> ), 2.92 ( <i>s</i> )	3.42 ( <i>s</i> ); 2.84 ( <i>s</i> )	2.62 ( <i>s</i> )	
OCO-CH <sub>3</sub>		1.86 ( <i>s</i> )	1.88 ( <i>s</i> )	1.86 ( <i>s</i> )

Das EI-Massenspektrum der Verbindung **8** zeigt den Molekülion-Peak bei  $m/z = 524$  (s. Anhang, Abb. A.8). Im mittleren Feld des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums fehlen die Signale für H-1, H-2 und H-3, statt dessen erscheint nur ein Singulett bei 4.49 ppm. Weiterhin tauchen Multiplett-Signale für jeweils 2 Protonen bei ca. 2.33 - 2.39 ppm, 3.30 - 3.34 ppm und 4.11 - 4.16 ppm auf. Dieses Signal-Muster ist ein Hinweis für einen ungewöhnlichen Pyrimidinon-Ring-Substituenten an C-1 und C-2. Somit handelt es sich bei Verbindung **8** um Rocaglamid S (s. Abb. 2.8). Diese Verbindung wurde zum ersten Mal aus Wurzeln von *A. odorata* isoliert (Kokpol *et al.*, 1994).



[8] Rocaglamid S

Abb. 2.8 : Struktur des Pyrimidinon-Derivates, Rocaglamid S

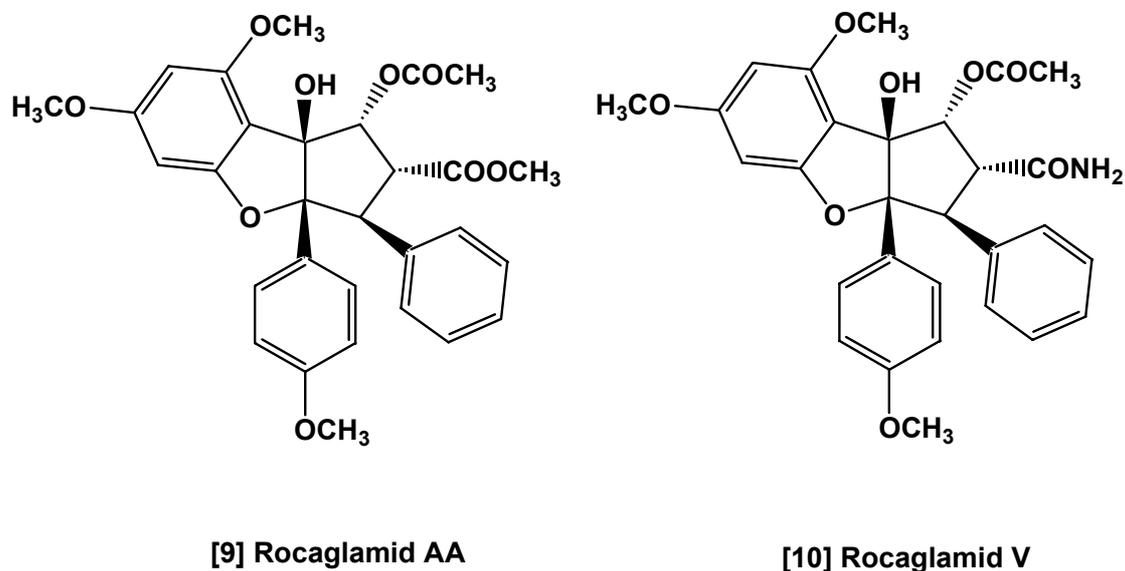
Tabelle 2.4 :  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Rocaglamid S (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Rocaglamid S [8]	Position	S [8]
3	4.49 (s)	$\text{OCH}_3$ -8	3.85 (s)
5	6.33 (d, 2.0)	$\text{OCH}_3$ -4'	3.67 (s)
7	6.17 (d, 2.0)	2'''	A : 4.16 (m)
2'/6'	7.08 (d, 9.0)		B : 4.11 (m)
3'/5'	5.56 (d, 9.0)	3'''	A : 2.39 (m)
2''/6''	6.87 (m)		B : 2.33 (m)
3'', 4'', 5''	7.04 (m)	4'''	A : 3.34 (m)
$\text{OCH}_3$ -6	3.84 (s)		B : 3.30 (m)

### 2.2.1.4. Neue Rocaglamid-Derivate

#### C-1-O-Acetyl-Methylrocglat (Rocaglamid AA)

Verbindung **9** zeigt im EI-Massenspektrum den Molekülion-Peak bei  $m/z = 534$  (s. Anhang, Abb. A.9) und dazu Signale für Fragmentationen bei  $m/z = 300$  (Basis-Peak) und 313, die für ein Substitutionsmuster der Ringe A und B wie bei Rocaglamid sprechen (vgl. Abb. 2.4). Die Tieffeldverschiebung des Signals für H-1, das Auftreten eines Methylsignals bei 1.87 ppm sowie der Massenverlust von 60 amu ( $m/z = 474$ ) im EI-Massenspektrum belegen die Acetylierung der Hydroxygruppe an C-1, ähnlich wie bei den Rocaglamiden W [3], I [5], M [6] und N [7]. Weiterhin trägt Verbindung **9** an C-2 wie Rocaglamid N [7] eine Carbonsäuremethylester-Gruppe, deren entsprechenden Methyl-Signal bei 3.61 ppm zusehen ist. Damit wurde dieser neue Naturstoff als C-1-O-Acetyl-Methylrocglat (Rocaglamid AA) identifiziert (s. Abb. 2.9).



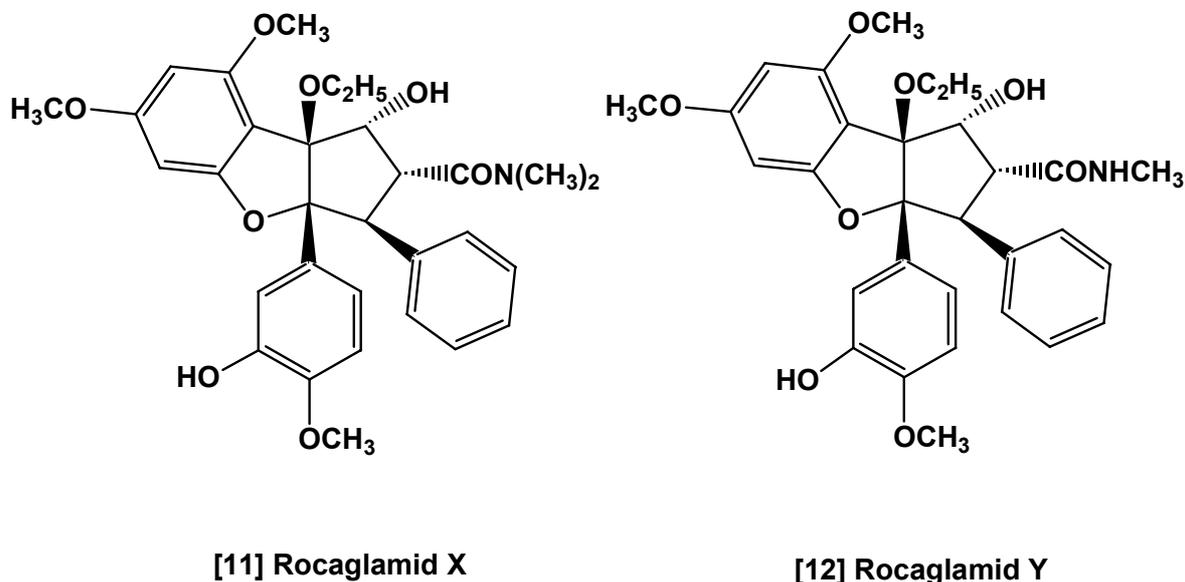
**Abb. 2.9 : Struktur des Rocaglamids AA und V**

C-1-O-Acetyl-Didesmethylocaglamid (Rocaglamid V)

Verbindung **10** zeigt das Molekülion im EI-Massenspektrum bei  $m/z = 519$  und erneut ein entsprechendes Fragmention bei  $m/z = 459$ , das über eine Eliminierung einer Acetoxy-Gruppe entsteht (s. Anhang, Abb. A.10). Gleichmaßen erscheint auch das Signal für H-1 im tiefen Feld bei 6.13 ppm ( $d$ ,  $J = 5.8$  Hz). Somit ist die Hydroxygruppe an C-1 wie bei Rocaglamid AA [9] acetyliert. Die ungerade Zahl des Molekülions spricht für die Anwesenheit eines Stickstoff-Atoms im Molekül. Weiterhin zeigt das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum keine zusätzliche Methylgruppe außer den drei Methoxygruppen. Durch Vergleich mit den  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Didesmethyl- Rocaglamid (Rocaglamid B), das aus Samen von *A. argentea* (Dumontet *et al.*, 1996) isoliert worden ist, und der Analyse der elementaren Zusammensetzung wurde Verbindung **10** als C-1-O-Acetyl-Didesmethylocaglamid (Rocaglamid V) identifiziert (s. Abb. 2.9).

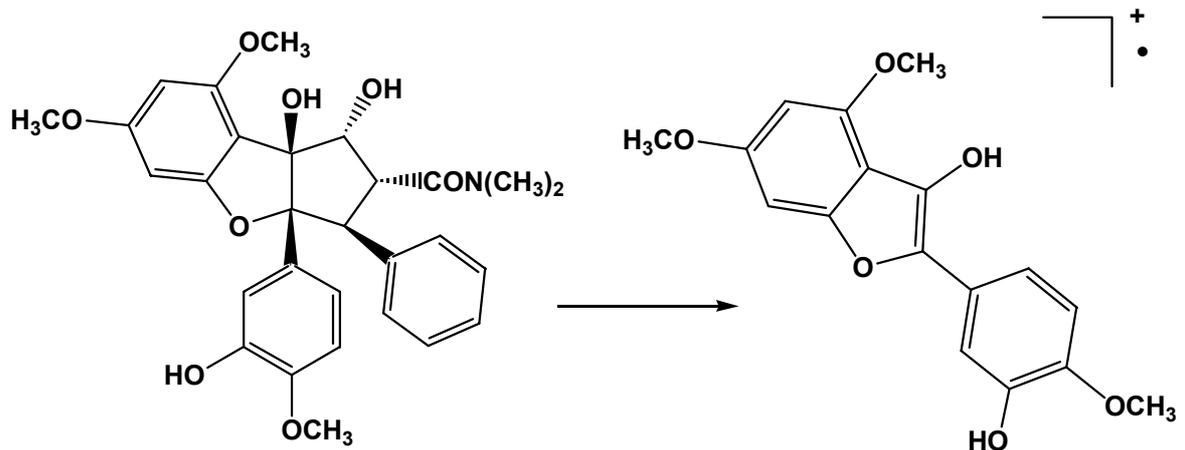
Tabelle 2.5 :  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Rocaglamid AA und V (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Rocaglamid AA [9]	V [10]
1	6.07 ( $d$ , 5.1)	6.13 ( $d$ , 5.8)
2	4.12 ( $dd$ , 5.1, 14.4)	4.06 ( $dd$ , 5.8, 14.4)
3	4.21 ( $d$ , 14.4)	4.24 ( $d$ , 14.4)
5	6.32 ( $d$ , 2.0)	6.31 ( $d$ , 1.9)
7	6.17 ( $d$ , 2.0)	6.16 ( $d$ , 1.9)
2'/6'	7.19 ( $d$ , 9.0)	7.42 ( $d$ , 9.1)
3'/5'	6.67 ( $d$ , 9.0)	6.66 ( $d$ , 9.1)
2''/6''	6.95 ( $m$ )	6.99 ( $m$ )
3'', 4'', 5''	7.07 ( $m$ )	7.05 ( $m$ )
OCH <sub>3</sub> -6	3.87 ( $s$ )	3.86 ( $s$ )
OCH <sub>3</sub> -8	3.79 ( $s$ )	3.78 ( $s$ )
OCH <sub>3</sub> -4'	3.70 ( $s$ )	3.71 ( $s$ )
CO-OCH <sub>3</sub>	3.61 ( $s$ )	
OCO-CH <sub>3</sub>	1.87 ( $s$ )	1.89 ( $s$ )

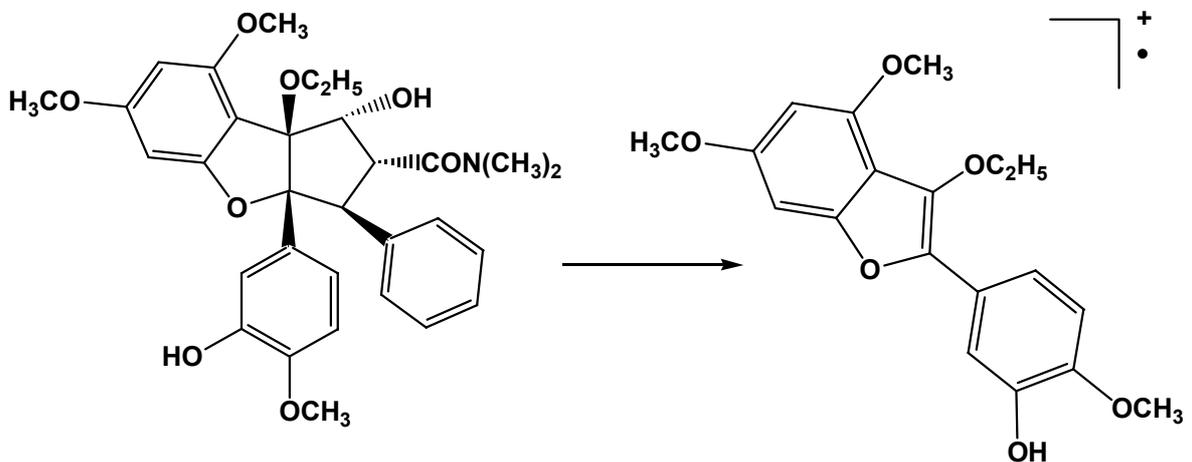
C-8b-Ethoxy-Derivat des Rocaglamid (Rocaglamid X und Y)**Abb. 2.10 : Struktur des Rocaglamids X und Y**

Das EI-Massenspektrum der Verbindung **11** liefert das Molekülion bei  $m/z = 549$ . Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt dieselben Spinsysteme für die Ringe A und B, die auch in den Spektren Rocaglamiden D, I, M und N [4 - 7] vorhanden sind (s. Anhang, Abb. A.11). Außerdem erscheint im höheren Feld neben den charakteristischen Signalen von zwei Methyl-Substituenten der Amid-Gruppe ein weiteres Spinsystem von insgesamt fünf Protonen bei 0.71 ppm (3H, *t*,  $J = 7.0$  Hz), 2.43 ppm (1H, *dq*,  $J = 8.8, 7.0$ ) und 2.68 ppm (1H, *dq*,  $J = 8.8, 7.0$ ), das einer Ethoxygruppe (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) zuzuordnen ist. Die Tatsache, daß die beiden Methylen-Protonen nicht äquivalent sind und zudem eine ungewöhnliche chemische Verschiebung aufweisen, ist begründet in der räumlichen Nähe der Ethoxygruppe zu einem asymmetrischen Zentrum sowie zu einem aromatischen Ring, dessen Ringstrom-Effekt für die extreme Hochfeldverschiebung verantwortlich ist. Dies sind beides Indizien dafür, daß die Ethoxygruppe an C-8b positioniert ist. Ein Vergleich mit NMR-Daten in der Literatur zeigt eine gute Übereinstimmung mit Ethyl-Rocaglaol, einem C-8b-Ethoxy-Derivat (Dumontet *et al.*, 1996).

Weitere Unterstützung für die Annahme der Positionierung der Ethoxygruppe an C-8b liefert die Untersuchung der Fragmentionen im EI-Massenspektrum. Es zeigt kein charakteristisches Fragmention bei  $m/z = 316$  wie bei Rocaglamid D [4], sondern bei



[4] Rocaglamid D

 $m/z = 316$ 

[11] Rocaglamid X

 $m/z = 344$ 

Abb. 2.11 : Plausible Struktur des Fragment-Ions  $m/z = 344$  im EI-Massenspektrum des Rocaglamids X (11) in Analogie mit der Fragmentierung des Rocaglamids D (4)

$m/z = 344$  (s. Abb. 2.11). Der Unterschied von 28 Masseneinheiten weist darauf hin, daß in diesem Fragment die Ethylgruppe noch enthalten ist, was nur möglich ist, wenn sich der Ethoxyl-Substituent an C-8b befindet. Anhand dieser Daten wurde Verbindung **11** als C-8b-Ethoxy-3'-Hydroxy-Rocaglamid (Rocaglamid X) identifiziert (s. Abb. 2.10).

Auch das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **12** zeigt die Signale einer Ethoxygruppe wie Verbindung **11** (s. Anhang, Abb. A.12). Das EI-Massenspektrum bestätigt ebenfalls die Anwesenheit der Ethoxygruppe an C-8b durch das Fragment-Ion bei  $m/z = 344$ . Das Molekülion bei  $m/z = 535$  ist 14 Masseneinheiten kleiner als bei

Tabelle 2.6 :  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Rocaglamid X und Y (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Rocaglamid X [11]	Y [12]
1	5.13 ( <i>d</i> , 7.4)	4.93 ( <i>d</i> , 7.4)
2	4.10 ( <i>dd</i> , 7.4, 13.7)	3.83 ( <i>dd</i> , 7.0, 14.5)
3	4.21 ( <i>d</i> , 13.7)	4.11 ( <i>d</i> , 14.5)
5	6.39 ( <i>d</i> , 2.0)	6.36 ( <i>d</i> , 2.0)
7	6.25 ( <i>d</i> , 2.0)	6.27 ( <i>d</i> , 2.0)
2'	6.73 ( <i>m</i> )	6.71 ( <i>m</i> )
5'	6.73 ( <i>m</i> )	6.71 ( <i>m</i> )
6'	6.73 ( <i>m</i> )	6.71 ( <i>m</i> )
2''/6''	6.82 ( <i>m</i> )	6.88 ( <i>m</i> )
3'', 4'', 5''	7.03 ( <i>m</i> )	7.05 ( <i>m</i> )
OCH <sub>3</sub> -6	3.89 ( <i>s</i> )	3.89 ( <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -8	3.92 ( <i>s</i> )	3.91 ( <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub> -4'	3.80 ( <i>s</i> )	3.80 ( <i>s</i> )
N-CH <sub>3</sub>	2.87 ( <i>s</i> ), 3.34 ( <i>s</i> )	2.64 ( <i>s</i> )
OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	A : 2.68 ( <i>dq</i> , 8.8, 7.0) B : 2.43 ( <i>dq</i> , 8.8, 7.0)	A : 2.71 ( <i>dq</i> , 8.8, 7.0) B : 2.38 ( <i>dq</i> , 8.8, 7.0)
OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.71 ( <i>t</i> , 7.0)	0.72 ( <i>t</i> , 7.0)

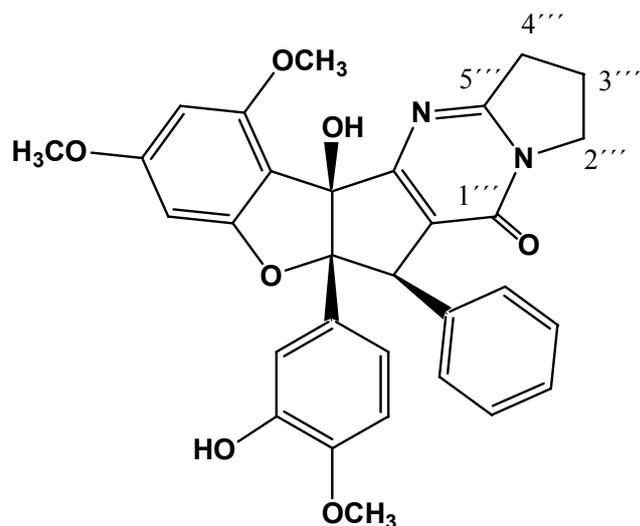
Verbindung **11**, und im höheren Feld des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums erscheint nur ein Singulett für einen Methyl-Substituenten der Amid-Gruppe. Damit handelt es sich bei dem neuen Naturstoff **12** um das C-8b-Ethoxyl-Derivat des bekannten 3'-Hydroxy-Desmethylocaglamid (Rocaglamid L), der erstmals aus *A. odorata* isoliert wurde (Nugroho *et al.*, 1999).

Das Vorkommen eines Ethoxyl-Substituenten an C-8b bei den Verbindungen **11** und **12** ist für Naturstoffe ungewöhnlich; und man könnte vermuten, daß beide Verbindungen Artefakte sind, die aus den nicht ethoxylierten Vorstufen Rocaglamid D [**4**] bzw. Rocaglamid L beispielsweise während der Aufarbeitung entstanden sind. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden in getrennten Ansätzen die Rocaglamide D [**4**] sowie Q [**1**] – Rocaglamid L stand leider nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung – über Nacht bei Raumtemperatur sowohl in Ethanol als auch in Ethylacetat inkubiert. Bei keinem dieser Versuche konnte eine Ethoxylierung an C-8b festgestellt werden. Diese Befunde sprechen deutlich dafür, daß es sich bei den Rocaglamiden Y [**11**] und X [**12**] um echte Naturstoffe und nicht um Artefakte handelt.

#### C-3'-Hydroxy-Rocaglamid S (Rocaglamid Z)

Der Verbindung **13** zeigt ähnlich wie Rocaglamid S [**8**] ein ungewöhnliches  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, in dem das charakteristische ABC-Spinsystem der Signale von H-1, H-2 und H-3 fehlt und sechs Multipllett-Signale eines Pyrimidinon-Rings als Substituent an C-1 und C-2 zwischen 3.23 ppm – 4.15 ppm erscheinen. Beide Verbindungen haben somit die gleiche Grundstruktur (s. Anhang, Abb. A.13).

Aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum läßt sich ableiten, daß Ring B 1,3,4-trisubstituiert sein muß; dieser Teil des Spektrums ist praktisch identisch mit dem der Rocaglamide D, I, M und N [**4** - **7**]. Das EI-Massenspektrum zeigt das Molekülion bei  $m/z = 540$  und Verbindung **13** ist somit 16 Masseneinheiten größer als bei **8**. Dies bestätigt die Anwesenheit einer Hydroxygruppe an C-3'. Damit ist Verbindung **13** als C-3'-Hydroxy-Rocaglamid S identifiziert (s. Abb. 2.12).



[13] Rocaglamid Z

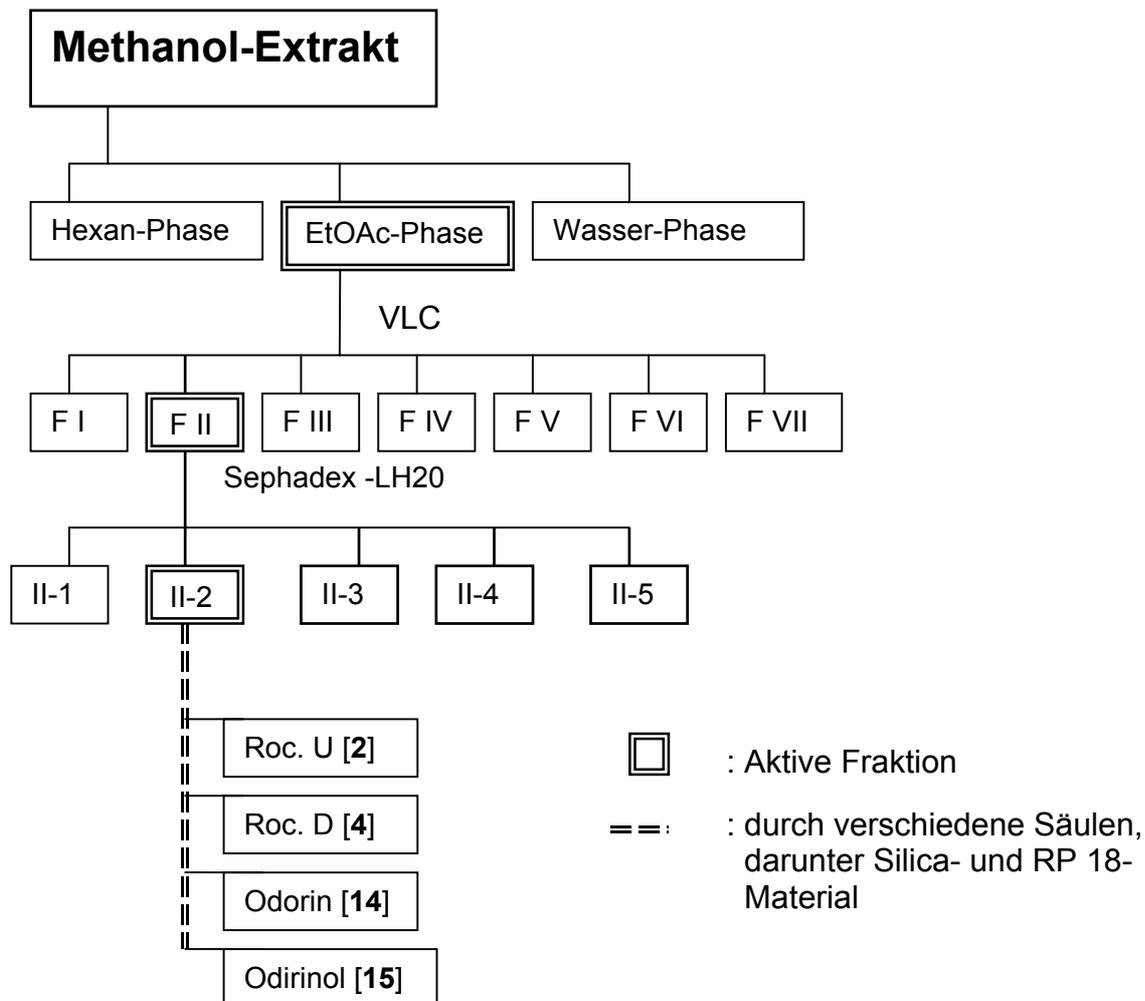
Abb. 2. 12 : Struktur des neuen Pyrimidinon-Derivates

Tabelle 2.7 :  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von Rocaglamid Z (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^1\text{H}$	Position	$^1\text{H}$
3	4.49 (s)	$\text{OCH}_3$ -6	3.84 (s)
5	6.32 (d, 2.0)	$\text{OCH}_3$ -8	3.85 (s)
7	6.17 (d, 2.0)	$\text{OCH}_3$ -4'	3.73 (s)
2'	6.69 (d, 2.0)	2'''	A : 4.18 (m)
5'	6.56 (d, 8.5)		B : 4.12 (m)
6'	6.63 (d, 2.0, 8.5)	3'''	A : 2.40 (m)
2''/6''	6.90 (m)		B : 2.34 (m)
3''/4''/5''	7.05 (m)	4'''	A : 3.36 (m)
			B : 3.31 (m)

### 2.2.2. Isolierung und Strukturaufklärung der untersuchten Verbindungen aus Blättern von *A. duperreana*

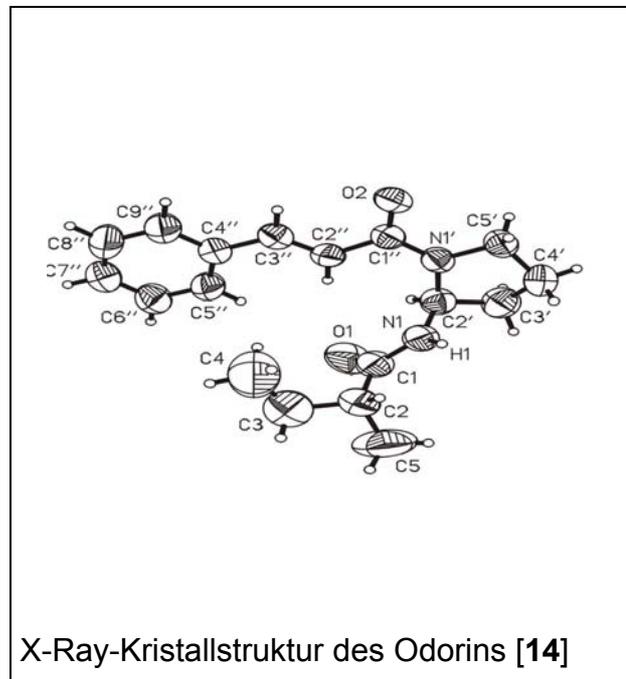
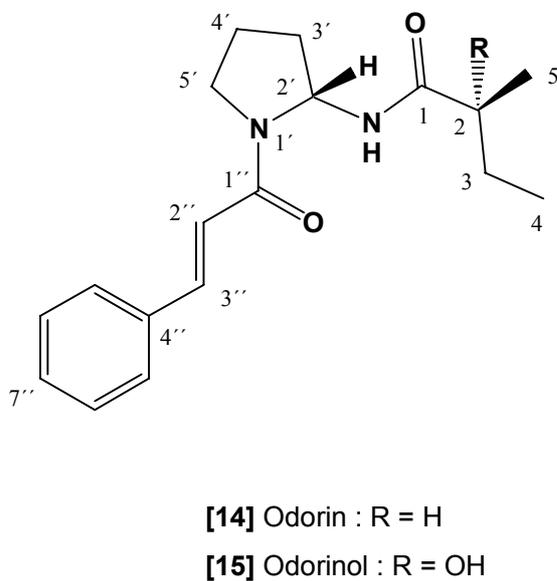
Wie bei der Bearbeitung der Blüten von *A. duperreana* wurde der aus 1 kg getrockneten Blättern gewonnene Rohextrakt mit Lösungsmitteln steigender Polarität (Hexan, EtOAc und Wasser) einer Flüssig-Flüssig-Verteilung unterzogen. Anhand des Insektizid-Biotests gegenüber Raupen von *S. littoralis* wurde festgelegt, daß sich die aktive Fraktion in der EtOAc-Phase befand. Vor allem aus dieser Phase wurden die aktiven Inhaltsstoffe mittels Säulenchromatographie mit verschiedenen stationären Phasen und unterschiedlichen Fließmitteln isoliert (s. Abb. 2.13).



**Abb. 2.13** : Die Trennungsschritte bei der Isolierung von Rocaglamid-Derivaten aus Blättern von *A. duperreana*.

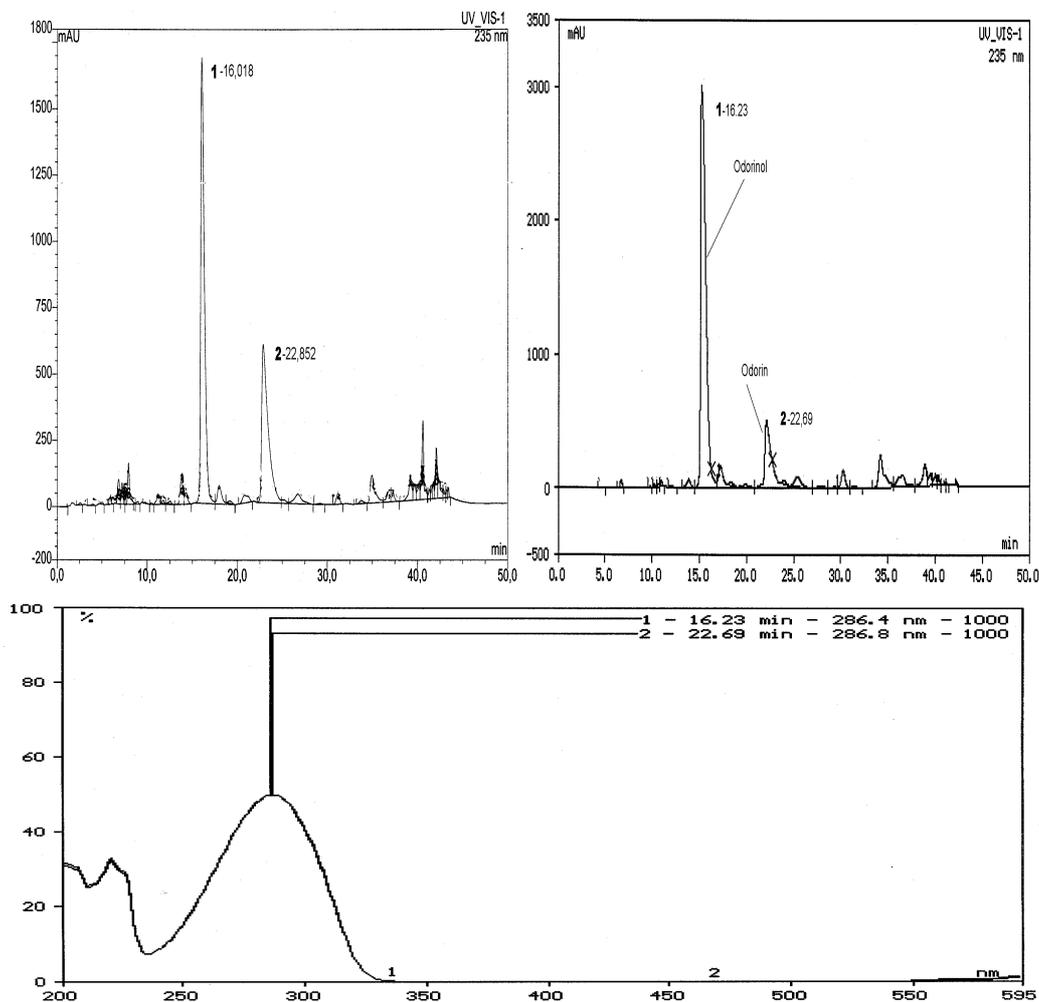
Die einzelnen Trennungsschritte wurden durch den obengenannten Biotest begleitet, um die Rocaglamide enthaltenden Fraktionen zu finden. Die Ergebnisse des Biotests und der HPLC-Untersuchung läßt auf die Anwesenheit von Rocaglamid-Derivaten in der aktiven VLC-Fraktion II schließen.

Allerdings wurden aus dieser Fraktion insgesamt nur 4 Verbindungen isoliert. Zwei Verbindungen davon wurden als bereits bekannte Rocaglamid-Derivate, nämlich Rocaglamid D [4] und Rocaglamid U [2], identifiziert, die auch in den Blüten von *A. duperreana* vorkommen. Andere Verbindungen sind stickstoffhaltige Verbindungen, wie Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamid, Odorin [14] oder Roxburghilin und Odorinol [15] (Abb. 2.14), die schon vor langem bereits aus Blättern von *A. odorata* isoliert worden waren (Shiengthong *et al.*, 1979; Purushothaman *et al.*, 1979). Die Strukturaufklärung aller isolierten Verbindungen erfolgte mit Hilfe von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren bzw. EI- und ESI-Massenspektrometrie sowie durch den Vergleich mit bekannten Literaturdaten.



**Abb. 2.14 : Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamid aus Blättern von *A. duperreana***

Odorin [14] und Odorinol [15] wurden als weiße Kristalle isoliert. Sie finden sich in relativ großen Mengen und können als Hauptkomponenten bezeichnet werden. Diese Verbindungen machen nach Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz auf der DC-Platten einen gelben Fleck. Im Chromatogramm der mit Dioden-Array-Detektor gekoppelten HPLC zeigen sie ein UV-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum von 286 nm (s. Abb. 2.15). Diese beiden Verbindungen besitzen keine insektizide Aktivität und fallen selbstverständlich in einer Biotest begleitenden Fraktionierung bei der Bearbeitung des Methanol-Extrakts der Blüten von *A. duperreana* aus. Der Nachweis ihres Vorkommens in den Blüten von *A. duperreana* erfolgte durch den Vergleich der HPLC-Chromatogramme. (s. Abb. 2.15).



**Abb. 2.15 : Nachweis von Odorin- und Odorinol in HPLC-Chromatogrammen von *A. duperreana*; Blätter (links) und Blüten (rechts).**

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Odorins (s. Anhang; Abb. A.14) zeigt im Tieffeld fünf Protonen-Signale für einen Phenylring bei 7.63 ppm (2H, *m*, H-5''/H-9'') und 7.42 ppm (3H, *m*, H-6''/H-7''/H-8''), zwei Olefin-Signale bei 7.63 ppm (1H, *d*,  $J = 15.4$  Hz, H-3'') und 7.10 ppm (1H, *d*,  $J = 15.4$  Hz, H-2'') und ein Signal für das chirale Proton am 2-Aminopyrrolidin-Ring bei 6.17 ppm (1H, *dd*,  $J = \text{ca. } 2.0, 6.7$  Hz, H-2'). Im Mittelfeld bis Hochfeld erscheinen die Signale für Methylen-Protonen des Pyrrolidin-Rings, die wegen des Rings als getrennte Multipllett-Signale detektiert werden. Anschließend finden sich die Protonen-Signale für den 2-Methyl-Buttersäure-Rest. Besonders charakteristisch sind die Signale für H-3, die wegen der Nachbarschaft eines chiralen Zentrums (C-2) als getrennte Signale erscheinen und entsprechende geminale Kopplung besitzen.

Tabelle 2.8 :  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Odorin [14] und Odorinol [15] (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Odorin [14]	Odorinol [15]
2	2.23 ( <i>tg</i> , 1.8, 6.9)	
3	A : 1.61 ( <i>dq</i> , 2.1, 7.4) B : 1.37 ( <i>dq</i> , 1.6, 7.4)	A : 1.86 ( <i>dq</i> , 21.3, 7.5) B : 1.60 ( <i>dq</i> , 21.3, 7.5)
4	0.76 ( <i>t</i> , 7.4)	0.91 ( <i>t</i> , 7.5)
5	1.14 ( <i>d</i> , 6.9)	1.26 ( <i>s</i> )
2'	6.17 ( <i>dd</i> , ca. 2.0, 6.7)	6.15 ( <i>dd</i> , 2.1, 5.7)
3'	A : 2.32 ( <i>m</i> ) B : 2.04 ( <i>m</i> )	A : 2.37 ( <i>m</i> ) B : 2.04 ( <i>m</i> )
4'	A : 2.15 ( <i>m</i> ) B : 1.96 ( <i>m</i> )	A : 2.14 ( <i>m</i> ) B : 2.00 ( <i>m</i> )
5'	A : 3.75 ( <i>ddd</i> , 3.2, 8.4, 11.8) B : 3.53 ( <i>ddd</i> , 7.4, 9.4, 12.0)	A : 3.77 ( <i>ddd</i> , 3.9, 7.7, 11.9) B : 3.57 ( <i>ddd</i> , 7.3, 8.4, 11.9)
2''	7.10 ( <i>d</i> , 15.4)	7.06 ( <i>d</i> , 15.4)
3''	7.63 ( <i>d</i> , 15.4)	7.62 ( <i>d</i> , 15.4)
5''/9''	7.63 ( <i>m</i> )	7.62 ( <i>m</i> )
6''/8''	7.42 ( <i>m</i> )	7.42 ( <i>m</i> )
7''	7.42 ( <i>m</i> )	7.42 ( <i>m</i> )

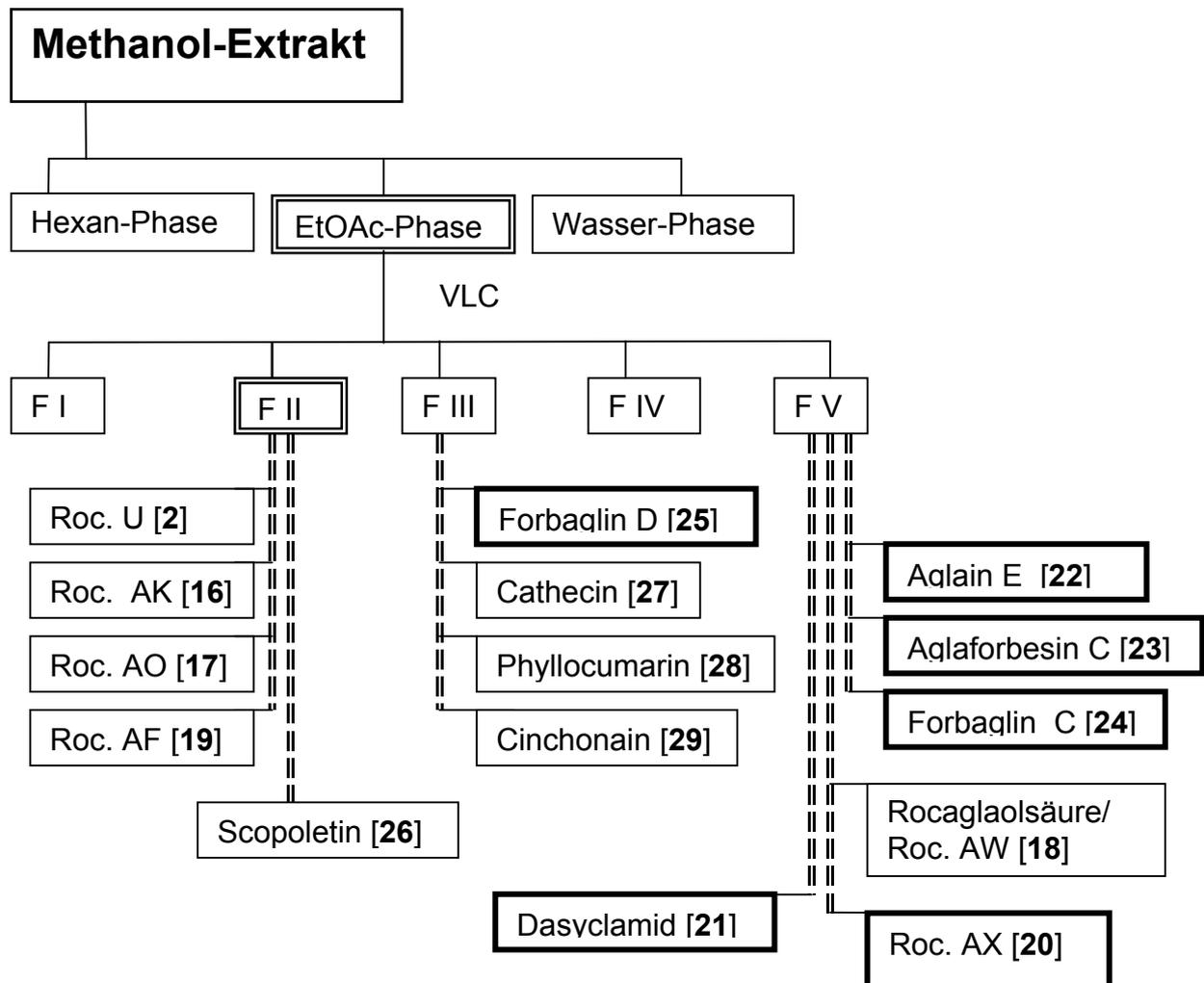
Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Odorinols zeigt ein ähnliches Muster (s. Anhang; Abb. A.15). Der Unterschied besteht nur darin, daß das Signal von H-5 als Singulett und kein Signal von H-2 erscheint. Der Unterschied des Molekulargewichts von 16 Masseneinheiten zwischen den beiden Verbindungen (im ESI-positiv-Massenspektrum zeigt Odorin den Molekülion-Peak bei  $m/z = 301$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , Odorinol bei  $m/z = 317$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und die Tieffeld-Verschiebung der Protonen-Signale H-3 und H-5 bestätigt, daß der Buttersäure-Rest mit einer Hydroxygruppe an C-2 substituiert ist.

Die Stereochemie von H-2'' und H-3'' und die relative Konfiguration der chiralen Atome, C-2' und C-2 der beiden Verbindungen wurde über die Kopplungskonstanten im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bzw. durch Einkristall-Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Stellung von H-2'' und H-3'' in beiden Verbindungen ist in *trans*-Konfiguration gemäß der Kopplungskonstante von 15.4 Hz. Obwohl die planaren Strukturen von Odorin [14] und Odorinol [15] gleich sind wie bei den Strukturen der bereits aus Blättern und Zweigen von *A. odorata* isolierten Verbindungen (Shiengthong und Ungphakorn, 1979; Hayashi *et al.*, 1982), zeigten diese beiden Verbindungen umgekehrte bzw. andere Werte ihrer optischen Drehung. Sie stellen damit Enantiomere dar. Die Bestimmung der relativen Konfiguration der chiralen Atome, C-2' und C-2 des Odorins [14] erfolgte durch Einkristall-Röntgenstrukturanalyse. Die Kristalldaten sind in Anhang (s. Tab. A.14.1 und Tab. A.14.2) zu finden. Für Odorin wurde die 2'S, 2R-Konfiguration festgelegt, wie in Abb. 2.14 gezeigt wird. Der Drehwert des Odorinols [15] ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -11.0$ , c. 0.2,  $\text{CHCl}_3$ ) im Vergleich mit der des Odorins [14] ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -37.0$ , c. 0.2,  $\text{CHCl}_3$ ) scheint, daß die relative Konfiguration des Odorinols gleich der des Odorins ist. Damit wurde zum ersten Mal diese relative Konfiguration von Odorin und Odorinol beschrieben.

### 2.2.3. Isolierung und Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen aus Blättern von *A. dasyclada*

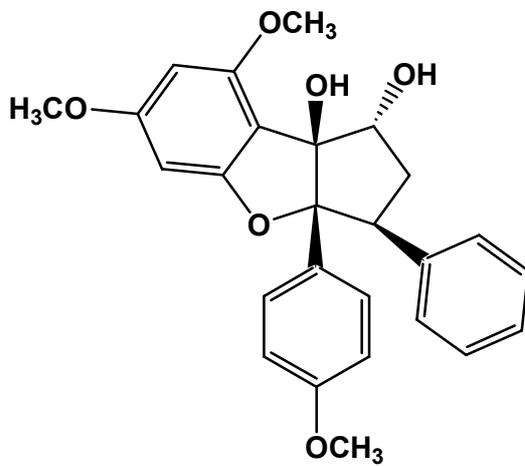
Die Bearbeitung des MeOH-Extrakts aus Blättern von *A. dasyclada* wurde mit den gleichen Fraktionierungsschritten wie bei der Bearbeitung des MeOH-Extrakts von *A. duperreana* durchgeführt. Aus der Fraktionierung mittels Vakuum-Liquid-Chromatographie (VLC) ergaben sich fünf weitere Fraktionen (s. Abb. 2.16). Nur Fraktion II (CHCl<sub>2</sub> : Isop. = 90 : 10) zeigt noch eine moderate Bioaktivität. Aus dieser Fraktion wurden vier Rocaglamid-Derivate mittels Säulenchromatographie isoliert. Eine Verbindung davon, Rocaglamid U [2], wurde bereits in dieser Arbeit aus *A. duperreana* isoliert. Die anderen (Verbindung **16**, **17**, und **19**) sind bekannte Rocaglamid-Derivate aus anderen *Aglaia*-Arten. Die weitere Isolierung aus der VLC-Fraktion V (Polare Fraktion, CHCl<sub>2</sub> : MeOH = 1 : 1) führte den HPLC-Chromatogrammen folgend zur Isolierung der Verbindungen **18** und **20** (Rocaglamid-Derivate). Außerdem wurden aus der gleichen Fraktion die Verbindungen **22**, **23** und **24** isoliert, welche keine Rocaglamid-Derivate sondern eine Reihe von biosynthetisch verwandten Verbindungen der Rocaglamide darstellen, nämlich: Aglain-[**22**], Aglaforbesin-[**23**] und Forbaglin-[**24**] Derivate.

Wegen der ungewöhnlichen Seitenkette bei den Verbindungen **22**, **23** und **24**, die statt einem Aminopyrrolidin-Ring einen Putrescin-Bisamid-Rest aufweisen, wurden weitere Fraktionen bearbeitet, um andere Bisamid-Verbindung zu isolieren. Tatsächlich wurde aus der VLC-Fraktion V ein Putrescin-Bisamid [**21**] isoliert. Außerdem wurden aus VLC-Fraktion II und III ein Cumarin-Derivat [**26**] sowie eine Reihe von Flavonoid-Derivaten [**27** – **29**] zusammen mit Verbindung **25** (Forbaglin-Derivat) gewonnen.

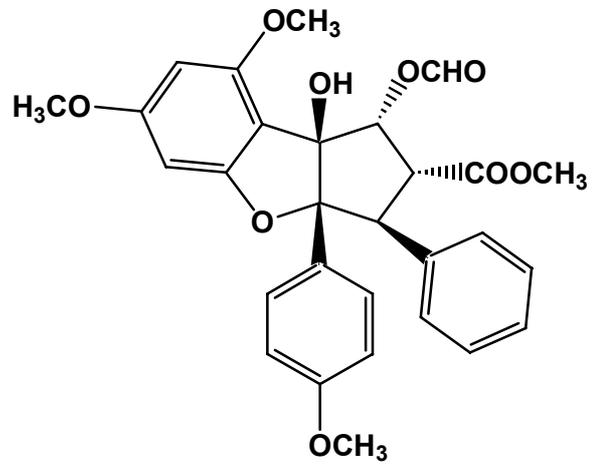


**Abb. 2.16 : Die Trennungsschritte der Isolierung von Rocaglamid-Derivaten und anderen verwandten Verbindungen aus Blättern von *Aglaia dasyclada***

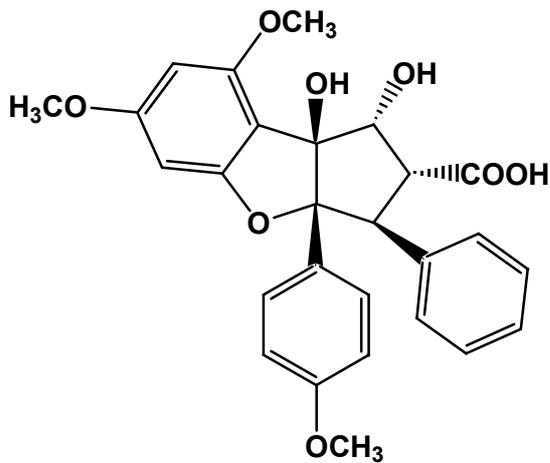
## 2.2.3.1. Bekannte isolierte Rocaglamid-Derivate



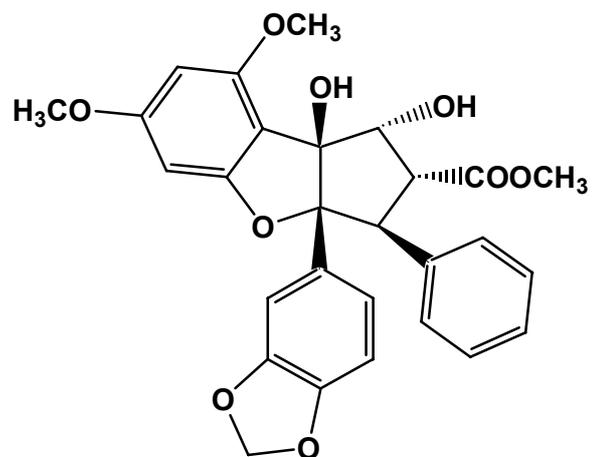
[16] Rocaglamid AK



[17] Rocaglamid AO



[18] Rocaglamid AW

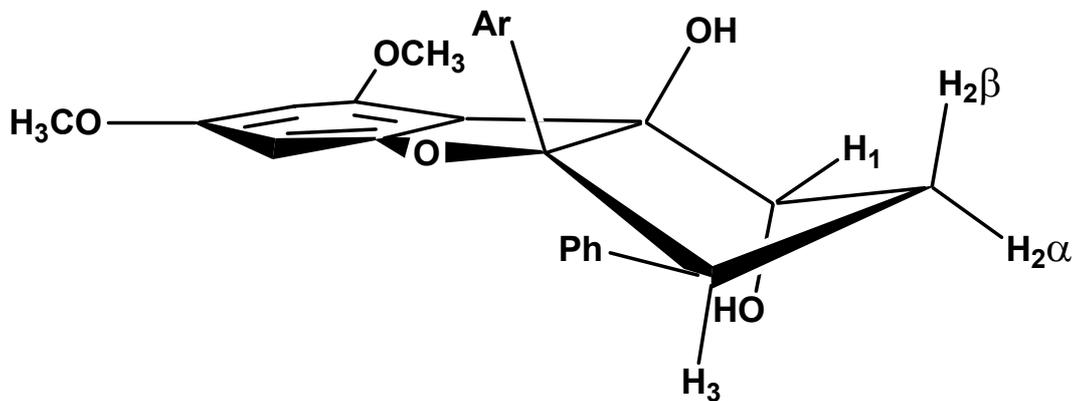


[19] Rocaglamid AF

Abb. 2.17 : Bekannte Rocaglamid-Derivate aus *A. dasyclada*.

Verbindung **16** wurde als Rocaglaol (Rocaglamid AK, s. Abb. 2.17) identifiziert, das zum ersten Mal für *A. odorata* (Ishibashi *et al.* 1993) beschrieben wurde. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt charakteristische Methylen-Protonen-Signale von H-2, die we

gen des chiralen Zentrums bei C-1 und C-3 als gekoppeltes Multiplett erschienen sind (s. Anhang; Abb. A.16). Die beiden Signale erscheinen bei 2.80 und 2.08 ppm für jeweils H-2 $\alpha$  bzw. H-2 $\beta$  als Doppel-Doppel-Dublett (*ddd*) (s. Tabel 2.9). Die Wannen-Konformation des Cyclopentanrings (s. Abb. 2.18) läßt sich dadurch ableiten, daß eine kleine Kopplungskonstante (1.5 Hz) gemäß einer äquatorial-äquatorial-vicinalen Stellung für H-2 $\alpha$  und H-1 $\beta$  vorliegt, während die große axial-axial-vicinale Kopplungskonstante von 14 Hz zu H-2 $\beta$  und H-3 $\alpha$  gehört. Der Molekülion-Peak bei  $m/z = 434$  im EI-Massenspektrum bestätigt die Struktur von Verbindung **16**.



**Abb. 2.18** : Die Wannen-Konformation des Cyclopentanrings von Rocaglaol

Verbindung **17** zeigt im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Singulett-Signal bei 8.06 ppm, das normalerweise zum Formyl-Proton gehört (s. Anhang; Abb. A.17). Dies ist ein Hinweis auf einen Formyloxy-Substituenten im Molekül. Während die Protonen-Signale für H-2 und H-3 als Multiplett bei 4.20 ppm zusammen erscheinen, tritt das Protonen-Signal H-1 als breites Singulett mit einer Tieffeld-Verschiebung von 6.12 ppm auf. Diese starke Tieffeld-Verschiebung läßt sich durch den Formyloxy-Substituenten am C-1 erklären. Weiterhin erscheint eine zusätzliche Methylgruppe bei 3.70 ppm, die normalerweise das Methyl-Signal einer Carbonsäuremethylester-gruppe wie bei Verbindung **2** darstellt. Das bestätigt die Anwesenheit einer Carbonsäuremethylester

gruppe am C-2. Damit ist Verbindung **17** als 1-Formyl-Methylrocaglat (Rocaglamid AO) identifiziert, das bereits aus *A. spectabilis* (Schneider *et al.* 2000) isoliert worden ist. Der Molekülion-Peak bei  $m/z = 520$  im EI-Massenspektrum und ein Vergleich mit publizierten NMR-Daten bestätigt die Struktur der Verbindung **17**.

Tabelle 2.9 :  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von Rocaglamid AK, AO und AW (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Rocaglamid AK [16]	AO [17]	AW [18]
1	4.75 (bs, 6.1)	6.12 (bs)	4.84 (d, 6.0)
2	$\alpha$ : 2.80 (ddd, 14.0, 13.8, 6.1) $\beta$ : 2.08 (ddd, 13.8, 6.6, 1.5)	4.20 (m)	3.92 (dd, 6.0, 14.1)
3	3.99 (dd, 14.0, 6.6)	4.20 (m)	4.31 (d, 14.2)
5	6.32 (d, 2.0)	6.31 (d, 2.0)	6.31 (d, 1.9)
7	6.23 (d, 2.0)	6.16 (d, 2.0)	6.20 (d, 1.9)
2'/6'	7.15 (d, 9.0)	7.20 (d, 9.0)	7.16 (d, 9.0)
3'/5'	6.66 (d, 9.0)	6.66 (d, 9.0)	6.64 (d, 9.0)
2''/6''	7.04 (m)	6.95 (m)	7.04 (m)
3'', 4'', 5''	7.07 (m)	7.046 (m)	7.04 (m)
OCH <sub>3</sub> -6	3.91 (s)	3.86 (s)	3.86 (s)
OCH <sub>3</sub> -8	3.87 (s)	3.78 (s)	3.87 (s)
OCH <sub>3</sub> -4'	3.71 (s)	3.61 (s)	3.69 (s)
CO-OCH <sub>3</sub>		3.70 (s)	
OCHO		8.06 (s)	

Verbindung **18** zeigt den Molekülion-Peak bei  $m/z = 478$  im EI-Massenspektrum (s. Anhang; Abb. A.18). Eine sorgfältige Untersuchung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums weist darauf hin, daß die Verbindung **18** eine ähnliche Struktur zum bekannten Methylrocaglat **[2]** hat. Ein Vergleich der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Verbindung **18** mit jener von Methylrocaglat zeigt die Abwesenheit des Methyl-Signals der Carbonsäuremethylestergruppe bei Verbindung **18**. Das EI-Massenspektrum zeigt auch die Fragmentationen bei  $m/z = 460$  und  $m/z = 416$ , die für den Verlust einer Hydroxy

gruppe bzw. einer Carboxyl-Gruppe sprechen. Der Unterschied zum Methylrocaglat liegt darin, daß sich bei Verbindung **18** eine Carboxyl-Gruppe am C-2 statt einer Carbonsäuremethylestergruppe befindet. Der Unterschied im Molekulargewicht von 14 Masseneinheiten zwischen Verbindung **18** und Methylrocaglat [2] bestätigt den Strukturvorschlag. Damit ist Verbindung **18** als Rocaglaolsäure (Rocaglamid AW) identifiziert, die bereits für *A. elliptifolia* (Wang *et al.*, 1999) beschrieben wurde.

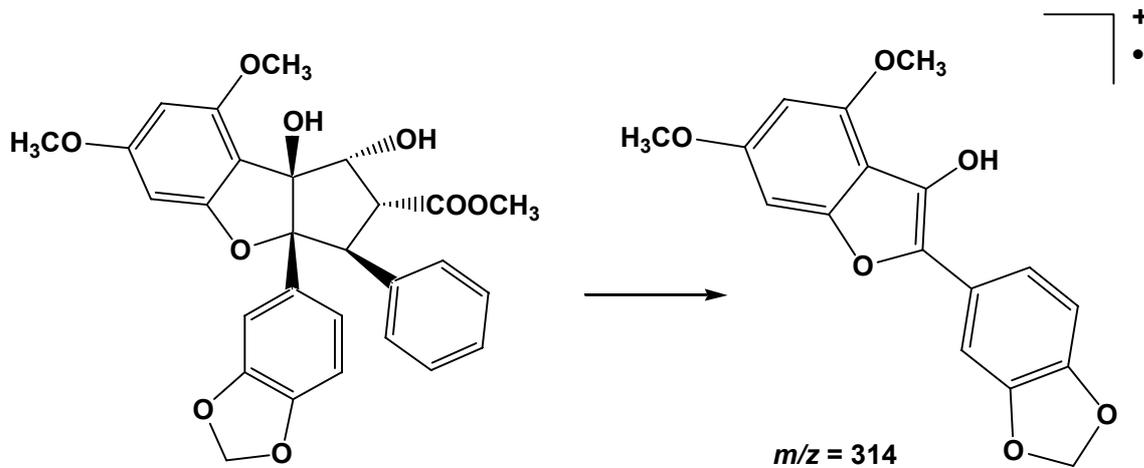
Verbindung **19** zeigt den Molekülion-Peak bei  $m/z = 506$  im EI-Massenspektrum. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum weist ein ABX-Spinsystem von drei aromatischen Protonen des Rings B auf (s. Anhang; Abb. A.19), wie er sich auch bei Rocaglamid D [4] findet. Im mittleren Feld erscheinen neben dem Signal für eine Methylgruppe der Carbonsäuremethylestergruppe am C-2 bei 3.66 ppm nur zwei Signale für Methoxygruppen bei 3.86 und 3.87 ppm.

Tabelle 2.10 :  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Rocaglamid AF (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Rocaglamid AF [19]	Position	AF [19]
1	4.89 ( <i>d</i> , 5.8)	2''/6''	6.97 ( <i>m</i> )
2	6.32 ( <i>dd</i> , 5.8, 14.2)	3''/4''/5''	7.08 ( <i>m</i> )
3	4.30 ( <i>d</i> , 14.2)	OCH <sub>3</sub> -6	3.86 ( <i>s</i> )
5	6.32 ( <i>d</i> , 2.0)	OCH <sub>3</sub> -6	3.87 ( <i>s</i> )
7	6.21 ( <i>d</i> , 2.0)	COOCH <sub>3</sub>	3.66 ( <i>s</i> )
2'	6.69 ( <i>d</i> , 1.7)	<u>O</u> CH <sub>2</sub> O	5.81 ( <i>s</i> )
5'	6.56 ( <i>d</i> , 8.3)		
6'	6.75 ( <i>dd</i> , 1.8, 8.2)		

Weiterhin erscheint ein Signal von zwei Protonen bei 5.81 ppm, das vermutlich von einer Methylendioxy-Gruppe stammt. Dies weist darauf hin, daß die Methoxygruppe am C-4' durch eine 3',4'-Methylendioxy-Gruppe ersetzt wurde. Die Anwesenheit der Methylendioxy-Gruppe in Verbindung **19** wurde mit Fragmentationen im EI-Massenspektrum bestätigt. Es zeigt den Basis-Peak bei  $m/z = 314$ , zwei Massen

einheiten kleiner als der Basis-Peak von Rocaglamid D [4] (s. Abb. 2.19). Der Unterschied von 14 Masseneinheiten des Moleküliions von Verbindung **19** im Vergleich zum Methylocaglat [2] ( $m/z = 492$ ) bestätigt, daß Verbindung **19** das 3',4'-Methyldioxy-Methylocaglat (Rocaglamid AF) ist, das bereits aus *A. elliptica* isoliert wurde (Cui *et al.* 1997).

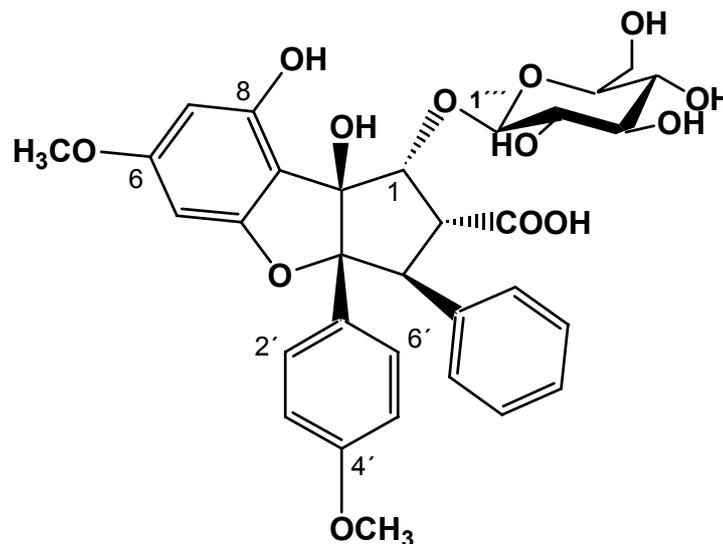


**Abb. 2.19 : Plausible Struktur des Fragment-Ions bei  $m/z = 314$  im EI-Massenspektrum des Rocaglamids AF [19]**

### 2.2.3.2. Neue Rocaglamid-Derivate

#### 1-O-Glucosid Rocaglaolsäure (Rocaglamid AX)

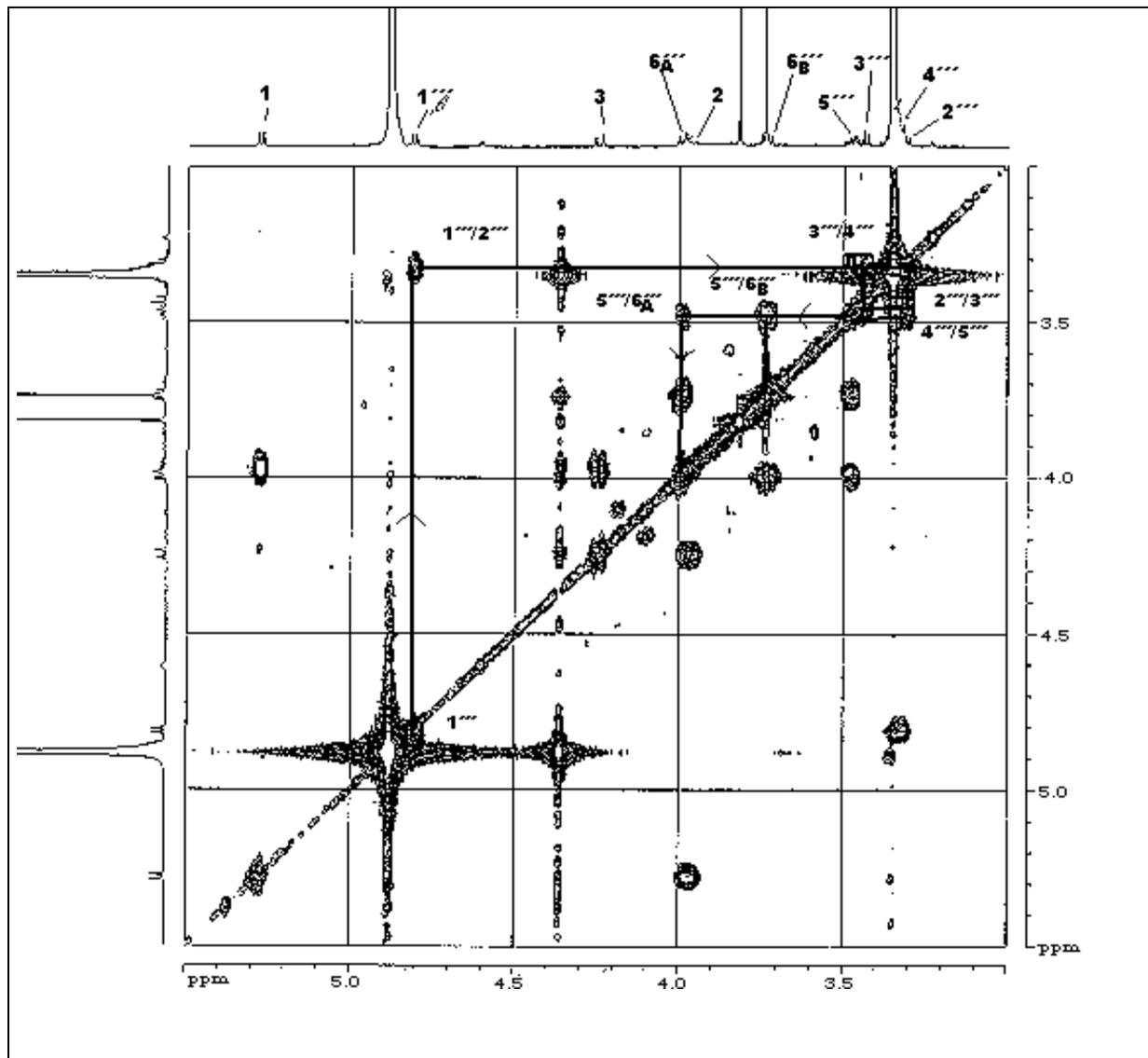
Aus der VLC-Fraktion V (polare Fraktion) wurde Verbindung **20** zusammen mit Rocaglaolsäure (Rocaglamid AW) isoliert. Sie hat den Molekülion-Peak bei  $m/z = 627$   $[M+H]^+$  im ESI-Massenspektrum. Die sorgfältige Untersuchung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums weist darauf hin, daß Verbindung **20** eine ähnliche Grundstruktur wie Rocaglaolsäure **[18]** hat. Ein Vergleich von beiden  $^1\text{H-NMR}$ -Daten zeigt den Verlust einer Methoxygruppe und eine Tieffeld-Verschiebung des H-1-Signals in Verbindung **20**. Die  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -long-range-Korrelationen von dem Proton-Signal bei 7.15 (2H, *d*,  $J = 8.9$  Hz, C2'/6') und dem Methoxy-Signal bei 3.81 ppm (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-4') mit einem Kohlenstoff-Signal bei 160.0 ppm (C-4') sind Hinweise, daß eine Methoxygruppe am Ring-B substituiert ist. Das Kohlenstoff-Resonanz bei 165.0 ppm, der eine Korrelation mit einem Methoxy-Signal bei 3.73 ppm im HMBC-Spektren indiziert, daß die andere Methoxygruppe nicht am C-8 sondern am C-6 des Rings A liegt (Nugroho *et al.*, 1997a; Nugroho *et al.*, 1997b; Güssregen *et al.*, 1997).



**[20] Rocaglamid AX**

**Abb. 2.20 : Aus *A. dasyclada* isolierte 1-O-Glycosid Rocaglaolsäure**

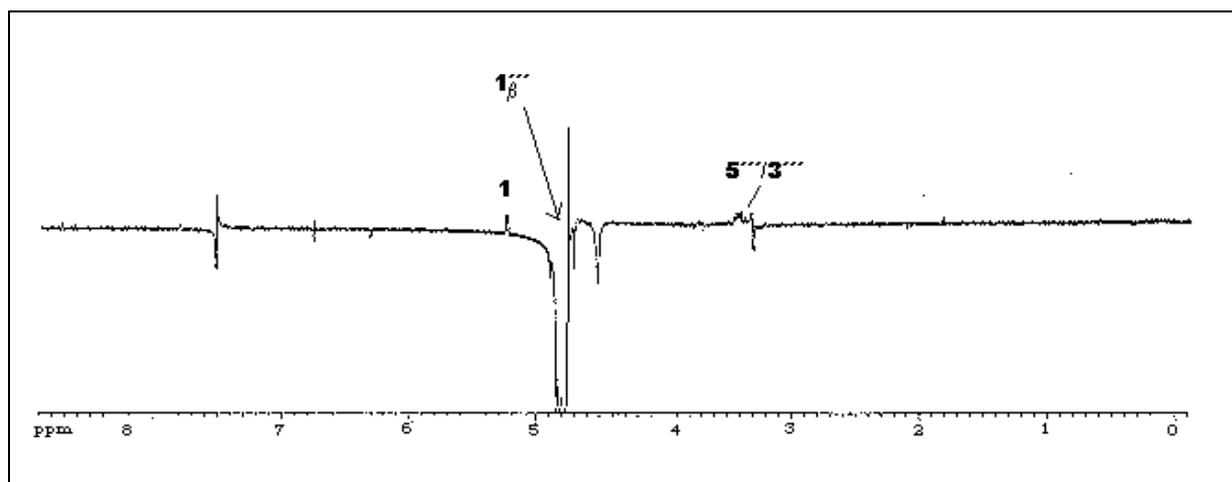
Weiterhin zeigt die Untersuchung des COSY-Spektrums, daß Verbindung **20** ein zusätzliches Spinsystem von mindestens sieben Protonen zwischen 3.30 und 4.90 ppm hat, das möglicherweise zu einem Zucker-Rest gehört (s. Abb. 2.21).



**Abb. 2.21 : <sup>1</sup>H, H-COSY-Spektrum des Rocaglamid AX; Ausschnitt aus dem Bereich der Glucose-Signale**

Das anomere Proton H-1'' des Zucker-Rests zeigt im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eine Resonanz bei 4.81 ppm (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz). Die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffs des Zucker-Restes ist anhand des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums (s. Tab. 2.11) als

$\beta$ -Glucose nachweisbar. Damit ist der Zucker-Rest als  $\beta$ -verknüpfte Glucose identifiziert. Die Verknüpfungposition der Glucose wurde durch die Einstrahlung auf H-1''' im 1-D NOE-Differenz-Experiment bestimmt. Es zeigt sich, daß der Glucose-Rest mit dem C-1 des Aglycons verknüpft ist (s. Abb. 2.22). So erklärt sich auch die Tieffeld-Verschiebung des H-1 (5.30 ppm) (s. Tab. 2.11). Die Struktur von Verbindung **20** kann damit als das 1-O-Glucosid der Rocaglaolsäure identifiziert werden.



**Abb. 2.22 : NOE-Differenzspektrern des Rocaglamids AX zur Ermittlung der Substitution des Glucose-Rests**

Tabelle 2.11 :  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von Rocaglamid AX (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	Rocaglamid AX [20]	Position	AX [20]
1	5.30 ( <i>d</i> , 8.2)	1'''	4.81 ( <i>d</i> , 7.7)
2	3.96 ( <i>dd</i> , 8.3, 13.8)	2'''	3.32 ( <i>m</i> )
3	4.30 ( <i>d</i> , 14.2)	3'''	3.44 ( <i>d</i> , 9.1)
5	6.24 ( <i>d</i> , 2.2)	4'''	3.33 ( <i>m</i> )
7	6.06 ( <i>d</i> , 2.2)	5'''	3.47 ( <i>m</i> )
2'/6'	7.15 ( <i>d</i> , 8.9)	6'''	A : 3.99 ( <i>dd</i> , 2.2, 12.3)
3'/5'	6.74 ( <i>d</i> , 8.9)		B : 3.73 ( <i>dd</i> , 6.9, 12.4)
2''/6''	6.92 ( <i>m</i> )	OCH <sub>3</sub> -6	3.73 ( <i>s</i> )
3''/4''/5''	7.08 ( <i>m</i> )	OCH <sub>3</sub> -4'	3.81 ( <i>s</i> )

### 2.2.3.3. Strukturell verwandte Verbindungen des Rocaglamids

Unter den sekundären Metaboliten aus der Gattung *Aglaia* kommen auch charakteristische Bisamid-Verbindungen vor. Diese liegen entweder als Putrescin (1,4-Butandiamin) oder als entsprechendes Pyrrolidin, wie Odorin [14] (s. Abb. 2.14) vor und sind durch zwei Amid-Bindungen mit Zimtsäure und 2-Methylbuttersäure verknüpft. Diese Strukturen sind auch häufig in anderen sekundären Metaboliten, vor allem in Aglain-, Aglaforbesin- und Forbaglin-Derivaten, als Diamin-Rest inkorporiert (Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1999; Bacher *et al.*, 1999 und Inada *et al.*, 2000). Solche Bisamide sind in den zur Gattung *Aglaia* gehörenden Pflanzen, soweit untersucht, meistens in relativ großen Konzentrationen enthalten (Haupt-Verbindungen). Aus *A. dasyclada* wurden ebenfalls Bisamid-Verbindungen isoliert. Sie repräsentieren einen Putrescin-Bisamid-Grundkörper und kommen sowohl als eigene Moleküle als auch als Teilstruktur von Aglain- Aglaforbesin- und Forbaglin-Derivaten vor.

#### Zimtsäure-Putrescin-Bisamid : Dasyclamid

Dasyclamid [21] wurde als weißes Nadelkristall isoliert. Die Summenformel  $C_{18}H_{24}N_2O_3$  wurde durch HRESI-MS (Hochauflösung-ESI-Massenspektrum) bestimmt. Mit Hilfe der COSY-Spektren (s. Abb. 2.23) sind drei verschiedene Spinn-Systeme im  $^1H$ -NMR-Spektrum zu erkennen. Die Signale des *mono*-substituierten Benzolrings liegen zwischen 7.35 - 7.57 ppm (5H) mit einem zusätzlichen Paar Dublett-Signalen bei 6.60 und 7.52 ppm ( $J = 15.8$  Hz, 2H), die zusammen zum Zimtsäure-Rest gehören. Des weiteren sind Multiplett-Signale von acht Protonen des Putrescin-Bisamids bei 3.30 (4H) und 1.60 ppm (4H) zu finden. Schließlich liegen ein Spin-System von sechs Protonen in Resonanz bei 6.34 ppm (1H, *tq*,  $J = 6.0, 1.6$  Hz), 4.23 ppm (2H, *dq*,  $J = 6.0, 0.9$  Hz) und 1.83 ppm (3H, *dt*,  $J = 1.6, 0.9$  Hz) vor.

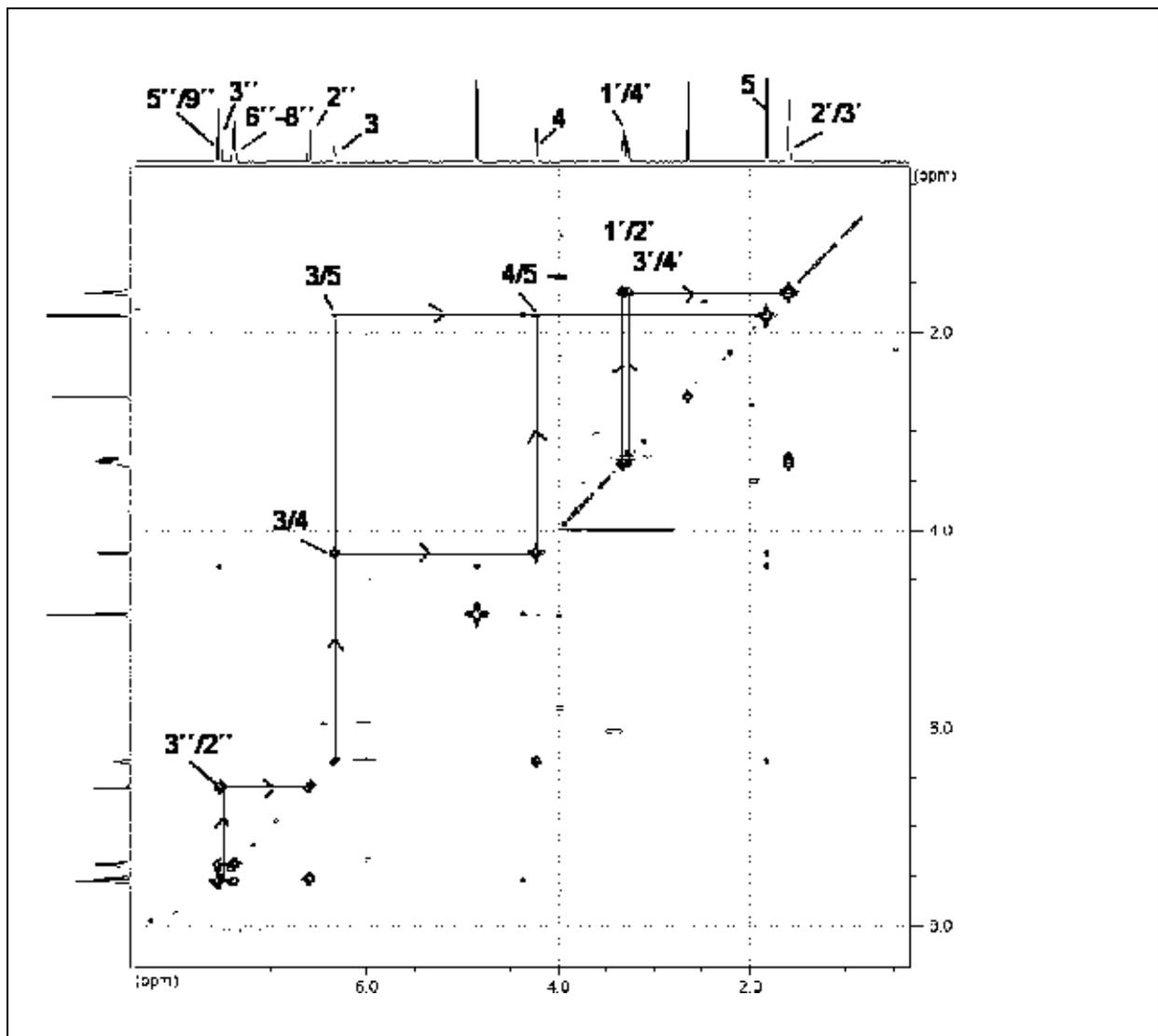
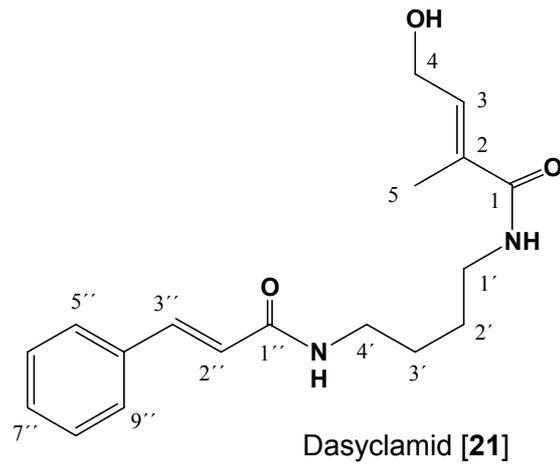
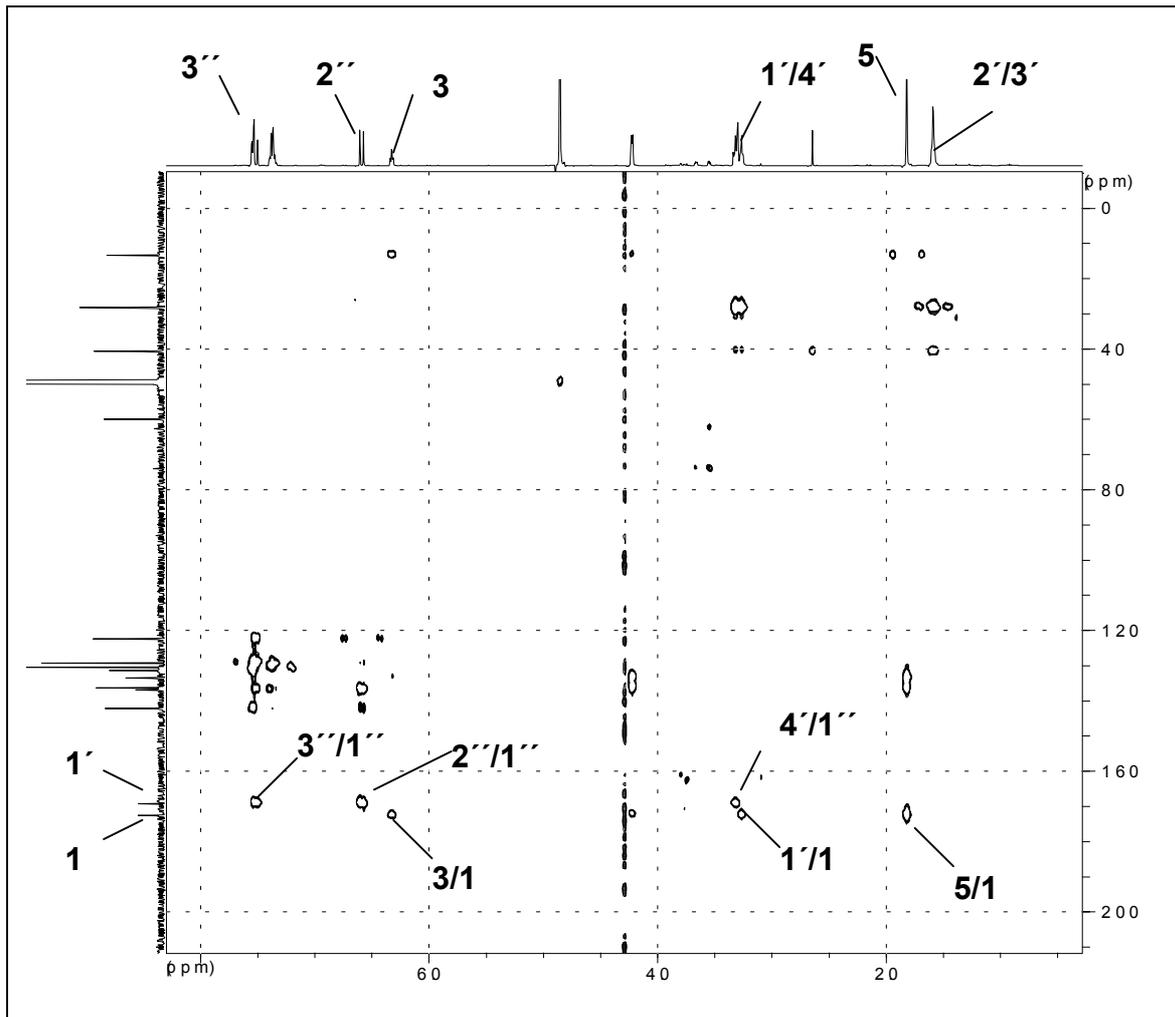


Abb. 2.23 :  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum des Dasyclamids [21]



**Abb. 2.24 : HMBC-Spektrum des Dasyclamids; Ermittlung der Amidbindungen**

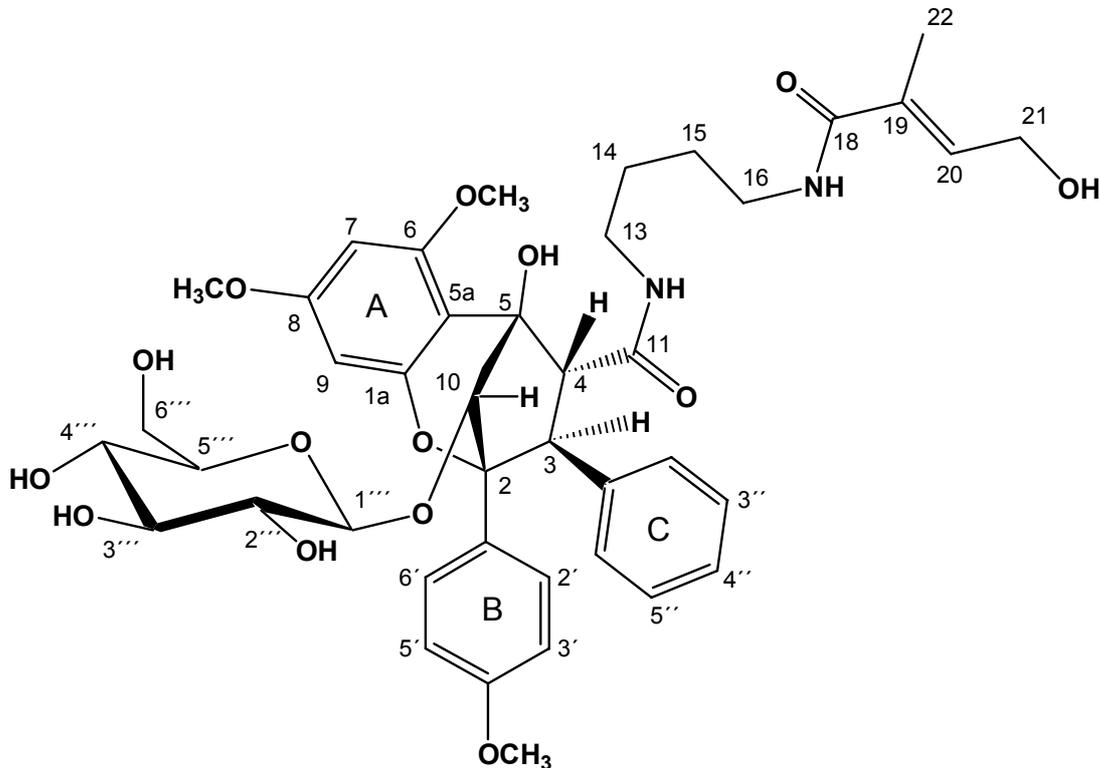
Dieses Signal-Muster ist fast gleich wie das des Putrescin-Bisamids, Grandiamid B, das bereits aus *A. grandis* (Inada *et al.*, 2000) identifiziert wurde. Der Unterschied im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Dasyclamid im Vergleich mit jenem von Grandiamid B besteht nur im Verlust eines Methyl-Signals des Tigloylsäure-Rests. Das Molekulargewicht von Dasyclamid ist 16 Masseneinheiten größer als das von Grandiamid B (Molekülion-Peak bei  $m/z = 300$ ) und das im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ins tiefere Feld verschobene Protonen-Signal der Methylen-Gruppe bei 4.23 ppm bestätigen die Anwesenheit einer Hydroxygruppe am C-4 in Dasyclamid. Damit wurde die Anwesenheit des 4-Hydroxy-Tigloylsäure-Rests nachgewiesen.

Weitere Untersuchungen durch HMQC- und HMBC-Spektren (s. Abb. 2.24) weisen darauf hin, daß das Putrescin-Bisamid durch zwei Amid-Bindungen mit beiden oben genannten Säure-Resten verknüpft ist. Die stereochemischen Eigenschaften von H-2'' und H-3'' wurden anhand ihrer Kopplungskonstanten,  $J = 15.7$  Hz, als *trans* identifiziert, während die Methylgruppe am C-2, wie die ROESY-Korrelation zeigt, ebenfalls in *trans*-Stellung gegenüber H-3 liegt.

Tabelle 2.12 :  $^1\text{H}$ - (400 MHz) und  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) NMR-Daten von Dasyclamid [21]  
( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	HMBC	ROESY
1	172.5 s			
2	133.5 s			
3	136.2 d	6.34 ( <i>tq</i> , 6.0, 1.6)	1, 5	5 <sup>a</sup>
4	60.0 t	4.23 ( <i>dq</i> , 6.0, 0.9)	2, 3	5
5	13.5 q	1.83 ( <i>dt</i> , 1.6, 0.9)	1, 3, 2	4, 3 <sup>a</sup>
1'	40.8 t	3.30 ( <i>m</i> )	1, 2'3'	
2'	28.4 t	1.60 ( <i>m</i> )	3', 1'4'	
3'	28.4 t	1.60 ( <i>m</i> )	1', 4', 2'	
4'	38.8 t	3.30 ( <i>m</i> )	1'', 2'3'	
1''	169.1 s			
2''	122.4 d	6.60 ( <i>d</i> , 15.8)	4'', 1'', 3''	
3''	142.1 d	7.52 ( <i>d</i> , 15.8)	1'', 5''9'', 2'', 4''	
4''	136.8 s			
5''/9''	129.3 d	7.55 ( <i>m</i> )	3'', 7''	
6''/8''	130.4 d	7.38 ( <i>m</i> )	4''	
7''	131.3 d	7.38 ( <i>m</i> )	5''9''	

<sup>a</sup> Korrelation zwischen H-3 und H-5 ist schwächer als H-4 und H-5.

Aglain E [22]

[22] Aglain E

**Abb. 2.25 : Glycosid-Derivat einer Verbindung des Aglain-Typs mit Putrescin-Bisamid als Seiten-Kette aus *A. dasyclada***

Verbindung **22** ist eine Verbindung vom Aglain-Typ, die zum ersten Mal aus *A. argentea* identifiziert worden ist (Dumontet *et al.*, 1996). Im FAB-Massenspektrum hat Verbindung **22** einen Molekülion-Peak bei  $m/z$  807  $[M-H]^-$  (s. Anhang; Abb. A22). Aus dem HRQTOF-Massenspektrum wurde die Summenformel  $C_{42}H_{52}N_2O_{14}$  ( $m/z$  810.3572 amu; berechnet als  $C_{42}H_{52}DN_2O_{14}$ , 810.3559 amu) ermittelt. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum erscheinen Resonanzen für drei aromatische Ringe und drei Methoxygruppen ähnlich wie bei Rocaglamid-Derivaten. Während beim Rocaglamid drei Methin-Signale erscheinen, befinden sich hier nur zwei Methin-Signale für H-3 und H-4 bei 4.09 ppm ( $d$ ,  $J = 9.7$  Hz) bzw. 3.38 ppm ( $d$ ,  $J = 9.7$  Hz) und ein Singulett bei 5.05 ppm, eine charakteristische Resonanz für H-10 des Aglain-Typs-Verbindungen.

Ein sorgfältige Untersuchung sowohl der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten als auch der CO-SY- und HMBC-Spektren, im Vergleich mit den NMR-Daten des Dasyclamids [20], weist die Anwesenheit von 4-Hydroxy-Tigloylsäure- und eines Putrescin-Rest im Molekül nach (s. Tab. 2.13). Diese Seitenkette ist nach der Long-Range-Korrelation

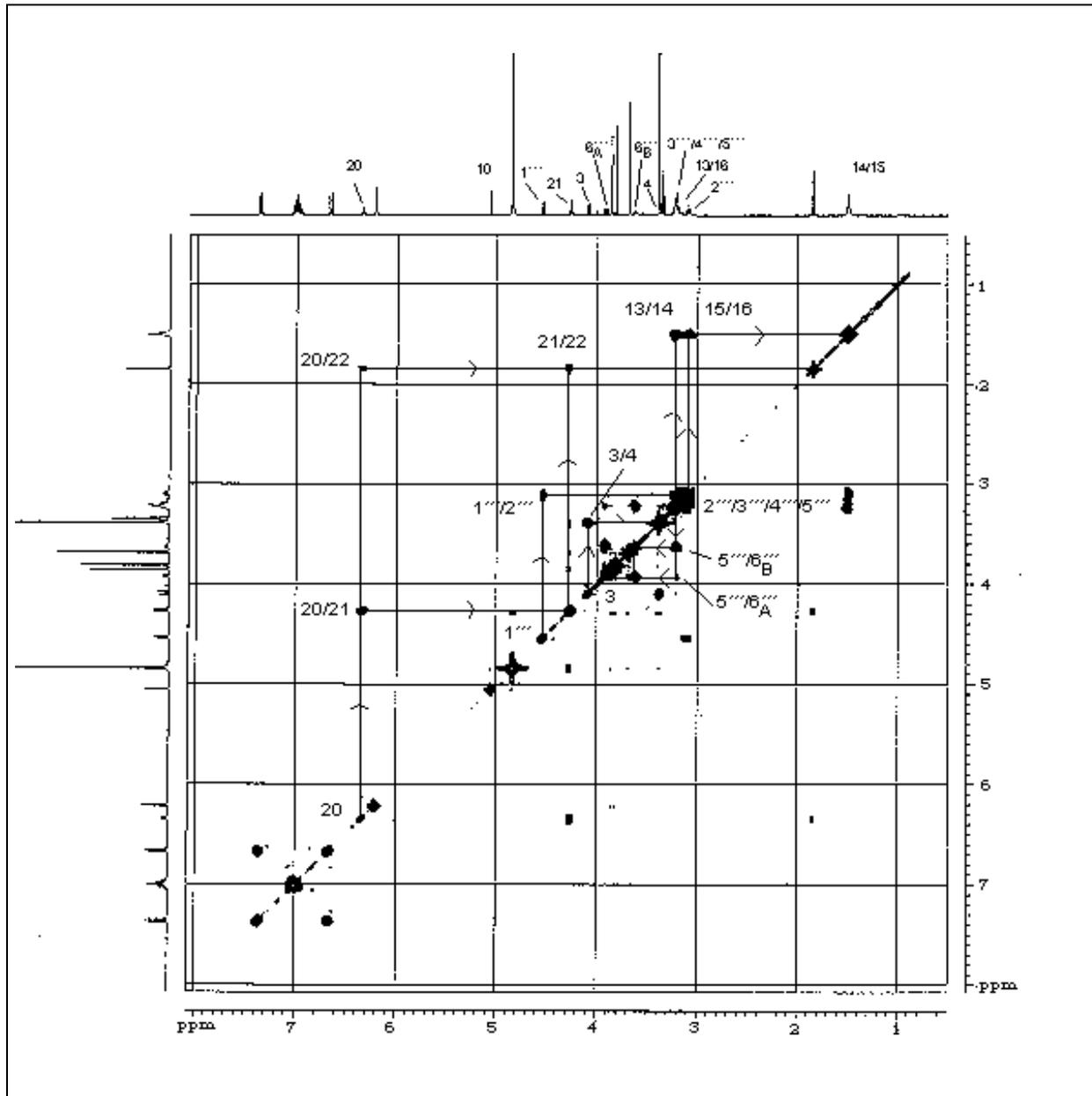
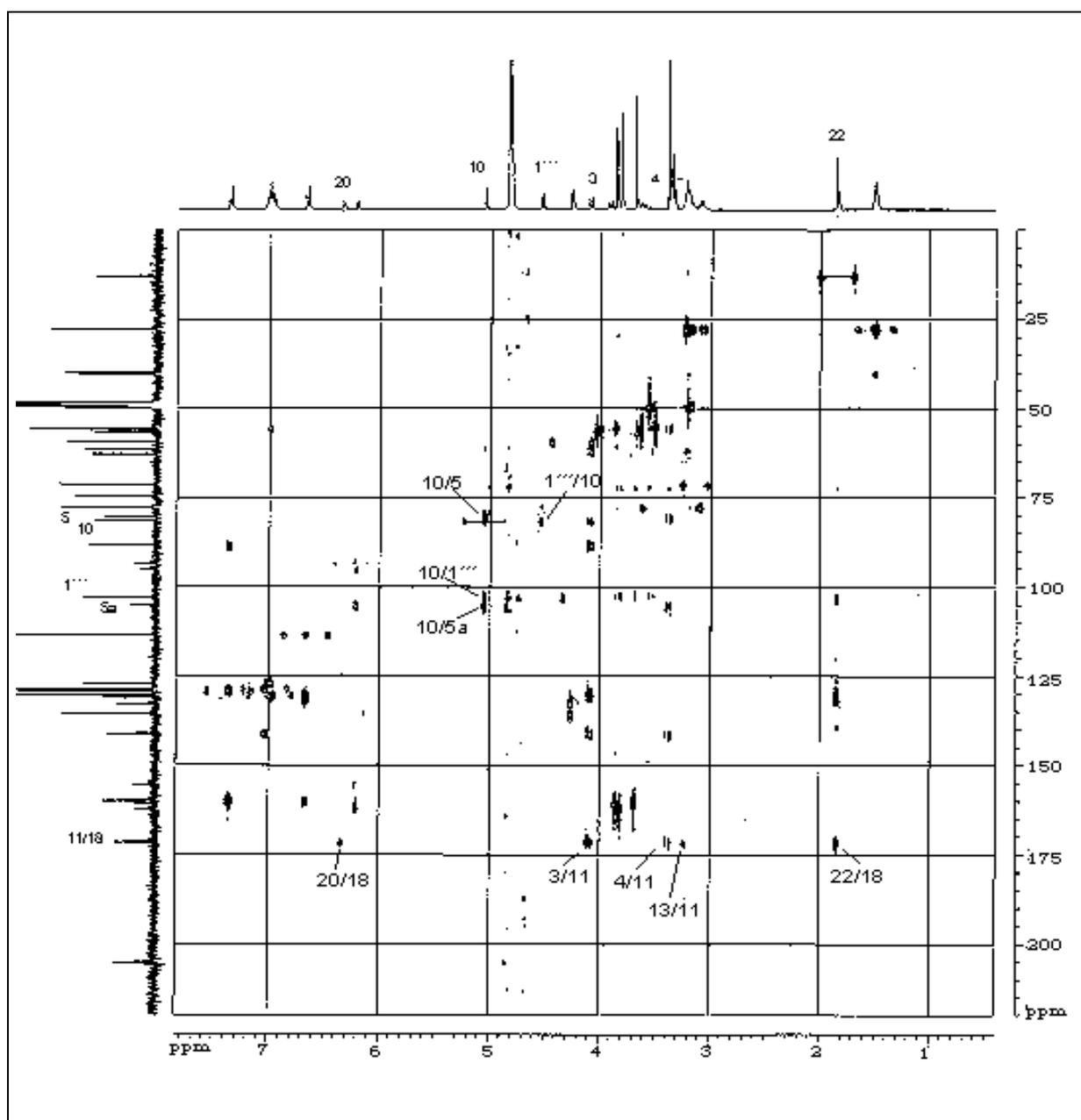


Abb. 2.26 : H, H-COSY-Spektrum des Aglains E : Ermittlung der Putrescin-Seitenkette und das Zucker-Rests.

zwischen H-3 bzw. H-4 und C-11 im HMBC-Spektrum mit C-4 verknüpft. Die Anwesenheit von Glucose wird durch Kohlenstoff-Signale im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum bei 103.3 (C-1'''), 74.7 (C-2'''), 78.0 (C-3'''), 71.6 (C-4'''), 77.9 (C-5''') und 63.0 ppm (C-6''') in Verbindung mit entsprechenden Signalen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zwischen 3.09 und 4.54 ppm angezeigt.



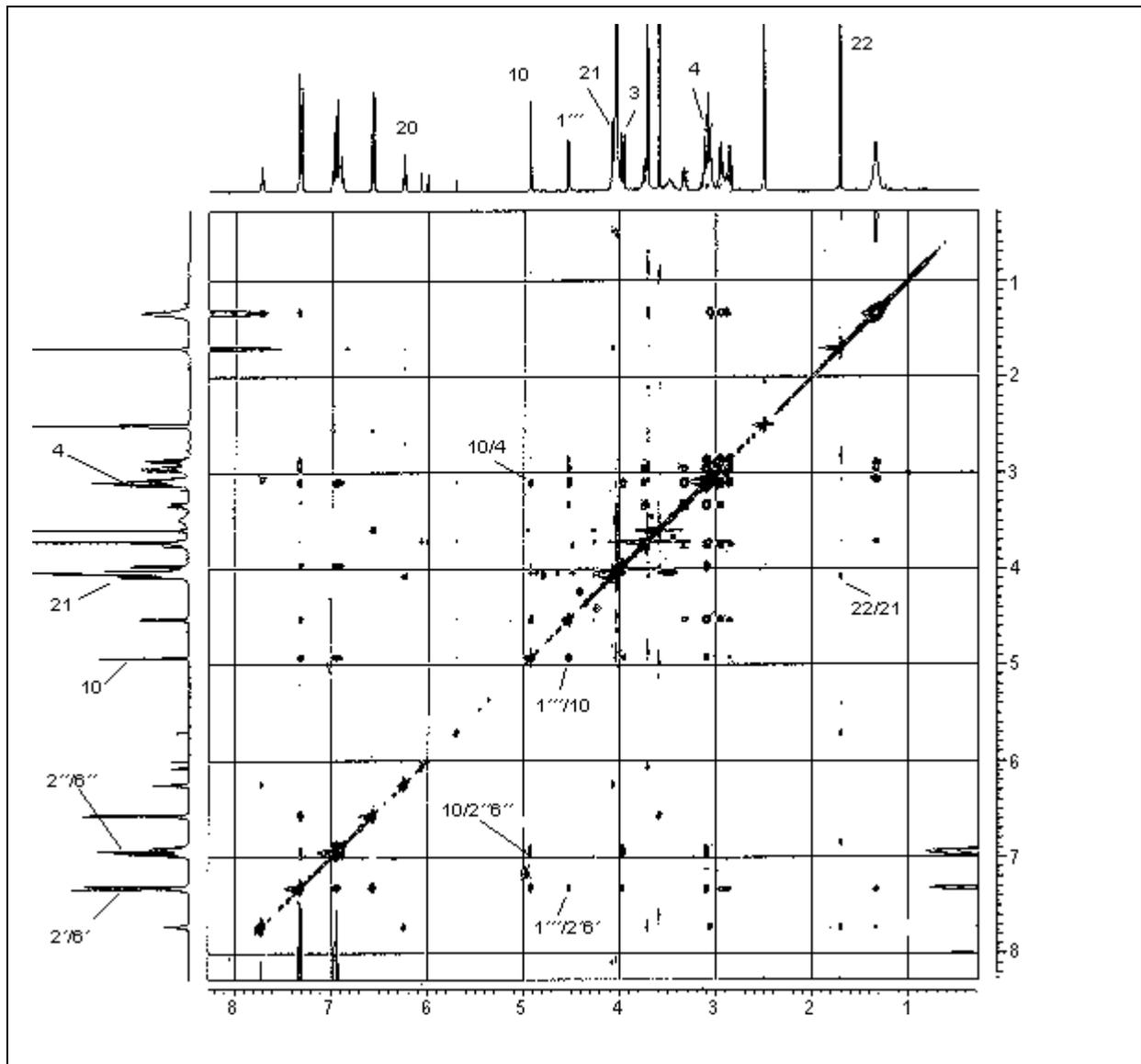
**Abb. 2.27 : HMBC-Spektrum des Aglains E : Ermittlung der Amid-Bindungen und der 10-O-Glycosid- Verknüpfung**

Tabelle 2.13 :  $^1\text{H}$  (500 MHz) und  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) NMR -Daten von Aglain E [22]  
( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^a$	HMBC <sup>a</sup>	ROESY <sup>b</sup>
1a	155.6 s			
2	88.5 s			
3	55.5 d	4.10 (d, 9.7)	10, 2''/6'', 11, 4, 2, 1''	2'/6', 2''/6''
4	61.8 d	3.38 (d, 9.7)	10, 5a, 1'', 3, 5, 11	10, 2''/6'', NH-12
5	80.7 s			
5a	105.4 s			
6	161.1 s			
7	93.5 d	6.21 (d, 2.4)	5a, 9, 6, 8	OCH <sub>3</sub> -6, OCH <sub>3</sub> -8
8	162.3 s			
9	95.2 d	6.22 (d, 2.4)	5a, 1a, 7, 8	OCH <sub>3</sub> -8
10	81.7 d	5.05 (s)	1''', 5a, 5	4, 2''6'', 1'''
11	171.9 s			
13	40.0 t <sup>d</sup>	A : 3.17 (m) B : 3.07 (m)	14, 15	
14	27.8 t	1.50 (m)	16, 13	
15	27.8 t	1.50 (m)	13, 16	
16	40.4 t <sup>d</sup>	3.22 (m)	14, 18, 15	
18	171.6 s			
19	133.0 s			
20	135.7 d	6.34 (qt, 0.8, 6.1)	18	NH-17
21	59.5 t	4.27 (dd, 0.8, 6.1)		22
22	13.0 q	1.85 (d, 0.8)	18, 20, 19	21
1'	131.2 s			
2'/6'	129.4 d	7.37 (d, 8.9) <sup>c</sup>	2, 4', 3'/5'	3
3'/5'	113.7 d	6.67 (d, 8.9) <sup>c</sup>	1', 2'/6', 4'	OCH <sub>3</sub> -4'
4'	160.0 s			
1''	141.2 s			
2''/6''	130.6 d	7.00 (m)	3, 1''	3, 4, 10
3''/5''	128.8 d	7.00 (m)		
4''	127.3 d	7.00 (m)		
1'''	103.3 d	4.54 (d, 7.9)	10, 3'''/5'''	10, 3''', 5'''
2'''	74.7 d	3.11 (dd, 7.9, 8.9)		
3'''	78.0 d <sup>d</sup>	3.22 (m)		1'''
4'''	71.6 d	3.22 (m)		
5'''	77.9 d <sup>d</sup>	3.22 (m)		1'''
6'''	63.0 t	A : 3.92 (dd, 1.3, 11.6) B : 3.62 (dd, 6.1, 11.6)		
OCH <sub>3</sub> -6	56.5 q	3.86 s	6	7
OCH <sub>3</sub> -8	55.8 q	3.81 s	8	7, 9
OCH <sub>3</sub> -4'	55.5 q	3.68 s	4'	3'/5'
NH-12		7.31 t <sup>b</sup>		4
NH-17		7.74 t <sup>b</sup>		20

<sup>a</sup> Lösungsmittel :  $\text{CD}_3\text{OD}$ . <sup>b</sup> Lösungsmittel :  $\text{DMSO-d}_6$ . <sup>c</sup> Signale erscheinen als AA'BB'-Spinsystem. <sup>d</sup> Umtauschbare Signale

Weiterhin deutet die Resonanz des anomeren Protons bei 4.54 ppm (1H, *d*,  $J = 7.9$  Hz) auf eine  $\beta$ -verknüpfte Glucose am Aglykon hin. Die ausführliche Analyse der HMBC-Spektren liefert die Korrelation des anomeren Protons H-1''' mit C-10 (s. Abb. 2.27). Damit wird bewiesen, daß der Glucose-Rest am C-10 O-glycosidisch substituiert ist. Infolgedessen wurde die Struktur der Verbindung **22** als 10-O-Glycosid-Derivat einer Verbindung des Aglain-Typs identifiziert. Es ist das erste Aglain-Glycosid aus der Gattung *Aglaia*, mit einer Putrescin- und Hydroxy-Tigloylsäure-Gruppe statt einem Odorin-Rest als Amid-Substituent.

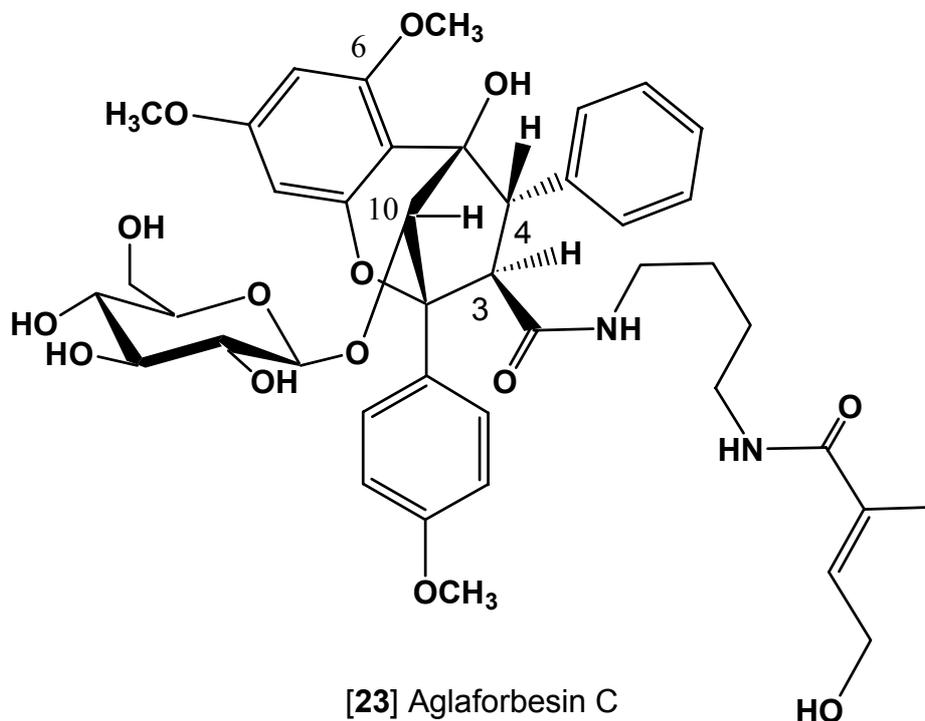


**Abb. 2.28** : ROESY-Spektrum (in DMSO) des Aglains E : Ermittlung der relativen Konfiguration am C-3, C-4 und C-10, sowie der *trans*-Stellung der Methylgruppe am C-19 gegenüber H-20

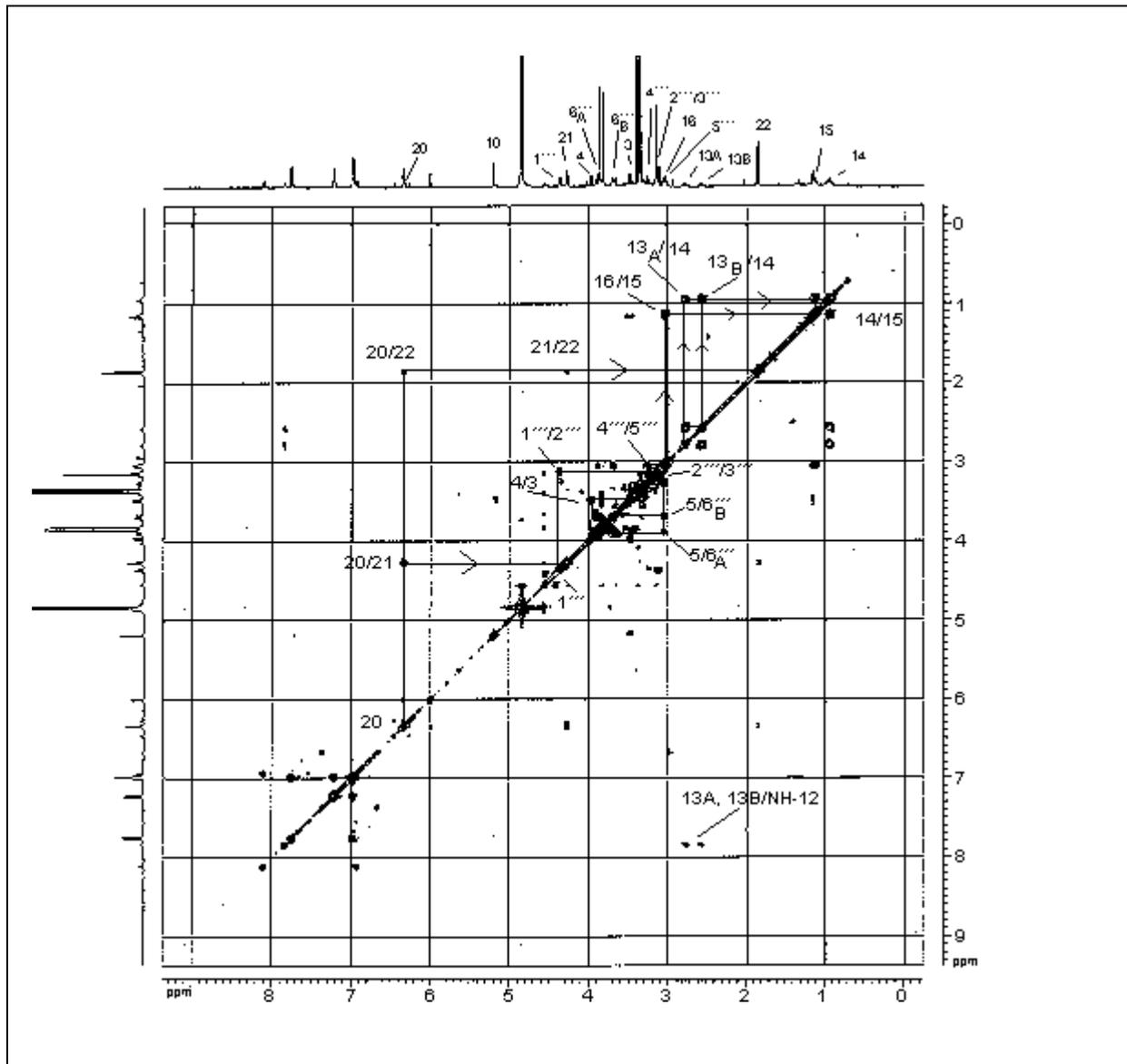
Die relative Konfiguration der Verbindung **22** wurde durch die Analyse der ROESY-Spektren bestätigt (s. Abb. 2.28). In den ROESY-Spektren wurde eine Korrelation von Proton H-10 mit H-4, aber nicht mit H-3 beobachtet. Es unterstützt die relative Konfiguration von H-3, H-4 und H-10, wie in Abb. 2.25 gezeigt wird.

### Aglaforbesin C [23]

Das FAB-Massenspektrum der Verbindung **23** liefert den Molekülion-Peak bei 807  $[M-H]^-$  (s. Anhang; Abb. A23). Die  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektren (s. Tab. 2.14) sind ebenfalls vergleichbar mit denen von Verbindung **22**, die entsprechenden Signale für ein Aglain-Grundgerüst zeigen. Einen Unterschied zeigt das Signal für die Methoxygruppe am C-6, das zum höheren Feld bei 3.16 ppm verschoben ist. Diese Hochfeldverschiebung deutet darauf hin, daß der Phenylring C in der Nähe der am C-6



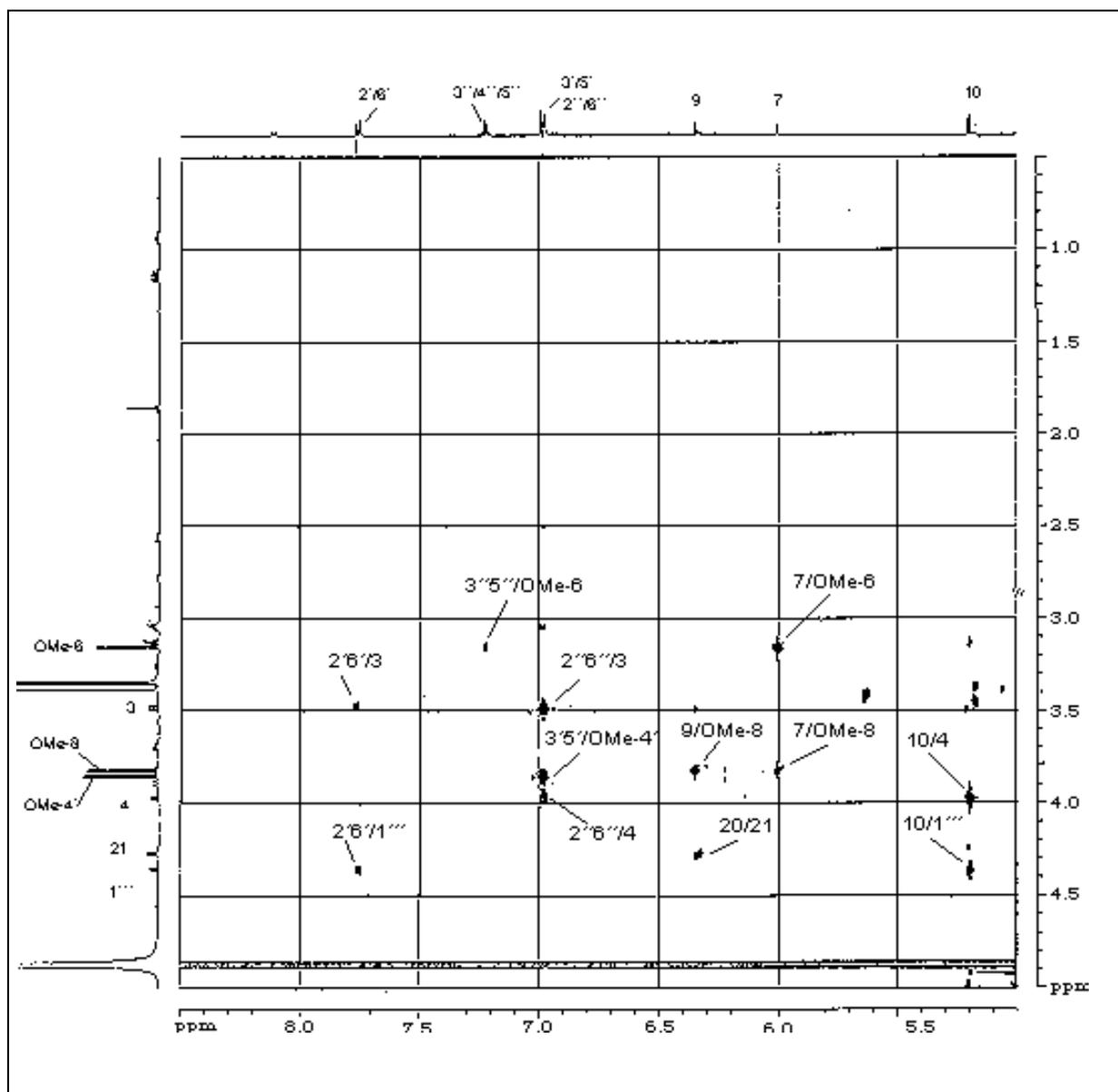
**Abb.2.29 : Glycosid-Derivat einer Verbindung vom Aglaforbesin-Typ mit Putrescin-Bisamid als Seiten-Kette aus *A. dasyclada***



**Abb. 2.30 : H, H-COSY-Spektrum des Aglaforbesin C : Ermittlung der Putrescin-Seitenkette und des Zucker-Restes**

befindlichen Methoxygruppe liegt (Dumontet *et al.*, 1996). Verbindung **23** hat deshalb das gleiche Grundgerüst wie Verbindungen des Aglaforbesin-Typs, in denen der Phenylring C nicht mit C-3 sondern mit C-4 verknüpft ist. Die HMBC-Daten (s. Tab. 2.14) unterstützt diese Teilstruktur. Weiterhin liegen auch nach der Analyse der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zusammen mit 2D-NMR-Daten (COSY und HMBC, s. Abb. 2.30 bzw. Tab. 2.14) Signale für Putrescin-, und Hydroxy-Tigloylsäure-Reste vor, wie sie ähnlich auch bei Verbindung **22** zu beobachten sind. Die entsprechenden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des Zucker-Restes liefern einen Beweis dafür, daß es sich um

die gleiche Struktur in derselben Konfiguration wie der Zucker-Substituent bei Verbindung **22** handelt. Verbindung **23** ist deshalb das erste Glycosid-Derivat des Aglaforbesins mit einem Putrecin- und Hydroxy-Tigloylsäure-Rest am C-3. Die relative Konfigurationen des H-3, H-4 und H-10, sowie der Stellung des Rings C wurden anhand von ROESY-Spektren bestimmt (s. Abb. 2.31).



**Abb. 2.31 : ROESY-Spektrum des Aglaforbesin C: Ermittlung der relativen Konfiguration am C-3, C-4 und C-10, sowie der Stellung des Rings C**

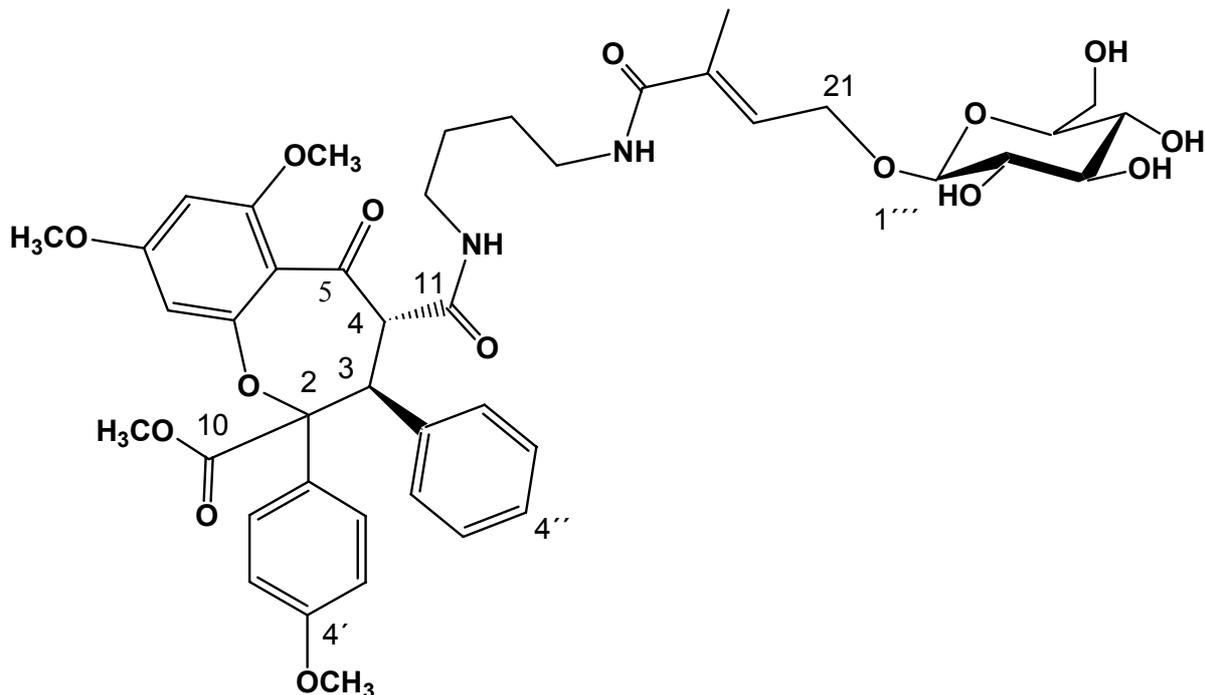
Tabelle 2.14 :  $^1\text{H}$ - (400 MHz) und  $^{13}\text{C}$ - (100 MHz) NMR-Daten von Aglaforbesin C  
 [23] ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	HMBC	ROESY
1a	154.7 s			
2	86.4 s			
3	59.9 d	3.49 (d, 9.8)	10, 1'', 11, 2, 4	2'/6', 2''/6''
4	57.7 d	3.97 (d, 9.8)	5a, 11, 2''/6'', 3, 5, 1''	10, 2''/6''
5	82.3 s			
5a	106.5 s			
6	162.0 s			
7	93.6 d	6.00 (d, 2.2)	5a, 9, 6, 8	OCH <sub>3</sub> -6, OCH <sub>3</sub> -8
8	162.3 s			
9	95.6 d	6.34 (d, 2.2)	5a, 7, 1a, 8	OCH <sub>3</sub> -8
10	78.7 d	5.19 (s)	4, 5a, 1', 1''', 5	4, 1'''
11	172.0 s			
13	39.9 t	A : 2.78 (dd, 7.0, 14.0) B : 2.57 (dd, 7.0, 14.0)	11 11	
14	27.1 t	0.99 (m)	13, 15	
15	27.5 t	1.14 (m)	14, 16	
16	40.1 t	3.05 (m)	18	
18	172.0 s			
19	133.0 s			
20	135.7 d	6.34 (qt, 1.0, 6.0)	18	
21	59.5 t	4.27 (d, 6.0)	19, 20	22
22	13.0 q	1.86 (d, 1.0)	18, 20, 19	21
1'	130.7 s			
2'/6'	129.1 d	7.75 (d, 8.8) <sup>a</sup>	2, 4'	3, 1'''
3'/5'	114.1 d	6.98 (d, 8.8) <sup>a</sup>	1', 4'	OCH <sub>3</sub> -4'
4'	160.9 s			
1''	138.0 s			
2''/6''	129.9 d	6.98 (m)	4''	3, 4
3''/5''	128.8 d	7.22 (m)	1'', 2''/6''	
4''	128.2 d	7.22 (m)	2''/6''	
1'''	101.9 d	4.37 (d, 7.8)	10	10, 2'/6', 3''', 5'''
2'''	74.8 d	3.15 (m)	4'''	
3'''	77.8 d	3.15 (m)	4'''	1'''
4'''	71.4 d	3.27 (t, 9.0)		6'''A, 6'''B
5'''	77.8 d	3.05 (m)	4'''	1'''
6'''	62.9 t	A : 3.89 (dd, 2.3, 12.0) B : 3.69 (dd, 5.8, 12.0)	5'''	4'''
OCH <sub>3</sub> -6	56.2 q	3.16 (s)	6	7
OCH <sub>3</sub> -8	55.8 q	3.82 (s)	8	7, 9
OCH <sub>3</sub> -4'	55.8 q	3.85 (s)	4'	3'5'

<sup>a</sup> Signale erscheinen als AA'BB'-Spinsystem.

Forbaglin C [24]

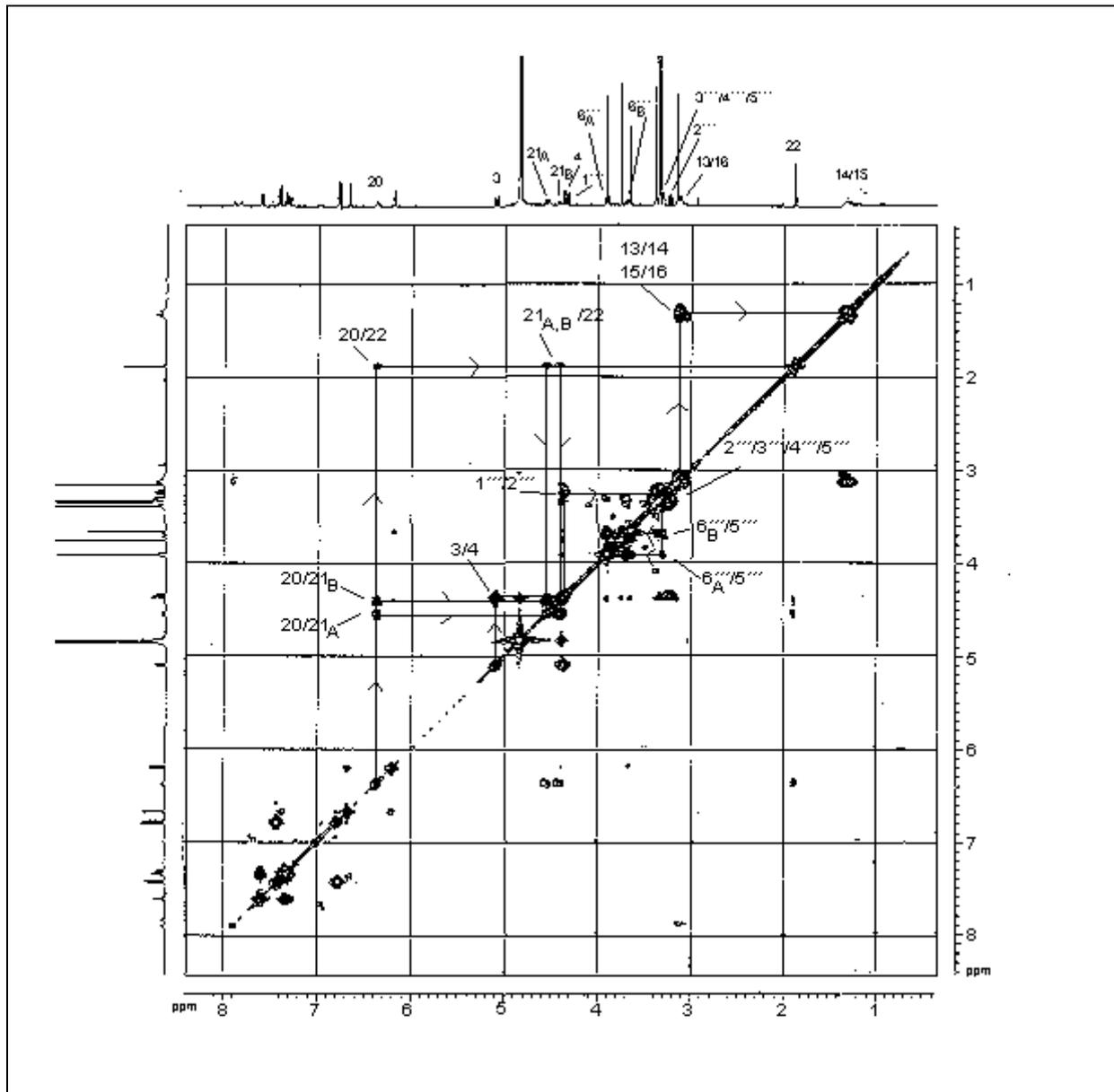
Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Verbindung **24** zeigen ähnliche Signale wie bei Aglain- bzw. Aglaforbesin-Derivaten (s. Anhang; Abb. A.24). Der Unterschied liegt nur darin, daß die Protonen-Signale H-3 und H-4 zum tiefen Feld hin verschoben sind und bei 5.20 (d,  $J = 10.3$  Hz) und 4.37 ppm (d,  $J = 10.3$  Hz) erscheinen. Die Abwesenheit von Signalen für H-10, C-10 und C-5, wie sie für Verbindungen des Aglain-Typs charakteristisch sind, weist darauf hin, daß die C-10-Kreuzbrücke bei Verbindung **24** nicht vorhanden ist. Statt dessen besitzt Verbindung **24** nach HMBC-Daten, vor allem die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelation zwischen H-4 und C-5 sowie zwischen H-3 und C-2 (s. Tab. 2.15), einen sauerstoffhaltigen Siebenring. Eine solche Grundstruktur wurde bereits früher identifiziert und als Forbaglin-Typ bezeichnet (Dumontet *et al.*, 1996). Die ausführliche Untersuchungen der HBC-Spektren (s. Tab. 2.15) bestätigen das vermutete Grundgerüst.



[24] Forbaglin C

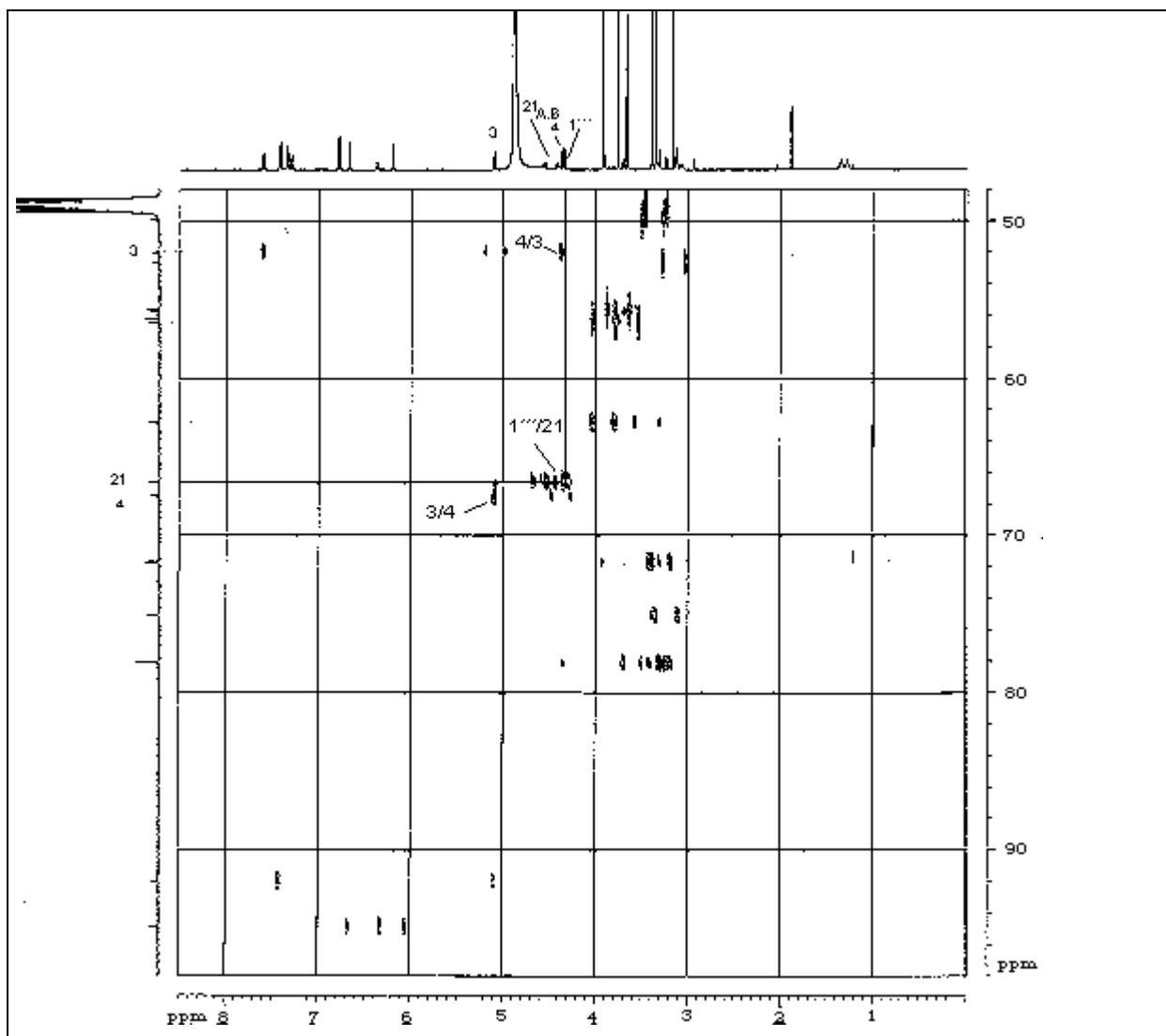
**Abb. 2.32 : Glycosid-Derivat von Forbaglin-Typs-Verbindung mit Putrescin-Bisamid als Seiten-Kette aus *A. dasyclada***

Weitere Hinweise liefern die Kohlenstoff-Signale bei 194.0 (s) und 172.0 ppm (s), die zu den Keto-Gruppen des C-5 bzw. C-10 gehören. Die Carbonsäuremethylester-Gruppe am C-2 wurde durch die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -long-range-Korrelation zwischen dem Protonen-Signal der Methoxygruppe am C-10 bzw. des H-3 und dem Signal des C-10 nachgewiesen.



**Abb. 2.33 : H, H-COSY-Spektrum des Forbaglins C : Ermittlung der Putrescin-Seitenkette und des Zucker-Restes**

Die Protonen-Signale eines Zucker-Restes, vor allem das anomere Protonen-Signal bei 4.35 ppm ( $d$ ,  $J = 7.8$  Hz, H-1''') stimmen mit einem  $\beta$ -Glucose-Rest wie bei den Verbindungen **22** und **23** völlig überein. Die HMQC- und HMBC-Korrelationen führen ebenfalls zur Identifizierung der Hydroxy-Tigloylsäure- und des Putrecin-Restes, die miteinander durch Amid-Bindung verknüpft sind, wie es auch als partielle Struktur bei der Verbindung **22** und **23** zu finden ist. Weiterhin zeigt das anomere Proton des Glucose-Rests eine  $^3J_{CH}$ -Korrelation mit dem C-21 des Hydroxy-Tigloylsäure-Rests, und weist damit darauf hin, daß die Glucose mit dem C-21 des Aglykons verknüpft ist (s. Abb. 2.34).



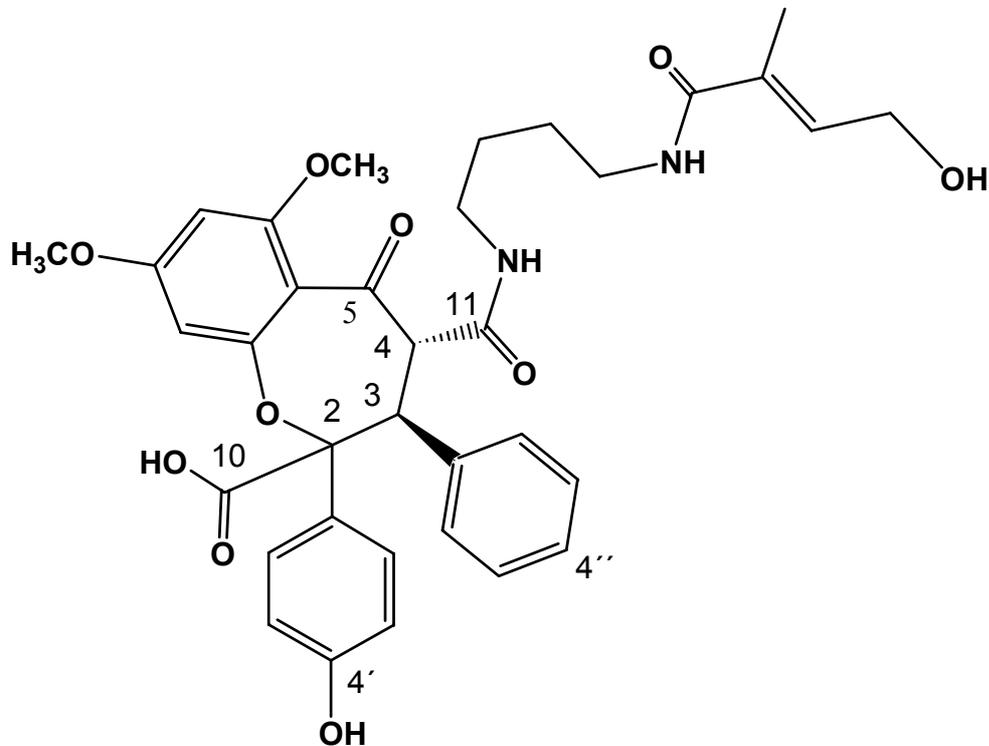
**Abb. 2.34 : HMBC-Spektrum des Forbaglins C : Ermittlung der 21-O-Glycosid-Verknüpfung**

Deshalb erscheinen die Protonen-Signale des H-21 als zwei durch geminale Kopplung gespaltene Signale. Das Hochauflösung-QTOF-Massenspektrum liefert die mit dem Strukturvorschlag übereinstimmende Summenformel,  $C_{43}H_{52}N_2O_{15}$  ( $m/z$  837.3465 amu  $[M+H]^+$ , berechnet für  $C_{43}H_{53}N_2O_{15}$ , 837.3446 amu). Die relative Konfiguration an C-3 und C-4 wurde durch Vergleich der Proton- und Kohlenstoff-Resonanzen mit Forbaglin, dessen relative Konfiguration an diesen Positionen durch Röntgenstrahlen-Kristallographie bestimmt wurde (Dumontet *et al.*, 1996), als H-3 $\alpha$ , H-4 $\beta$ , bestätigt.

Tabelle 2.15 :  $^1\text{H}$ -(400 MHz) und  $^{13}\text{C}$ -(150 MHz) NMR-Daten von Forbaglin C [24]  
( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	HMBC
1a	161.3 s		
2	92.0 s		
3	52.0 d	5.10 (d, 10.5)	1', 2''/6'', 11, 2, 4, 1''
4	67.5 d	4.37 (d, 10.5)	1'', 3, 5, 11
5	194.0 s		
5a	115.0 s		
6	161.4 s		
7	94.9 d	6.20 (d, 2.4)	5a, 9, 6, 8
8	165.8 s		
9	100.2 d	6.68 (d, 2.4)	5a, 7, 1a, 8
10	172.5 s		
11	169.3 s		
13	39.9 t	A : 3.13 (m) B : 3.07 (m)	11, 14 11, 14
14	27.2 t <sup>a</sup>	1.33 (m)	15
15	27.3 t <sup>a</sup>	1.27 (m)	14, 16
16	40.2 t	3.13 (m)	18, 15
18	172.3 s		
19	134.7 s		
20	132.5 d	6.38 (qdd, 1.1, 5.6, 6.8)	18
21	66.6 t	A : 4.56 (qdd, 1.1, 5.6, 13.7) B : 4.43 (qdd, 1.1, 6.8, 13.7)	19, 1''', 20 19, 1''', 20
22	13.2 q	1.88 (m)	18, 20, 19
1'	128.5 s		
2'/6'	130.4 d	7.42 (d, 9.0) <sup>b</sup>	2, 4', 1'
3'/5'	114.8 d	6.79 (d, 9.0) <sup>b</sup>	1', 4'
4'	161.4 s		
1''	141.1 s		
2''/6''	130.7 d	7.61 (m)	3, 4''
3''/5''	129.3 d	7.35 (m)	1''
4''	128.8 d	7.32 (m)	3''/5''
1'''	103.8 d	4.35 (d, 7.8)	21
2'''	75.1 d	3.24 (dd, 7.8, 9.2)	4''', 1''', 3'''
3'''	78.1 d	3.39 (m)	4'''
4'''	71.7 d	3.31 (m)	
5'''	78.1 d	3.31 (m)	
6'''	62.8 t	A : 3.91 (dd, 1.6, 11.9) B : 3.69 (dd, 5.9, 11.9)	5'''
OCH <sub>3</sub> -6	56.5 q	3.66 (s)	6
OCH <sub>3</sub> -8	56.2 q	3.91 (s)	8
OCH <sub>3</sub> -4'	55.7 q	3.76 (s)	4'
OCH <sub>3</sub> -10	52.6 q	3.16 (s)	10

<sup>a</sup> Umtauschbare Signale. <sup>b</sup> Signale erscheinen als AA'BB'-Spinsystem.

Forbaglin D [25]

[25] Forbaglin D

**Abb. 2.35 : Verbindung des Forbaglin-Typs mit Putrescin-Bisamid als Seitenkette aus *A. dasyclada***

Verbindung **25** hat den Molekülion-Peak bei  $m/z$  646 im ESI-Massenspektrum, und das Hochauflösungs-ESI-Massenspektrum liefert die Summenformel  $C_{35}H_{38}N_2O_{10}$ . Die  $^1H$  und  $^{13}C$  NMR-Daten sind fast gleich wie bei Verbindung **24**. Dies sind Hinweise dafür, daß es sich bei Verbindung **25** um ein Forbaglin-Derivat handelt. Der Unterschied zwischen beiden Substanzen besteht darin, daß keine Signale für einen Glucose-Rest am C-21 und nur zwei Methoxygruppen auftauchen (s. Anhang; Abb. A.25). Die Abwesenheit von zwei Methoxygruppen wird durch den Verlust der Methoxygruppe am C-4' des aromatischen Rings B und am C-10 der Säure-Gruppe bestätigt, weil es keine beobachtete Long-Range Korrelation für die Methoxy-Protonen

mit C-4' bzw. C-10 gibt und die Resonanz von C-10 in das tiefe Feld bei 177.0 ppm (s) verschoben ist. Damit ist die Struktur der Verbindung **25** wie in Abb. 2.35 dargestellt.

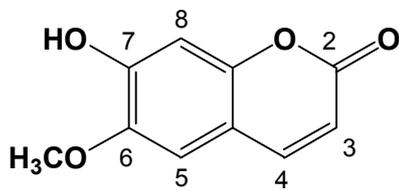
Tabelle 2.16 :  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Forbaglin D [**25**] (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1a		<sup>a</sup>	18		172.0 s
2		<sup>a</sup>	19		135.8 s
3	4.62 (d, 11.7)	52.3 d	20	6.37 (qt, 1.2, 6.2)	133.0 d
4	4.26 (d, 11.7)	58.7 d	21	4.27 (dq, 1.1, 6.2)	59.5
5		193.0 s	22	1.87 (s)	13.0 q
5a		112.0 s	1'		128.1 s
6		158.0 s	2'/6'	7.52 (d, 8.9)	130.3 d
7	5.52 (d, 2.4)	92.1 d	3'/5'	6.61 (d, 8.9)	115.4 d
8		163.2 s	4'		163.1 s
9	5.89 (d, 2.4)	96.7 d	1''		138.0 s
10		177.0 s	2''/6''	7.36 (m)	131.9 d
11		171.0 s	3''/5''	7.26 (m)	129.5 d
13	3.34 (m)	39.4 t	4''	7.26 (m)	128.3 s
14	1.63 (m)	26.3 t	OCH <sub>3</sub> -6	3.81 (s)	56.3 q
15	1.63 (m)	27.9 t	OCH <sub>3</sub> -8	3.49 (s)	55.4 q
16	3.54 (m)	40.1 t			

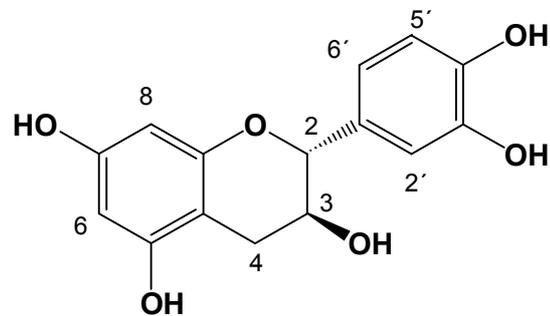
<sup>a</sup> Unauffindbare quarternäre Kohlenstoffe

### 2.2.3.4. Cumarin und Flavonoid

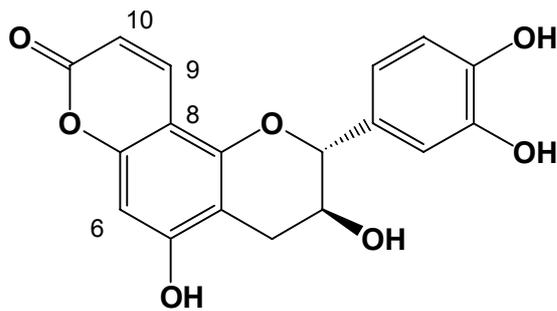
Neben den Rocaglamid-Derivaten und ihren verwandten Verbindungen wurden auch ein Cumarin [26] und Flavonoid-Derivate (Catechin [27], Flavanocumarin [28] und Phenylpropanoid-Derivat des Catechins [29], s. Abb. 2.36) aus verschiedenen Fraktionen isoliert und identifiziert.



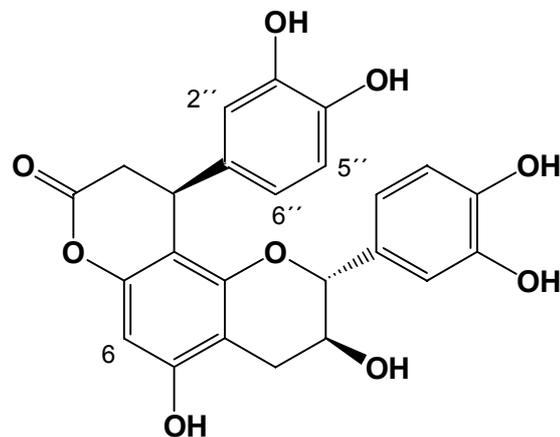
[26]



[27]



[28]



[29]

Abb. 2.36 : Cumarin und Flavonoide aus *A. dasyclada*

Verbindung **26** wurde in Form weißer Nadelkristalle isoliert und als 6-Methoxy-7-Hydroxycumarin oder Scopoletin identifiziert. Das EI-Massenspektrum zeigt den Molekülion-Peak bei  $m/z = 192$  (s. Anhang; Abb. A.26). Die  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zeigen die Anwesenheit des Cumarin-Grundgerüsts [6.20 (1H, *d*,  $J = 9.5$  Hz, H-3); 7.85 (1H, *d*,  $J = 9.5$  Hz, H-4) bzw. 164.0 (C-2) 112.6 (C-3), 146.1 ppm (C-4)]. Die zwei Singulett-Signale bei 6.76 (1H) und 7.10 ppm (1H) entsprechen dem H-5 und dem H-8. Die  $^4J_{\text{CH}}$ -Korrelation zwischen einem Methoxy-Signal bei 3.90 ppm und dem C-5 im HMBC-Spektrum (s. Abb. 2.37) sowie dem Signal bei 152.9 ppm für einen mit Sauerstoff verknüpften aromatischen Kohlenstoff weisen darauf hin, daß Ring-B mit einer Methoxy- und Hydroxy-Gruppe an C-6 bzw. C-7 substituiert ist.

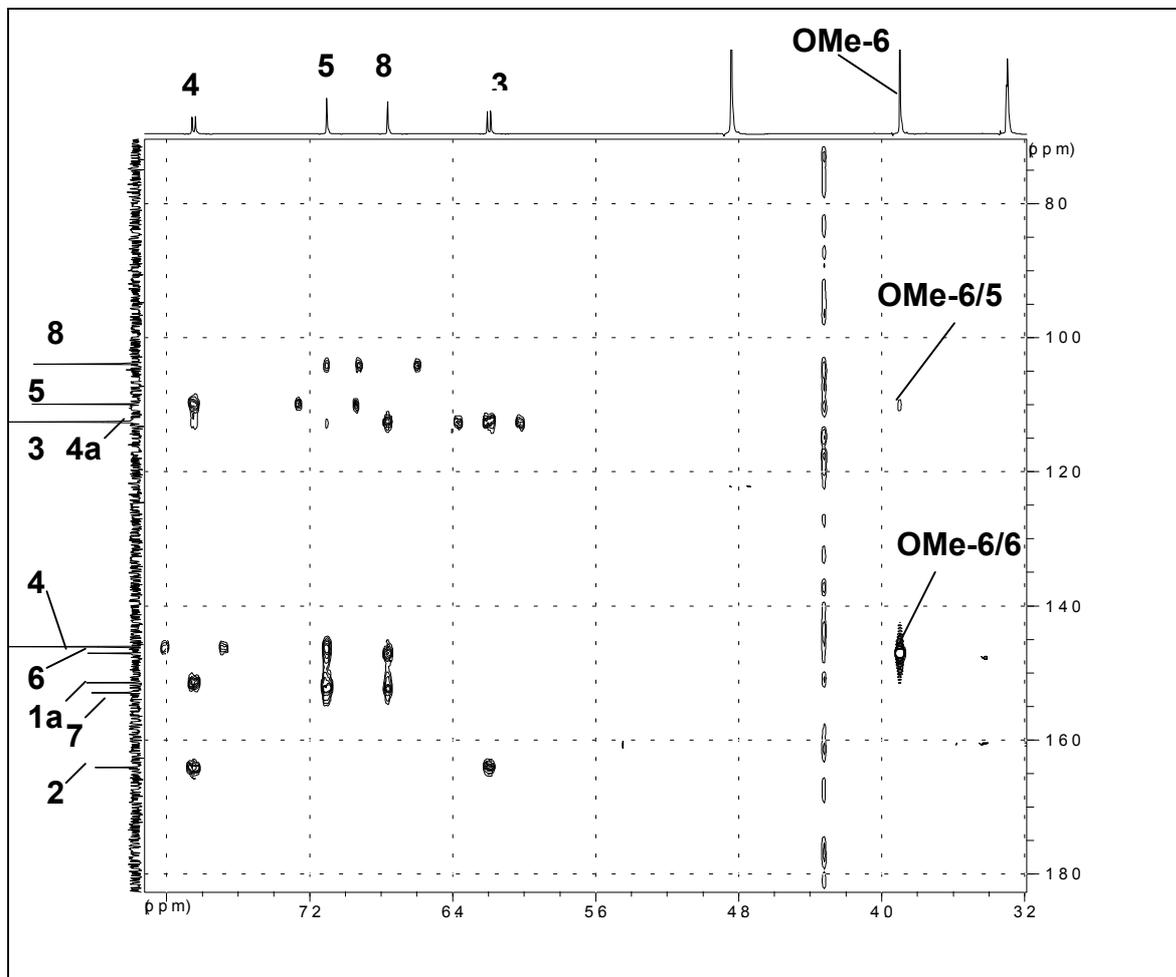


Abb. 2.37 : HMBC-Spektrum des Scopoletins : Ermittlung des Methoxyl-Substituenten

Tabelle 2.17 :  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Scopoletin [26] (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2		164.0 s
3	6.20 ( <i>d</i> , 9.5)	112.6 <i>d</i>
4	7.85 ( <i>d</i> , 9.5)	146.1 <i>d</i>
5	7.10 ( <i>s</i> )	109.9 <i>d</i>
6		147.1 s
7		152.9 s
8	6.76 ( <i>s</i> )	104.0 <i>d</i>
1a		151.4 s
4a		112.5 s
$\text{OCH}_3$ -6	3.90 ( <i>s</i> )	56.8 <i>q</i>

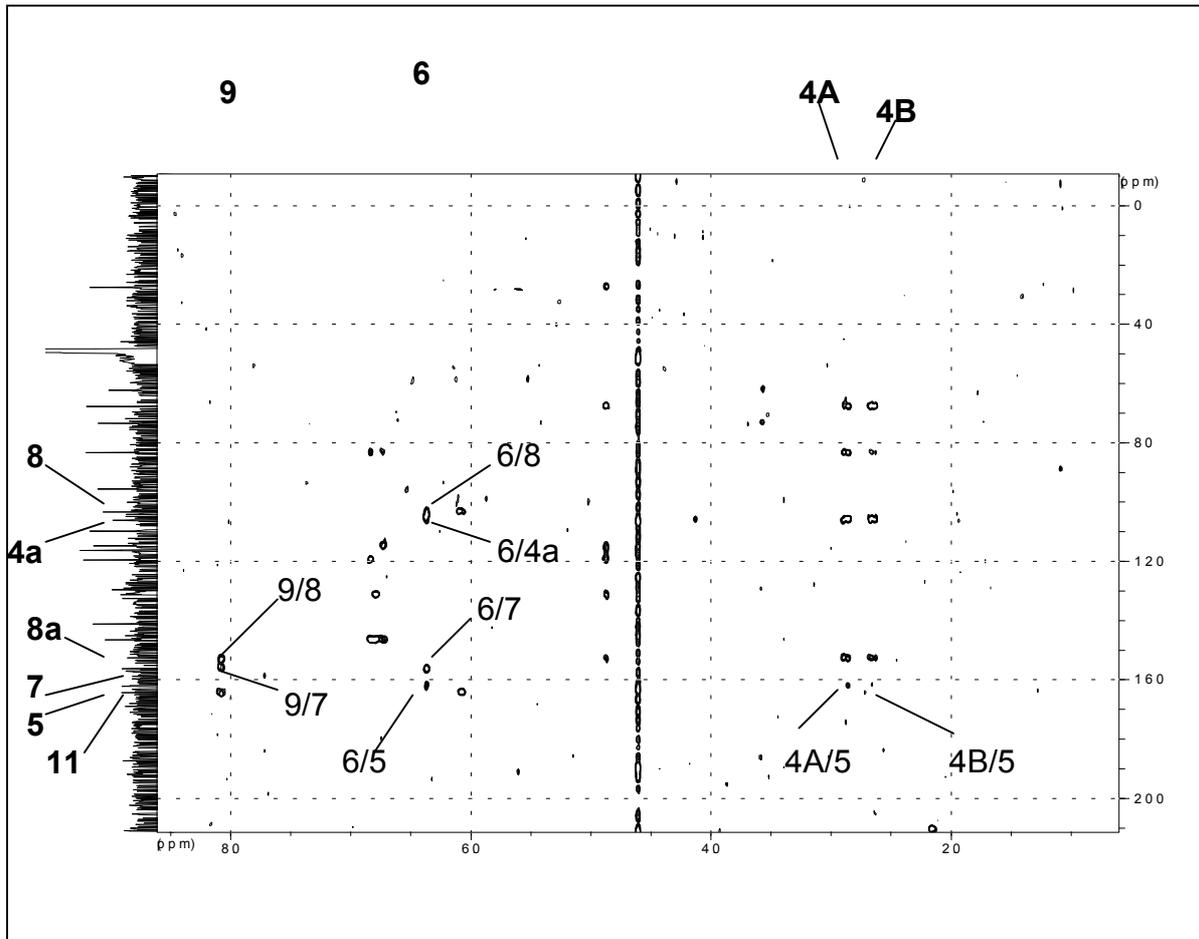
Eine weitere Verbindung ist ein Flavanol, das Catechin [27]. Catechin ist eine in Pflanzen weitverbreitete Verbindung. Das EI-Massenspektrum zeigt den Molekülion-Peak bei  $m/z = 290$  (s. Anhang; Abb. A.27). Die Anwesenheit des Flavan-3-ol-Grundgerüst im Molekül ist im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erkennbar (s. Anhang; Abb. A.27). Die Signale bei 4.55 (*d*,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 3.95 (*m*, H-3) und 2.84 ppm (*dd*,  $J = 5.7$ , 16.0 Hz, H-4A) bzw. 2.49 ppm (*dd*,  $J = 8.2$ , 16.7 Hz, H-4B) sind typisch für einen solchen heterocyclischen Ring. Ebenfalls charakteristisch sind Resonanzen des Rings A (Ring eines Phloroglucinol-Typs) mit *meta*-Kopplung zweier Protonen bei 5.84 (*d*,  $J = 2.5$  Hz, H-8) und 5.92 ppm (*d*,  $J = 2.5$  Hz, H-6) und des Catechol-Rings B mit einem ABX-Spinn-System bei 6.71 (*dd*,  $J = 1.9$ ; 8.2 Hz), 6.76 (*d*,  $J = 8.2$  Hz) und 6.83 ppm (*d*,  $J = 1.9$  Hz). Zur Unterscheidung von seinem Epimer, (–)-Epicatechin bzw. zur Bestimmung der relativen Konfiguration an C-2 und C-3 wurden die Resonanzen von C-2 und C-3 bei 82.9 bzw. 68.8 ppm im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum herangezogen (Porter *et al.*, 1983), sowie die entsprechend großen Kopplungskontanten von H-2 und H-3 von 7.6 Hz im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Auf diese Weise konnte die *trans*-Stellung zwischen H-2 und H-3 bewiesen werden.

Tabelle 2.18 :  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Catechin [27] (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	4.55 ( <i>d</i> , 7.6)	82.9 <i>d</i>
3	3.95 ( <i>m</i> )	68.8 <i>d</i>
4	A : 2.84 ( <i>dd</i> , 5.7, 16.0)	28.5 <i>t</i>
	B : 2.49 ( <i>dd</i> , 8.2, 16.7)	
4a		100.8 <i>s</i>
5		156.7 <i>s</i>
6	5.92 ( <i>d</i> , 2.5)	96.3 <i>d</i>
7		157.9 <i>s</i>
8	5.84 ( <i>d</i> , 2.5)	95.5 <i>d</i>
8a		158.2 <i>s</i>
1'		132.2 <i>s</i>
2'	6.83 ( <i>d</i> , 1.9)	115.2 <i>d</i>
3'		146.2 <i>s</i>
4'		146.2 <i>s</i>
5'	6.76 ( <i>d</i> , 8.2)	116.2 <i>d</i>
6'	6.71 ( <i>dd</i> , 1.9, 8.2)	120.0 <i>d</i>

Das NMR-Spektrum von Verbindung **28** zeigt auch die Signale eines Catechin-Grundgerüsts durch die chemische Verschiebung von 83.4, 67.8 und 27.7 ppm für Kohlenstoffe C-2, C-3 bzw. C-4 eines Flavan-3-ols (Porter *et al.*, 1983) bzw. Protonen-Resonanzen für den Catechol-Ring B und den heterocyclischen Ring C (s. Tab. 2.19). Allerdings erscheint im aromatischen Bereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums nur ein Singulett für aromatische Protonen des Rings A. Das bedeutet, Ring A ist *tri*-substituiert. Die weitere Untersuchung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren liefert die Resonanzen des 2-Pyranon-Ringes des Cumarin-Grundgerüsts (Verbindung **26**). Diese stellen zwei Protonen-Signale als Dublett bei 6.04 und 8.04 ppm (*d*,  $J = 9.5$  Hz) bzw. Kohlenstoff-Signale bei 103.3 (C-8), 156.2 (C-7), 109.8 (C-10), 141.1 (C-9) und 164.3 ppm (C-11) dar. Aus diesen Daten und entsprechenden HMBC-Daten wurde gefolgert, daß der Ring A der Verbindung des Catechin-Typs mit einem Pyranon-Ring substituiert ist.

Die Position des Pyranon-Rings am Ring A wurde mittels eines HMBC-Spektrums (s. Abb. 2.38) und durch den Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten, vor allem der Resonanz der unsubstituierten Kohlenstoffe C-6 und C-4a, mit publizierten Daten bestimmt. Die Substitution am C-8 führt zu einer in das tiefere Feld verschobenen Resonanz des Kohlenstoffes C-4a (bei ca. 105 ppm) im Vergleich zu dem C-6-Regioisomer (bei ca. 100 ppm, Foo, 1989).



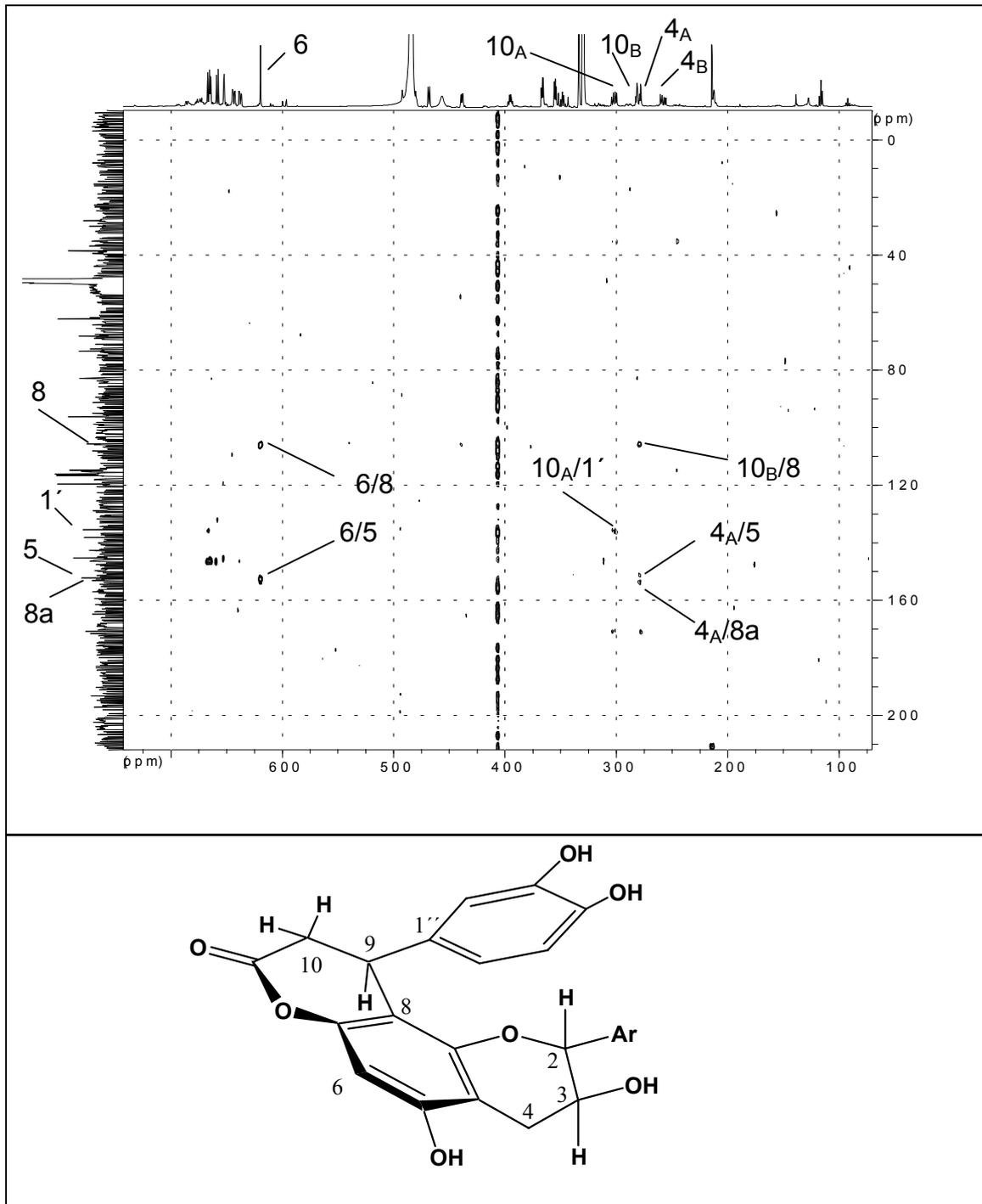
**Abb. 2.38 : HMBC-Spektrum des Phyllocumarins: Ermittlung des Pyranon-Rings am Ring A**

Der Molekülion-Peak bei  $m/z = 342$  im EI-Massenspektrum entspricht der vorgeschlagenen Struktur. Damit wurde Verbindung **28** als Phyllocumarin, eine Flavonocumarin-Typ-Verbindung, identifiziert. Diese Verbindung wurde bereits zuvor aus *Phyllocladus trichomanoides* (Podocarpaceae) isoliert (Foo, 1989).

Tabelle 2.19 :  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Flavanocumarin **[28]** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	4.88 ( <i>d</i> , 7.3)	83.4 <i>d</i>
3	4.11 ( <i>m</i> )	67.8 <i>d</i>
4	A : 2.85 ( <i>dd</i> , 5.2, 16.4)	27.7 <i>t</i>
	B : 2.63 ( <i>dd</i> , 7.1, 16.4)	
4a		106.1 <i>s</i>
5		162.2 <i>s</i>
6	6.34 ( <i>s</i> )	95.5 <i>d</i>
7		156.2 <i>s</i>
8		103.3 <i>s</i>
8a		153.0 <i>s</i>
9	8.04 ( <i>d</i> , 9.5)	141.1 <i>d</i>
10	6.04 ( <i>d</i> , 9.5)	109.8 <i>d</i>
11		164.3 <i>s</i>
1'		129.5 <i>s</i>
2'	6.81 ( <i>d</i> , 2.2)	114.8 <i>d</i>
3'		146.4 <i>s</i>
4'		146.4 <i>s</i>
5'	6.77 ( <i>d</i> , 8.2)	116.3 <i>d</i>
6'	6.71 ( <i>dd</i> , 2.2, 8.2)	119.6 <i>d</i>

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Verbindung **29** zeigen ebenfalls Resonanzen für eine Struktur des Flavanocumarin-Typs wie Verbindung **28** (s. Tab. 2.20 und Anhang; Abb A.29). Allerdings fehlen im Tieffeld des  $^1\text{H}$ -Spektrums die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonen-Signale des Pyranon-Rings. Weiterhin kommen im aromatischen Bereich zusätzliche Signale für einen Catechol-Ring neben jenen des Rings B vor. Ferner wird ein Spinsystem von Protonen bei 4.39 (*bd*,  $J = 6.9$  Hz, H-9), 3.02 (*dd*,  $J = 6.9$ , 15.8, H-10A) und 2.81 ppm (*m*, H-10B) beobachtet. Durch Untersuchung des HMBC-Spektrums (s. Abb. 2.39) wurde herausgefunden, daß der Pyranon-Ring der Verbindung **28** mit einem anderen Catechol-Ring am C-9 substituiert ist. Verbindung **29** wurde schließlich als Phenylpropanoid-Derivat des Catechins identifiziert. Das EI-Massenspektrum zeigt den Molekülion-Peak bei  $m/z$  452 und entspricht damit der vorgeschlagenen Struktur der Verbindung **29**.



**Abb. 2.39** : HMBC-Spektrum des Cinchonain-Derivats: Ermittlung des Phenylpropanoid-Rings (oben) und diamagnetische Anisotropie-Wirkung des Protons H-2 durch  $\beta$ -Stellung des 9-Catechol-Rings (unten)

Die Substitution des zweiten Catechol-Rings sowie die stereochemische Bestimmung am C-9 wurde durch ein HMBC-Spektrum bzw. durch Vergleich der NMR-Daten bestimmt. Die Verschiebung von H-2 ins höhere Feld bei 4.68 ppm im Vergleich zum entsprechenden Proton von Verbindung **28** (4.88 ppm) wird durch diamagnetische Anisotropie-Wirkung des aromatischen Substituenten am Lacton-Ring mit einer  $\beta$ -Konfiguration hervorgerufen (s. Abb. 2.39) (Foo, 1987).

Damit wurde die Verbindung **29** als ein bereits bekanntes Cinchonain-Derivat identifiziert. Diese Verbindung wurde erstmals aus *Phyllocladus trichomanoides* isoliert (Foo, 1987).

Tabelle 2.20 :  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten vom Cinchonain-Derivat [29] (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	4.68 ( <i>d</i> , 6.9)	82.8 <i>d</i>
3	3.95 ( <i>m</i> )	68.2 <i>d</i>
4	A : 2.81 ( <i>m</i> )	28.1 <i>t</i>
	B : 2.58 ( <i>dd</i> , 7.6; 16.4)	
4a		108.5 <i>s</i>
5		152.2 <i>s</i>
6	6.19 ( <i>s</i> )	96.2 <i>d</i>
7		153.0 <i>s</i>
8		105.7 <i>s</i>
8a		157.0 <i>s</i>
9	4.39 ( <i>bd</i> , 6.9)	35.4 <i>d</i>
10	A : 3.02 ( <i>dd</i> , 6.9; 15.8)	38.7 <i>t</i>
	B : 2.81 ( <i>m</i> )	
11		170.6 <i>s</i>
1'		129.0 <i>s</i>
2'	6.25 ( <i>d</i> , 1.9)	114.8 <i>d</i>
3'		145.2 <i>s</i>
4'		145.2 <i>s</i>
5'	6.65 ( <i>d</i> , 8.2)	116.5 <i>d</i>
6'	6.42 ( <i>dd</i> , 1.9; 8.2)	119.5 <i>d</i>
1''		138.0 <i>s</i>
2''	6.64 ( <i>d</i> , 1.9)	115.1 <i>d</i>
3''		146.0 <i>s</i>
4''		146.0 <i>s</i>
5''	6.57 ( <i>d</i> , 8.2)	116.0 <i>d</i>
6''	6.37 ( <i>dd</i> , 1.9; 8.2)	119.5 <i>d</i>

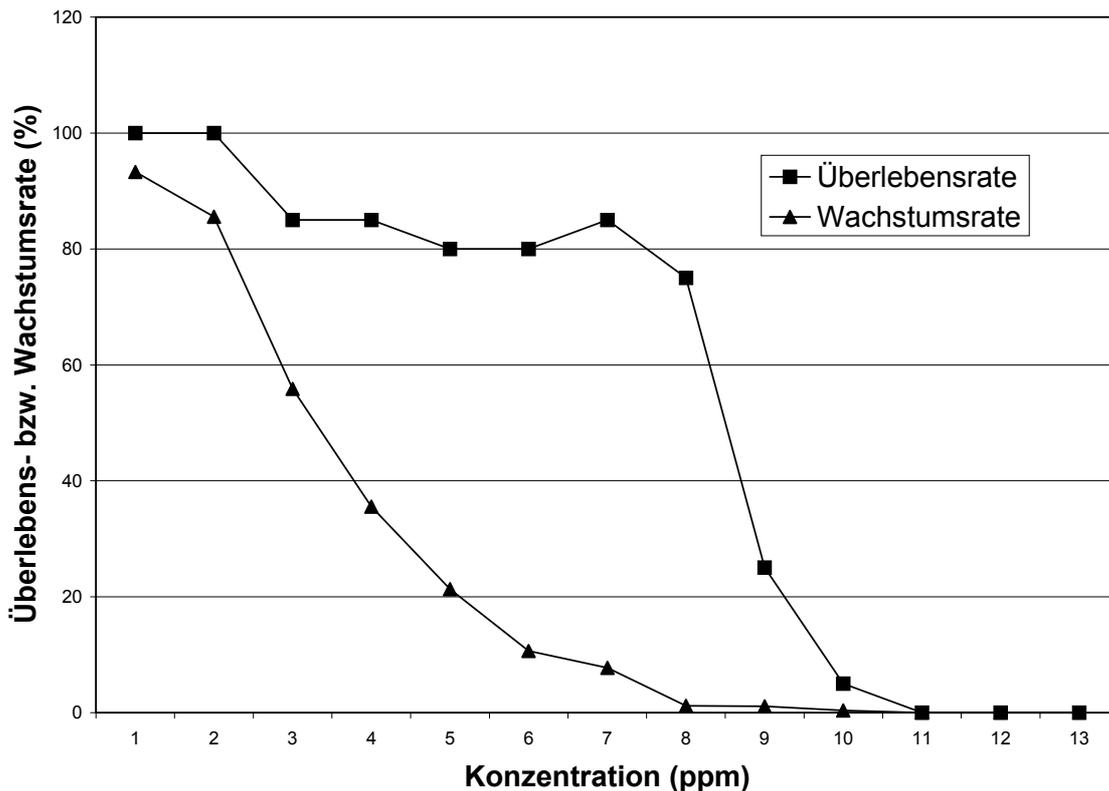
### 2.3. Biotest der isolierten Verbindungen gegenüber dem Modellinsekt *Spodoptera littoralis*

Zur Analyse der insektiziden Aktivität wurden alle isolierten Verbindungen, vor allem die neuen Rocaglamid-Derivate, im Fraßversuch gegenüber dem Insekt *Spodoptera littoralis* getestet. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen der reinen Verbindungen verwendet. In diesem Fall wurde eine Konzentrationsreihe der jeweiligen reinen Verbindung dem Futterstück zugegeben. Die Konzentrationsreihe beinhaltet folgende Mengen : 0.1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40 und 50 ppm. Als positive Kontrolle wurde das bekannte aus Pflanzen isolierte Insektizid Azadirachtin verwendet.

Tabelle 2.21 : LC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte der Rocaglamide und anderer isolierter Verbindungen

Substanz	LC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>
<b>Rocaglamid V</b>	1.97	0.14
<b>X</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Y</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Z</b>	5.70	0.31
<b>AA</b>	6.62	1.03
<b>Aglain E</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Aglaforbesin C</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Forbaglin C</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Forbaglin D</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Dasyclamide</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Phyllocumarin</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Cinchonain</b>	inaktiv	inaktiv
<b>Azadirachtin</b>	0.9	0.04

Aus diesem Test wurde die Überlebensrate und die Wachstumsrate der Versuchstiere ermittelt. Abbildung 2.40 zeigt die Abhängigkeit der Überlebensrate bzw. der Wachstumsrate der Raupen von der Konzentration des Rocaglamids V im Vergleich zur Kontrolle (Azadirachtin). Mittels einer Probit-Analyse wurden schließlich die  $LC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werte berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.21 zu sehen.



**Abb. 2.40 : Dosis-Wirkungskurven des Rocaglamids V an Raupen von *Spodoptera littoralis***

Anhand dieser Ergebnisse erwiesen sich nur die Rocaglamide V, Z und AA als aktiv. Rocaglamid V zeigte die stärkste insektizide Wirkung mit  $LC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werten von 1.97 bzw. 0.14 ppm und ist in dieser Hinsicht fast vergleichbar mit dem Azadirachtin (0.9 ppm bzw. 0.04 ppm), während die Rocaglamide Z ( $LC_{50}$ -Werte : 5.70) und AA ( $LC_{50}$ -Werte : 6.62 ppm) eine schwächere Aktivität besaßen.

## 2.4. Züchtung einer Kalluskultur von *Aglaia*

### 2.4.1. Sterilisationsdauer

Für die Sterilisation des Pflanzenmaterials von *A. odorata* ist eine Vorbehandlung mit Ethanol 70 % zu empfehlen. Es folgt dann eine Behandlung mit Hypochloritlösung, in diesem Fall mit  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  über einen Zeitraum von 10 Minuten. Die beste Überlebensrate der sterilisierten Explantate (junge Blätter, Stengelstücke und Sproßspitze) wurde hierbei mit einer 1%igen Calciumhypochloritlösung erreicht. Zur Entfernung des Sterilisationsmittels wurde das Pflanzenmaterial dreimal in sterilem Wasser gewaschen. Auf diese Weise blieb mehr als 80 % des Pflanzenmaterials keimbar und konnte anschließend als Explantat benutzt werden.

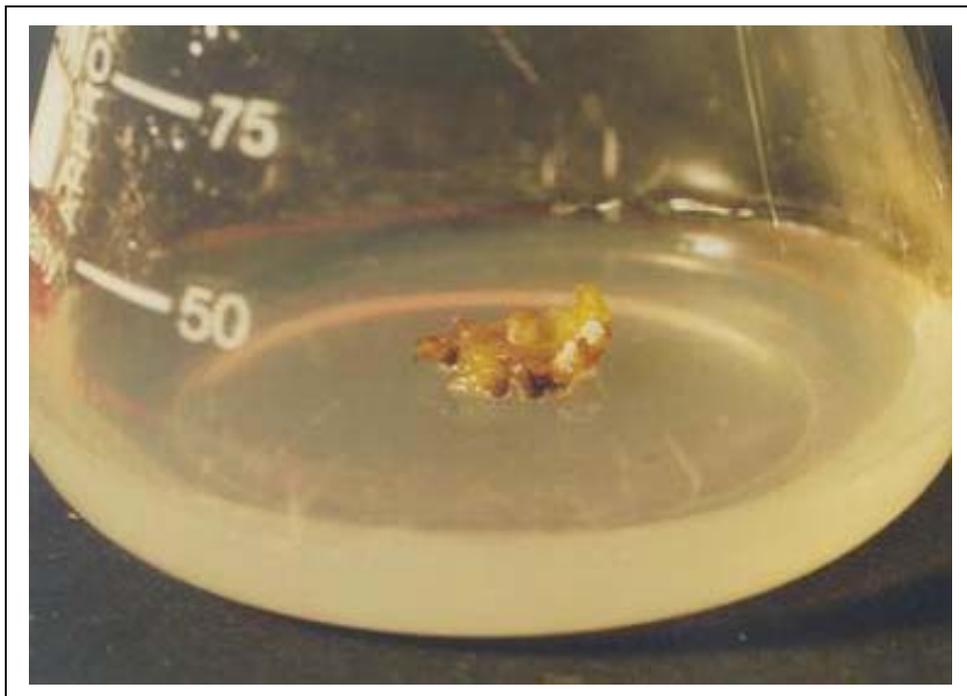
Für eine Gewinnung von sterilen Keimen aus Samen von *A. elliptica*, war eine Sterilisierungszeit von 10 Minuten in 3%iger Hypochloritlösung optimal. Die Verwendung von direkt aus Früchten gewonnenen Samen als Ausgangsmaterial hat sich bewährt.

### 2.4.2. Screening des Kallusmediums

Für ein optimales Kallus-Medium erwiesen sich Antioxidantien und Phytohormone als unerlässlich. In Gewebekulturen von tropischen Pflanzen wie *Aglaia* lässt sich oft eine Nekrose beobachten, die auf eine Oxidation von phenolischen Verbindungen zurückzuführen ist. Diese oxidierten phenolischen Verbindungen sind sehr toxisch für die Zellen (George und Sherrington). In allen Medien, in denen kein Antioxidationsmittel zugegeben worden war (Medium A, s. Tab. 5.74), zeigte sich eine sehr deutliche Hemmung der Kallusbildung. Hier wurde entweder kein Kallus aus dem Explantat gebildet, oder der gebildete Kallus wurde im Laufe des Experiments nekrotisch.

Durch Zugabe von 100 ppm Ascorbinsäure (Medium B, s. Tab. 5.7.4) als Antioxidationsmittel in das Medium wurde sowohl bei den Explantaten als auch bei den gebildeten Kalli die Nekrose verringert. Hierbei erwiesen sich das Medium Risser und

White (RW) mit 2.4-D im Vergleich zum NAA-haltigen Medium als deutlich besser zur Induktion der Kallusbildung geeignet. Weiterhin führten bei vielen Explantaten geringe Cytokinin- und besonders Kinetin-Konzentration auch nach mehrwöchiger Inkubation nicht zur Kallusbildung, während andere Explantate gleichen Ursprungs unter dem Einfluß der BAP-Konzentration gute Kallusbildung zeigten. Sowohl die jungen Blätter als auch Stengelstücke erwiesen sich als Explantate für die Kallusbildung geeignet. An den meisten Explantanten hatten sich nach einwöchiger Inkubation auf festem Medium am basalen Ende erste Verdickungen gebildet, die in der vierten bis sechsten Woche in einigen Fällen bereits Kallusbildung zeigten. Bei den Blättern wurde der Kallus vor allem am Rand und an der Oberfläche gebildet (s. Abb. 2.41), während sie bei den Stengelstücken vor allem im Schnittbereich stattfand. Allerdings war die Kallusbildung in dieser Versuchsreihe noch gering und das Wachstum sehr langsam (zwischen 10 bis 12 Wochen).



**Abb. 2.41 : Kallusbildung auf einem Blattstück von *A. odorata***

Weitere Kulturmedien wurden mit komplex organischen Zusätze (Hefeextrakt und Caseinhydrolysat, Medien C bzw. D) versetzt, die möglicherweise in der Lage sind,

Kallusbildung und -wachstum zu induzieren. In dieser Medienreihe erwies sich Caseinhydrolysat (Medium D) für die Kallusbildung als besser geeignet. Die Explantate gingen hiermit bereits nach eine Woche in die Kallusbildung über. Darüber hinaus zeigte der Kallus ein schnelleres Wachstum.

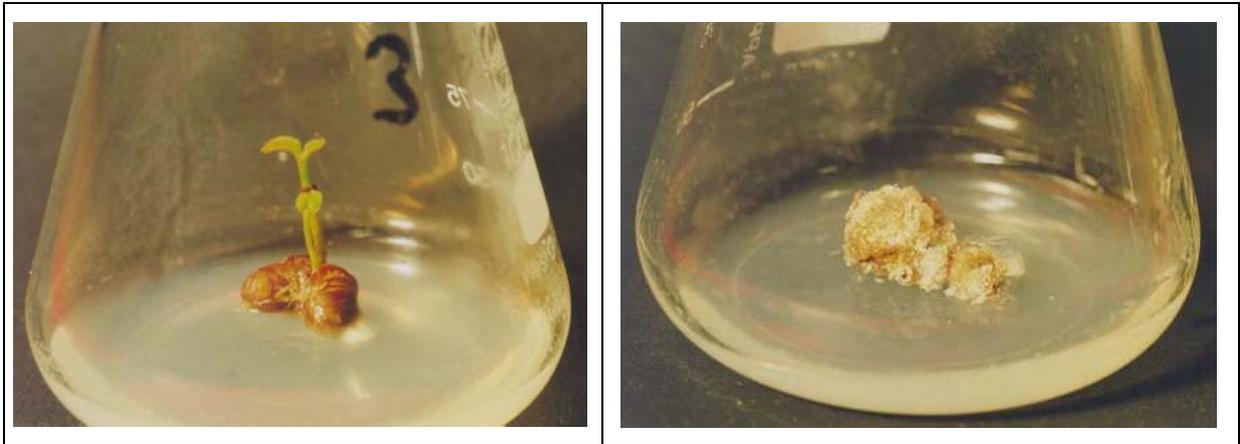
Nach acht bis zehn Wochen zeigte sich dann allerdings auch bei dem auf Medium D gezüchteten Kallus eine Braunfärbung, und er ging langsam zugrunde. Da sich hierbei aber nur der Kallus und nicht das Medium braun färbte, wie das normalerweise der Fall ist, hat in diesem Fall vermutlich keine Nekrose stattgefunden. Es wird vermutet, daß die *A. odorata*-Pflanzen, die als Quelle der Explantate gedient hatten, mit einem pathogenen Mikroorganismus infiziert gewesen waren. Die beobachteten bräunliche Tröpfchen auf den noch grünen Explantaten, auf denen kein Kallus gebildet worden war, verstärken diese Vermutung.

Solche Braunfärbungen waren bei aus Hypokotyl- und Kotyledonenabschnitten von *A. elliptica* gewonnene Kalluskulturen nicht zu beobachten (vgl. 2.4.2). Im optimalen Medium zur Kallusbildung von *A. odorata* (RW-BasalMedium mit 1.0 ppm 2.4-D, 100 ppm Ascorbinsäure und 500 ppm Casein Hydrolysate) wurden Kalli in allen Explantaten gebildet, die nicht nekrotisch wurden. Darüber hinaus bildeten sich die Kalli unter gleichen Bedingung bereits nach der zweiten Woche deutlich schneller (s. Abb. 2.41). Der stark merismatische Zustand der Zellen im Gewebe der Explantate war eine wichtige Voraussetzung für das schnellere Wachstum der Kalli.

### **2.4.3. Anzucht der sterilen Keimlinge aus Samen von *A. elliptica***

Die Keimwerte der getrockneten Samen von *A. elliptica* war sehr gering. Fast keiner der aufgelegten Samen in den verwendeten Medien (vgl. 5.7.2) hatte gekeimt. Anders bei den Samen aus den Früchten, die noch in der Lage waren, Keime zu bilden (s. Abb. 2.42). Trotz der stärkeren Sterilisationsverfahren wiesen diese Samen noch zu 70 % Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze auf. Aus diesem Grund ist die Zahl der aus diesem Ausgangsmaterial stammenden Kulturen relativ gering. Die Temperatur von 30 °C (Kulturbedingung II, s. Tab. 5.5) erwies sich für die Keimung

der Samen als besser geeignet. Die steril gewonnenen Keimlinge wurden als Ausgangsmaterial für die Kalluskultur verwendet.



**Abb. 2.42 : Steriler Keimling (links) und vier Wochen alte Kalluskultur von *A. elliptica* (rechts)**

#### **2.4.4. Phytochemische Voruntersuchung des Kallus**

Das ESI-Massenspektrum des aus dem Kallus von *A. elliptica* gewonnenen Methanol-Extraktes zeigt bei 25.54 Minuten im totalen Ionstrom den charakterische Molekülonen-Peak von Odorinol bei  $m/z$  317  $[M+H]^+$ . Die charakteristischen Fragmentationen von Odorinol, bei  $m/z$  200 (Zimtsäure-Pyrrolidin-Fragmentationen) und bei  $m/z$  131 (Zimtsäure-Fragmentationen), sind im Massenspektrum zu sehen (s. Abb. 2.43). Diese ESI-MS-Musterionen stimmen mit dem ESI-Massensepktrum des Odorinols [15] überein. Weitere Molekülonen konnten weder durch den Vergleich mit den ausgewählten Standard-Verbindungen (Rocaglamid- und Aglain-Derivate) noch durch den Vergleich mit dem Extrakt der Blätter von *A. elliptica* identifiziert werden (s. Abb. 2.43). Das Ergebniss dieses Vorversuchs weist darauf hin, daß das Zimtsäure-Pyrrolidin-Derivat, Odorinol [15] auch in der Kalluskultur von *Aglaia* gebildet wird.

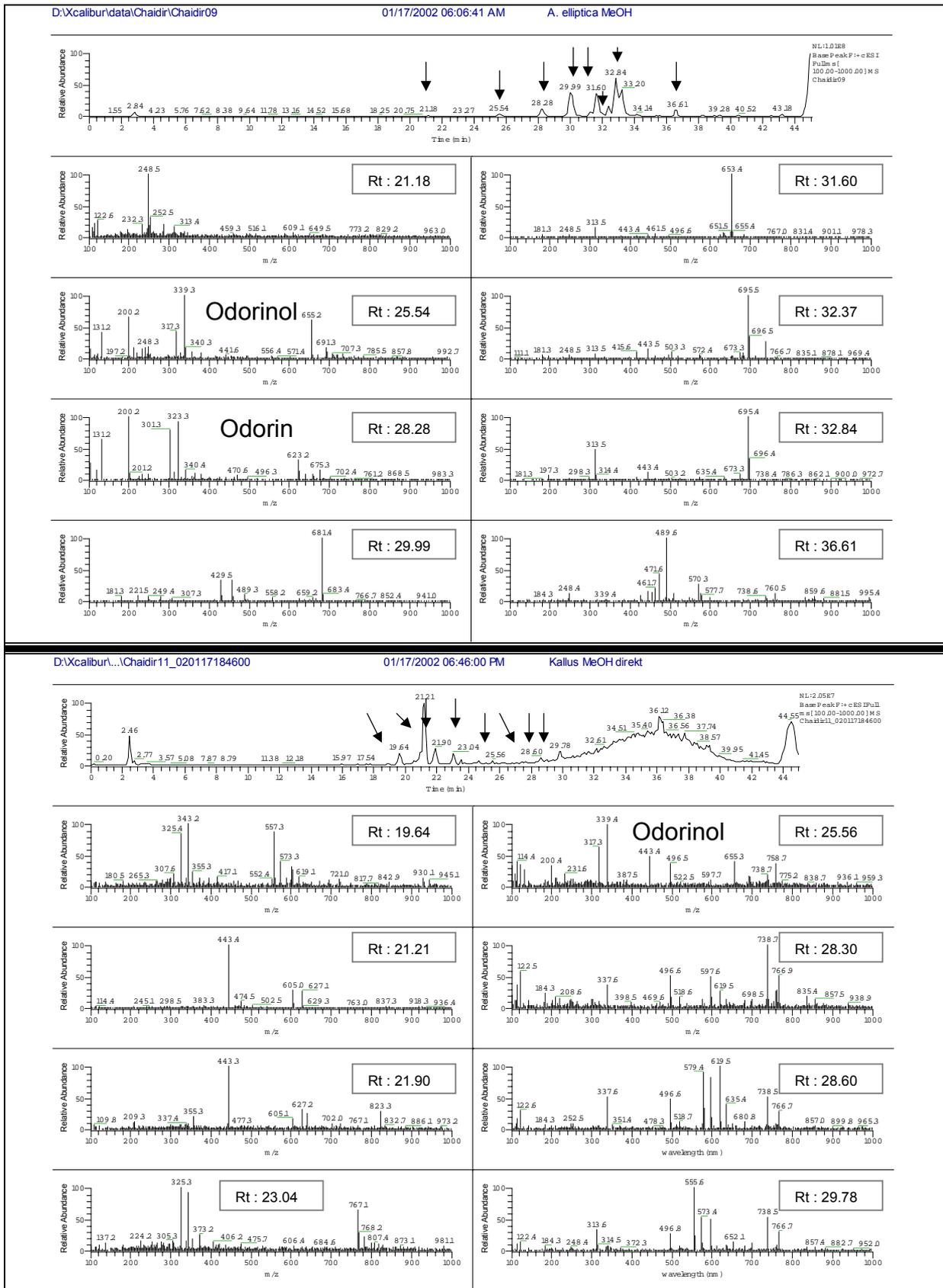


Abb. 2.43 : ESI-Massenspektren des Methanolextrakte der Blättern (oben) und des Kallus (unten) von *A. elliptica*

## Kapitel 3

### Diskussion

Trotz großer Fortschritte in der Erforschung und Entwicklung neuer Arzneimittel und Pflanzenschutzprodukte, wie dem computergestützten Entwurf von neuen Medikamenten (*Computer-aided Drug Design*) sowie der kombinatorischen Chemie im Wirkstofffindungsprozeß, wird die zukünftige Rolle der Naturstoffforschung als Ideengeber für Wirkstoffe auch in Zukunft immer eine besondere Stellung innehaben. Sie bietet einen strukturell einzigartigen Ideenpool, der trotz noch so intensiver Syntheseanstrengungen nicht zu ersetzen ist, und repräsentiert damit eine einmalige und einzigartige Quelle für die Wirkstofffindung und –entwicklung. Tropische Pflanzen stellen dabei ohne Zweifel ein riesiges Reservoir an wertvollen Naturstoffen dar. Wegen ihrer großen Biodiversität sowie des hohen ökologischen Drucks in den Habitaten der Tropen liefern sie vielfältige biologisch aktive Verbindungen.

Bei der umfangreichen Suche nach bioaktiven Naturstoffen pflanzlichen Ursprungs steht u.a. die Gattung *Aglaia* (Meliaceae) im Mittelpunkt. Im Zuge von phytochemischen Untersuchungen innerhalb dieser Gattung wurden neben verschiedenen Triterpenen auch charakteristische Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamide, wie Odorin und Odorinol, gefunden (Shiengtong und Ungphakorn, 1979). Sie waren *in vivo* Inhibitoren verschiedener Zell-Linien (Hayashi *et al.*, 1982; Duh *et al.*, 1993). Im weiteren Screening mit P388 Zell-Linien wurde das stark antileukämisch wirksame Rocaglamid identifiziert. (King *et al.*, 1982). Die später gefundene stark insektizide Aktivität des Rocaglamids motivierte zu weiteren phytochemischen Untersuchungen dieser Verbindungs-Klasse. Weiterhin wurden zusätzlich einige charakteristische, strukturell verwandte Verbindungen der Rocaglamide, wie Aglaine, Aglaforbesine und Forbagline identifiziert, die sich aber allesamt als biologisch inaktiv erwiesen (Proksch *et al.*, 2001; Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1999; Bacher *et al.*, 1999).

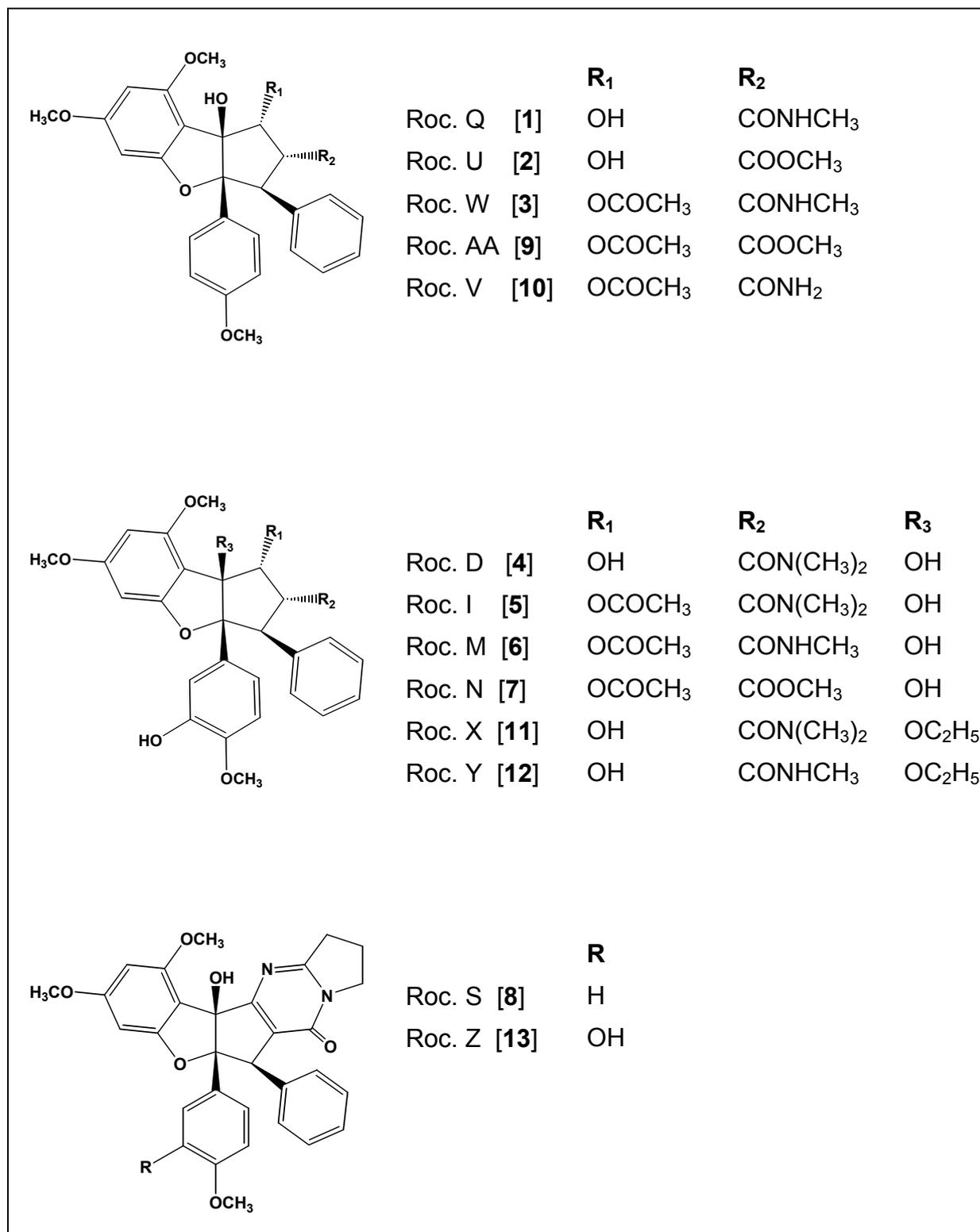
### 3.1. Chemie und Taxonomie ; Rocaglamid und seine verwandten Verbindungen als phytochemisches Merkmal der Gattung *Aglaia*

#### 3.1.1. *Aglaia duperreana*

Die Familie der Meliaceae, zu der die Gattung *Aglaia* gehört, ist schon lange für ihre botanischen Insektizide bekannt. Aus dem Neembaum, *Azadirachta indica*, wurde das stärkste Insektizid pflanzlicher Ursprungs, das Azadirachtin, isoliert. Es ist ein Vertreter der sogenannten Limonoide, einer Klasse modifizierter Tetranortriterpenoide, die in Bezug auf ihr Vorkommen innerhalb der Ordnung Rurales in der Familie der Meliaceen besonders stark vertreten ist (Connolly, 1983). Das aktivste C-sec-Limonoid Azadirachtin und seine Analoge, die Azadirachtole und Meliacarpine, kommen im Tribus Meliae ausschließlich bei den Gattungen *Azadirachta* und *Melia* vor (Isman *et al.*, 1996). Die Limonoide gelten deswegen schon seit langem als phytochemische Merkmale dieser Familie (Champagne *et al.*, 1992).

Die Insektizide aus der Gattung *Aglaia*, Rocaglamide, repräsentieren keine Limonoide, sondern charakteristische Benzofuran-Verbindungen mit einer relativ komplexen Struktur, die sich biogenetisch aus der Kondensation eines Flavonoids mit einem Zimtsäure-Bisamid-Derivat ableiten (Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1999). Die Tatsache, daß das Rocaglamid bislang nur in *Aglaia*-Arten identifiziert wurde, führte zu weiteren phytochemischen Untersuchungen dieses Verbindungs-Typs. Die vorangegangenen Arbeiten mit verschiedenen *Aglaia*-Arten haben bezüglich des Vorkommens von Rocaglamid-Derivaten und ihrer verwandten Verbindungen darauf hingewiesen, daß diese Verbindungsklasse als phytochemisches Merkmal für den Gattung *Aglaia* betrachtet werden kann (Ishibashi *et al.*, 1993; Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1997a; Nugroho *et al.*, 1997b; Nugroho *et al.*, 1999; Bacher *et al.*, 1999).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung und Identifizierung der Inhaltsstoffe aus zwei *Aglaia*-Arten, *A. duperreana* und *A. dasyclada*, und zwar vor allem mit solchen des Rocaglamid-Typs.



**Abb. 3.1 : Aus Blüten und Blättern der *A. duperreana* isolierte Rocaglamid-Derivate**

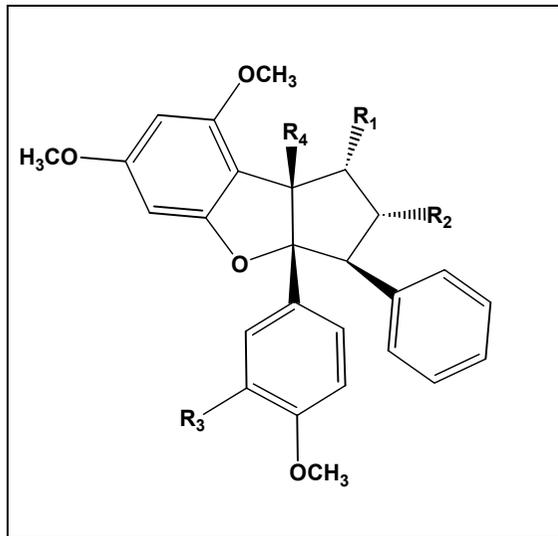
Im Rahmen des in dieser Arbeit durchgeführten insektiziden Screenings zeigten die Extrakte von *A. duperreana* und von *A. odorata* deutlich die stärkste insektizide Aktivität gegenüber *S. littoralis*-Raupen (s. Kapitel 2; Tab. 2.1), während die anderen *Aglaiia*-Arten keine bzw. geringe Aktivität aufwiesen. Diese Ergebnisse entsprechen auch anderen vorhergehenden insektiziden Screenings der Methanol-Extrakte von verschiedenen *Aglaiia*-Arten (Champagne *et al.*, 1989; Nugroho, 1997c). Die Aktivität von *Aglaiia odorata* ist sogar vergleichbar mit dem Extrakt von *Azadirachta indica* (Champagne *et al.*, 1989).

Aus Blüten und Blättern von *A. duperreana* (Stammpflanzen aus Vietnam) wurden 13 Rocaglamid-Derivate isoliert (s. Abb. 3.1); darunter fünf Verbindungen [9 - 13], die sich als neue Derivate des Rocaglamids erwiesen. Vorhergehende Arbeiten haben bereits darauf hingewiesen, daß *A. duperreana* viele verschiedene Rocaglamid-Derivate produziert. Bei der phytochemischen Untersuchung der Wurzel von *A. duperreana* gleicher Herkunft (Stammpflanzen aus Vietnam) wurden achtzehn unterschiedliche Rocaglamid-Derivate isoliert (Hiort *et al.*, 1999), während die Zweige von *A. duperreana* aus Indonesien lediglich sieben Rocaglamid-Derivate enthielten (Nugroho *et al.*, 1997a). Diese Art ist somit in ihrem Spektrum an Rocaglamiden nur mit *A. odorata* vergleichbar, aus der ebenfalls sehr viele verschiedene Rocaglamid-Derivate isoliert wurden (Güssregen *et al.*, 1997; Nugroho *et al.*, 1999). Generell sind diese unterschiedlichen Rocaglamid-Derivate, die jeweils durch von Insektizid-Biotests begleitete Fraktionierung isoliert wurden, verantwortlich für die starke insektizide Aktivität des Rohextraktes der beiden Arten.

Ein Vergleich mit den publizierten Daten über isolierte Rocaglamide aus *A. odorata* und *A. duperreana* zeigt allerdings unterschiedliche Verteilungsmuster (s. Tab. 3.1). In *A. odorata* wurden bis etwa zur Mitte der neunziger Jahre relativ wenige Rocaglamid-Derivate gefunden. Sehr umfangreiche phytochemische Untersuchungen der Wurzel von *A. odorata* in unserer Arbeitsgruppe lieferten aber interessante Ergebnisse (Nugroho und Lin, 1999, unpublizierte Daten). Wie bei Bearbeitung der Wurzel von *A. duperreana* (Hiort *et al.*, 1999) konnte ebenfalls eine Vielzahl – in diesem Falle acht verschiedene - Rocaglamid-Derivate identifiziert werden.

Diskussion

Tabelle 3.1 : Die in dieser [1 - 13] und anderen Arbeiten isolierten Rocaglamid-Derivate aus *A. duperreana* und *A. odorata*.



<sup>a</sup> Im Rahmen dieser Arbeit

<sup>b</sup> Hiort *et al.*, 1999

<sup>c</sup> Nugroho *et al.*, 1997a

<sup>d</sup> Güssregen *et al.*, 1997

<sup>e</sup> Ishibashi *et al.*, 1993 und Ohse *et al.*, 1996

<sup>f</sup> Kokpol *et al.*, 1994

<sup>g</sup> Janprasert *et al.*, 1993

<sup>h</sup> Nugroho *et al.*, 1999

(x) Nugroho BW und Lin WH, 1999

(unpublizierte Daten)

Blü : Blüten

Blä : Blätter

Wu : Wurzeln

Zw : Zweige

ZB : Zweige und Blätter zusammen

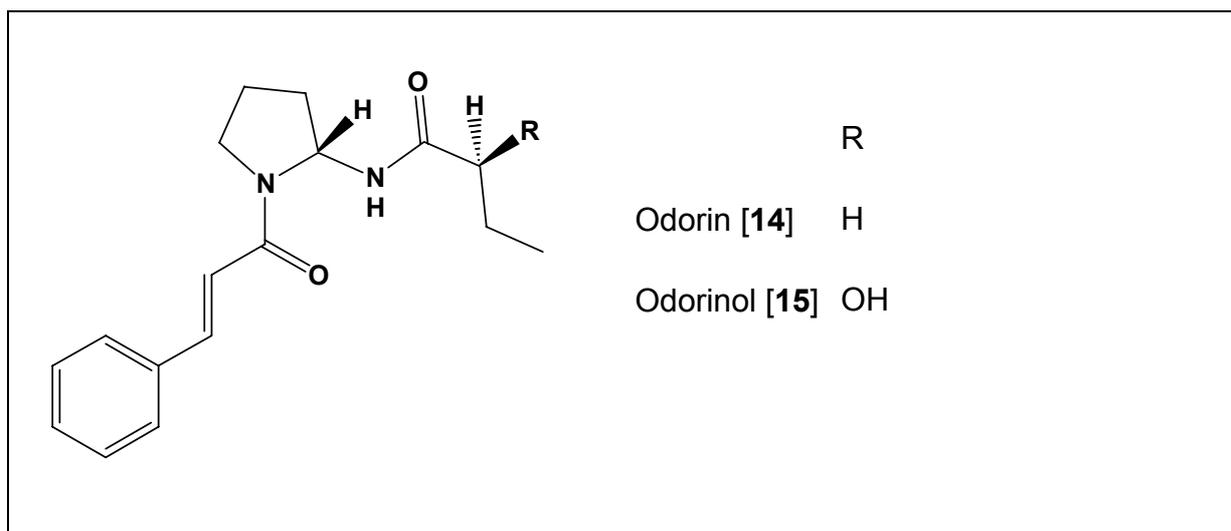
NA : nicht aktiv (keine insektizide Aktivität  
bis 50 ppm)

Substanz Nummer	Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	<i>A. duperreana</i>				<i>A. odorata</i>					LC <sub>50</sub> (ppm)
						Blü <sup>a</sup>	Blä <sup>a</sup>	Wu <sup>b</sup>	Zw <sup>c</sup>	Blü <sup>d</sup>	Blä <sup>e</sup>	Wu <sup>f</sup>	Zw <sup>g</sup>	ZB <sup>h</sup>	
	Roc. A	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	OH			X	X		X	X (X)	X	X	0.9
[1]	Roc. Q	OH	CONHCH <sub>3</sub>	H	OH	X		X	X		X	X (x)			1.3
[2]	Roc. U	OH	COOCH <sub>3</sub>	H	OH	X	X	X			X	X (x)			1.3
[3]	Roc. W	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	H	OH	X		X							8.1
[4]	Roc. D	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH	X	X	X	X	X		(x)			1.5
[5]	Roc. I	OCOCH <sub>3</sub>	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH	X		X	X	X				X	8.0
[6]	Roc. M	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OH	X		X		X					17.8

Dissskusion

Substanz Nummer	Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	<i>A. duperreana</i>				<i>A. odorata</i>					LC <sub>50</sub> (ppm)
						Blü <sup>a</sup>	Blä <sup>a</sup>	Wu <sup>b</sup>	Zw <sup>c</sup>	Blü <sup>d</sup>	Blä <sup>e</sup>	Wu <sup>f</sup>	Zw <sup>g</sup>	ZB <sup>h</sup>	
[7]	Roc. N	OCOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	OH	OH	X		X		X					14.2
[8]	Roc S	Pyrimidinon		H	OH	X		X	X		X	X (x)			1.1
[9]	Roc. AA	OCOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	H	OH	X		X							6.6
[10]	Roc. V	OCOCH <sub>3</sub>	CONH <sub>2</sub>	H	OH	X		X							2.0
[11]	Roc. X	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	X									NA
[12]	Roc. Y	OH	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	X									NA
[13]	Roc. Z	Pyrimidinon		OH	OH	X									5.7
	Roc. AB	OCOCH <sub>3</sub>	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	OH			X							7.1
	Roc. L	OH	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OH			X					X		1.1
	Roc. AC	OH	COOCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>			X							N.A
	Roc. J	OH	COOCH <sub>3</sub>	OH	OH			X			(x)		X		1.1
	Roc. AK	OH	H	H	OH			X		X	X (x)				17.0
	Roc. AD	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>			X							N.A
	Roc. R	dihydropyrimidinon		OH				X	X		X				1.7
	Roc. H	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH				X		(x)		X		1.0
	Roc. E	OH	CONH <sub>2</sub>	OH	OH					X			X		1.6
	Roc. K	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH					X			X		6.7
	Roc. T	=NOH	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH								X		1.3

Weiterhin wurden auch die in *Aglaia*-Arten weitverbreiteten Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamide Odorin [14] und Odorinol [15], identifiziert (s. Abb. 3.2). Sie kommen sowohl in den Blättern als auch in den Blüten von *A. duperreana* als Hauptkomponenten vor. Die ist auch der Fall bei *A. odorata* (Shiengthong und Ungphakorn, 1979). Beide Verbindungen besitzen keine insektizide Aktivität und werden deshalb beim Bioscreening des Methanol-Extrakts aus *A. duperreana* nicht erfaßt.



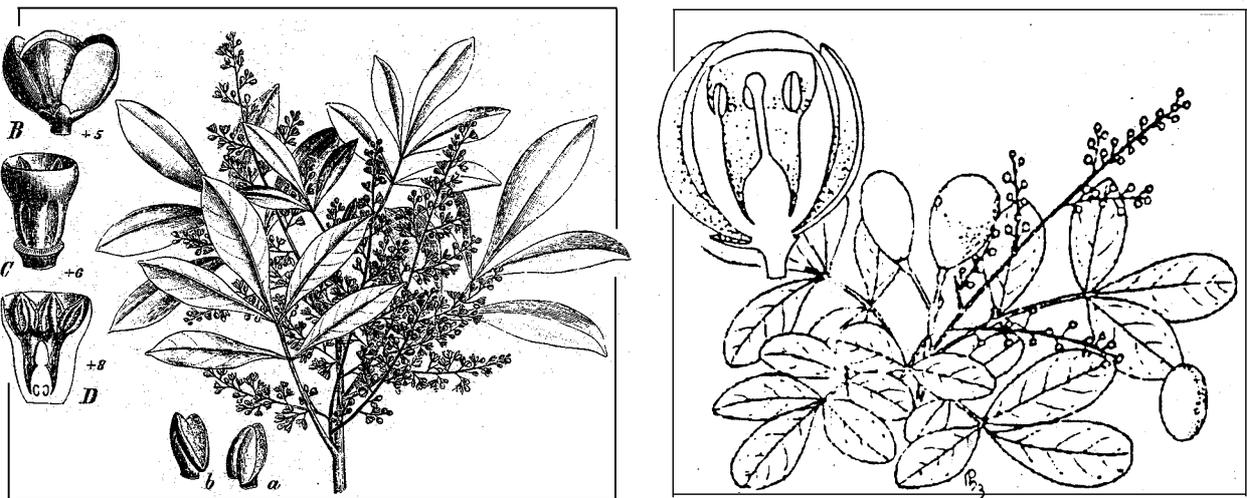
**Abb. 3.2 : Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamide aus *A. duperreana***

Im taxonomischen Kontext bildet *Aglaia* - wohl aufgrund ihrer Vögel bedingten Verbreitung der Samen - nicht nur die größte Gattung in der Familie Meliaceae, sondern zeigt auch eine große Variabilität (Pannell, 1992). Daraus resultieren größere taxonomische Probleme als bei anderen Gattungen innerhalb der Familie. Beispielsweise existieren verschiedene Konzepte zur Abgrenzung der Gattung, und es ist noch unklar, ob es sich bei manchen synonym geführten Arten tatsächlich um eine und dieselbe Art, oder doch um verschiedene Arten handelt.

In ihrer Monographie über die Gattung *Aglaia* hat Pannell *A. duperreana* mit *A. odorata* synonymisiert (Pannell, 1992). Als verwandte Art von *A. odorata* ist *A. duperreana* vor allem in Indochina (Vietnam) heimisch. Aufgrund ihrer stark duftenden Blüten

ist sie dort wie *A. odorata* in Indonesien durch Anbau weitverbreitet. Morphologisch sind Unterschiede zwischen beiden Arten zu erkennen (s. Abb. 3.3). Die Blätter von beiden Arten sind wechselständig und unpaarig gefiedert. Bei *A. duperreana* sind aber die Blätter und die Blütenrispen deutlich kleiner und nicht zugespitzt wie bei *A. odorata*.

Die bisherige phytochemische Betrachtung der Rocaglamid- und Bisamid-Muster in beiden *Aglaia*-Arten wies darauf hin, daß sie möglicherweise tatsächlich eine Art darstellen und nur als geographische Varietäten zu betrachten seien. Zur weitergehenden Beantwortung dieser taxonomischen Fragestellung ist jedoch sicherlich eine eingehende phytochemische Analyse beider Arten in Begleitung mit genetischen Untersuchungen notwendig.



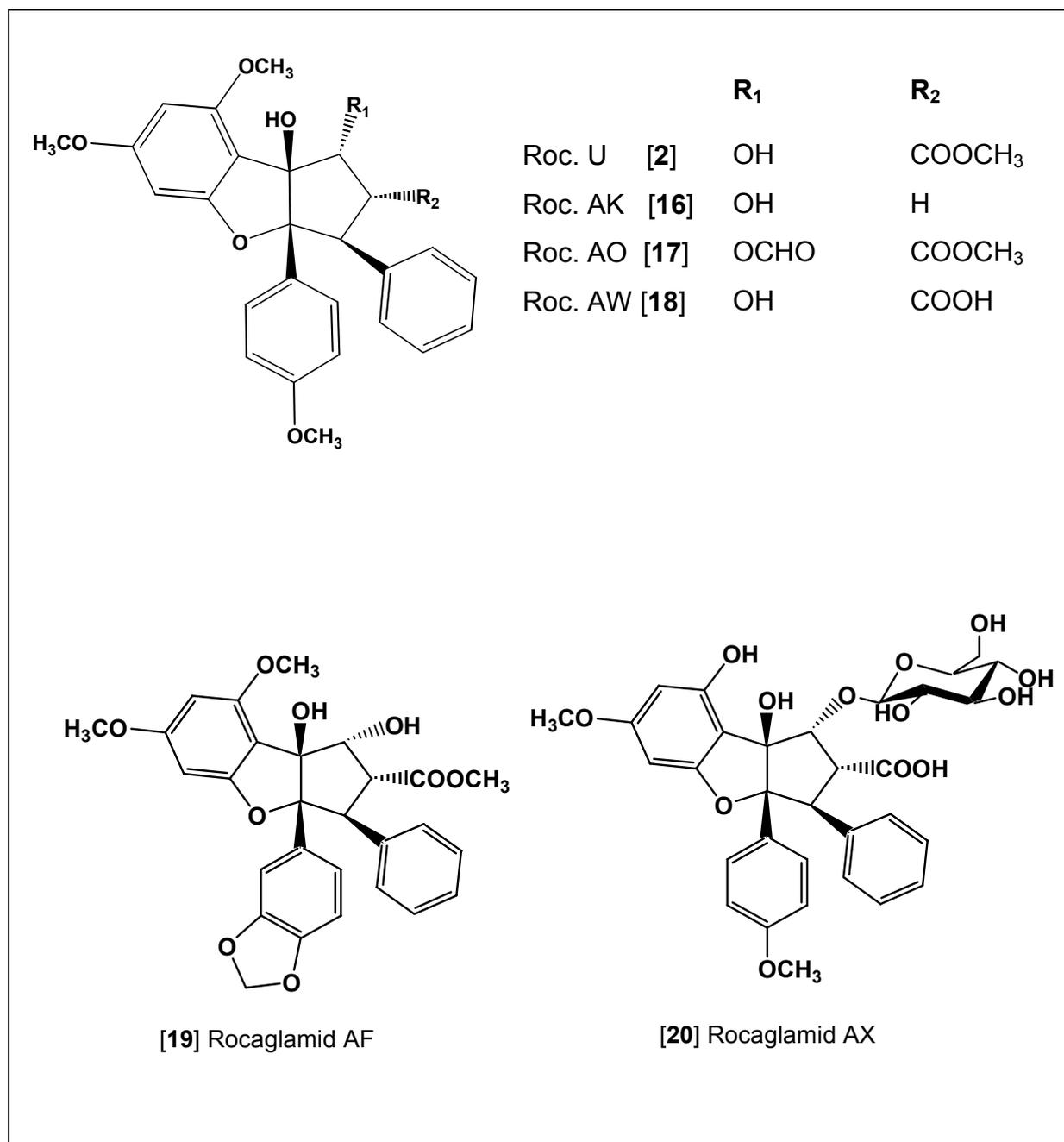
**Abb. 3.3 : *A. odorata* LOUR. (links, Engler et al., 1960) und *A. duperreana* PIERRE (rechts, Auszug aus einem unbekanntem vietnamesischen Buch)**

### 3.1.2. *Aglaia dasyclada*

Die Ergebnisse der phytochemischen Untersuchung des Methanol-Extrakts von *A. dasyclada* zeigten ein anderes Muster an Rocaglamiden und verwandten Verbindungen als in *A. duperreana* (s. Abb. 3.4). Aus relativ aktiven Fraktionen wurden vier Rocaglamid-Derivate isoliert. Es handelt sich um die bereits bekannten Rocaglamide U, AK, AO und AF (Ishibashi *et al.*, 1993 ; Cui *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 2000). Diese Rocaglamid-Derivate zeigten gegenüber Raupen von *Spodoptera littoralis* LC<sub>50</sub>-Werte von 1.3, 17.0, 5.2 bzw. 7.7 ppm (Hiort *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2000). Zwei weitere Rocaglamid-Derivate, Rocaglaolsäure (Rocaglamid AW) und das 1-O-Glycosid der Rocaglaolsäure (Rocaglamid AX) wurden aus polaren, inaktiven Fraktionen isoliert. Rocaglamid AX stellt einen neuen Naturstoff dar.

Die ermittelte Zusammensetzung des Rocaglamid-Spektrums aus *A. dasyclada* erklärt die geringe insektizide Aktivität beim Screening des Methanol-Extrakts, sowohl in der vorliegenden Arbeit (s. Kapitel 2; Tab. 2.1) als auch bei einer Reihe von Methanol-Extrakten aus chinesischen *Aglaia*-Arten (unpublizierte Daten).

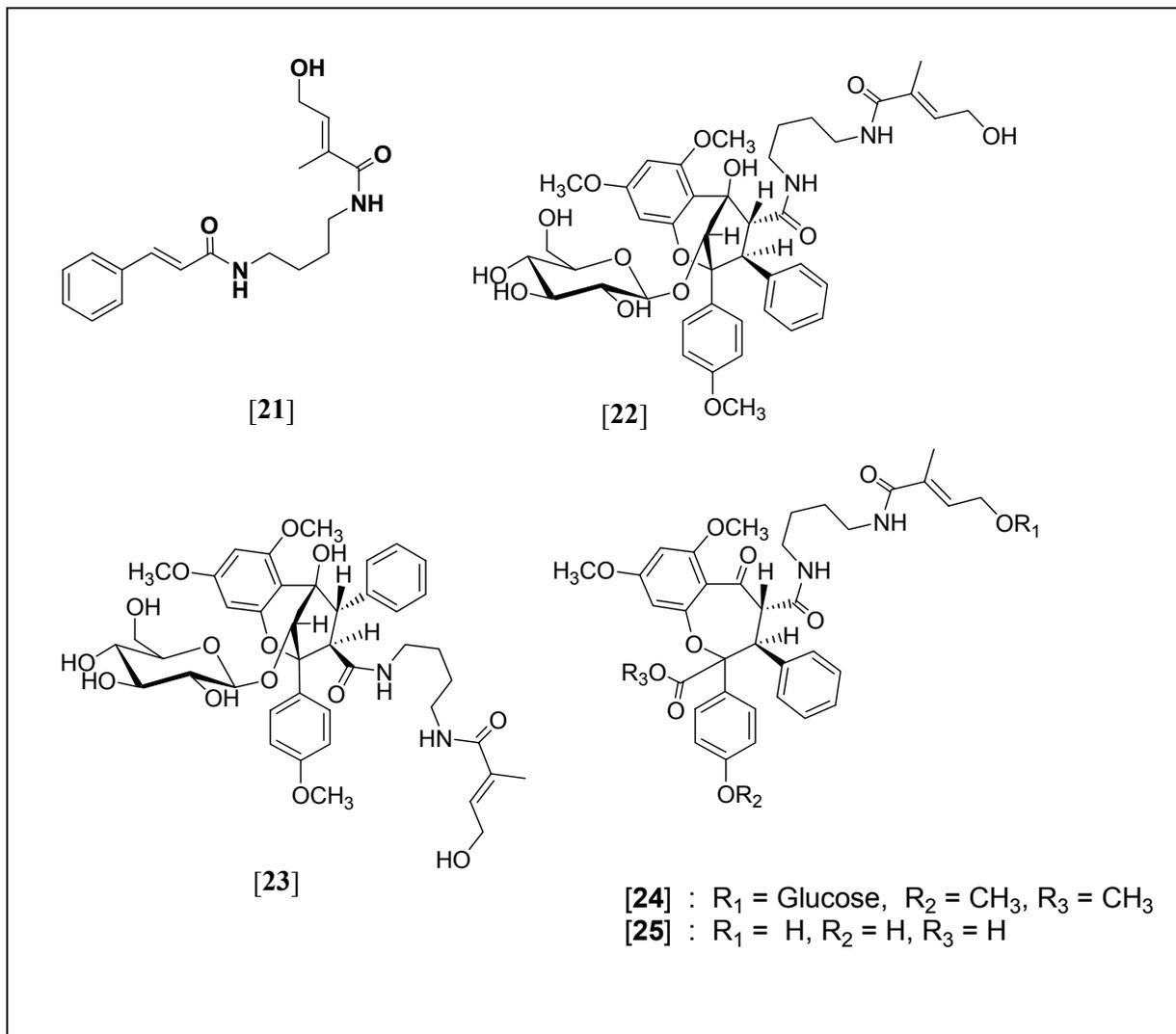
In den vorangegangenen Arbeiten wurden aus *Aglaia*-Arten neben den Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamiden wie Odorin [14] auch eine Reihe von komplexeren, strukturell mit Rocaglamiden verwandten Verbindungen isoliert, die entsprechende Pyrrolidin-Bisamid-Seitenketten aufweisen. Sie besitzen verschiedene aromatisch-heterozyclische Grundgerüste, nämlich ein Benzopyran- (im Falle von Aglainen und Aglaforbesinen) bzw. ein Benzoxepin-System (bei den Forbaglinien) (s. Kapitel 1; Abb. 1.6). Allerdings zeigen sie im Unterschied zu den Rocaglamiden generell keine insektizide Aktivität. Ebenso wie die Rocaglamide leiten sich Aglaine, Aglaforbesine und Forbagline biogenetisch wahrscheinlich aus Flavonoiden und Zimtsäure-Bisamid-Derivaten ab (Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1999). Das Vorkommen des Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamids Odorin zusammen mit den entsprechend substituierten Aglainen, Aglaforbesinen und Forbaglinien ist in mehreren phytochemischen Untersuchungen von *Aglaia*-Arten nachgewiesen worden (Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001).



**Abb. 3.4 : Die aus *A. dasyclada* isolierten Rocaglamid-Derivate**

Aus inaktiven Fraktionen von *A. dasyclada* wurden Aglaine [22], Aglaforbesine [23] und Forbagline [24, 25] zusammen dem entsprechenden Zimtsäure-Bisamid [21] isoliert (s. Abb. 3.5). Damit ergibt sich hier ein anderes phytochemisches Bild als bei den bisher beschriebenen *Aglaia*-Arten: Der auffälligste Unterschied liegt darin, daß alle Aglaine, Aglaforbesine und Forbagline keine Pyrrolidin-Bisamid-, sondern eine

Putrescin-Bisamid-Seitenkette tragen. Parallel dazu konnten in *A. dasyclada* weder Odorin [14] noch Odorinol [15], sondern nur Dasyclamid [21] detektiert werden - also ebenfalls eine Verbindung, bei der die Seitenkette nicht zum Pyrrolidin zyklisiert ist, sondern offenkettig als Putrescin vorliegt. Das Bisamid-Muster in *A. dasyclada* (s. Abb. 3.5) ist im Einklang mit dem vermuteten biogenetischem Zusammenhang des Zimtsäure-Bisamid-Derivats mit den Verbindungen des Aglain-, Aglaforbesin- bzw. Forbaglin-Typs (Dumontet *et al.*, 1996; Nugroho *et al.*, 1999).



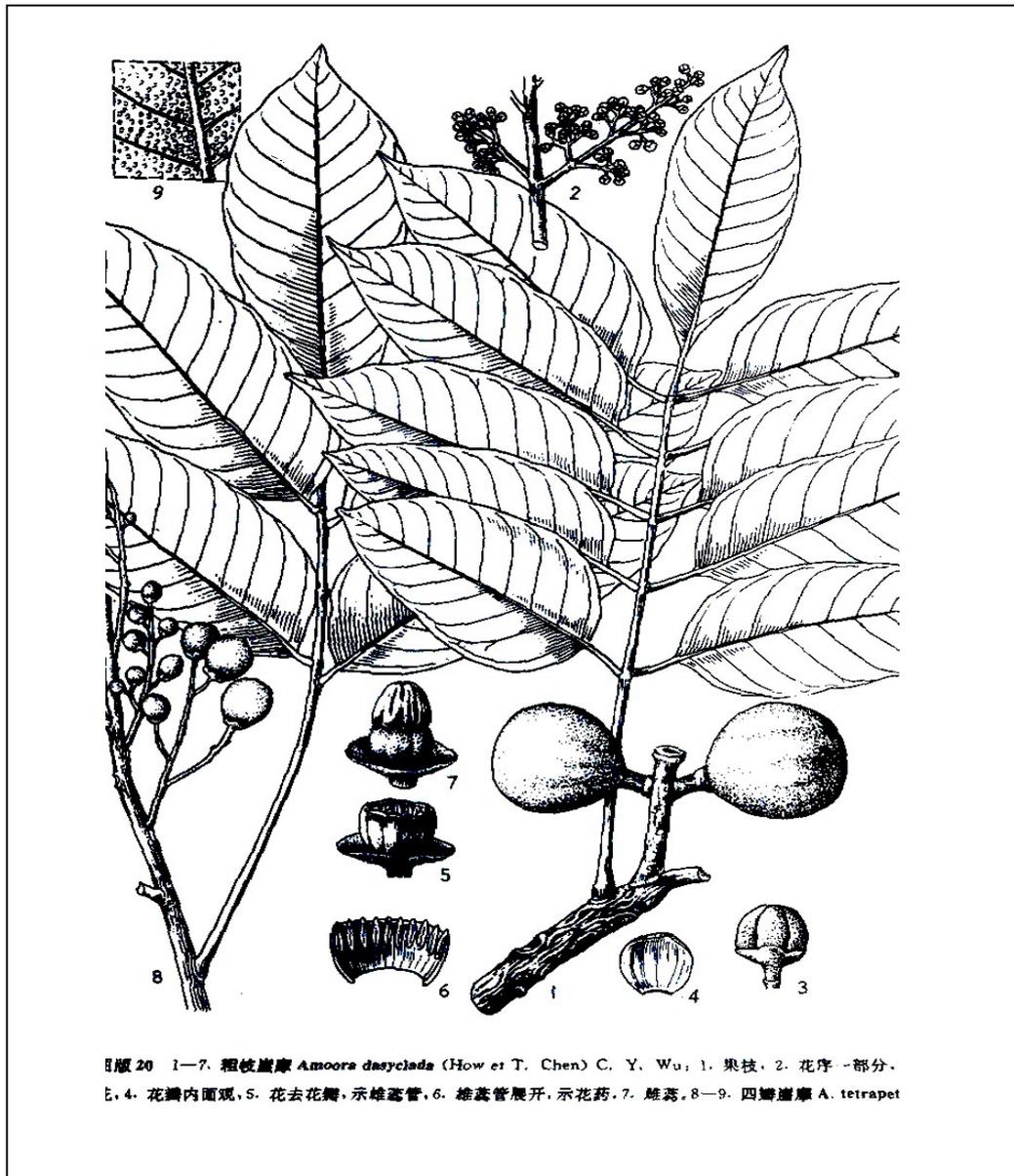
**Abb. 3.5 : Verbindungen aus *A. dasyclada* mit Putrescin-Bisamid-Gruppe**

Diese Befunde deuten darauf hin, daß es eine enge Korrelation zwischen der Natur der „einfachen“ Zimtsäure-Bisamide (als biogenetischer Vorstufe) und dem Substitutionsmuster der Seitenketten der entsprechenden Rocaglamid-verwandten komplexeren Naturstoffe innerhalb einer untersuchten *Aglaia*-Art gibt.

Natürlich ist es naheliegend, die zyklisierten Pyrrolidin-Derivate als aus den offenkettigen Putrescin-Derivaten abgeleitet zu betrachten. Damit wäre es sicherlich zutreffend, im Zusammenhang mit Odorin [14] und Odorinol [15] von Alkaloiden zu sprechen, da diese sich sicherlich von Ornithin ableiten, wie man bei oberflächlicher Betrachtung zunächst vermuten könnte (Shiengthong und Ungphakorn, 1979). Im Einklang mit dieser Vorstellung einer „sekundären“ Zyklisierung des Putrescins zum Pyrrolidin steht ebenfalls die schon sehr früh getätigte Beobachtung, daß Odorin [14] und Odorinol [15] in den meisten, wenn nicht in allen Fällen in den entsprechenden Pflanzen als Diastereomeregemische (an Position 2' des Pyrrolidin-Rings) vorliegen (Saifah und Puripattavong, 1993).

Insgesamt liefern diese Ergebnisse eine mögliche Erklärung für die starke Tendenz zur Akkumulation von Zimtsäure-Bisamid-Verbindungen in der Gattung *Aglaia*, die biogenetisch mit der Biosynthese der Rocaglamide und verwandter Verbindungen verknüpft sind. Sie können damit für chemotaxonomische Fragen innerhalb der Gattung *Aglaia* als phytochemische Merkmale genutzt werden.

*A. dasyclada* wurde weder von Pannell noch von Mabberley in ihren taxonomischen Bearbeitungen der Gattung *Aglaia* bzw. der Familie Meliaceae beschrieben (Pannell, 1992; Mabberley *et al.*, 1995). Offensichtlich lag beiden Autoren, die insgesamt über 105 *Aglaia*-Arten untersuchten, weder Frischmaterial von *A. dasyclada* vor, noch fanden sich entsprechende Herbarbelege. In der chinesischen Literatur wird diese *Aglaia*-Art aber anerkannt und entweder als *Aglaia dasyclada* (Institute of Gangtong Botany Research, 1974) oder *Amoora dasyclada* bezeichnet (s. Abb. 3.6; Anonymous, 1984; Anonymous, 1997). Der Name *Amoora* fand sich in der Literatur erstmals 1820 in „*Plants of the Coast of Coromandel*“ (Candolle, 1878) und die Typusart ist *Amoora cucullata*. *Aglaia* und *Amoora* wurden ursprünglich als getrennte Gattungen geführt und unterscheiden



**Abb. 3.6 : In chinesischem Buch beschriebener *Amoora dasyclada* (Anonymous, 1997)**

sich – je nach Auffassung des jeweiligen Bearbeiters - entweder durch eine unterschiedliche Zahl an Antheren bzw. Blütenblättern oder durch die Art des Aufspringens der Früchte. Von einigen Autoren wurden wegen der Schwierigkeit, beide Untergruppen durch morphologische bzw. anatomische Merkmale zu trennen, beide Bezeichnungen parallel verwendet (Candolle, 1878; Pannell, 1992). Daher ist gene

rell die Abgrenzung von *Aglaia* gegenüber *Amoora* vor allem in der älteren Literatur unsicher. In ihrer Monographie der Gattung *Aglaia* hat Pannell die Taxa *Aglaia* und *Amoora* weitestgehend synonymisiert, allerdings die Gattung *Aglaia* basierend auf der Art des Aufspringens der Früchte in die beiden Untergruppen (*sectiones*) *Aglaia* und *Amoora* aufgetrennt (Pannell, 1992; Mabberley *et al.*, 1995).

In der gesamten phytochemischen Literatur wurden Rocaglamide bisher ausschließlich für *Aglaia*-Arten beschrieben. Insbesondere lieferten phytochemische Untersuchungen an *Amoora*-Arten keinen einzigen Hinweis auf das Vorkommen von Rocaglamiden (Haque *et al.*, 1995; Haque *et al.*, 1996; Aboutabl *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2001). Die Tatsache, daß Rocaglamid-Derivate und verwandte Verbindungen in *A. dasyclada* im Rahmen der vorliegende Arbeit identifiziert wurden, könnte einen Beitrag zu obengenannter taxonomischer Fragestellung leisten. In phytochemischer Hinsicht ist *A. dasyclada* somit eindeutig nicht der Untergruppe *Amoora*, sondern der Untergruppe *Aglaia* zuzuordnen.

Zu den weiteren im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen aus *A. dasyclada* gehören das Cumarin-Derivat Scopoletin [26], das Flavonoid Catechin [27] sowie die komplexen Flavonoid-Derivate Phyllocumarin [28] und das Cinchonain-Derivat [29] (s. Abb. 3.7). Scopoletin [26] und Catechin [27] sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Für Cumarine gilt, daß sie innerhalb der Ordnung Rutales viel häufiger in der Familie Rutaceae als in der Familie Meliaceae vorkommen (Waterman und Grundon, 1983). Ihr Vorkommen in *Aglaia*-Arten könnte somit eine Bedeutung für die Chemotaxonomie haben, insbesondere zur Abgrenzung gegen andere Gattungen innerhalb dieser Familie.

Phyllocumarin [28], ein Flavanocumarin, und das Cinchonain-Derivat [29], ein Phenylpropanoid-Derivat des Catechin, sind Vertreter von für Pflanzen seltenen Flavonoid-Klassen (Porter, 1993). Solche Verbindungen wurden zum ersten Mal aus *Phyllocladus trichomanoides* (Podocarpaceae) bzw. *Cinchona succirubra* (Rubiaceae) isoliert (Foo, 1989; Nonaka und Nishioka, 1982). Vor allem die Cinchonaine repräsentieren eine interessante Modifikation von Flavonoiden; sie werden auch als Neoflavonoide eingeordnet (Porter, 1993). Ihr Vorkommen in Pflanzen erstreckt sich über einige, miteinander kaum verwandte Gattungen aus verschiedenen Pflanzenfa

milien, z. B. *Uncaria rhyncophylla* (Rubiaceae), *Kandelia candel* (Rhizophoraceae), *Polygonum bistorta* (Polygonaceae) und *Raphiolepis umbelatta* (Rosaceae) (Nonaka et al, 1982; Hsu et al., 1985). Flavanocumarine entstehen möglicherweise als Abbauprodukte der Cinchonaine (Foo, 1989). Die chemotaxonomische Bedeutung des Auftretens dieser seltenen Flavonoid-Derivate in *Aglaia*-Arten kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilt werden.

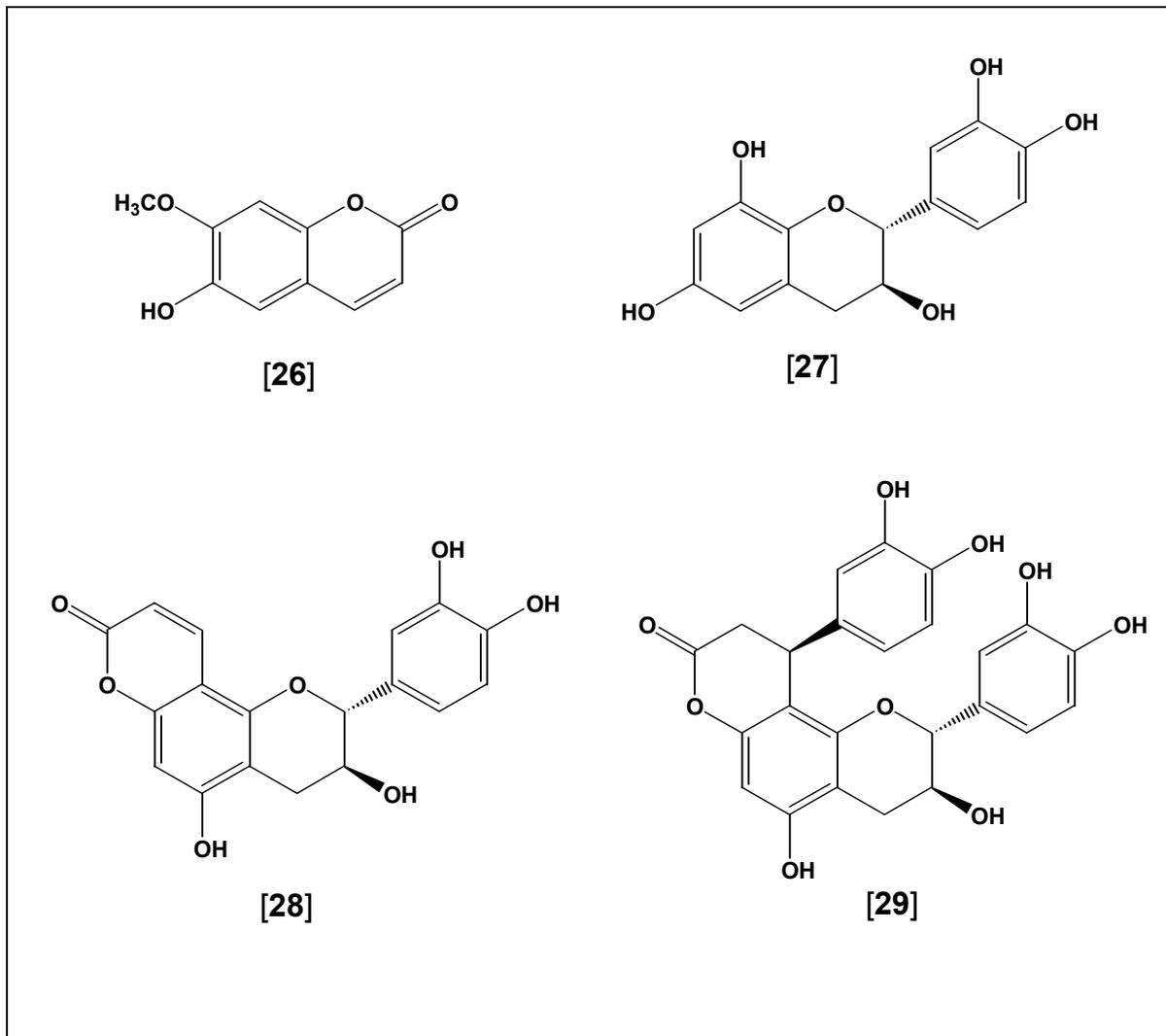


Abb. 3.7 : Aus *A. dasyclada* isolierte Cumarin und Flavonoid-Derivate

Abschließend kann gesagt werden, daß der Zusammenhang zwischen den vorliegenden Ergebnissen der phytochemischen Untersuchungen der *Aglaia*-Arten und den jeweiligen taxonomischen Fragestellungen vorsichtig betrachtet werden muß. Rocaglamide und ihre verwandten Verbindungen, vor allem die Aglaine, Aglaforbesine und Forbagline, sowie die entsprechende Zimtsäure-Bisamid-Derivate, sind nach wie vor sehr charakteristische phytochemische Merkmale dieser Gattung. Sie könnten mit den anderen relativ weit verbreiteten Verbindungen wie Cumarinen und den Flavonoiden einen signifikanten taxonomischen Beitrag leisten. Auf der anderen Seite kann aber bezüglich der Variation und Redundanz der Rocaglamide und seiner verwandten Verbindungen in der Gattung *Aglaia* das Muster dieser Sekundärstoffe taxonomisch und ökologisch variieren. Diese qualitative und quantitative Variation des Rocaglamid-Gehaltes innerhalb einer Art wurde bereits in einer eingehenden Untersuchung dargelegt (Satasook *et al.*, 1994), wobei sowohl Proben verschiedener geographischer Herkunft als auch verschiedene Pflanzenorgane einbezogen wurden. Diese Variation läßt sich möglicherweise als Ausdruck der Adaptation der Pflanzen an verschiedene physikalische und biotische Bedingungen interpretieren.

Eine vollständige Untersuchung, nicht nur an verschiedenen Arten, sondern auch von verschiedenen Individuen bzw. Organen der gleichen Art, ist somit wichtig, damit die biochemische Kapazität der Gattung *Aglaia* bestimmt werden kann und die chemotaxonomisch relevanten Verbindungen identifiziert werden können.

### 3.2. Biologische Aktivität

Die insektizide Aktivität des Rocaglamids wurde zum ersten Mal im Jahre 1993 durch die Wirkung gegenüber Schadinsekten wie *Peridroma saucia* und *Spodoptera litura* nachgewiesen (Janprasert *et al.*, 1993). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden weitere 28 isolierte Rocaglamid-Derivate gegenüber Raupen des Nachtfalters *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) getestet (Nugroho *et al.*, 1997a; Güssregen *et al.*, 1997; Nugroho *et al.*, 1997b; Nugroho *et al.*, 1999). Sie repräsentieren eine neue Klasse von Insektiziden pflanzlichen Ursprungs, die eine mit dem bekannten Azadirachtin vergleichbar starke insektizide Aktivität besitzen. Beispielsweise zeigt Rocaglamid (Rocaglamid A) gegenüber *S. littoralis* LC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte von 0.9 bzw. 0.008 ppm (Azadirachtin : 0.9 bzw. 0.04 ppm) (Nugroho *et al.*, 1997a). Die umfangreichen Untersuchungen zur insektiziden Aktivität anderer Rocaglamid-Derivate lieferte Informationen über die Wirkung von verschiedenen Substituenten an C-1, C-2, bzw. C-3'. Schließlich zeigte die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen zur antiproliferativen Aktivität einer Reihe von Rocaglamid-Derivaten gegenüber menschlichen Krebszell-Linien eine sehr gute Korrelation zu den Ergebnissen der Untersuchungen zur insektiziden Aktivität (Bohnenstengel *et al.*, 1999a; Bohnenstengel *et al.*, 1999b).

In der vorliegenden Arbeit wurde der bereits im Labor etablierte insektizide Biotest mit Raupen von *S. littoralis* für alle neue isolierten Naturstoffe, vor allem neue Rocaglamid-Derivate, eingesetzt, um ihre biologische Aktivität zu ermitteln. In diesem Biotest besaßen wie erwartet nur Rocaglamid-Derivate eine insektizide Aktivität, während andere Verbindungen, vor allem die verwandten Verbindungen des Rocaglamids – Aglaine, Aglaforbesine und Forbagline – keine insektizide Aktivität zeigten (s. Tab. 2.19, Kapitel 2: Ergebnisse). Außergewöhnlich in diesem Zusammenhang ist, daß die Rocaglamide Y und X, die am C-8b mit einer Ethoxygruppe substituiert sind, keine Aktivität zeigten. Dies ist das erste Mal, daß über gegenüber Insekten inaktive Rocaglamid-Derivate berichtet wird.

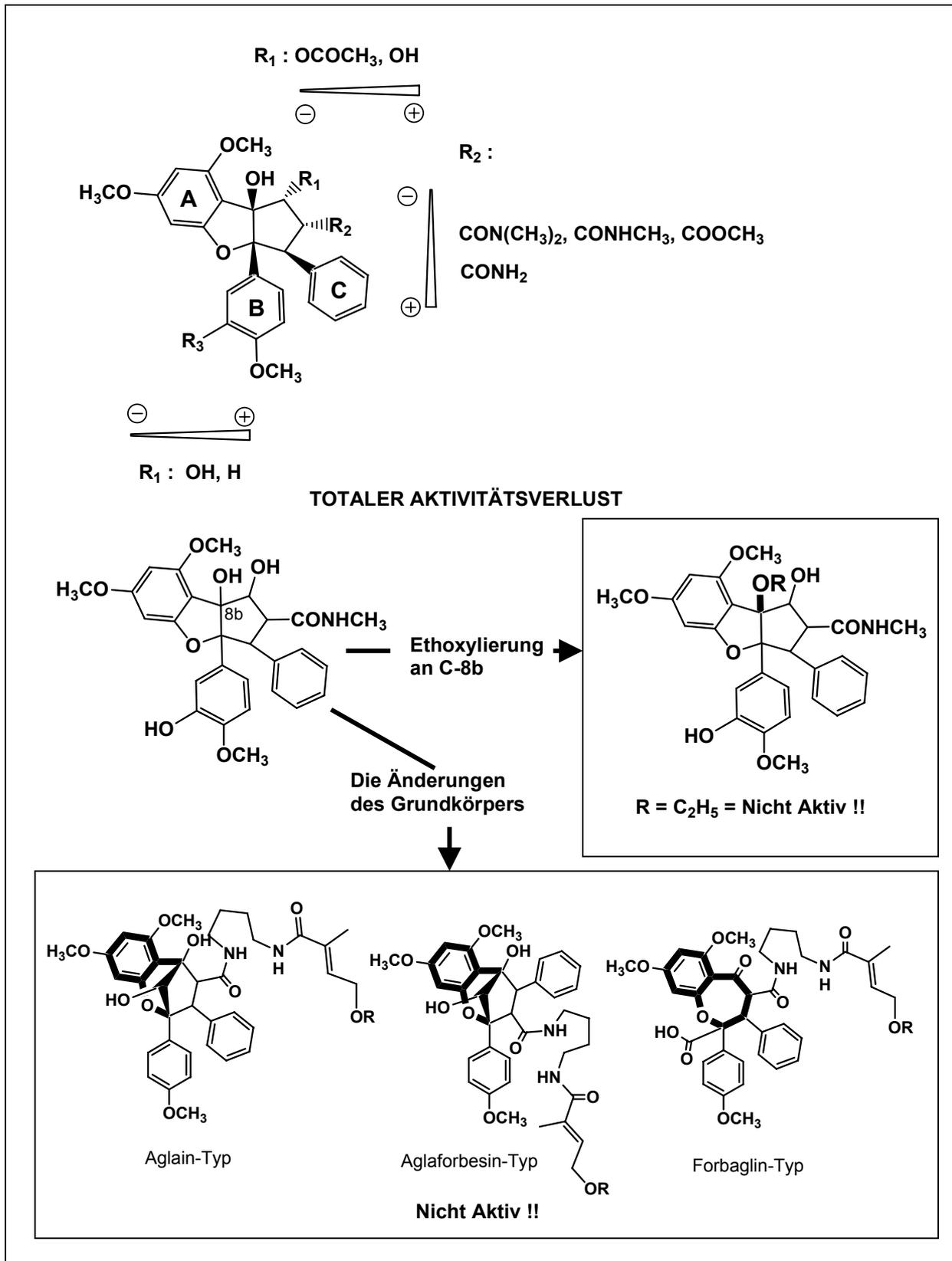
Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR, *Structure Activity Relationship*) der neuen Rocaglamid-Derivate gegenüber *S. littoralis* wurden durch den Vergleich ihrer LC<sub>50</sub>-Werte (s. Tab. 3.1) mit denen der bekannten Rocaglamid-Derivate ermittelt. Mit

einem  $LC_{50}$ -Wert von 2.0 ppm zeigt Rocaglamid V im Vergleich zu Rocaglamid B ( $LC_{50} = 0.8$  ppm, Nugroho *et al.*, 1997b) die Auswirkung einer Acetylierung an C-1. Der Vergleich des Rocaglamids V mit den Rocaglamiden AB und W ( $LC_{50} = 7.1$  ppm bzw. 8.1 ppm, Hiort *et al.*, 1999), die eine unterschiedliche Alkylamidgruppe an C-2 tragen, zeigt den Einfluß der Demethylierung der tertiären Amidgruppe an C-2. Eine Acetylierung an C-1 führt zur Abnahme der Aktivität um ungefähr die Hälfte im Vergleich zu einer freien Hydroxylgruppe, während die Demethylierung der Amidgruppe, sowohl vom tertiären als auch vom sekundären Amin, eine bis zu 4fach stärkere Aktivität verursacht (s. Abb. 3.8).

Dies ist auch der Fall bei Rocaglamid AA ( $LC_{50} = 6.6$  ppm). Der Ersatz der Hydroxylgruppe an C-1 (Rocaglamid U;  $LC_{50} = 1.3$  ppm, Nugroho *et al.*, 1997a) durch eine Acetylgruppe führt zur erwarteten Abnahme der Aktivität. Bezüglich des Einflusses des Substituenten an C-2 ist die Methylestergruppe des Rocaglamids AA in etwa vergleichbar mit einer N-Monomethylamidgruppe (wie bei Rocaglamid W) oder einer N,N-Dimethylamidgruppe (wie im Falle des Rocaglamids AB), während eine primäre, nichtmethylierte Amidgruppe (Rocaglamid V) zu einer etwa 4fach höheren Aktivität führt.

Schließlich belegt der Vergleich des Rocaglamids Z ( $LC_{50} = 5.7$  ppm) mit den Rocaglamiden S und R ( $LC_{50} = 1.1$  ppm bzw. 1.7 ppm, Nugroho *et al.*, 1997a) die Abschwächung der insektiziden Wirkung durch eine Hydroxylierung an C-3'.

Die nicht vorhandene Aktivität der Rocaglamide X [11] und Y [12] stellt eine erstaunliche Entdeckung dar. Beide Verbindungen besaßen im verwendeten Konzentrationsbereich (bis 50 ppm absolut keine Aktivität, weder als Insektizid, noch hinsichtlich einer Wachstumsregulierung. Gemeinsames Merkmal der beiden Derivate ist ein ungewöhnlicher Substituent an C-8b, nämlich eine Ethoxygruppe anstelle einer Hydroxylgruppe. Der völlige Verlust der Aktivität der beiden Derivate im Vergleich mit den C-8b-Hydroxy-analoga Rocaglamid L bzw. D ( $LC_{50} = 1.1$  ppm bzw. 1.5 ppm, Nugroho *et al.*, 1999; Nugroho *et al.*, 1997a) deutet darauf hin, daß die Hydroxylgruppe an C-8b essentiell für den Wirkmechanismus der Rocaglamid-Derivate ist.



**Abb. 3.8 : Ermittlungen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen der insektiziden Aktivitäten bei den Rocaglamid-Derivaten**

Dieser Befund wurde auch bestätigt durch die Isolierung zweier weiterer neuer Derivate, Rocaglamid AC und AD, aus den Wurzeln von *A. duperreana* (Hiort *et al.* 1999), die an C-8b ebenfalls eine Methoxygruppe tragen. Beide zeigten ebenfalls keinerlei insektizide Wirkung. Weitere Untersuchungen mit menschlichen Krebszelllinien ergaben, daß auch in diesem biologischen System keinerlei Aktivität zu beobachten war (Bohnenstengel *et al.*, 1999b).

Abschließend läßt sich anhand der vorliegenden Biotest-Ergebnisse die wichtige Bedeutung des Benzofuran-Grundkörpers für die biologische Wirkung der Rocaglamide im Vergleich zu den inaktiven Aglainen [22], Aglaforbesinen [23] und Forbaglinen [24] bestätigen. Letztere besitzen keine insektizide Aktivität (s. Kapitel 2; Tab. 2.21), wie auch bereits in vorangegangenen Arbeiten berichtet wurde (Nugroho *et al.*, 1999; Bacher *et al.*, 1999; Molleyres *et al.*, 1999). Dies zeigt damit deutlich, daß der Benzofuran-Grundkörper als Pharmacophor der Verbindungen des Rocaglamid-Typs anzusehen ist.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, daß der Hydroxylsubstituent am C-8b neben dem Benzofuran-Grundkörper eine weitere essentielle Voraussetzung für die insektizide Wirkung der Rocaglamide darstellt. Eine Alkylierung an dieser Position führt zu einem völligen Verlust der Aktivität. Die neuen Naturstoffe Rocaglamid X [11] und Y [12] stellen somit die ersten bekannten Rocaglamid-Derivate dar, die keine insektizide Aktivität besitzen. Unterschiede der Substituenten an C-1, C-2 und C-3' haben, soweit experimentelle Daten vorhanden sind, meist nur einen geringen Effekt im Vergleich zur aktivsten Verbindung, dem Rocaglamid B (LC<sub>50</sub>-Wert 0.80 ppm; Nugroho *et al.* 1997b). So betrug der LC<sub>50</sub>-Wert des Rocaglamid Z 5.70 ppm; nur in Ausnahmefällen können größere Aktivitätsverluste wie beim Rocaglamid F (LC<sub>50</sub>-Wert 19.70 ppm; Nugroho *et al.* 1997b) festgestellt werden.

### 3.3. Bildung von Zimtsäure-Derivaten in der Primärkalluskultur von *Aglaia elliptica*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang erstmalig die Anzucht von Kalluskulturen von *Aglaia*-Arten. Die Induktion der Kallusbildung gelang im basalen RW-(Risser und White) Medium unter Zugabe von Phytohormonen (1 ppm 2.4-D, 0.2 ppm BAP), sowie 100 ppm Ascorbinsäure (Antioxidationsmittel) und 500 ppm Caseinhydrolysat (komplex organische Zusatz). Als Explantate erwiesen sich sowohl junge Blätter und Stengelstücke als auch sterile Keimlinge aus Samen als geeignet. Ebenfalls zum ersten Mal wurde mit Hilfe einer LC-MS-Analyse einer charakteristischer Inhaltsstoff der Gattung *Aglaia*, dem Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamid-Derivat, Odorinol [15] im Kallus identifiziert. Das Vorkommen von Odorin [14], der in den Pflanzen fast immer zusammen mit Odorinol in nahezu gleicher Konzentration identifiziert wurde (Nugroho *et al.*, 1999; Brade *et al.*, 1998), konnte allerdings im Kallus nicht nachgewiesen werden. Nach der von uns dargelegten hypothetischen Biosynthese von Rocaglamiden und Aglainen spielen solche Bisamid-Derivate eine wichtige Rolle als Vorstufe (Nugroho *et al.*, 1999). Dies läßt das Vorkommen von biosynthetisch verwandten Verbindungen, wie Rocaglamiden und Aglainen, in den Kulturen auch plausibel erscheinen.

Die unterschiedlichen qualitativen Zusammensetzungen der Methanol-Extrakte der Kalli und der Blättern lassen sich durch die unterschiedlichen physiologischen Zustände sowie durch die verschiedenen Kulturbedingungen erklären. Weiterhin liegt die Ursache dafür häufig im geringen Differenzierungsgrad der Zellen in der Kalluskultur. Die Sekundärstoffbildung und/oder –speicherung ist häufig an differenzierte Gewebe und bestimmte Entwicklungsstadien gebunden (Wink, 1987). In viele Fällen wurden in den Kulturen sogar völlig neue, in den Pflanzen nicht vorkommende Sekundärstoffe nachgewiesen (Berlin, 1986).

Dennoch könnte eine Kalluskultur, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, als Modellsystem zur Untersuchung der Biosynthese interessanter Verbindungen in *Aglaia*-Arten, wie den Odorinen, Rocaglamiden sowie den Aglainen verwendet werden. Es wird vermutet, daß der Cyclopenta[bc]benzopyran-Grundkörper der Aglaine und Aglaforbesine durch Cycloaddition eines Flavonoids und eines Bisamids, z. B.

Odorin, gebildet wird (Nugroho *et al.*, 1999). Ob bei dieser Kultur tatsächlich ein solcher Zusammenhang besteht, könnte z. B. durch Zugabe von radioaktiv markierten Vorstufen der Zimtsäure-Derivate im Nährmedium überprüft werden. Damit könnte die bisher vorliegende hypothetische Biosynthese von Zimtsäure-, Benzofuran-Derivaten und anderen verwandten Verbindungen in *Aglaia* geprüft werden.

Die Tatsache, daß ein qualitativer und quantitativer Unterschied von Rocaglamiden zwischen den Pflanzenorganen und auch zwischen den an verschiedenen Orten gesammelten Pflanzen gleicher Arten vorliegt (Satasook *et al.*, 1994) weist auf einen möglichen ökologischen Zusammenhang und eine Kompartementierung der Rocaglamide-Bildung in den Pflanzen hin. Auch die Frage, ob Rocaglamide aus einem konstitutiven oder induzierbaren Benzofuranstoffwechsel abgeleitet werden, könnte durch solche Zellkultur-Systeme beantwortet werden.

## Kapitel 4

# Zusammenfassung

Die Gattung *Aglaia* (Meliaceae) ist in den tropischen Wäldern des gesamten Südostasiens, Südchina, den Pazifikinseln und Nordaustralien weit verbreitet. Die phytochemische Untersuchungen der Gattung *Aglaia* werden zur Zeit hauptsächlich durch ihre insektizide Wirkung motiviert. Die Ergebnisse zeigen das Vorkommen von Bisamiden, Lignanen, Triterpenoiden und Benzofuranen. Die Benzofuran-Derivate, sogenannte Rocaglamide, repräsentieren eine neue Verbindungsklasse und sind verantwortlich für die insektizide Aktivität. Weiterhin besitzen Rocaglamid-Derivate zytotoxische Aktivität gegenüber menschliche Krebs-Zelllinien. Neben Rocaglamid-Derivaten sind auch verwandte Verbindungsklassen aus *Aglaia*-Arten bekannt, nämlich Aglainen, Aglaforbesine (Benzopyrane) und Forbagline (Benzooxepine).

Auf der Suche nach neuen biologisch aktiven Naturstoffe aus der Gattung *Aglaia* (Meliaceae) wurde die insektizide Wirkung von Methanol-Extrakten verschiedener *Aglaia*-Arten gegenüber frisch geschlüpften Raupen des Schadinsektes *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) untersucht. Die getesteten Proben stammen aus Vietnam und Südchina. Insgesamt wurden zehn verschiedene Pflanzenorgane aus sechs *Aglaia*-Arten getestet. Daraus wurden die aktiven Rohextrakte der Blüten und Blätter von *A. duperreana* sowie der Blätter von *A. dasyclada* ausgewählt und weiter bearbeitet.

Aus den in diesem Bioscreening aufgefallenen Extrakten wurden mit Hilfe von durch Biotests begleiteter Fraktionierung sowie parallel durchgeführten chemisch-physikalischen Analysen insgesamt 29 Naturstoffe isoliert und charakterisiert (s. Tab. 1). Darunter befinden sich sechs bisher nicht beschriebene Benzofurane (Rocaglamide) [9 – 13, 20], zwei Benzopyrane (je ein Aglain und ein Aglaforbesin) [22, 23], zwei Benzooxepine (Forbagline) [24, 25] sowie ein Zimtsäure-Putrescin-Bisamid [21]. Die Strukturaufklärung erfolgte vor allem durch NMR-Spektroskopie

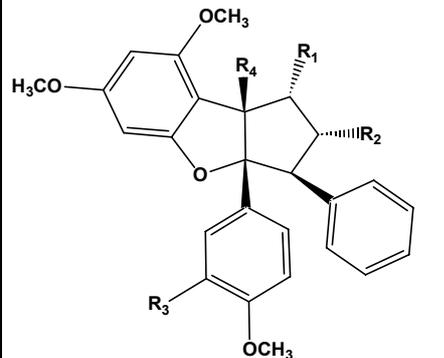
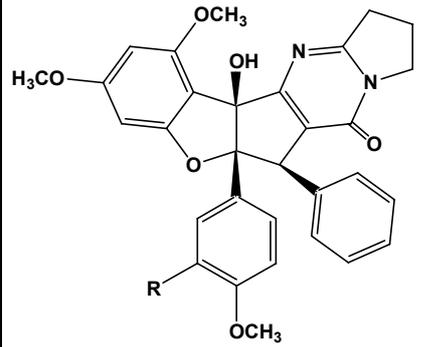
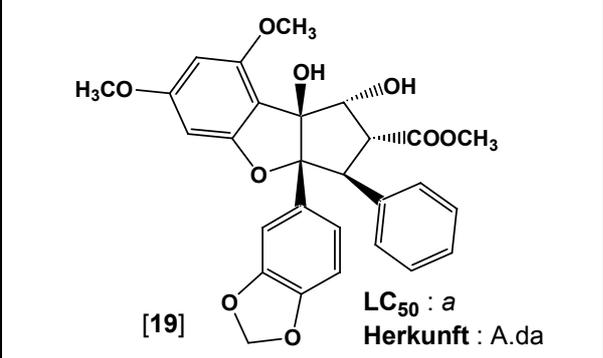
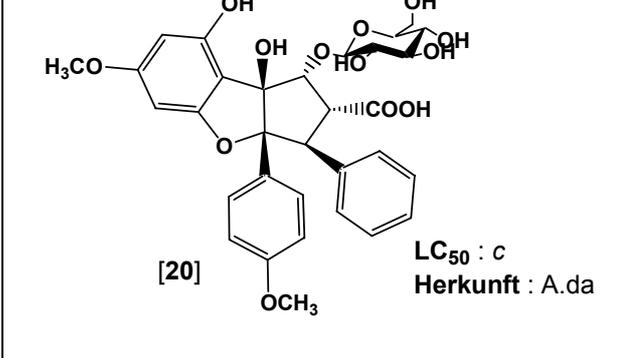
(darunter 2D-Experimente wie H-H-COSY, HMQC, HMBC und ROESY) sowie durch Massenspektrometrie.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

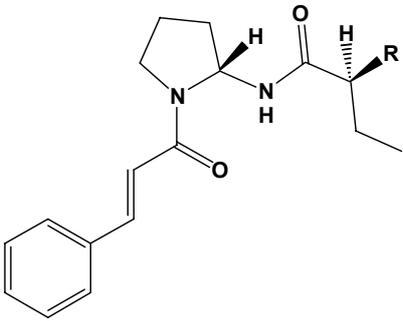
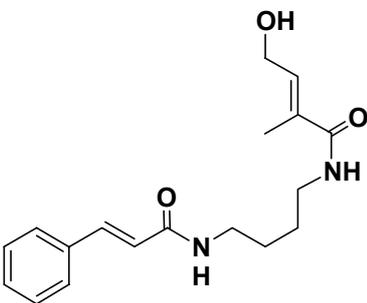
1. Beide *Aglaia*-Arten beinhalten Rocaglamid-Derivate, welche für die insektizide Aktivität des Rohextraktes verantwortlich sind. Aus *A. duperreana* konnten 13 Rocaglamid-Derivate in den Blüten bzw. zwei Rocaglamid-Derivate in den Blättern identifiziert werden, während aus *A. dasyclada* 6 weitere Rocaglamid-Derivate charakterisiert werden konnten.
2. Das Bisamid-Muster in *A. dasyclada* beinhaltet keine Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamide [14, 15] wie bei *A. duperreana*, sondern offenkettige Zimtsäure-Putrescin-Bisamide [21]. Das gemeinsame Vorkommen des Bisamids mit den Rocaglamiden, Aglainen, Aglaforbesinen sowie Forbaglinen, unterstützt ihren vermuteten biogenetischen Zusammenhang.
3. Die Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung ergaben für die Rocaglamide V [10], Z [13] und AA [9] eine starke insektizide Aktivität gegenüber Raupen von *S. littoralis* mit LC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werten von 2.0 bis 6.6 ppm bzw. 0.1 bis 1.0 ppm, während die Rocaglamide X [11] und Y [12] überraschenderweise keine Aktivität zeigten. Letztere stellen bisher die ersten Beispiele für biologisch inaktive Rocaglamid-Derivate überhaupt dar. Dieser Befund weist darauf hin, daß für die insektizide Aktivität dieser Verbindungs-Klasse der Hydroxyl-Substituent am C-8b neben dem Benzofuran-Grundkörper eine entscheidende Rolle spielt, da eine Alkoxylierung an C-8b zum vollständigen Verlust der Aktivität führt.
4. Aus phytochemischer Sicht erscheint es als gerechtfertigt, *A. dasyclada* aufgrund der vorhandenen Rocaglamide und der strukturell verwandten Verbindungen, wie den Aglainen, Aglaforbesinen und Forbaglinen, sowie den enthaltenen Zimtsäure-Putrescin-Bisamiden nicht der Untergruppe (Subgenus) *Amoora*, sondern der Untergruppe *Aglaia* zuzuordnen.

5. Sowohl das Auftreten der Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamide als auch das Muster der Rocaglamid-Derivate von *A. duperreana* unterstützen die aus morphologischen Gründen postulierte enge Verwandtschaft von *A. duperreana* mit *A. odorata*.
6. Als weitere Inhaltsstoffe der Blätter von *A. dasyclada* wurden Vertreter seltener Flavonoid-Typen wie Phyllocumarin [28] und Cinconain [29] zusammen mit Catechin [27] und Scopoletin [26] nachgewiesen. Als phytochemische Merkmale könnten die erstgenannten Flavonoid-Derivate neben den o.g. Verbindungsklassen eventuell einen weiteren Beitrag zur Chemotaxonomie der Gattung *Aglaia* leisten.
7. In einem Screening mit drei verschiedenen basalen Medien, die mit unterschiedlichen Phytohormonen und organischen Zusätzen versetzt worden waren, erwies sich das RW-(Risser und White) Medium mit 1 ppm 2.4-D, 0.2 ppm BAP, 100 ppm Ascorbinsäure und 500 ppm Caseinhydrolysat als geeignetstes Kulturmedium zur Kalusbildung bei *Aglaia*-Arten. Die Vorversuche zeigten darüber hinaus deutlich, daß Kalluskulturen von *Aglaia elliptica* in der Lage sind, relevante Inhaltsstoffe wie das Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamid-Derivat zu bilden.

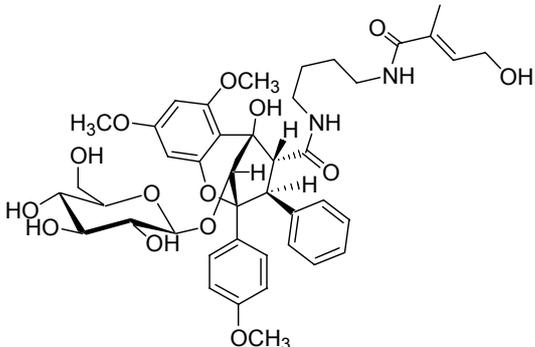
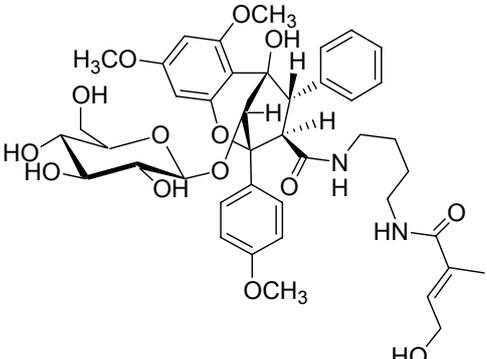
**Tabelle 4.1 : Zusammenstellung aller aus *A. duperreana* und *A. dasyclada* isolierten Verbindungen**

I. Rocaglamid-Derivate																																																																																																										
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Verb.</th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> <th>R<sub>4</sub></th> <th>LC<sub>50</sub></th> <th>Herkunft</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>[1]</td><td>OH</td><td>CONHCH<sub>3</sub></td><td>H</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A..du</td></tr> <tr><td>[2]</td><td>OH</td><td>COOCH<sub>3</sub></td><td>H</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A.du/A.da</td></tr> <tr><td>[3]</td><td>OCOCH<sub>3</sub></td><td>CONHCH<sub>3</sub></td><td>H</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[9]<sup>b</sup></td><td>OCOCH<sub>3</sub></td><td>COOCH<sub>3</sub></td><td>H</td><td>OH</td><td>6.6</td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[10]<sup>b</sup></td><td>OCOCH<sub>3</sub></td><td>CONH<sub>2</sub></td><td>H</td><td>OH</td><td>2.0</td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[4]</td><td>OH</td><td>CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></td><td>OH</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[5]</td><td>OCOCH<sub>3</sub></td><td>CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></td><td>OH</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[6]</td><td>OCOCH<sub>3</sub></td><td>CONHCH<sub>3</sub></td><td>OH</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[7]</td><td>OCOCH<sub>3</sub></td><td>COOCH<sub>3</sub></td><td>OH</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[11]<sup>b</sup></td><td>OH</td><td>CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></td><td>OH</td><td>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub></td><td>n.a</td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[12]<sup>b</sup></td><td>OH</td><td>CONHCH<sub>3</sub></td><td>OH</td><td>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub></td><td>n.a</td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[16]</td><td>OH</td><td>H</td><td>H</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A.da</td></tr> <tr><td>[17]</td><td>OCHO</td><td>COOCH<sub>3</sub></td><td>H</td><td>OH</td><td><sup>a</sup></td><td>A.da</td></tr> <tr><td>[18]</td><td>OH</td><td>COOH</td><td>H</td><td>OH</td><td><sup>c</sup></td><td>A.da</td></tr> </tbody> </table>	Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	LC <sub>50</sub>	Herkunft	[1]	OH	CONHCH <sub>3</sub>	H	OH	<sup>a</sup>	A..du	[2]	OH	COOCH <sub>3</sub>	H	OH	<sup>a</sup>	A.du/A.da	[3]	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	H	OH	<sup>a</sup>	A.du	[9] <sup>b</sup>	OCOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	H	OH	6.6	A.du	[10] <sup>b</sup>	OCOCH <sub>3</sub>	CONH <sub>2</sub>	H	OH	2.0	A.du	[4]	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH	<sup>a</sup>	A.du	[5]	OCOCH <sub>3</sub>	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH	<sup>a</sup>	A.du	[6]	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OH	<sup>a</sup>	A.du	[7]	OCOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	OH	OH	<sup>a</sup>	A.du	[11] <sup>b</sup>	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	n.a	A.du	[12] <sup>b</sup>	OH	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	n.a	A.du	[16]	OH	H	H	OH	<sup>a</sup>	A.da	[17]	OCHO	COOCH <sub>3</sub>	H	OH	<sup>a</sup>	A.da	[18]	OH	COOH	H	OH	<sup>c</sup>	A.da
Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	LC <sub>50</sub>	Herkunft																																																																																																				
[1]	OH	CONHCH <sub>3</sub>	H	OH	<sup>a</sup>	A..du																																																																																																				
[2]	OH	COOCH <sub>3</sub>	H	OH	<sup>a</sup>	A.du/A.da																																																																																																				
[3]	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	H	OH	<sup>a</sup>	A.du																																																																																																				
[9] <sup>b</sup>	OCOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	H	OH	6.6	A.du																																																																																																				
[10] <sup>b</sup>	OCOCH <sub>3</sub>	CONH <sub>2</sub>	H	OH	2.0	A.du																																																																																																				
[4]	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH	<sup>a</sup>	A.du																																																																																																				
[5]	OCOCH <sub>3</sub>	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH	<sup>a</sup>	A.du																																																																																																				
[6]	OCOCH <sub>3</sub>	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OH	<sup>a</sup>	A.du																																																																																																				
[7]	OCOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	OH	OH	<sup>a</sup>	A.du																																																																																																				
[11] <sup>b</sup>	OH	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	n.a	A.du																																																																																																				
[12] <sup>b</sup>	OH	CONHCH <sub>3</sub>	OH	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	n.a	A.du																																																																																																				
[16]	OH	H	H	OH	<sup>a</sup>	A.da																																																																																																				
[17]	OCHO	COOCH <sub>3</sub>	H	OH	<sup>a</sup>	A.da																																																																																																				
[18]	OH	COOH	H	OH	<sup>c</sup>	A.da																																																																																																				
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Verb.</th> <th>R</th> <th>LC<sub>50</sub></th> <th>Herkunft</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>[8]</td><td>H</td><td><sup>a</sup></td><td>A.du</td></tr> <tr><td>[13]<sup>b</sup></td><td>OH</td><td>5.7</td><td>A.du</td></tr> </tbody> </table>	Verb.	R	LC <sub>50</sub>	Herkunft	[8]	H	<sup>a</sup>	A.du	[13] <sup>b</sup>	OH	5.7	A.du																																																																																													
Verb.	R	LC <sub>50</sub>	Herkunft																																																																																																							
[8]	H	<sup>a</sup>	A.du																																																																																																							
[13] <sup>b</sup>	OH	5.7	A.du																																																																																																							
 <p>[19] LC<sub>50</sub> : a Herkunft : A.da</p>	 <p>[20] LC<sub>50</sub> : c Herkunft : A.da</p>																																																																																																									

## II. Zimtsäure-Bisamid-Derivate

	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Verb.</th> <th>R</th> <th>LC<sub>50</sub></th> <th>Herkunft</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>[14]</td> <td>H</td> <td>n.a</td> <td>A.du</td> </tr> <tr> <td>[15]</td> <td>OH</td> <td>n.a</td> <td>A.du</td> </tr> </tbody> </table>	Verb.	R	LC <sub>50</sub>	Herkunft	[14]	H	n.a	A.du	[15]	OH	n.a	A.du
Verb.	R	LC <sub>50</sub>	Herkunft										
[14]	H	n.a	A.du										
[15]	OH	n.a	A.du										
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Verb.</th> <th>LC<sub>50</sub></th> <th>Herkunft</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>[21]<sup>b</sup></td> <td>n.a</td> <td>A.da</td> </tr> </tbody> </table>	Verb.	LC <sub>50</sub>	Herkunft	[21] <sup>b</sup>	n.a	A.da						
Verb.	LC <sub>50</sub>	Herkunft											
[21] <sup>b</sup>	n.a	A.da											

## III. Rocaglamid-verwandte Verbindungen

	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Verb.</th> <th>LC<sub>50</sub></th> <th>Herkunft</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>[22]<sup>b</sup></td> <td>n.a</td> <td>A.da</td> </tr> </tbody> </table>	Verb.	LC <sub>50</sub>	Herkunft	[22] <sup>b</sup>	n.a	A.da
Verb.	LC <sub>50</sub>	Herkunft					
[22] <sup>b</sup>	n.a	A.da					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Verb.</th> <th>LC<sub>50</sub></th> <th>Herkunft</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>[23]<sup>b</sup></td> <td>n.a</td> <td>A.da</td> </tr> </tbody> </table>	Verb.	LC <sub>50</sub>	Herkunft	[23] <sup>b</sup>	n.a	A.da
Verb.	LC <sub>50</sub>	Herkunft					
[23] <sup>b</sup>	n.a	A.da					

	<b>Verb.</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>Herkunft</b>
	[24] <sup>b</sup>	Glucose	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	n.a	A.da
	[25] <sup>b</sup>	H	H	H	n.a	A.da

## IV. Weitere Verbindungen

<p>[26]</p>	<p>[27]</p>	<b>Verb.</b>	<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>Herkunft</b>
		[26]	n.a	A.da
		[27]	n.a	A.da
<p>[28]</p>	<p>[29]</p>	[28]	n.a	A.da
		[29]	n.a	A.da

<sup>a</sup> bereits bekannte Verbindungen; LC<sub>50</sub>-Werte wurden bereits ermittelt

<sup>b</sup> neue Naturstoffe

<sup>c</sup> LC<sub>50</sub>-Wert noch nicht ermittelt

n.a. : nicht aktiv

A.du : *Aglaia duperreana*

A.da : *Aglaia dasyclada*

## Kapitel 5

# Experimenteller Teil

### 5.1. Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden zwei *Aglaia*-Arten (Meliaceae) untersucht. Das Pflanzenmaterial wurde im August 1997 am natürlichen Standort in Vietnam (Blüten und Blätter von *A. duperreana*) und 1998 in Südchina (Blätter von *A. dasyclada*) gesammelt. Die Pflanzen wurden nach Pflanzenorganen bzw. Gewebe, wie z.B. Stengel, Blätter, Blüten, Rinde und Wurzel getrennt, und anschließend vor Ort in einem hellen Raum luftgetrocknet. Die Bestimmung des Pflanzenmaterials erfolgte sofort nach dem Sammeln.

Die Systematische Einordnung der untersuchten *Aglaia*-Arten ist die folgende (Pannell, 1992) :

Stamm : Meliaceae  
Klasse : Melioideae  
Ordnung : Aglaieae  
Familie : Meliaceae  
Art : 1. *Aglaia duperreana* Pierre (Pannell, 1992)  
2. *Aglaia dasyclada* Miq. (Institute of Gangtong Botany Reseach, 1974)

### 5.2. Bearbeitung des Pflanzenmaterials

Das luftgetrocknete Pflanzenmaterial (800 g Blüten von *A. duperreana*, 1 kg Blätter von *A. duperreana* und 1.5 kg Blätter von *A. dasyclada*) wurde mit einer Kaffemühle zunächst pulverförmig klein gemahlen. Bei Raumtemperatur wurde dann unter Rühren mehrmals mit Methanol extrahiert und filtriert.

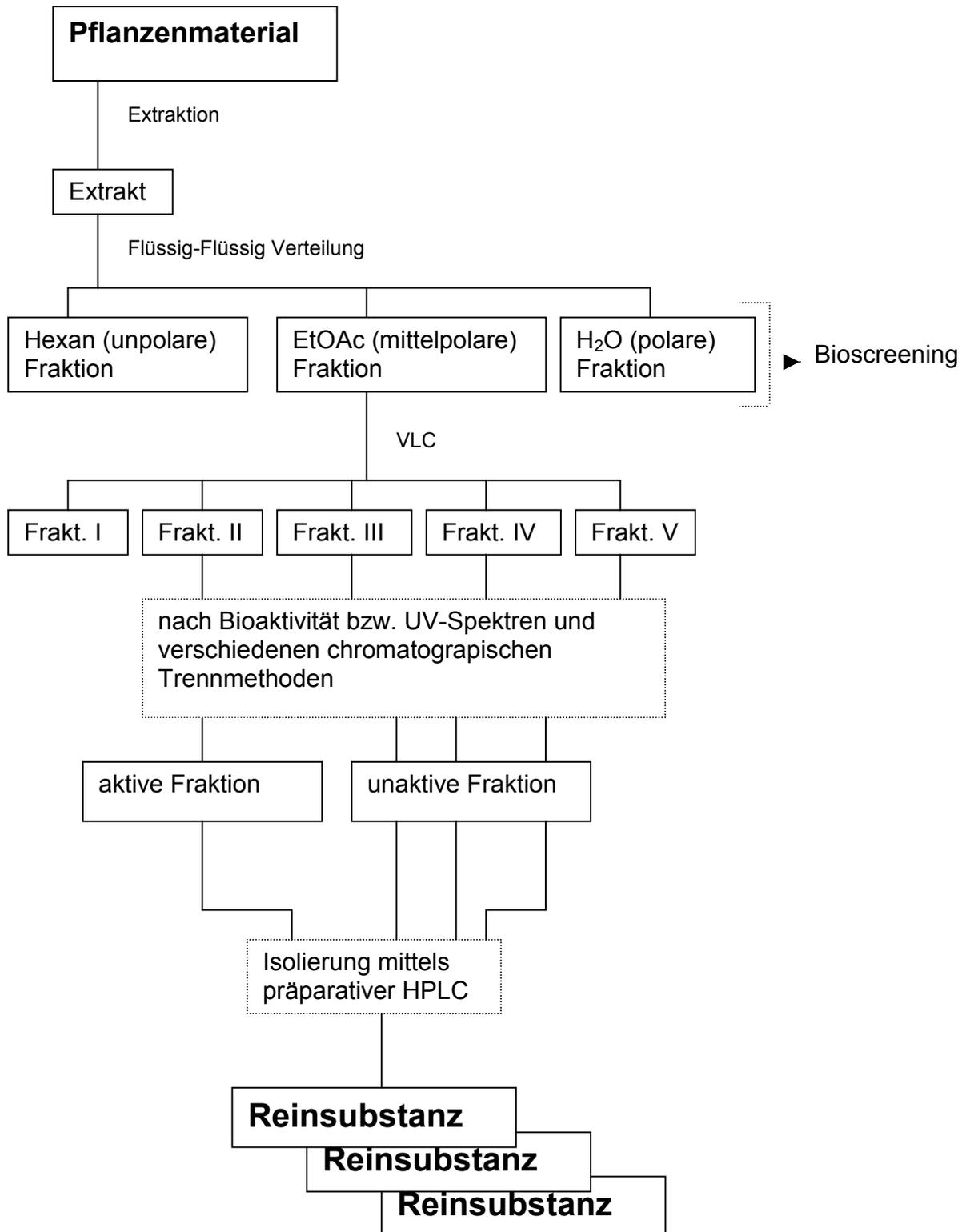


Abb. 5.1 : Bearbeitungsschema des Pflanzenmaterials

Das Lösungsmittel des in Rundkolben gesammelten Methanolextrakte wurde mit Hilfe von Rotationsverdampfern zur Trockne eingengt. Es folgte dann die Flüssig-Flüssig-Verteilung des gewonnenen Rohextraktes mit Lösungsmitteln steigender Polarität. Zunächst wurden unpolare Verbindungen aus dem 95%ige Methanol-Extrakt mit Hexan abgetrennt. Nach Einengen der Methanol-Fraktion und Zugabe von Wasser wurden mittelpolare Verbindungen anschließend von polaren Verbindungen durch Ethylacetat abgetrennt (s. Abb. 5.1). Die drei ausgeschüttelten Phasen wurden zur Trockne erneut eingengt und 5 mg davon in das Kunstfutter inkorporiert. Dies wurde an Raupen von *S. littoralis* verfüttert, um das Bioscreening auf insektizide Aktivität durch Fraßversuche (s. 5.4.2.) durchzuführen. Die aktiven Phasen wurden abschließend durch verschiedene Trennverfahren weiter bearbeitet.

### 5.3. Versuchstiere *Spodoptera littoralis*

Während der Extraktion und der Isolierung (Biotest begleitete Fraktionierung) wurden jeder Extrakt bzw. jede gewonnene Fraktion sowie die gewonnenen Pflanzeninhaltsstoffe als Reinsubstanzen an Raupen des Nachtfalters *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) getestet, um den optimalen Isolierungspfad zu finden und um die Wirkung der isolierten Verbindungen auf Insekten zu bestimmen.

Die systematische Einordnung von *S. littoralis* ist die folgende (Gawaad und El-Gayar, 1974) :

Stamm : Arthropoda  
Klasse : Insecta  
Ordnung : Lepidoptera  
Familie : Noctuidae  
Art : *Spodoptera littoralis* BOISD.

### 5.3.1. Kultivierung von *S. littoralis* im Labor

Die Aufzucht der Raupen erfolgte mit Hilfe einer künstlichen Nahrung in Kunststoffboxen unter optimalen Bedingungen in einem Kulturschrank (Temperaturen : zwischen 24 – 28 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 70 - 90 % sowie eine Hell-Dunkel-Phase von 16 : 8 h). Das Kunstfutter besteht aus gemahlene weißen Bohnen, Hefe, heißer Agar-Agar-Lösung sowie Vitamin C, Gentamycinsulfat (Antibiotikum), Formaldehydlösung und Nipagin (Konservierungsmitteln), was den Tieren eine optimale Entwicklung ermöglichte. In der Kultur betrug die Zeit vom Schlüpfen der Raupen bis zu ihrer Verpuppung 2-3 Wochen. Die Insekten wurden bis zu Vorpuppe in den Kunststoffboxen gehalten.

Bei Beginn der Verpuppung wurden die Vorpuppen auf Vermiculit, einem Silicat, aufbewahrt. Die Vorpuppen mußten sofort aus der Kultur entfernt werden, da bei *S. littoralis* Kannibalismus auftritt und besonders die wehrlosen Vorpuppen von ihren Artgenossen aufgefressen werden. Die Verwendung des Silicats eignet sich in zweierlei Hinsicht besonders gut als Kulturmedium. Zum einen kann es viel Feuchtigkeit aufnehmen und besitzt gute Wärmeisolationseigenschaften. Zum anderen ermöglicht es den Puppen sich einzugraben, wie es auch unter natürlichen Bedingungen der Fall wäre (Gawaad und El-Gayar, 1974). Die fertigen Puppen wurden bis zum Schlüpfen der Falter nach 7-9 Tagen in einem Kulturschrank bei 27 °C aufbewahrt.

Nach dem Schlüpfen wurden die Falter in einem Plastikeimer in dem oben erwähnten Kulturschrank mit Tag-Nachtrhythmus gehalten und mit Zuckerwasser gefüttert. In dem Eimer befand sich ein Filterpapier, auf dem die Weibchen ihre Eier ablegen konnten. Die Gelege wurden ausgeschnitten und in einem unbelichteten Kulturschrank bei 27 °C aufbewahrt, bis nach 3-4 Tagen wieder Raupen schlüpften.

### 5.3.2. Herstellung des Kunstfutters

Das verwendete Kunstfutter zur Kultivierung von *S. littoralis* und für den Biotest ist eine mit Agar verfestigte Nahrung, die nach Bowling (1967) und Dimetry (1970) hergestellt wurde. Die Hauptbestandteile sind weiße Bohnen (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae), Bäckerhefe und Ascorbinsäure, die mit Agar und unter Zugabe von Antibiotikum und Konservierungsmittel verfestigt wird.

Die Herstellung des Kunstfutters für die Kultivierung geschieht wie folgt : 150 g weiße Bohnen werden 24 h in 460 ml kaltem Wasser gequollen und danach mit einem Mixer zerkleinert. Anschließend wurden folgende Stoffe hinzugefügt :

30.0 g	Bäckerhefe	
3.0 g	L-(+)-Ascorbinsäure	
180 mg	Gentamycinsulfat	(Aminoglycosid-Antibiotikum)
3.0 g	Nipagin	(Konservierungsmittel)
1.0 ml	Formaldehydlösung	(Konservierungsmittel)

Die gesamte Mischung wurde gut homogenisiert. Dann wurden 10.0 g Agar-Agar mit 315 ml Wasser zum Kochen gebracht und nach Abkühlung auf ca. 50 °C zu dem Bohnengemisch zugefügt und kurz durchmischt. Die kalte, verfestigte Nahrung konnte direkt an die Raupen verfüttert bzw. ein bis zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 5.4. Isolierung der Inhaltsstoffe

Die Isolierung der Inhaltsstoffe (vor allem Rocaglamid-Derivate) erfolgte durch die sogenannte Biotest begleitete Fraktionierung (*bioassay guided fractionation*) sowie mit Hilfe der DAD (*Diode Array Detektor*)-gekoppelten-analytischen HPLC. Verschiedene Trennverfahren wurden durch mehrere nacheinander folgende Fraktionierungen mittels chromatograpischer Schritte an unterschiedlichen stätionären Phasen mit

verschiedenen Fließmitteln durchgeführt (s. Abb. 5.1). Diese Trennungsschritte wurden sowohl mit den oben erwähnten Fraßversuchen begleitet, um die insektiziden Eigenschaften der Fraktionen zu prüfen, als auch mit den entsprechenden HPLC Chromatogrammen.

#### **5.4.1. Chromatographische Methoden**

##### **5.4.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die qualitative Zusammensetzung von Rohextrakten, ausgeschüttelten Phasen der Rohextrakte, sowie der Fraktionen säulenchromatographisch getrennter Verbindungsgemische wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie betrachtet. Außerdem erfolgte die Optimierung der Fließmittel für die Säulenchromatographie ebenfalls mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

##### **Stationäre Phase**

Die folgenden DC-Platten wurden für analytische Zwecke eingesetzt :

- Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-Alufolie (Merck), 0.2 mm Schichtdicke.
- DC-Glassplatten RP-18 (Merck), 0.25 mm Schichtdicke.
- DC-Glassplatten Diol (Merck), 0.25 mm Schichtdicke.

##### **Fließmittel**

- a) Zur schrittweisen Auftrennung der Pflanzeninhaltsstoffe wurde ihre qualitative Zusammensetzung jeweils an Kieselgelplatten mit einem bereits optimierten Fließmittel überprüft :

Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : MeOH ( 95 : 5)

Die Laufhöhe betrug ca. 8 cm bei Kammersättigung

b) Austesten der Fließmittel für die Säulenchromatographie.

Zur Optimierung der mobilen Phasen wurden an verschiedene Platten je nach Trennproblem folgende Fließmittel in unterschiedlichen Zusammensetzungen getestet :

- Kieselgel als stationäre Phase :

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Isopropanol-Gemische

Hexan-Aceton-Gemische

- RP-18-Material als stationäre Phase :

MeOH-Wasser-Gemische

- Diol-Material als stationäre Phase :

Hexan-EtOAc-Gemische

Auch hier betrug die Laufhöhe jeweils ca. 8 cm bei Kammersättigung.

Das Fließmittel, das bei der Dünnschichtchromatographie eine optimale Trennung erbrachte, wurde dann für die Säulenchromatographie verwendet.

## Detektion

Die Detektion erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden :

- a) unter UV-Licht bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung) und bei 366 nm (Eigenfluoreszenz)
- b) durch Besprühen der Platte mit Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz und anschließendem Erhitzen auf 110 °C für ca. 2 min. Die Rocaglamide zeigen eine braune Färbung. Die Bisamide (z.B. Odorin) zeigen ebenfalls eine gelbe Färbung, die teilweise nach gelbbraun umschlägt.

## Detektionsreagenzien

### Anisaldehyd-Sprühreagenz

Folgende Chemikalien wurden in nachstehender Reihenfolge zusammengegeben.

2,5 ml	4-Methoxybenzaldehyd
50 ml	Essigsäure 100 %
425 ml	Methanol
25 ml	Schwefelsäure (konz.)

Das Reagenz ist vor Licht geschützt bei  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  mehrere Wochen haltbar.

### 5.4.1.2. Vakuum-Flüssigkeits-Chromatographie (VLC)

Dieses Trennverfahren eignet sich besonders zur Vortrennung von Rohextrakten (Coll und Bowden, 1986, Pelletier *et al.*, 1986). Als Säule diente ein Büchner-Trichter, der mit einer stationären Phase (Kieselgel 60, Korngröße 14 – 40  $\mu\text{m}$ ) auf eine gleichmäßige Höhe von ca. 5 cm befüllt und auf eine Saugflasche als Auffanggefäß für Fraktionen aufgesetzt wurde. Der Extrakt wurde als Kieselgel-Extrakt-Pulvermischung auf den Säulenkopf aufgebracht und durch Durchfluss des Lösungsmittelgradient steigender Polarität mit Hilfe des Wasser-Vakuums getrennt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Lösungsmittelgemische sind in Tab. 5.1 zu sehen.

Tabelle 5.1 : Eingesetzte Lösungsmittelgemische

Lösungsmittel (%)		
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Isopropanol	MeOH
100	-	-
90	10	-
80	20	-
70	30	-
50	-	50
-	-	100

### 5.4.1.3. Säulenchromatographie (SC)

Mit Hilfe der Säulenchromatographie wurde jede Fraktion, vor allem die, welche nach den Trennungsschritten im Biotest aktiv waren, weiter aufgetrennt. Dazu wurden mehrere aufeinanderfolgende Fraktionierungen an verschiedenen stationäre Phasen mit unterschiedlichen Fließmitteln durchgeführt (s. Abb. 5.1). Die ausgewählten stationären und mobilen Phasen (Fließmittel) für jeden Trennungsschritt wurden durch vorher durchgeführte Dünnsichtchromatographie überprüft (vgl. 5.4.1.1.).

Folgende Sorbentien wurden eingesetzt :

a) Stationäre Phase : Sephadex LH-20 (25 - 100  $\mu\text{m}$  Korngröße)

Fließmittel : MeOH

b) Stationäre Phase : RP-18-Material (Lobarsäule, Größe A und B)

Fließmittel : MeOH : NANOpur-Wasser (70 : 30)

c) Stationäre Phase : Diol-Material (Lobarsäule, Größe A und B)

Fließmittel : EtOAc : Hexan (70 : 30)

d) Stationäre Phase : Kieselgel (Lobarsäule, Größe A und B)

Fließmittel :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (90 : 10)

### 5.4.1.4. Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

#### 5.4.1.4.1. Analytische HPLC

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) ist eine Sonderform der Säulechromatographie, die wegen ihre Sensitivität und Reproduzierbarkeit häufig in der analytischen Trennung verwendet wird. Die hohe Trennleistung resultiert aus der verwendeten stationären Phase, die zwischen 3

bis 10  $\mu\text{m}$  Korngröße liegt und gleichmäßiger geformt ist als das Material das für die klassische Säulenchromatographie eingesetzt wird. Die hohe Packungsdichte in der Säule erfordert nun, daß das Elutionsmittel mit Hilfe von Pumpen durch die Säule gepumpt wird, um eine ausreichende Strömungsgeschwindigkeit zu gewährleisten (Skoog und Leary, 1992).

Mit der HPLC lassen sich die folgenden Untersuchungen durchführen:

- Qualitative Untersuchung der Inhaltsstoffe der pflanzlichen Rohextrakte sowie der durch weitere Trennverfahren gewonnenen Fraktion.
- Überprüfung der Reinheit der isolierten Verbindungen
- Identifizierung isolierter Verbindungen durch *Coelution* mit bereits bekannten Reinsubstanzen und durch Vergleich mit der im Arbeitskreis angelegten Spektrenbibliothek.

### Technische Daten der analytischen HPLC

HPLC	: Gynkotec-Anlage
Säule	: Vertex Column, Knauer Eurosphere 100-C18 (RP-18-Material) 5 $\mu\text{m}$ (Korngröße), 125x4 mm (Säulengröße)
Degaser	: GT 103, Gynkotec
Pumpe	: M 480, Gynkotec
Probengeber	: GINA 50, Gynkotec
Injektionsvolumina	: 1-250 $\mu\text{l}$ (variable)
Detektor	: UVD 340S, Gynkotec (Photodioden-Array-Detektor)
Steuerung	: GynkoSoft Version 5.30

## Fließmittel und Gradientenelution

Die analytische Untersuchung eines komplex zusammengesetzten Verbindungsgemisches mittels HPLC erfolgte durch Gradientenelution mit einem binären Stufengradienten (s. Tab. 5.2), in dem die gesuchten Verbindungen nach Löslichkeit und Polarität getrennt werden konnten.

Elutionsmittel A : 100 % Phosphorsäure 0.15 %, pH 2.0

Elutionsmittel B : 100 % Methanol

Flußrate : 1.0 ml / min

## Detektion

Die Chromatogramme wurden mit Hilfe eines Photodioden-Array-Detektors (Mehrkanalphotometer-Detektor) aufgezeichnet, der gleichzeitig auch ein 3D-Feld aufgenommen hat.

Tabelle 5.2 : HPLC-Gradient für analytische Trennung

Zeit (min)	Elutionsmittel A (%)	Elutionsmittel B (%)
0	70	30
5	54	46
8	52	48
22	52	48
30	44	56
35	40	60
40	0	100
50	0	100

Auf diese Weise kann man etwas über die Komplexität einer Fraktion sowie die Identität und die Reinheit der eluierten Substanzen aussagen. Die bei einem solchen Detektor für jeden Peak aufgezeichneten UV-Spektren sind vor allem wichtig für die Identifizierung und die Überprüfung der Reinheit einzelner Peaks durch den Vergleich mit vorhandenen Daten.

#### 5.4.1.4.2. Semipräparative HPLC

Die Semipräparative HPLC wurde in erster Linie eingesetzt, um die Isolierung einzelner Substanzen durchzuführen. Eine semipräparative Säule wurde mit einer Flußrate von 5 ml/min eluiert. Jeder getrennte Peak wurde mit Hilfe eines Schreibers gleich nach der Säule im Erlenmeyer-Kolben gesammelt.

#### Technische Daten der semipräparative HPLC

HPLC	: Semipräparative HPLC-Anlage (Merck)
Säule	: Eurospher 100-C18 (RP-18-Material) 7 µm (Korngröße), 300 x 8 mm (Säulengröße)
Pumpe	: L-7100, Merck Hitachi
Detektor	: L-7400, Merck Hitachi
Integrator	: D-2000, Merck Hitachi
Probengeber	: Rheodyne 77251i
Injektionsvolumina	: 1 ml und 5 ml

#### 5.4.2. Biotest begleitete Fraktionierung

Die Isolierung der aktiven Inhaltstoffe (vor allem Rocaglamid-Derivate) erfolgte durch die Biotest begleitete Fraktionierung aller gewonnener Fraktionen mit Raupen von *S. littoralis*. Prinzipiell wurden alle durch diesen Biotest als aktiv nachgewiesenen Fraktionen weiter bearbeitet. In diesem Biotest wurden auf ein mit 5 bzw. 1 mg der Fraktion präpariertes Kunstfutterstück 20 frischgeschlüpfte Raupen gesetzt und in einem Kulturschrank bei einer Temperatur von 25 °C und ca. 75 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Nach einem Zeitraum von 6 - 7 Tagen wurden die überlebenden Raupen gezählt und eingewogen. Die Auswertung dieses Biotests erfolgte in Form der Überlebensrate (%) und der Wachstumsrate (%) der Raupen (vgl. 5.6).

## Herstellung des Kunstfutters für den Biotest

Als Kunstfutter für den Biotest wurde ein Futterstück mit einem Frischgewicht von 3.75 g vorbereitet. In das Futterstück wurde eine bestimmte Menge des jeweiligen Extrakts- bzw. der Fraktionslösung inkorporiert. Im Prinzip sind die Bestandteile des Kunstfutters entsprechend dem Futter für die Kultivierung. Nur die Herstellung des Futters wird modifiziert. Zunächst wurde das sogenannte Diempulver hergestellt. Die Bestandteile des Kunstfutters (vgl. 5.3.2. außer Nipagin und Agar-Agar-Lösung) wurden in entsprechender Menge fein gemahlen, und in der Kühltruhe eingefroren. Anschließend wurde das Pulver im Gefriertrockner getrocknet. Für jeden Test wurde 0.735 g Diempulver in ein 30 ml Becherglas eingewogen. Nach Zugabe einer bestimmten Menge an Testlösung wurde auf insgesamt 2 ml mit leicht flüchtigen Lösungsmitteln (in der Regel, Methanol) verdünnt und durch Verrühren homogenisiert und 24 h im Dunkeln trocknen gelassen. Danach wurde 0.75 mg Gentamycinsulfat gelöst in 1.41 ml Wasser auf das wieder getrocknete Futter pipettiert und anschließend mit heißer Agar-Agar-Lösung (78 mg in 2.2 ml Wasser) vermischt. Das nach dem abkühlen fest gewordene Futterstück wurde in einen Plastikbecher gelegt und war damit zur Verwendung als Testmedium bereit.

## 5.5. Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Reinsubstanzen

Neben der Auswertung der analytischen HPLC-Chromatogramme anhand der charakteristischen UV-Spektren, wurde die Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Reinsubstanzen in erster Linie mit Hilfe der Massenspektrometrie,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie und durch Vergleich mit Literaturdaten durchgeführt. Zusätzlich wurden auch die Drehwert-Messung und die CD-Spektroskopie eingesetzt.

### 5.5.1. Massenspektrometrie

Bei der Identifizierung und Strukturaufklärung von Verbindungen diene die Massenspektrometrie in dieser Arbeit vor allem zur Bestimmung der Molekularmasse und der Summenformeln. Das in der Massenspektrometrie auftretende Fragmentierungsmuster liefert oft Informationen über An- oder Abwesenheit verschiedener funktioneller Gruppen und kann die Identität einer Verbindungen durch Vergleich mit Massenspektren bekannter Substanzen bestätigen (Skoog und Leary, 1992).

Die Aufnahme der Elektronenstoßionisationspektren (EI = *electron impact*,) erfolgte mit Massenspektrometern vom Typ Finnigan MAT 8430 und MAT CH-7A der Fa. Varian. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV.

Die DCI (Direkte Chemische Ionization)-MS-Spektren wurden mit einem Quadrupolmassenspektrometer INCOS 50 der Fa. Finnigan MAT mit Ammoniak als Reaktandgas aufgenommen. Zur Messung wurden 1-2  $\mu\text{l}$  einer methanolischen Probenlösung auf den Emitter aufgebracht. Nach dem Trocknen an der Luft und anschließend im Vorvakuum war die Probe meßbereit. Die Emitter-Heizraten betrug  $10 \text{ mAs}^{-1}$ , der Reaktandgasdruck lag bei 60 Pa und die Primärionisierungsenergie war 100 eV.

Die ESI (Electro-Spray-Ionization) -MS wurde durch das mit HPLC gekoppelte Finnigan TSQ 7000 aufgenommen. Die Proben wurden in 100 % HPLC-Methanol gelöst. Die Injektion erfolgte über eine Warteschleife (*loop*). Es wurden negative sowie positive Ionen vermessen.

Die FAB (*Fast Atom Bombardement*)-Messungen, vor allem von Glykosid-Derivaten, wurden durch Finnigan MAT 8400 aufgenommen. Zur Durchführung der Messungen wurden 1-2  $\mu\text{l}$  einer 0.5 % methanolischen Probenlösung über 3  $\mu\text{l}$  87%iges Glycerin geschichtet und in die Ionenquelle eingeschleust. Als Gas wurde Xenon eingesetzt. Der Primärteilchenstrom betrug 0.03 mA, die Primärteilchenenergie 7 kV. Es wurden negative Ionen vermessen.

Für die Aufnahme der Hochauflösungsmassenspektren wurde schließlich eine HRQTOF (*High Resolution Quantitative Time of Flight*)-Massenspektrometrie ver-

wendet. Diese Methode berücksichtigt das Isotopenverhältnis einer Verbindung. Wenn das Signal des Molekülions identifiziert und dessen genaue Masse bestimmt werden kann, kann man die Massenunterschiede von wenigen tausend Masseneinheiten durch ein höchauflösendes Gerät erkennen, um die Summenformel daraus abzuleiten. In dieser Arbeit wurde, besonders für Glycosid-Derivate, Stachyose-Zucker als Referenz (interner Standard) verwendet.

Die Aufnahme von EI- und DCI-MS bzw. FAB-MS wurden von Herrn Dr. L. Witte am Institut für Organische Chemie in Braunschweig und von Herrn Dr. Matthiesen, Spurenelementlabor der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine- Universität in Düsseldorf durchgeführt. Die Aufnahme der ESI-MS-Spektren wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt. Die Aufnahme der Hochauflösungsmassenspektren wurde von Herrn Dr. Manfred Nimtz in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt.

### 5.5.2. NMR-Spektroskopie

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrometrie ist eine der wichtigsten und häufigsten Methoden bei der Strukturbestimmung organischer Verbindungen. Sie beruht auf der Absorptionsmessung elektromagnetischer Strahlung im Hochfrequenzbereich von etwa 4 MHz bis 600 MHz. Die Methode basiert im wesentlichen auf der Zuordnung chemischer Verschiebungen und vor allem bei der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie auch auf den Spin-Spin-Kopplungswerten, die von Protonen bzw. Kohlenstoffen einer einem starken Magnetfeld ausgesetzten Verbindung erzeugt werden (Skoog and Leary, 1992).

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern AM-300 (300.135 bzw. 75.473 MHz), ARX-400 (400.132 bzw. 100.625 MHz), AM-600 und DMX-600 (600.133 bzw. 150.905 MHz) der Fa. Bruker in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bzw.  $\text{DMSO-d}_6$  aufgenommen. Dabei diente das Lösungsmittelsignal bei  $\delta_{\text{H}} = 3.30$  ppm bzw.  $\delta_{\text{C}} = 49.0$  ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) und bei  $\delta_{\text{H}} = 2.49$  ppm bzw.  $\delta_{\text{C}} = 39.5$  ppm ( $\text{DMSO-d}_6$ ) als interner Standard (Referenzsignal). Die darauf bezogenen chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) sind in ppm und die Kopplungskonstanten ( $J$ ) in Hz angegeben.

Alle 1D- ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135) und 2D- (COSY, HMQC, HMBC und NOESY bzw. ROESY) Spektren wurden mit Standard Bruker Pulsprogrammen aufgenommen und die Daten-Prozessierung der FID's erfolgte bei den AM-300 und AM-600 Spektrometern mit einem Aspect X-32-Rechner und in den anderen Fällen mit dem ARX- bzw. DMX-System.

Die NMR-Spektren wurden von Herrn Dr. V. Wray vom Institut der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Abt. Molekulare Strukturforchung, in Braunschweig aufgenommen.

### 5.5.3. Einkristall-Röntgenstrukturanalyse

Die moderne Einkristall-Röntgenstrukturanalyse gehört zu ebenfalls den wichtigen Methoden der Strukturaufklärung. Im Unterschied zu den spektroskopischen Methoden, die Strukturinformationen lediglich indirekt über das energetische Verhalten eines Moleküls in einem bestimmten Spektralbereich zugänglich machen, wird bei der Röntgenbeugung die dreidimensionale Elektronendichteverteilungsfunktion gemessen. Das ermöglicht für jedes Atom die Berechnung der zugehörigen Raumkoordinaten. Aus diese Kenntnis lassen sich dann wesentliche Informationen ableiten wie die Konstitution und Konformation der Moleküle sowie genaue Bindungslängen und Winkel (Massa, 1994)

Die Züchtung von Einkristallen der untersuchten Verbindung gelang durch direkte Umkristallisieren in eine Lösung von Methanol-Wasser-Gemischen. Nach dem langsamen Verdampfen bilden sich die Kristalle. Sie wurden abschließend durch eine Stoe-Imaging-Plate-Diffraktion durch einsetzende Graphite-Monochromatized Mo  $K\alpha$  Radiation analysiert. Die Einkristall-Röntgenstrukturanalyse wurde im Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie / Lehrstuhl II, der Universität Düsseldorf durchgeführt.

#### 5.5.4. Spezifischer Drehwert

Die Messung des Drehwerts erfolgte mit einem Polarimeter des Typs 241 MC von Perkin Elmer am Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis von Prof. Bringmann, Universität Würzburg. Die Substanz wurde im Lösungsmittel (Methanol für Spektrometrie) zunächst gelöst und unter Verwendung einer Küvette (Schichtdicke 1 dm) wurde die Substanzlösung bei 20 °C und den Wellenlängen 546 und 579 nm zehn Mal vermessen. Anschließend wurde der resultierende Mittelwert bestimmt und der entsprechende spezifische Drehwert  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  wie folgt berechnet (Flügge, 1965).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{[\alpha]_{579} \times 3.199}{4.199 - \frac{[\alpha]_{579}}{[\alpha]_{579}}}$$

#### 5.5.5. CD (Circular Dichroismus)-Spektroskopie

Circular Dichroismus ist eine der am häufigsten verwendeten Chiroptischen Methoden, mit der man bei der Strukturaufklärung einer Verbindung die absolute Stereochemie bestätigen oder bestimmen kann. Sie basiert im Prinzip auf der Interaktion zwischen einem chiralen Atom einer enantiomeren, reinen Verbindung und dem linear polarisierten eingestrahlten Licht und stellt die Absorptions-Differenz zwischen links- und rechts polarisiertem Licht (Cotton Effekt) (Schreier *et al.*, 1995) dar. Die differentialen Absorptionskoeffizienten  $\Delta\varepsilon$  (cm<sup>2</sup>/mol) bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  wurden in dieser Arbeit in Ethanol bzw. Methanol als Lösungsmittel bestimmt.

Die Aufnahme der CD-Spektroskopie wurde mit einem Jobin Yvon Discrograph CD 6 am Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis von Prof. Bringmann, Universität Würzburg durchgeführt.

## 5.6. Ermittlung der Insektizid-Werte der isolierten Verbindungen

Die insektizide Aktivität der einzelnen isolierten Verbindungen wurde durch Fraßversuche an frisch geschlüpften Raupen von *S. littoralis* evaluiert. Die insektizide Aktivität wird als Wachstums- und Überlebensraten (WR und ÜR) der getesteten Raupen qualitativ ausgewertet.

Die Wachstumsrate (WR) bezeichnet den prozentualen Anteil des durchschnittlichen Gewichts von 20 Versuchsruppen, denen eine Substanz verfüttert wurde, bezogen auf das Durchschnittsgewicht von 20 Kontrollruppen, deren Gewicht mit 100% festgelegt wird. Die Überlebensrate (ÜR) ist definiert als prozentualer Anteil der Versuchsruppen, die von den 20 Versuchsruppen, denen eine Substanz verfüttert wurde, überlebt haben. Sie werden zu 20 Kontrollruppen in Bezug gesetzt, deren ÜR 100% entspricht.

Weiterhin wurde aus Wachstums- und Überlebensrate anhand einer Probit-Analyse die Toxizität (die  $LC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werte) bestimmt. Der  $LC_{50}$ -Wert ist diejenige Konzentration einer Substanz, bei der die Hälfte der Versuchstiere absterben, während der  $EC_{50}$ -Wert diejenige Konzentration ist, bei der die Wachstumsrate die Hälfte gegenüber der Kontrolle ist.

### **Versuchsdurchführung** (Srivastava und Proksch, 1991)

Die Durchführung des Versuchs erfolgte mit einem Futterstück aus künstlicher Raupen-Nahrung (vgl. 5.4.2), das mit der zu testenden Substanz in einer bestimmten Konzentration präpariert wurde. Zwanzig frischgeschlüpfte Raupen (Neonates) wurden auf das Futterstück in einem Plastikbecher gesetzt und mit einem luftdurchlässi

gen Deckel verschlossen. Zusammen mit der Kontrolle in einer mit feuchten Tüchern bedeckten Plastikbox wurden sie unter entsprechenden Kulturbedingungen (vgl. 5.3.1) 6 Tage lang gehalten. Als Kontrolle wurden 20 Neonates auf ein Futterstück gesetzt, das nur mit Lösungsmittel, anstelle der gelösten Probe versetzt worden war. Anschließend wurden die überlebenden Raupen gezählt und ausgewogen. Daraus wurden die obengenannte Wachstums- und Überlebensrate relativ zu den Kontrollen berechnet.

$$\text{Wachstumsrate [\%]} = \frac{\text{Durchschnittsgewicht der überlebenden Versuchstiere} \times 100 \text{ \%}}{\text{Durchschnittsgewicht der Kontrolltiere}}$$

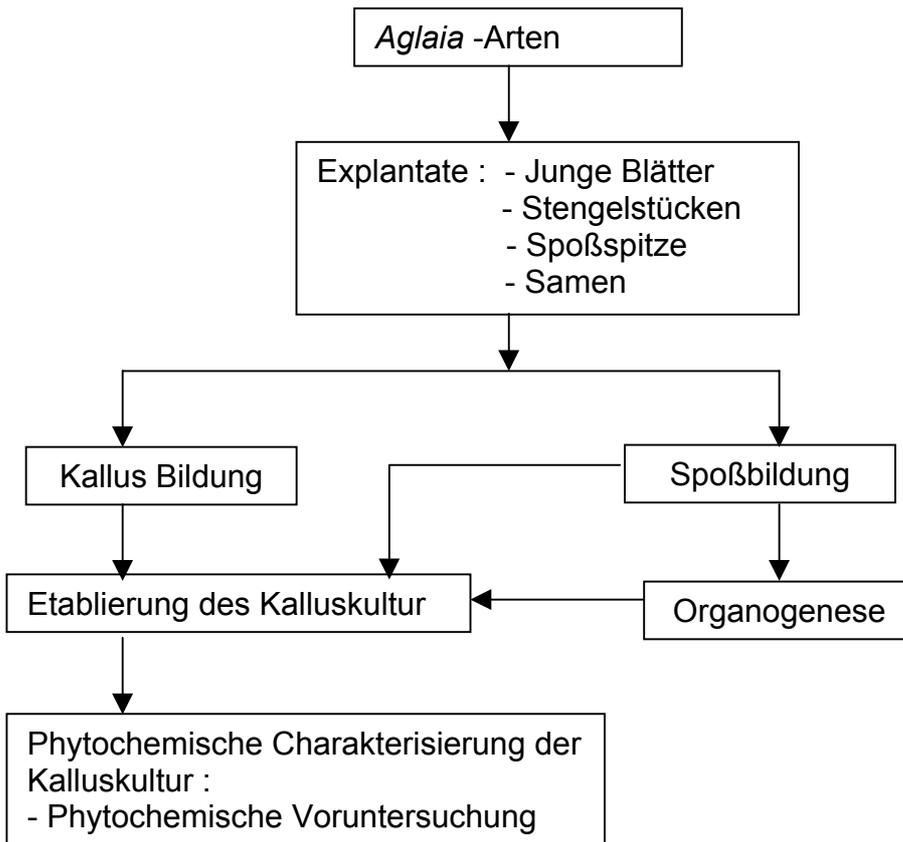
$$\text{Überlebensrate [\%]} = \frac{\text{Anzahl der überlebenden Versuchstiere} \times 100 \text{ \%}}{\text{Anzahl der Kontrolltiere}}$$

#### **Herstellung der Futterstücke (Frischgewicht 3.75 g) für einen Fraßversuch :**

0.735 g gefriergetrocknetes Diätpulver (vgl. 5.4.2) wurde in ein 30 ml Becherglass eingewogen. Es folgt die Zugabe der zu testenden Substanz in der gewünschten Konzentration in max. 2 ml Methanol. Die Konzentration der getesteten Substanz lag in einer Reihe von 0.01 bis 50 ppm für den jeweiligen Versuch. In die Kontrollen wurde nur reines Lösungsmittel gegeben.

## 5.7. Vorversuch zur Züchtung von Zellkulturen aus *Aglaia*

Um die *Aglaia*-Zellkultur als Modellsystem zur Untersuchung der Biosynthesewege interessanter Sekundärstoffe dieser Arten zu etablieren, wurde ein Vorversuch durchgeführt, der im folgenden Arbeitsschema dargestellt ist :



**Abb. 5.2 : Arbeitsschema des Vorversuchs zur Etablierung einer Zellkultur von *Aglaia***

### 5.7.1. Pflanzenmaterial

Der Größte Teil der Explantate stammte von der Pflanze *Aglaia odorata* Lour. Weitere Explantate wurden aus der steriler Anzucht der Pflanze *A. elliptica* gewonnen. Hierfür wurden sowohl getrocknete als auch aus frischen Früchten von *Aglaia elliptica* gewonnenen Samen verwendet. *A. odorata* wurde vom Botanische Garten der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Die Früchte und getrockneten Samen

von *A. elliptica* stammten aus dem Botanische Gartener Bogor, Indonesien. Sie wurden dort im Juli 2001 gesammelt und identifiziert.

### 5.7.2. Kulturmedium

Die heterotrophe *Aglaia*-Kultur wurde in MS- (Murashige und Skoog, 1962), WPM- (*Woody Plant Medium*, Llyod und McCown, 1981) und RW-Medium (Risser und White, 1964) kultiviert. Die Zusammensetzung der Medien ist im Anhang zu finden (s. Anhang B). Zur Induktion der Kallusbildung wurden die o.g. Medien mit verschiedenen Phytohormonen, im wesentlichen mit Auxinen und Cytokininen, sowie anderen organischen Substanzen versetzt (s. Tab. 5.3). Zur Gewinnung der sterilen Pflanzen wurde dagegen ein phytohormonfreies 10%iges MS-Basalmedium ohne Vitamine, Aminosäuren und Zucker verwendet.

Tabelle 5.3 : Screening-Medien zur Züchtung der Kalluskultur von *Aglaia*

Versuch-Reihe <sup>a</sup>	Phytohormone (PH) (ppm)				Andere Zusätze (ppm)		
					Antioxidations- mittel (Ascorbinsäure)	Komplex organische Zu- sätze	
	2,4-D	NAA	BAP	Kin		Hefeextrakt	Caseinhydr.
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-
IA – ID	1	-	-	-	100	500	500
IIA – IID	1	-	0.2	-	100	500	500
IIIA – IIID	1	-	-	0.2	100	500	500
IVA – IVD	-	1	-	-	100	500	500
VA – VD	-	1	0.2	-	100	500	500
VIA – VID	-	1	-	0.2	100	500	500

<sup>a</sup> Versuch-Reihe A : nur mit Phytohormonen (PH); Reihe B : PH plus Ascorbinsäure (Antioxidant) ohne komplexe organische Zusätze; Reihe C : PH plus Ascorbinsäure und Hefeextrakt; Reihe D : PH plus Ascorbinsäure und Caseinhydrolysat

### 5.7.3. Sterile Anzucht von *Aglaia elliptica*

Die Samen wurden aus den frischen Früchte von *A. elliptica* entfernt und gründlich gewaschen. Danach erfolgte die Sterilisierung der Samen mit Hypochloritlösung (s. Tab. 5.4). Hierbei wurden die Samen zunächst mit Ethanol entfettet und dann zur Abtötung von Bakterien und Pilzen für 10 Minuten in verschiedene Konzentrationen von Hypochloritlösung gelegt. Anschließend wurde die Lösung mit sterilem Wasser abgewaschen.

Tabelle 5.4 : Verfahren zur Sterilisation der Samen von *Aglaia elliptica*

Sterilisationmittels	Konzentration		
	I	II	III
Ethanol, 1x, kurz	70 %	70 %	70 %
Ca(OCl) <sub>2</sub> 1x 10 mnt	1% (w/v)	3 % (w/v)	5 % (w/v)
H <sub>2</sub> O Steril 3x , jedes 1 mnt	-	-	-

Die sterilisierten Samen wurden anschließend in einer sterilen Impfbank auf dem Kulturmedium (s. Abs. 5.7.2). ausgelegt. Zwei verschiedene Kulturbedingungen wurden hierbei getestet (s. Tab. 5.5).

Tabelle 5.5 : Kulturbedingungen zur Gewinnung von sterilen Pflanzen

Kulturbedingung	I	II
Temperatur [°C]	25	30
Beleuchtungsdauer [h.d <sup>-1</sup> ]	16	16
Beleuchtungsintensität [ $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ ]	30	45
Leuchtmittel/Lichtfarbe	Neonröhre/W	Neonröhre/W

### 5.7.4 Kalluskultur

Zur Induktion der Kallusbildung wurden junge Blätter und Stengelstücke von *A. odorata* sowie sterile Hypokotyle und Kotyledonen von *A. elliptica* als Explantate verwendet. Die Sterilisierung wurde wie bei den Samen von *A. elliptica* durchgeführt. Das Sterilisationsverfahren verläuft dabei wie folgt :

Tabelle 5.6 : Verfahren zur Sterilisation von Organen von *A. odorata*

Sterilisationsmittels	Konzentration		
	I	II	III
Ethanol 1x, kurz	70 %	70 %	70 %
Ca(OCl) <sub>2</sub> 1x 10 mnt	0.5 % (w/v)	1 % (w/v)	2 % (w/v)
H <sub>2</sub> O Steril 3x 1 mnt	-	-	-

Das sterilisierte Pflanzenmaterial von *A. odorata* sowie die Hypokotyle und Kotyledonen von *A. elliptica* wurden dann auf verschiedenen Versuchsmedien (s. Tab. 5.3) ausgelegt. Die Kulturen wurden in einer Dunkelkammer bei 25 °C gelagert.

### 5.7.5. Phytochemische Voruntersuchung des Kallus

Das gefriergetrocknete Material wurde direkt nach der Trockengewichtsbestimmung extrahiert. Nach vier Wochen wurde erstmals ein Kallus aus dem Medium entnommen und vorsichtig vom Explantate getrennt. Nachdem er bei -18 °C eingefroren worden war, wurde der Kallus gefriergetrocknet. Anschließend wurde die getrocknete Probe in einem Becherglas mit einem Glastab zermahlen und mit Methanol extrahiert. Nach Zentrifugation wurde der gesammelte Methanol-Extrakt in einem Kolben mit einem Vakkumverdampfer eingengt. Mit Hilfe von HPLC-UV und HPLC-MS erfolgte die Voruntersuchung des Extrakts. Als Standard wurden Zimtsäure-Pyrrolidin-Bisamide (Odorin und Odorinol), Benzofuran-Derivate (Rocaglamid A und Rocaglaol) sowie ein Benzopyran-Derivate (Aglain) verwendet. Die Identifizierung erfolgte durch

den Vergleich der charakteristischen Retentionszeiten, der in der analytischen HPLC gemessenen UV-Spektren, sowie der ESI-Massenspektren.

## 5.8. Chemikalien

Chemikalien mit der Kennzeichnung CI wurden vom Chemischen Institut der Universität Würzburg bezogen. Aceton, Dichlormethan, Hexan, EtOAc und Methanol wurden vor Gebrauch destilliert.

Aceton	CI
Acetonitril für HPLC	Merck
Agar-Agar	Merck
L-(+)-Ascorbinsäure	Merck
Azadirachtin	Roth
Dichlormethan	CI
DMSO (Dimethylsulfoxynamide) für NMR	Merck
Essigsäure (konz.)	Merck
Ethanol für Spektroskopie	Merck
Ethylacetat	CI
Formaldehydlösung min. 37 % z.A.	Merck
Gentamycinsulfat p.a.	Serva
Isopropanol	CI
Hexan	CI
p-Hydroxy-Benzoessäureethylester (Nipagin E)	Sigma
Methanol technisch	CI,
Methanol für HPLC	Merck
Methanol für Spektroskopie	Merck
Methanol für NMR	Merck
4-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd)	Merck
Nipagin A (p-Hydroxybenzoessäureethylester)	Sigma
ortho-Phosphorsäure	Merck
Schwefelsäure (konz.)	Merck

Trifluoressigsäure	Merck
2,4-D	Sigma
NAA	Merck
Kinetin	Serva
BAP	Fluka
Caseinhydrolysat (enzymatic hydrolysate)	Duchefa
Hefeextrakt	Fluka
Makro- und Mikroelemente sowie Vitaminen für Pflanzenzellkultur (s. Anhang B)	Merck

### 5.9. Chromatographie-Zubehör

DC-Fertigplatten (Alu), Kieselgel 60 F <sub>254</sub> mit Fluoreszenz, 0,2 mm Schichtdicke	Merck
DC-Fertigplatten (Glas), RP-18, F <sub>254</sub> S 0,25 mm Schichtdicke	Merck
Sephadex LH-20, bead size 25-100 $\mu\text{m}$	Merck
Lobarsäule LiChroprep RP-18, bead size 40-63 $\mu\text{m}$ Größe A (240-10) und Größe B (310-25)	Merck
Lobarsäule LiChroprep Si 60, bead size 40-63 $\mu\text{m}$ Größe A (240-10)	Merck
HPLC-Fließmittel :	
HPLC-Methanol (Mikrosolv.)	Merck
HPLC-Acetonitril	Merck
Phosphorsäure 0.15 %, pH 2.0, hergestellt aus :	
ortho-Phosphorsäure 85 % z.A	Merck
Wasser aus der NANOpur-Anlage	Barnsread

**5.10. Geräte**

Analysenwaage AT 200	Mettler
Analysenwaage AT 1600	Mettler
Digital-pH-Meter 646	Knick
Exsikkator	Desaga
Fraktionensammler	ISCO Cygnet TM
Gefrietrockner Christ Alpha 2-4 mit Anlagensteuerung LDC-IM und Drehschiebervakuumpumpe DUO 004B	Balzers
Heizblock 2081 DA	Gebr. Liebisch
HPLC-Anlage	Gynkotec
Kaffeemühle	Krupps
Laborzentrifuge 2-15	Sigma
Magnetrührer Variomag Multipoint HP 15	Heinse Ziller
UV-Lampen (254 nm und 366 nm)	Camag
Vakuum-Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111	Büchi

## Literaturverzeichnis

- Aboutabl E.A., El-Sakhawy F.S., Fathy, M.M., and Megid R.M.A. (2000) : Composition and antimicrobial activity of the leaf and fruit oils *from Amoorah rohituka* Wigth. Et Arn., *J. of Essential Oil Research* **12**, 635 - 638.
- Anonymous (1984) : Seed Plants from Yunnan, in : Plants from Yunnan, Vol. 1. Yunnan Press, P.R. China.
- Anonymous (1997) : Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Science Press, P.R. China.
- Babbar, O.P., Joshi, M.N., and Chowdhury, B.L. (1983) : Protection induced in chick embryos against Ranikhet disease virus by some plant extracts or their fraction. *Indian J. Exp. Biol.* **21**, 637 - 638.
- Bacher, M., Hofer, O., Brader, G., Vajrodaya, S., and Greger, H. (1999) : Thapsakins : possible biogenetic intermediate towards insecticidal cyclopenta[*b*]benzofurans from *Aglaia edulis*. *Phytochemistry* **52**, 253 - 263.
- Benosman, A., Richomme, P., Sevenet, T., Hamid, A., Hadi A., and Bruneton, J. (1994) : Secotirucallane triterpenes from the stem bark of *Aglaia leucophylla*, *Phytochemistry* **37**, 1143 - 1145.
- Benosman, A., Richomme, P., Sevenet, T., Perromat, G., Hamid, A., Hadi A., and Bruneton, J. (1995) : Tirucallane triterpenes from the stem bark of *Aglaia leucophylla*, *Phytochemistry* **40**, 1485 - 1487.
- Bell, E.A. (2001) : Ecological biochemistry and its development, *Phytochemistry* **56**, 223 - 227

- Bohnenstengel, F.I., Steube, K.G., Meyer, C., Nugroho, B.W., Hung, P.D., Kiet, L.C., and Proksch, P. (1999a) : Structure activity relationships of antiproliferative rocaglamide derivatives from *Aglaia* ssp. (Meliaceae), *Z. Naturforsch.* **54c**, 1-6.
- Bohnenstengel, F.I., Steube, K.G., Meyer, C., Quentmeier, H., Nugroho, B.W., and Proksch, P. (1999b) : 1*H*-Cyclopenta[*b*]benzofuran lignans from *Aglaia* species inhibit cell proliferation and alter cell cycle distribution in human monocytic leukemia cell lines, *Z. Naturforsch.* **54c**, 1075 - 1083.
- Bowling, C.C. (1967) : Rearing of two lepidopterous pest of rice on a common artificial diet. *Ann. Ent. Soc. Am.* **60**, 1215 - 1216.
- Brader, G., Vajrodaya, S., Greger, G., Bacher, M., Kalchhauser, H., and Hofer, O. (1998) : Bisamides, Lignans, Triterpenes, and Insecticidal Cyclopenta[*b*]benzofuran from *Aglaia* Species, *J. Nat. Prod.* **61**, 1482 - 1490.
- Brogdon, W.G., and McAllister, J.C. (1998) : Insecticide Resistance and Vector Control, *Emerging Infectious Disease* **4**, 605 - 613.
- Bugg, C.E., Carson, W.M., Montgomery, J.A. (1994), *Spektrum der Wissenschaft*, März, 30 - 36.
- Casida, J.E., and Quistad, G.B. (1995) : Pyrethrum flowers, production, chemistry, toxicology and uses, Oxford Univ. Press. NY.
- Candolle, C. de. (1878) : *Amoora* and *Aglaia*. In A. und C. de Candolle, *Monographiae Phanerogamarum* 1.

- Champagne, D.E., Isman, M.B., and Towers, G.H.N. (1989) : Insecticidal activity of phytochemicals and extracts of the meliaceae. In: *Insecticides of plant origin* (Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., and Morand, P., eds.). ACS Symposium Series 387, ACS, Washington DC, 95 - 109.
- Champange, D.E., Koul, O., Isman, M.B., Scutter, G.G.E., and Towers, G.H.N. (1992) : Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry* **31**, 377 - 394.
- Chiu, S.F. (1985) : Recent research findings on Meliaceae and other promising botanical insecticides in China. *J. Plant Diseases and Protection* **92**, 310 - 319.
- Coll, J.C., and Bowden, B.F. (1986) : The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. Prod.* **49**, 934 -936.
- Connolly, J.D. (1983) : Chemistry of the limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae. In: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales* (Waterman, P.G., and Grundon, M.F., eds), Academic Press, London, 175 - 213.
- Corner, E.J. (1951) : *Wayside Tress of Malaya*, Vol. **1**, Government Printer, Singapore, p. 456.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., and Snader, K.M. (1997) : Natural Products in Drug Discovery and Development, *J. Nat. Prod.* **60**, 52 - 60
- Cui, B., Chai, H., Santisuk T., Reutraku, V., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., and Kinghorn A.D. (1997) : Novel Cytotoxic 1*H*-Cyclopenta[*b*]benzofuran Lignans from *Aglaia elliptica*, *Tetrahedron* **53**, 17625 - 17632.
- Dictionary of Natural Products (1994), Vol. 4, Chapman & Hall, p. 4506.
- Dhawan, B.N., Dubey, M.P., Mehrotra, B.N., Rastogi, R.P., and Tandon, J.S. (1980) : Screening of Indian plants for biological activity: Part IX. *Indian J. Exp. Biol.* **18**, 594 - 606.

- Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehrotra, B.N., Simal, R.C., and Tandon, J.S. (1973) : Screening of Indian plants for biological activity: Part IV. *Indian J. Exp. Biol.* **11**, 43 – 54
- Dimetry, N.Z. (1970) : A successful technique for mass rearing of cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisd. *Journ. Appl. Entomol.* **66**, 408 - 411.
- Dreyer, M., Nugroho, B.W., Bohnenstengel, F.I., Ebel, R., Wray, V., Witte, L., Bringmann, G., Mühlbacher, J., Herold, M., Hung, P.D., Kiet, L.C., and Proksch, P. (2001): New Insecticidal Rocaglamide Derivatives and related compounds from *Aglaia oligophylla*. *J. Nat. Prod.* **64**, 415–420.
- Duh, C.Y., Wang, S.K., Hou, R.S., Wu, Y.C., Wang, Y., Cheng, M.C., and Chang, T.T. (1993) : Dehydroodorin, a cytotoxic diamide from the leaves of *A.formosana*, *Phytochemistry* **34**, 857 - 858.
- Dumontet, V., Thoison, O., Omobuwajo, O.R., Martin, M.T., Perromat, G., Chiaroni, A., Riche, C., Pais, M., and Sévenet T. (1996) : New Nitrogenous and Aromatic Derivatives from *Aglaia argentea* and *A. forbesii*. *Tetrahedron* **52**, 6931 - 6942.
- Engelmeier, D., Hadacek, F., Pacher, T., Vajrodaya, S., and Greger, H. (2000) : Cyclopenta[*b*]benzofurans from *Aglaia* Species with Pronounced Antifungal Activity against Rice Blast Fungus (*Pyricularia grisea*), *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1400 - 1404.
- Engler, A., Harms, H. und Matfeld, J. (1960) : Die Natürlichen Pflanzenfamilien, band **19b1**, Duncker und Humbolt, Berlin, p. 143.
- Ewete, F., Nicol, R.W., Hengsawad, W., Sukumalanand, P., Satasook, C., Wiriyachitra, P., Isman, M.B., Kahn, Y., Duval, F., Philogene, B.J.R., and Arnason, J.T. (1996) : Insecticidal activity of *Aglaia odorata* extract and the active principle, rocaglamide, to the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübn. (Lep., Pyralidae). *J. Appl. Ent.* **120**, 483 - 488.

- Flüge, J. (1965) : Grundlagen der Polarimetrie. Carl Zeiss Verlag, Oberkochen/Württ.
- Folker, G., and Kubinyi, H. (1997) : Spektrum der Wissenschaft, Spezial **6** : *Pharmaforschung*, 17 - 27.
- Foo, L.Y. (1989) : Flavanocoumarins and Flavanophenylpropanoids from *Phyllocladus trichomanoides*, *Phytochemistry* **28** 2477 - 2481.
- Fuzzati, N., Dyatmiko, D., Rahman, A., Achmad, F., and Hostettmann, K. (1996) : Triterpenoid, lignans and a benzofuran derivative from the bark of *Aglaia elaeagnoidea*, *Phytochemistry* **42**, 1395 - 1398.
- Gawaad, A.A.A., and El-Gayar, F.H. (1974) : Habits and behavior of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae) and their importance for control measures. *Journ. Appl. Entomol* **75**, 295 - 300.
- Gentry, A.H. (1993) : Tropical forest biodiversity and the potential for new medicinal plants, In : Human Medicinal Agent from Plants (Kinghorn, A.D., and Balandrin, M.F., eds), ACS, Washington DC, 13 - 24.
- George, E.F., and Sherrington, P.D. (1984) : Plant Propagation by Tissue Culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories, Exegetics Ltd, Edington, Westbury, 334 -335.
- Georghiou, G. and Mellon., R.B. (1983) : Pesticide resistance in time and space. In: Pest Resistance to Pesticides (G.P. Georghiou and T. Saito, eds.). Plenum Pub., NY. 1 - 46
- Güssregen, B., Fuhr, M., Nugroho, B.W., Wray, V., Witte, L., and Proksch, P. (1997): New Insecticidal Rocaglamide Derivatives from Flowers of *Aglaia odorata*. *Z. Naturforsch.* **52c**, 339 - 344.

- Haque E., Uddin, M.N., and Shahjalal, M. (1995) : Dammarane triterpenoids from the stem bark of *Amoora cuculata* (Meliaceae), *Bangladesh Journal of Botany* **24**, 165 - 171.
- Haque E., Uddin, M.N., and Shahjalal, M. (1996) : Cabraleactone and isofouquierone from the stem bark of *Amoora cuculata* (Meliaceae), *Bangladesh Journal of Botany* **25**, 177 - 181.
- Harvey, A. L. (1993) : An Introduction to drugs from natural products. In : Drugs from Natural Products, pharmaceuticals and agrochemicals (Harvey, A.L., ed.). Chichester, England.
- Hayashi, N., Lee, K.H., Hall, I.H., McPhail, A.T., and Huang, H.C. (1982) : Structure and stereochemistry of (–)-odorinol, an antileukemic diamide from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* **21**, 2371 - 2373.
- Heyne, K., (1987): Tumbuhan berguna Indonesia. Diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Jakarta. Yayasan Sarana Wanajaya, Jakarta.
- Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B. (1987) : Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hiort, J., Chaidir, Bohnenstengel, F.I., Nugroho, B.W., Schneider, C., Wray, V., Witte, L., Hung, P.D., Kiet, L.C., and Proksch, P. (1999): New Insecticidal Rocaglamide Derivatives from the Roots of *Aglaia duppereana*. *J. Nat. Prod.* **62**, 6132 - 1635.
- Horgen, F.D., Edrada, R.A., de los Reyes, G., Agcaoili, F., Madulid, D.A., Wongpanich, V., Angerhofer, C.K., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D., and Farnsworth, N.R. (2001) : Biological screening of rain forest plot trees from Palawan Island (Philippines), *Phytomedicine* **8**, 71 - 81.

- Hsu, F., Nonaka, G-I., and Nishioka, I. (1985) : Tannins and Related Compounds. XXXI. Isolation and Characterization of Proanthocyanidins in *Kandelia candel* (L) Druce, *Chem. Pharm. Bull* **33**, 3142 - 3152.
- Inada, A., Murayta, H., Inatomi, Y., and Nakanishi, T. (1995) : Cycloartane triterpenes from the leaves of *Aglaiia harmsiana*, *J. Nat. Prod.* **58**, 1143 - 1146.
- Inada, A., Shono, K., Murata, H., Inatomi, Y., Darnaedi, D., and Nakanishi, T. (2000) : Three putrescine bisamides from the leaves of *Aglaiia edulis*. *Phytochemistry* **53**, 1091 - 1095.
- Institute of Gangtong Botany Research (1974) : Flora Hainanica III, Science Press, P.R. China, 67.
- Ishibashi, F., Satasook, C., Isman, M.B., and Towers, G.H.N. (1993) : Insecticidal 1H-Cyclopentatetrahydro[b]benzofurans from *Aglaiia odorata*. *Phytochemistry* **32**, 307 - 310.
- Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A. and Kaminski, J. (1990) : *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1406
- Isman, M.B. (1995) : Leads and prospects for the development of new botanical insecticides, *Rev. Pestic. Toxicol.* **3**, 1 - 20.
- Isman, M.B., Matsuura, H., MacKinnon, S., Durst, T., Towers G.H.N., and Arnason, J.T. (1996) : Phytochemistry of the Meliaceae, so many terpenoids, so few insecticides. In : Recent Advances in Phytochemistry; Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions (Romeao, J.T., Saunders, J.A., and Barbosa P. eds). Plenum Press, New York, 155 - 178.
- Isman, M.B., Gunning, P.J., and Spollen, K.M. (1997) : Tropical timber species as source of botanical insecticides. In : Phytochemical for Pest Control (Hedin, P.A., Hollingworth, R.M., Masler, E.P., Miyamoto, J., and Thompson D.G., eds). ACS Symp. Ser. **658**, Washington DC, 27 - 38.

- Jacobson, M. (1989) : Botanical pesticides : past, present, and future. In : „Insecticides of plant origin“ (Arnason, J.T., Philogene, B.J.R. and Morand, P., eds). ACS Symposium Series 387, ACS, Washington DC. 1 - 10
- Janaki, S., Vijayasekaran, V., Viswanathan, S., and Balakrishna, K. (1999) : Anti-inflammatory activity of *Aglaia roxburghiana* var. *beddomei* extract and triterpenes roxburghiadiol A and B, *Journal of Ethnopharmacology* **67**, 45 - 51
- Janprasert, J., Satasook, C., Sukumalanand, P., Champagne, D.E., Isman, M.B., and Towers, G.H.N. (1993) : Rocaglamide, a natural benzofuran insecticide from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* **32**, 67 - 69.
- Katsuda, Y. (1999) : Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. *Pesticide Science* **55**, 775 - 782.
- King, M.L., Chiang, C.C., Ling, H.C., Fujita, E., Ochiai, M., and McPhail, A.T. (1982) : X-ray crystal structure of rocaglamide, a novel antileukemic 1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran from *Aglaia elliptifolia*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **20**, 1550 - 1151.
- Ko, F.-N., Wu, T.-S., Liou, M.-J., Huang, T.-F., and Teng, C.-M. (1992) : PAF antagonism in vitro and in vivo by aglafoline from *Aglaia elliptifolia*, *Eur. J. Pharm.* **218**, 129 - 135.
- Kraus, W., Bokel, M., Schwinger, M., Vogler, B., Soellner, R., Wendisch, D., Steffens, R., and Wachendorff, U. (1993) : The chemistry of azadirachtin and other insecticidal constituent of Meliaceae. In : *Phytochemistry and Agriculture* (van Beek, T.A., and Breteler, H., eds.). Clarendon Press, Oxford, 18 - 39.
- Ku, H.S. (1987) : Potential industrial applications of allelochemicals and their problems. ACS Symposium Series 330. 449 - 454.

- Kumar S., and Müller K. (1999) : Medicinal plants from Nepal, II. Evaluation as inhibitors of lipid peroxidation in biological membranes. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 135 - 139.
- Leahey, J.P. (1985) : The Pyrethroid Insecticides, Taylor and Francis, Inc., Philadelphia.
- Lee, S.K., Cui, B., Mehta, R.R., Kinghorn, A.D., and Pezzuto, J.M. (1998) : Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1*H*-cyclopenta[*b*]benzofuran lignans isolated from *Aglaia elliptica*, *Chemico-Biological Interactions* **115**, 215 - 228.
- Li, H.L. (1997) : Flora of Taiwan. Epoch Publishing Co. Ltd. Taipei, Taiwan.
- Luo X.D., Wu, S.H., Ma, Y.B., and Wu D.G. (2001) : The chemical constituents of *Amoora yunnanensis*, *Acta Botanica Sinica* **43**, 426 - 430.
- Lloyd G. and Mc Cown B. (1981), *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* (1980), **30**, 421 - 427.
- Mabberley, D.J., Pannell, C.M., and Sing, A.M. (1995) : Meliaceae, In : Flora Malesiana ser. I, Vol. 12 (Mabberley, D.J., Pannell, C.M., and Sing, A.M.), 1 - 407.
- Maillard, M., Marston, A. and Hostettmann, K. (1993) : Search for Molluscicidal and Larvicidal Agents from Plants, In : Human Medicinal Agents from Plants (Kinghorn, A.D. and Balandrin, M. F. eds.). ACS, Washington, DC., 256 - 273.
- Mandaya, N.B., ed. (1985) : Handbook of Natural Pesticides : Methodes; Vol. 1 and 2, CRC Press: Boca Raton, FL.
- Massa, W. (1994) : Kristallstrukturbestimmung, B.G. Teubner, Stuttgart.
- McLafferty, F.W.; Turecek, F. (1995) : Interpretation von Massenspektrum. Spektrum Akademischer Verlag, Heilderberg.

- Mikolajczak, K.L. and Reed, D.K. (1987) : Extractives of seeds of the Meliaceae: effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.) and *Artemia salina* Leach. *J. Chem. Ecol.* **13**, 99 - 111.
- Molloyres, L-P., Rindlisbacher, A., Winkler, T., and Vijaya, K. (1999) : Insecticidal natural products : new rocaglamide derivatives from *Aglaia roxburghiana*, *Pestic. Sci.* **55**, 486 - 503.
- Moussa, M.A., Zaher, M.A., and Kotby, F. (1960) : Abundance of the cotton leaf worm *Prodenia litura* (F.) in relation to host plants. I. Host plants and their effect on biology (Lep., *Agrotidae*, *Xenobiinae*). *Bull. Soc. Ent. Egypte*, **44**, 241 - 251.
- Murakami, A., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., and Ohigashi, H. (1995) : Screening for *in vitro* anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand. *Cancer Letters* **95**, 139 -146.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962), *Physiol.Plant.*, **15**, 473 - 497.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M. (2000) : The influence of natural products upon drug discovery, *Nat. Prod. Rep.* **17**, 215 - 234.
- Nonaka, G-I. and Nishioka, I. (1982) : Tannins and Related Compounds. VII. Phenylpropanoid-substituted Epicatechins, Cinchonains from *Cinchona succirubra*, *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 4277 - 4282.
- Nonaka, G-I., Kawahara, O., and Nishioka, I. (1982) : A new Type of Proanthocyanidin, Cinchonains lia and lib from *Cinchona succirubra*, *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 428 - 4276.
- Nugroho, B.W., Edrada, R.A., Güssregen, B., Wray, V., Witte, L., and Proksch, P. (1997a) : Insecticidal rocaglamid derivatives from *Aglaia duperreana*. *Phytochemistry* **44**, 1455 - 1461.

- Nugroho, B.W., Güssregen, B., Wray, V., Witte, L. Bringmann, G., and Proksch, P. (1997b) : New insecticidal rocaglamid derivatives from *Aglaia elliptica* and *Aglaia harmsiana* (Meliaceae). *Phytochemistry*, **45**, 1579 - 1585.
- Nugroho, B.W. (1997c) : Isolierung und Strukturaufklärung insektizider Naturstoffe aus tropischen Pflanzen der Familie Zingiberaceae und *Aglaia*-Arten, Dissertation, Würzburg.
- Nugroho, B.W., Edrada R.A., Wray, V., Witte, L. Bringmann, G., Gehling, M., and Proksch, P. (1999) : An insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry* **45**, 1579 - 1585.
- Nuhn, P. (1997) : Naturstoffchemie, mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Ohse, T., Ohba., S., Yamamoto, T., Koyano, T., and Umezawa, K. (1996) : Cyclopentabenzofuran lignan protein synthesis inhibitors from *A. odorata*. *J. Nat. Prod.* **59**, 650 - 652.
- Omobuwajo, O.R., Martin, M.T., Perromat, G., Sevenet, T., Awang, K., and Pais, M. (1996a) : Cytotoxic cycloartanes from *Aglaia argentea*, *Phytochemistry* **41**, 1325 - 1328.
- Omobuwajo, O.R., Martin, M.T., Perromat, G., Sevenet, T., and Pais, M. (1996b) : Apotirucallane triterpenes from *Aglaia argentea*, *J. Nat. Prod.* **59**, 614 - 617.
- Pannell, C.M. (1992) : A taxonomic monograph of the genus *Aglaia* Lour. (Meliaceae). Kew Bulletin Additional Series XVI, Royal Botanic Gardens, Kew. HMSO. London.
- Phaetthanesuan, P. (1972) : Thai medicinal plants, Vol.2. Ampol Pitayya, Bangkok.

- Pelletier, S.W., Chokshi, H.P., and Desai, H.K. (1986) : Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *J. Nat. Prod.* **49**, 892 - 900.
- Pennington, P.D., Styles, B.T. (1975) : A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea* **22**, 419 - 540.
- Perkow, W. (1993) : Strukturelemente biologisch aktiver Verbindungen. Verlag Harri Deutsch.
- Perry L.M. and Metzger J. (1980) : *Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*. MTT-Press, Cambridge, UK.
- Plunkett, M.J., and Ellman, J.A. (1997): Pharmaforschung, *Spektrum der Wissenschaft*, Spezial 6, 28 - 35.
- Potier, P. (1997) : Pharmaforschung, *Spektrum der Wissenschaft*, Spezial 6, 6 - 8.
- Porter, L.J. (1993) : Flavans and Proanthocyanidins, In : The Flavonoids : Advances in Research since 1986 (Harborne, J.B., ed.), Chapman & Hall, London.
- Porter, L.J., Newman, R.H., Foo, L.Y., and Wong, H. (1982) : Polymeric Proanthocyanidins. <sup>13</sup>C NMR Studie of Procyanidins, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1217 – 1221.
- Proksch, P. (1996) : Natürliche und abgewandelte Insektizide, *Deutsche Apotheker Zeitung* **136**. p. 95
- Proksch, P., Edrada, R., Ebel, R., Bohnenstengel, F.I., and Nugroho B.W. (2001) : Chemistry and Biological Activity of Rocaglamide Derivatives and Related Compounds in *Aglaia* Species (Meliaceae), *Current. Org. Chem.* **5**, 947 - 962.

- Purushothaman, K.K., Sarada, A., Connolly, J.D., and Akinniyi, J.A. (1979) : The Structure of Roxburghilin, a Bis-amide of 2-Aminopyrrolidine from the Leaves of *Aglaia roxburghiana*, *J.Chem. Soc., Perkin, Trans 1*, 3171 - 3174.
- Rembold, H., and Puhlmann, I. (1995) : Azadirachtin : structure and activity relations in case of *Epilachna verivestis*. In : The Neem Tree *Azadirachta indica* A.Juss. and Other Meliaceous Plants: Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes (Schmutterer, H., ed.), VCH, Weinheim, 222 - 230.
- Rice, M.J., Legg, M., and Powell, K.A. (1998) : Natural Products in Agriculture - A View from the Industry, *Pestic. Sci.* **52**, 184 - 188.
- Ridley, H.N. (1992) : The flora of the malay peninsula. L. Reeve and Co. Ltd., London.
- Risser, P.G. and White, P.R. (1964), *Physiol. Plant.* **17**, 620 - 635.
- Rivani, E. (1961) : The phenology of *Prodenia litura* in israel with references to its occurrence in the near east at large. *Bull. Res. Coun. Israel* **10**, 100 - 106.
- Rücker, G. et al. (1971) : Instrumentelle pharmazeutische Analytik. 2. Aufl., Wiss. Verl.-Ges.mbH, Stuttgart.
- Saifah, E., and Jongbunprasert, V. (1988) : Piriferine, A New Pyrrolidine Alkaloids from *Aglaia pirifera* Leaves, *J. Nat. Prod.* **51**, 80 - 82.
- Saifah, E., and Puripattanavong, J. (1993) : Bisamides from *Aglaia* species : Structure analysis and potential to reverse drug resistance with cultured cells, *J. Nat. Prod.* **56**, 473 - 477.
- Satasook, C., Isman, M.B., Ishibashi, F., Medbury, S., Wiriyaichitra, P., and Towers, G.H.N. (1994) : Insecticidal bioactivity of crude extracts of *Aglaia* species (Meliaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **22**, 121 - 127.

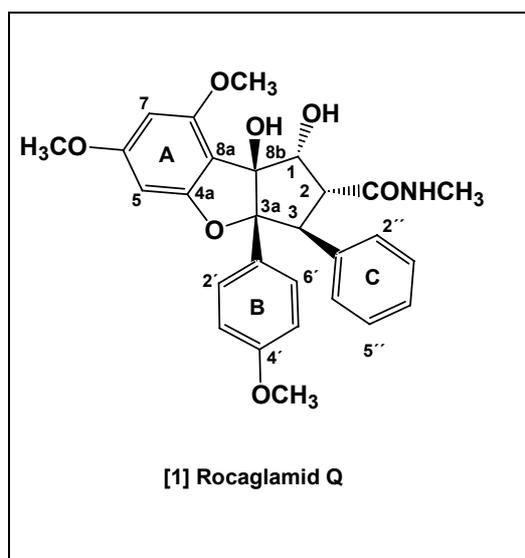
- Saxena, R.C. (1988) : Insecticides from Neem. In *Insecticide of Plant Origin* (Arna-son, J.T., Philogene, B.J.R. and Morand, P., eds). ACS Symposium Series 387, ACS, Washington DC, 110 - 135.
- Schneider, C., Bohnenstengel, F.I., Nugroho, B.W., Wray, V., Witte, L., Hung, P.D., Kiet, L.C., and Proksch, P. (2000) : Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia spectabilis* (Meliaceae), *Phytochemistry* **54**, 731 - 736.
- Schneider, G. (1990) : Arzneidrogen, ein Kompendium für Pharmazeuten, Biologen und Chemiker. Wissenschaftsverlag, Mannheim-Wien-Zürich.
- Schreier, P., Bernreuther, A., and Huffer M. (1995) : Analysis of Chiral Organic Molecules, Methodolgy and Applications, de Gruyter, Berlin.
- Schröder, F. (1998) : Induzierte chemische Abwehr bei Pflanzen, *Angew. Chem*, **110**, 1271 - 1274.
- Seigler, D.S. (1998) : Plant Secondary Metabolism, Kluwer Academic Publishers, USA.
- Shiengthong, D., and Ungphakorn, A. (1979) : Constituents of Thai Medicinal Plants – IV, new nitrogenous compounds – odorine and odorinol, *Tetrahedron Lett.* **24**, 2247 - 2250.
- Shu, Y-Z. (1998) : Recent Natural Products Based Drug Development : A Pharmaceutical Industry Perspective, *J. Nat. Prod.* **61**, 1053 - 1071.
- Singh, K.K., Palvi, S.K., and Singh, H.B. (1981) : Survey and biological activity of some medicinal plants of Mannanur Forest, Andhrapradesh. *Indian J. For.* **4** (2), 115 - 118.
- Skoog, D.A., and Leary, J.J. (1992) : Principles of Instrumental Analysis, 4. ed., Saunders College Publishing. USA.

- Spring, O. und Buschmann, H. (1998) : Grundlagen und Methoden der Pflanzensystematik, Quelle & Meyer Verlag, Wiesbaden.
- Srivastava, R.P., and Proksch, P. (1991) : Contact toxicity and feeding inhibitory activity of chromenes from asteraceae against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol. Gener.*, **15**, 265 - 274.
- Torsell, K.B.G. (1997) : Natural Product Chemistry, Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society, Sweden.
- Tripathi, S.N., Tiwari, C.M., Upadhyay, B.N., and Singh, R.S. (1979) : Screening of hypoglycemic action in certain indigenous drugs. *J. Res. Indian. Med. Yoga Homeopath.* **14** (3-4), 159 - 169.
- Trost, B.M., Greenspan, P.D., Yang, B.V., and Saulnier, M.G. (1990): An Unusual Oxidative Cyclization: A Synthesis and Absolute Stereochemical Assignment of (-)- Rocaglamide. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9022 - 9024.
- Wang, S-K., Cheng, Y-J., and Duh, C-Y. (2001) : Cytotoxic Constituent from Leaves of *Aglaia elliptifolia*, *J. Nat. Prod.* **64**, 92 - 94.
- Wateman, P.G., and Grundon, M.F. (1983) : Chemistry and Chemica Taxonomy of the Rutales, Academic Press, London, England.
- Wink, M. (1987) : Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In : Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 4: Cell culture in phytochemistry (Constable, (ed.)), Academic Press, New York, London, 17 - 42.
- Wu, T-S., Liou, M-J., Kuoh, C-S., Teng, C-M., Nagao, T., and Lee, K-H. (1997) : Cytotoxic and Antiplatelet Aggregation Principles from *Aglaia elliptifolia*, *J. Nat. Prod.*, **60**, 606 - 608.

Xu, Y-J, Wu, X-H., Tan, B.K.H., Lai, Y-H., Vittal, J.J., Imiyabir, Z., Madani, L., Khorizah, K.S., and Goh, S.H. (2000) : Flavonol-Cinnamate Cycloadducts and Diamide Derivates from *Aglaia laxiflora*, *J. Nat. Prod.*, **63**, 473 - 476.

## Anhang A : Strukturdaten

Abb. A.1 : Strukturdaten des Rocaglamids Q



Summenformel :  $C_{28}H_{29}NO_7$

Molekulargewicht :  $M_r$  491

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.2

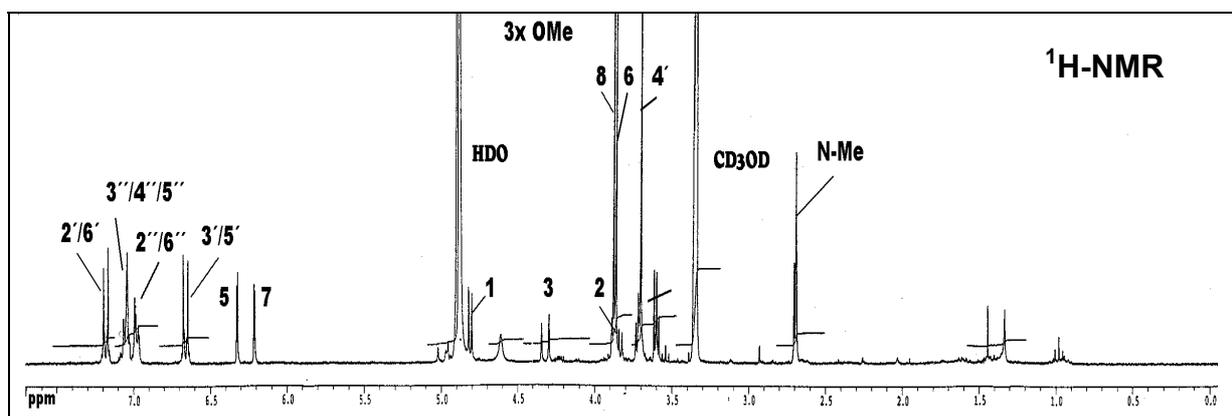
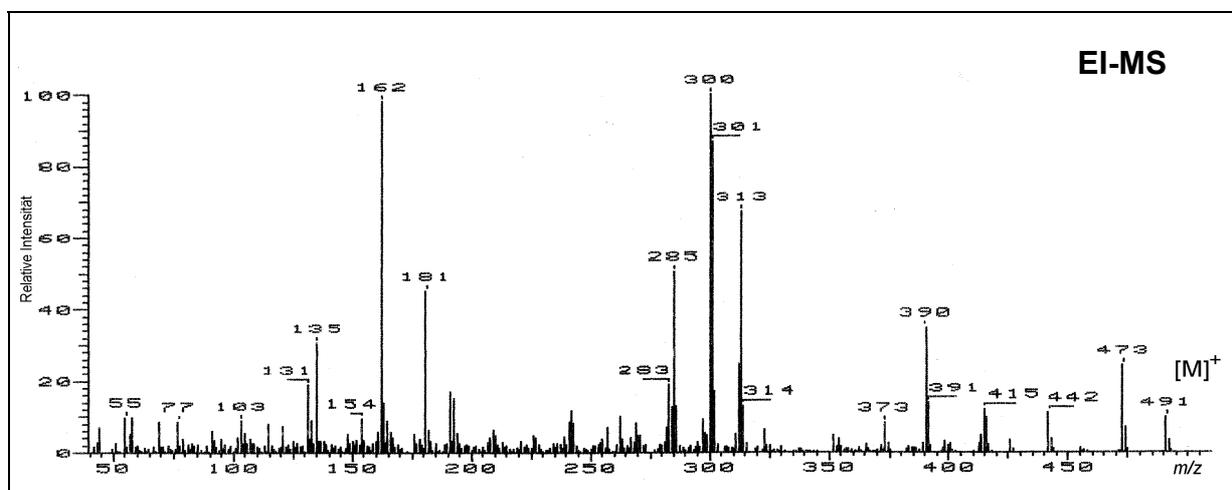
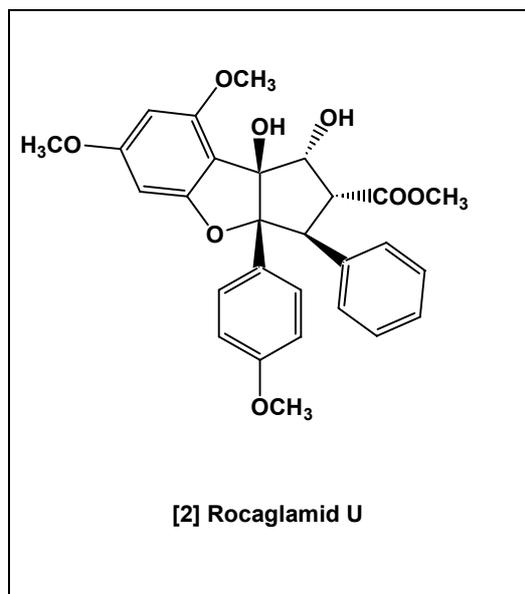


Abb. A.2 : Strukturdaten des Rocaglamids U



Summenformel :  $C_{28}H_{28}O_8$

Molekulargewicht :  $M_r$  492

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.2

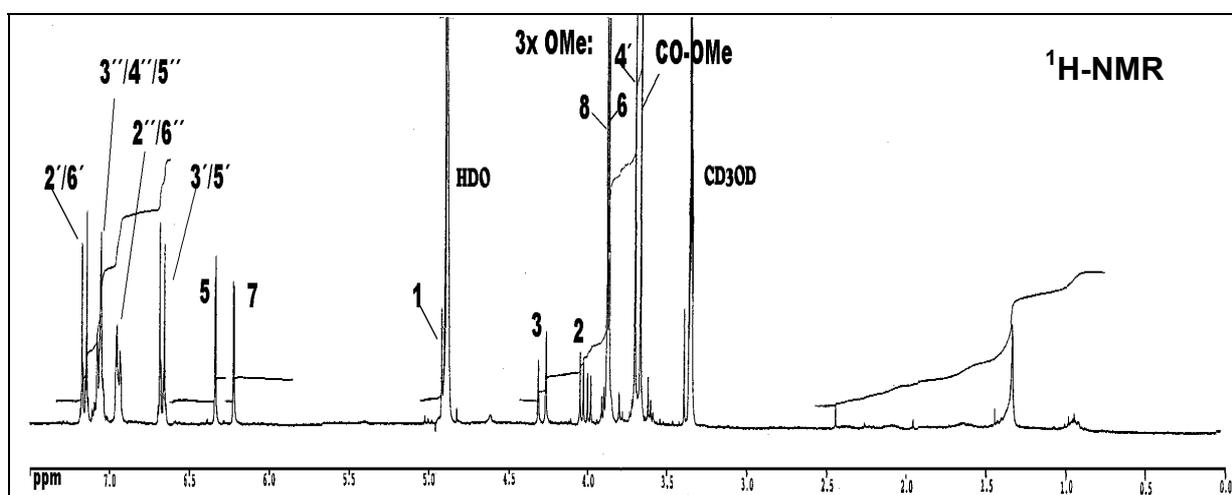
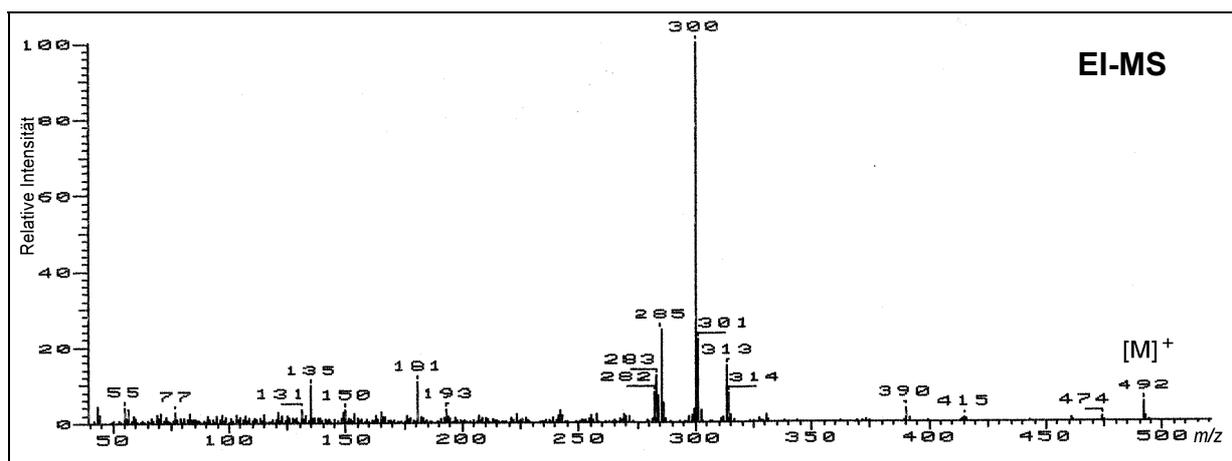
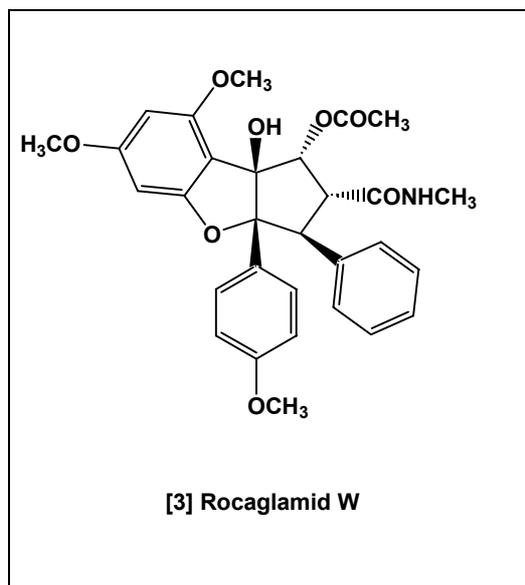


Abb. A.3 : Strukturdaten des Rocaglamids W

Summenformel : C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>8</sub>Molekulargewicht : M<sub>r</sub> 533

NMR-daten : siehe auch Tab. 2.2

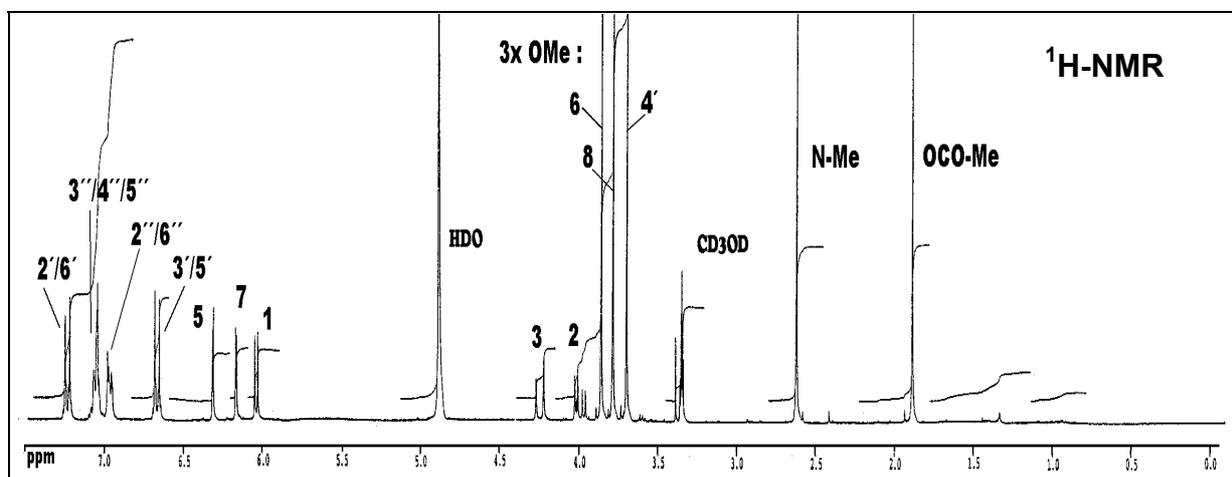
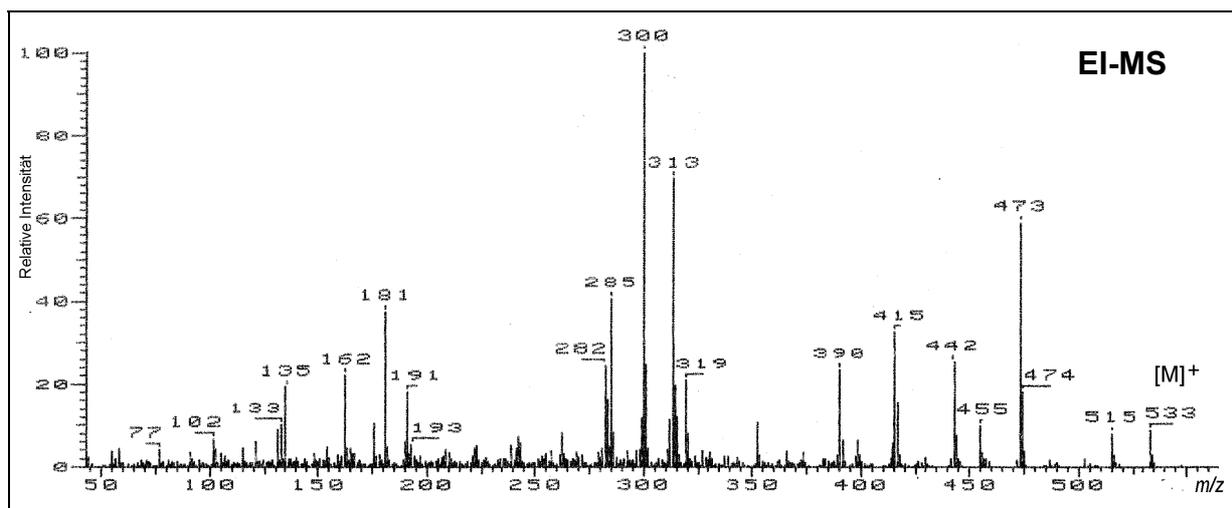
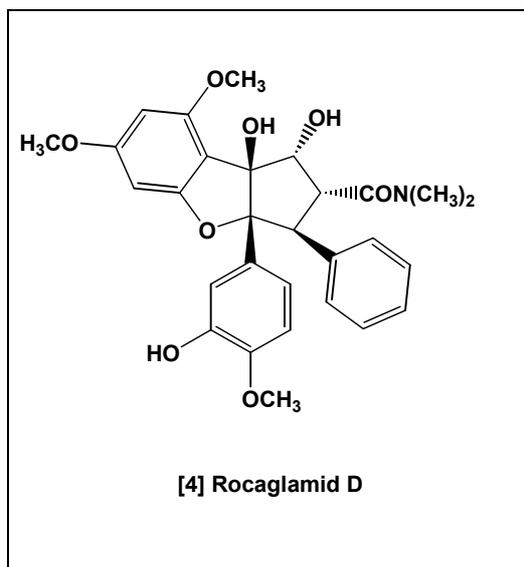


Abb. A.4 : Strukturdaten des Rocaglamids D



Summenformel :  $C_{29}H_{31}NO_8$

Molekulargewicht :  $M_r$  521

NMR-daten : siehe auch Tab. 2.3

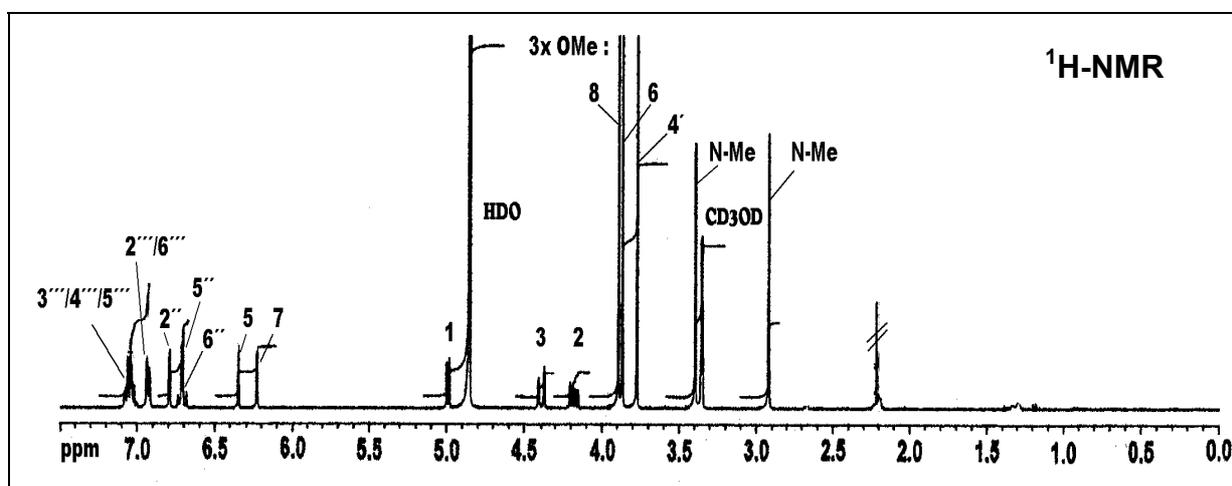
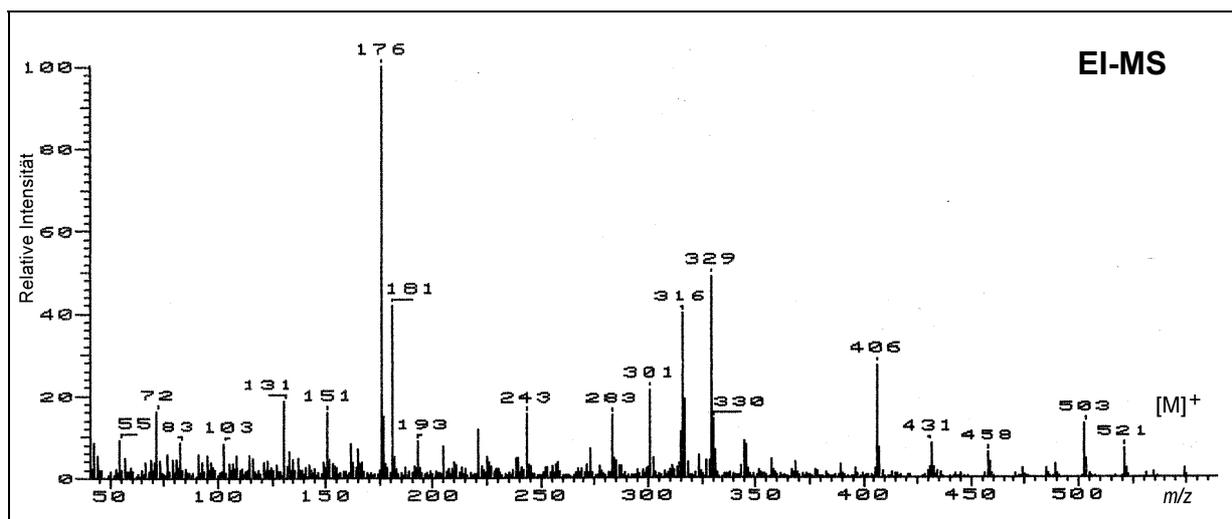
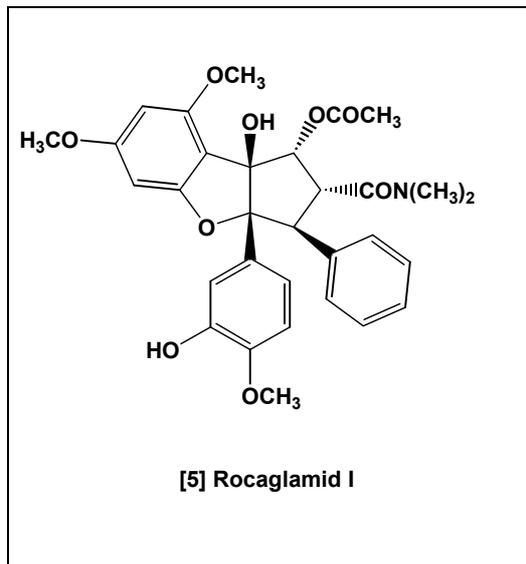


Abb. A.5 : Strukturdaten des Rocaglamids I



Summenformel :  $C_{31}H_{33}NO_9$

Molekulargewicht :  $M_r$  563

NMR-daten : siehe auch Tab. 2.3

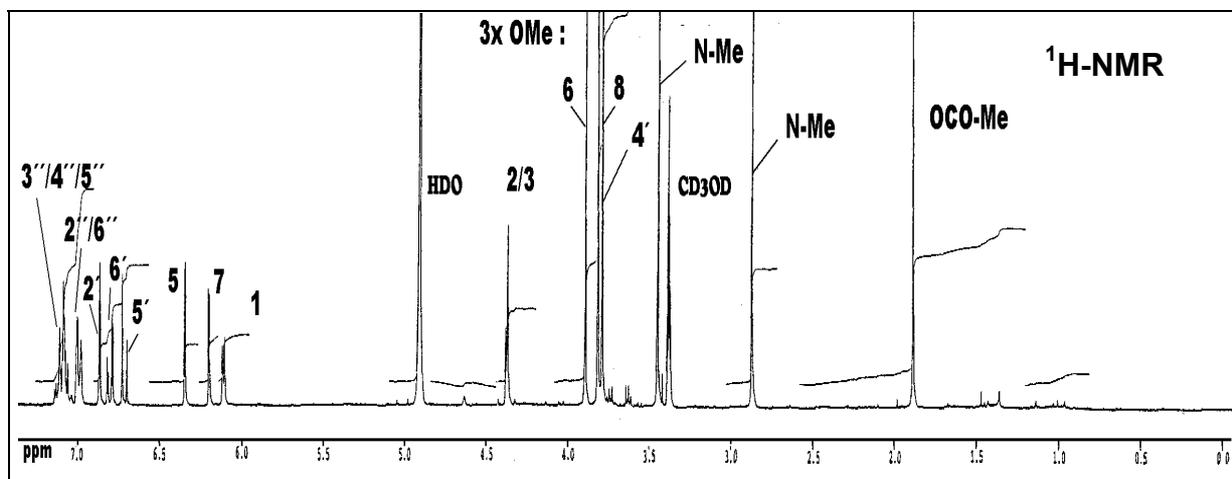
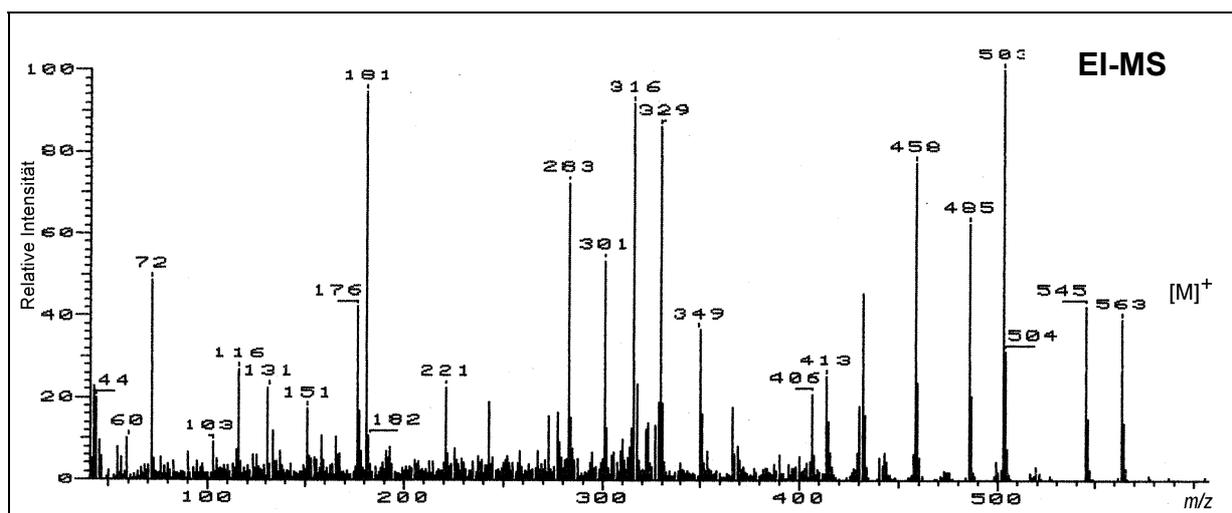
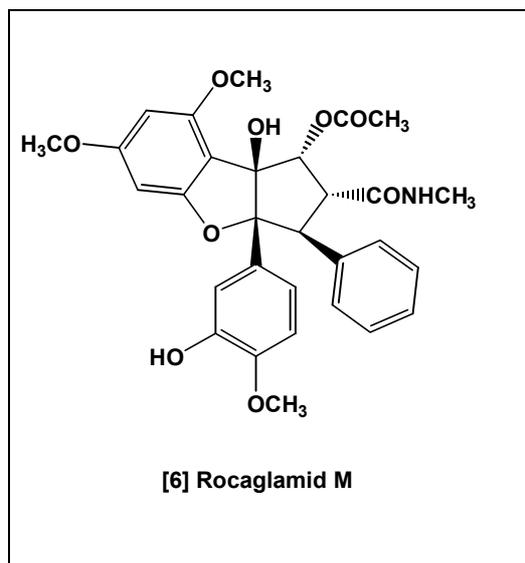


Abb. A.6 : Strukturdaten des Rocaglamids M



Summenformel : C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>9</sub>

Molekulargewicht : M<sub>r</sub> 549

NMR-daten : siehe auch Tab. 2.3

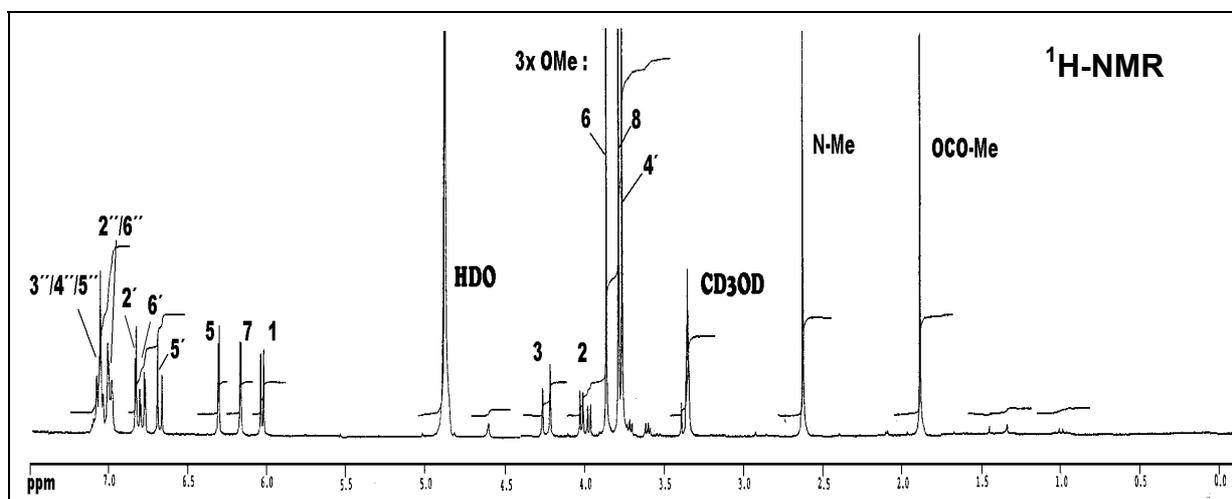
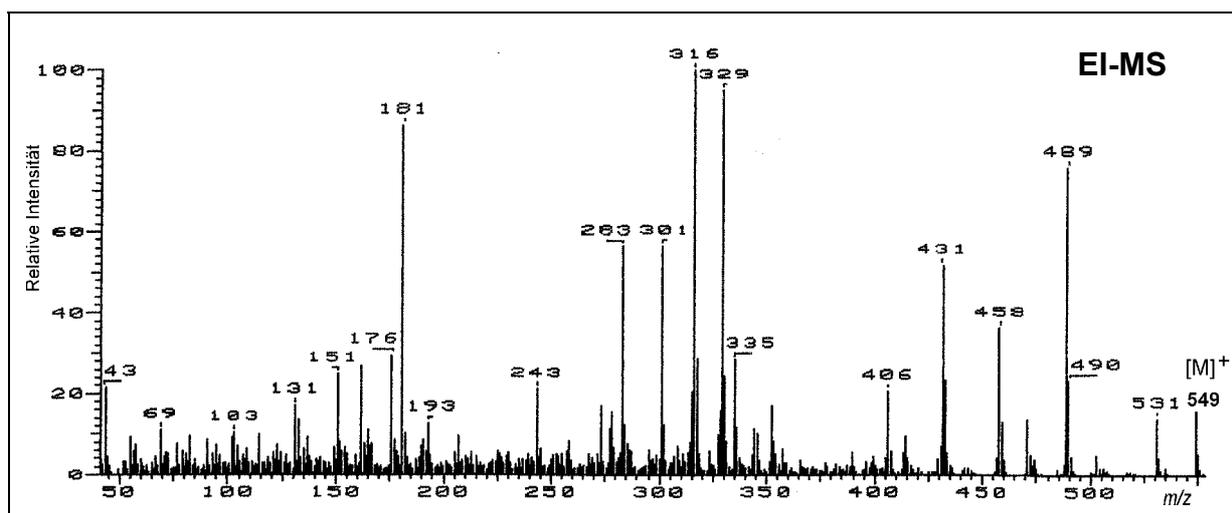
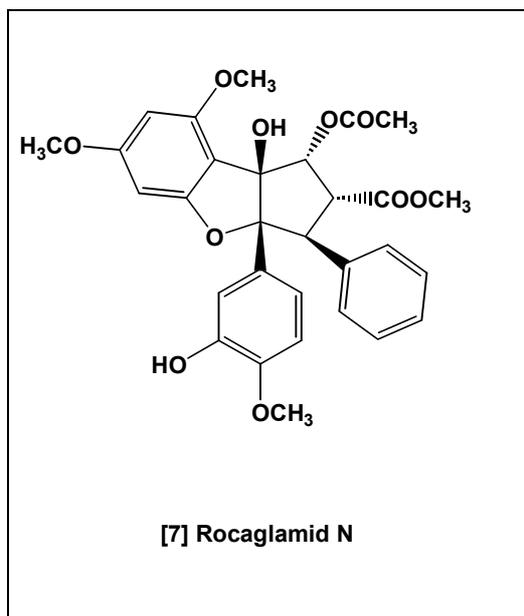


Abb. A.7 : Strukturdaten des Rocaglamids N



Summenformel :  $C_{30}H_{30}O_{10}$

Molekulargewicht :  $M_r$  550

NMR-daten : siehe auch Tab. 2.3

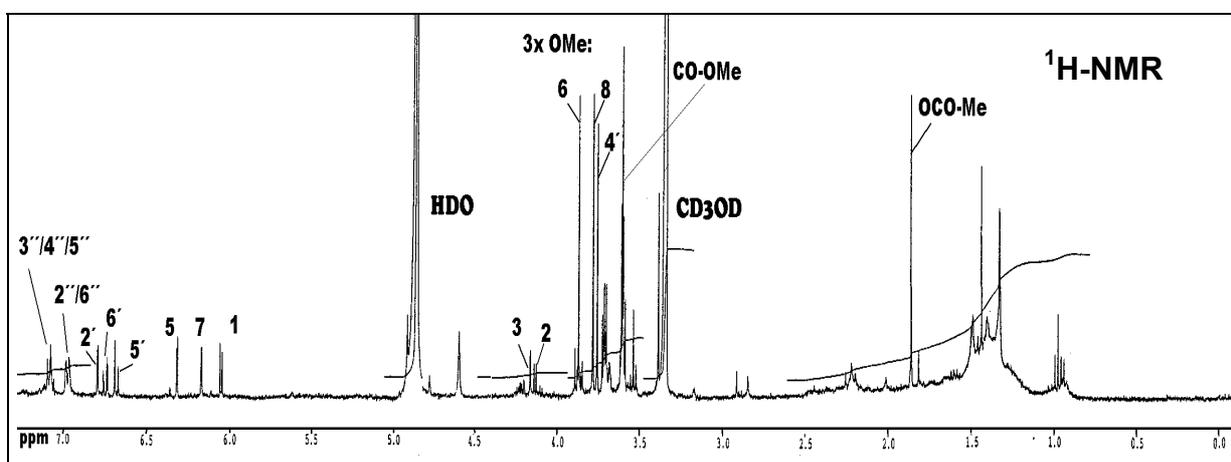
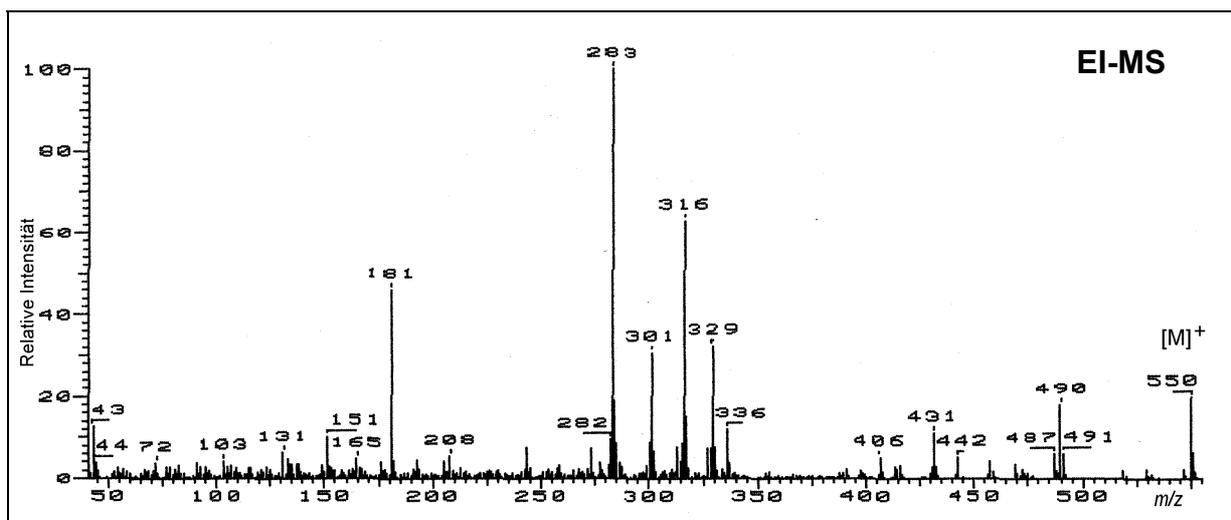
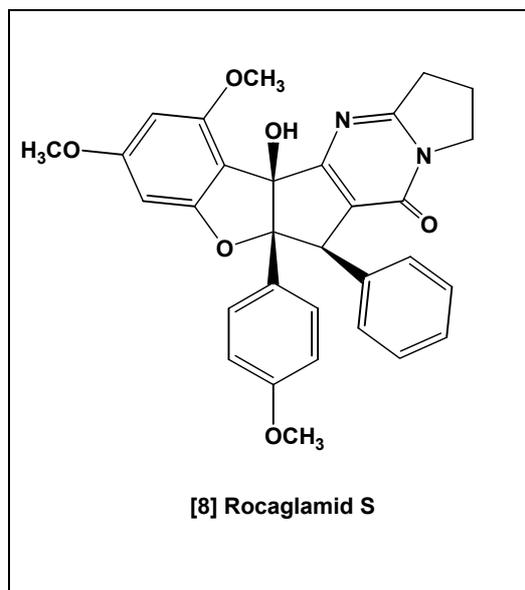


Abb. A.8 : Strukturdaten des Rocaglamids S



Summenformel :  $C_{31}H_{28}N_2O_6$

Molekulargewicht :  $M_r$  524

NMR-daten : siehe auch Tab. 2.4

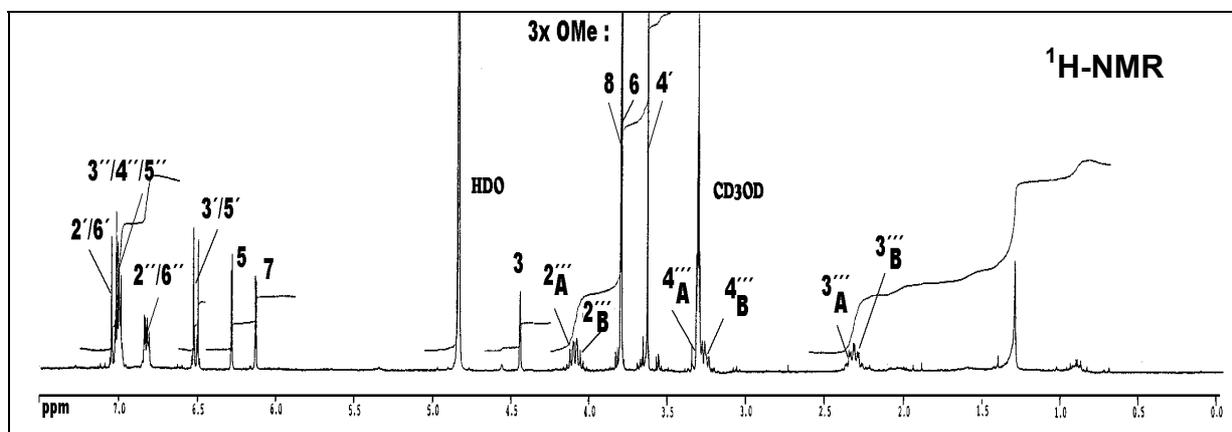
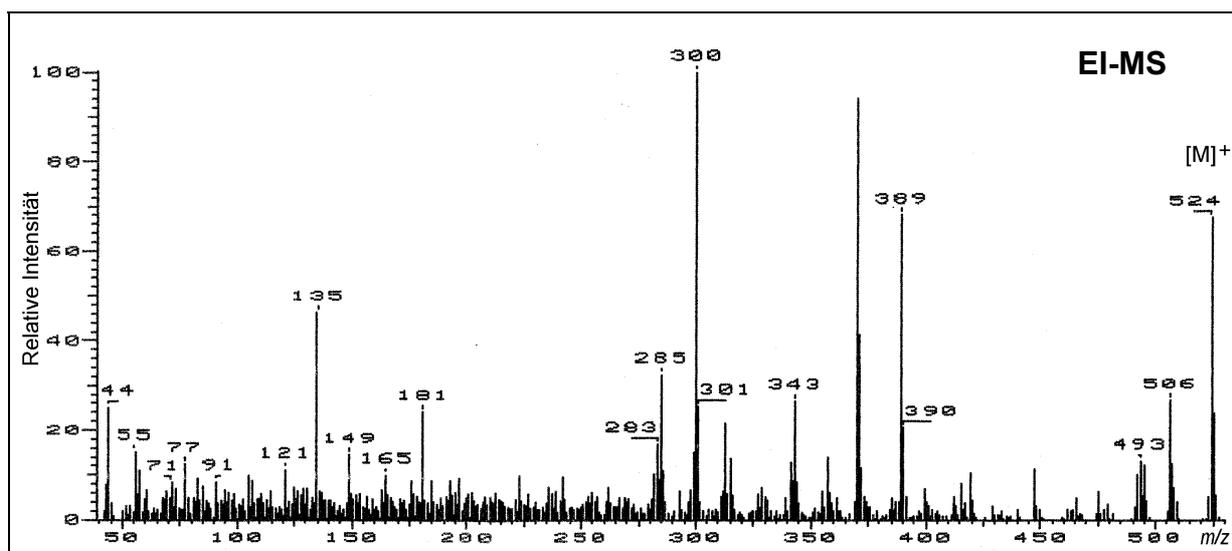
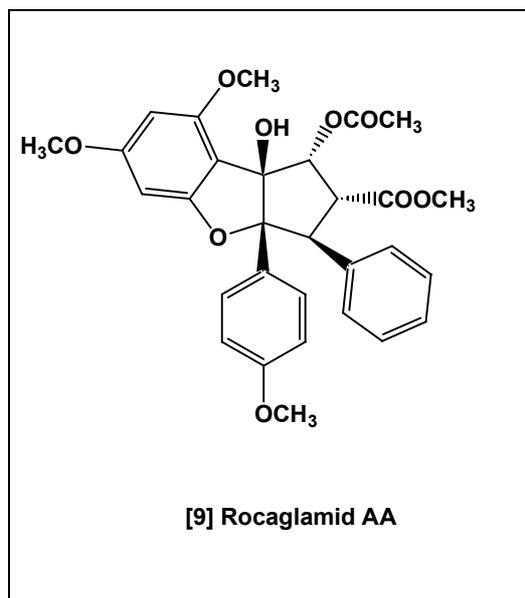


Abb. A.9 : Strukturdaten des Rocaglamids AA



Summenformel :  $C_{30}H_{30}O_9$   
 Molekulargewicht :  $M_r$  534  
 CD-Werte : 216 nm ( $\Delta\epsilon$ -8)  
 NMR-daten : siehe auch Tab. 2.5

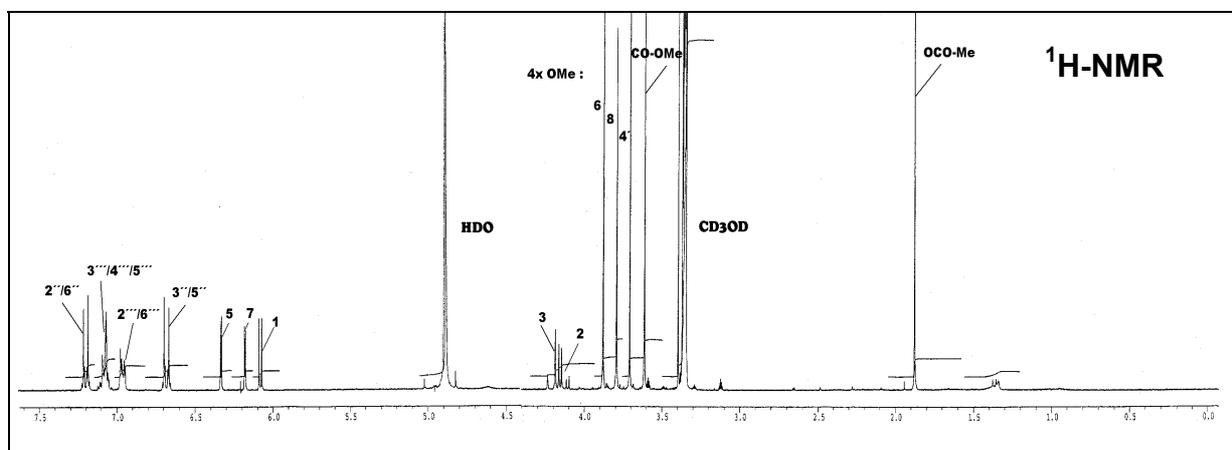
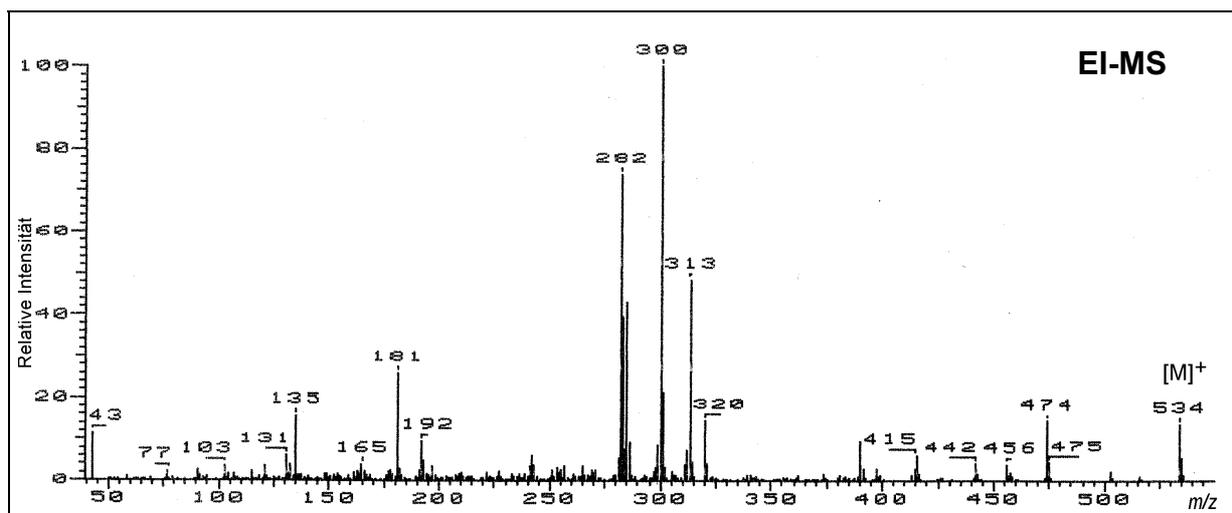
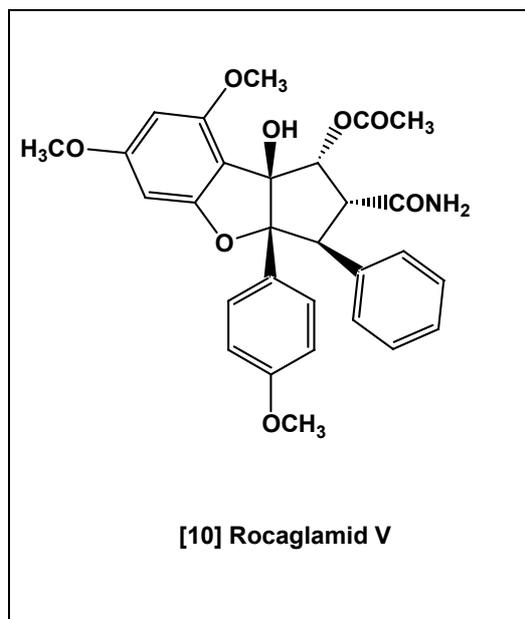


Abb. A.10 : Strukturdaten des Rocaglamids V



Summenformel :  $C_{29}H_{29}NO_8$   
 Molekulargewicht :  $M_r$  519  
 CD-Werte : 213 nm ( $\Delta\epsilon$ -4)  
 NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.5

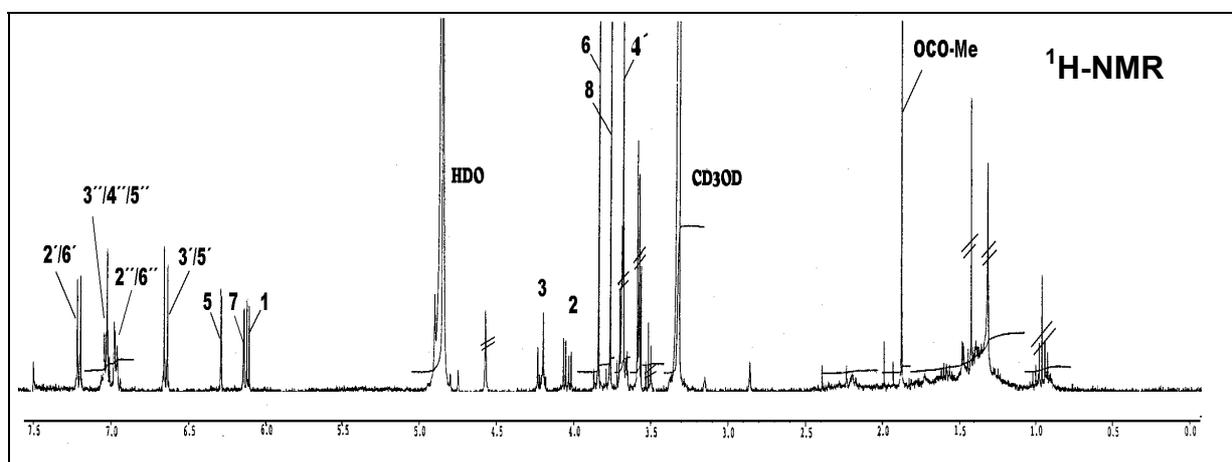
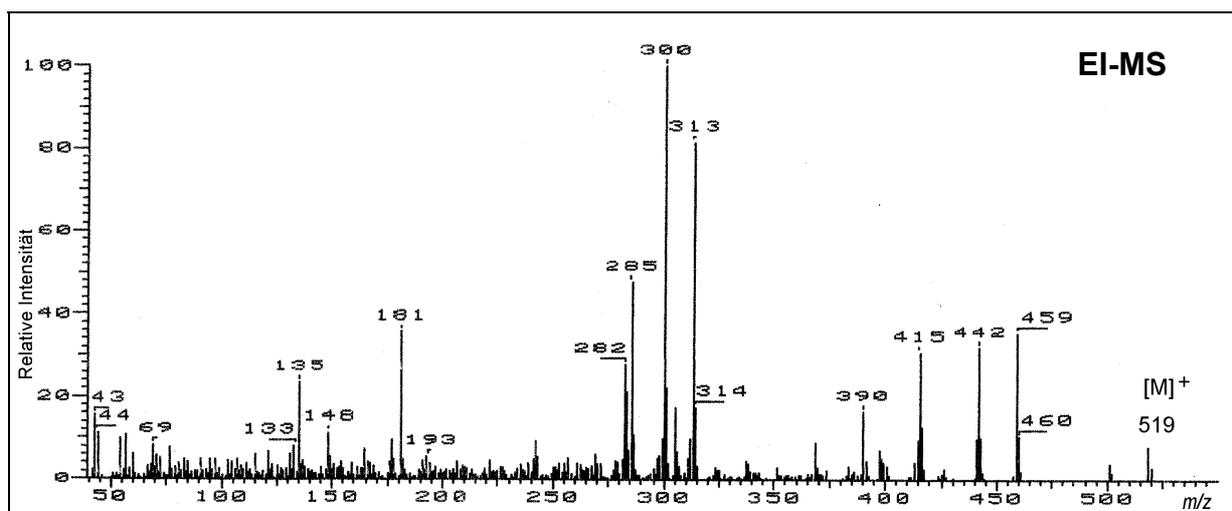
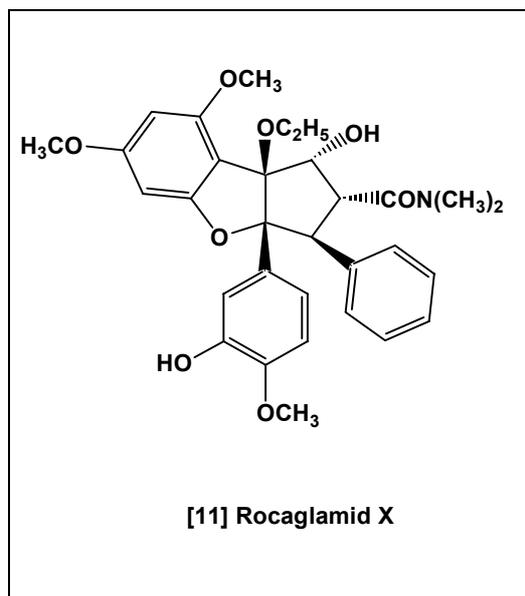


Abb. A.11 : Strukturdaten des Rocaglamids X



Summenformel :  $C_{31}H_{35}NO_8$   
 Molekulargewicht :  $M_r$  549  
 CD-Werte : 220 nm ( $\Delta\epsilon$ -13)  
 NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.6

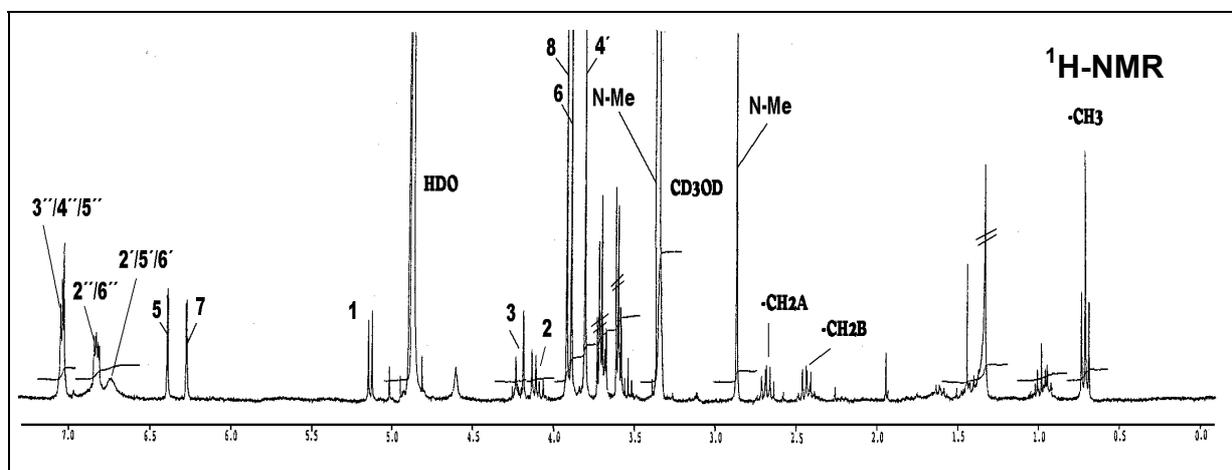
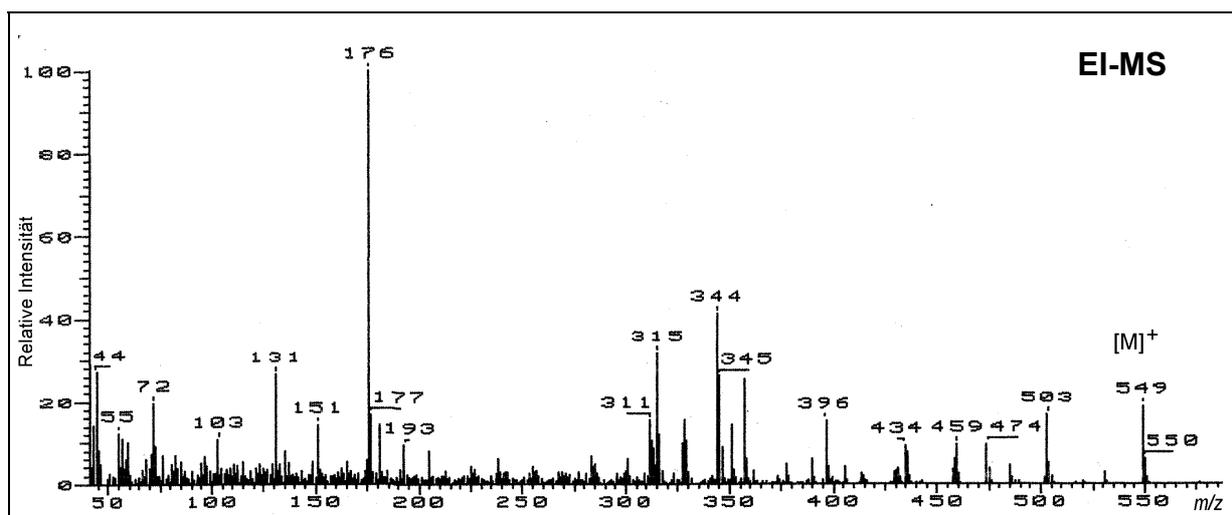
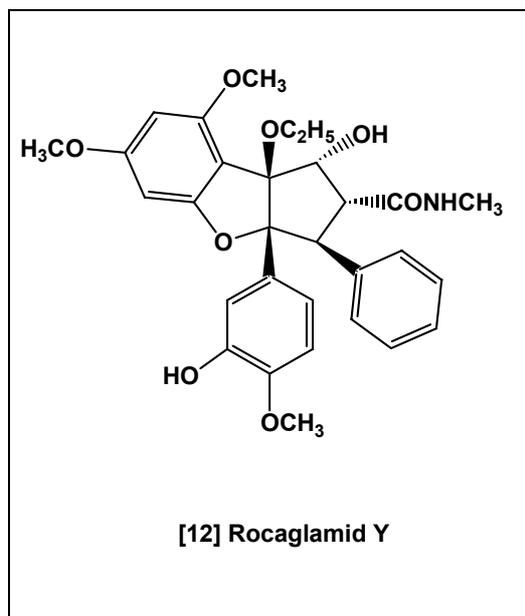
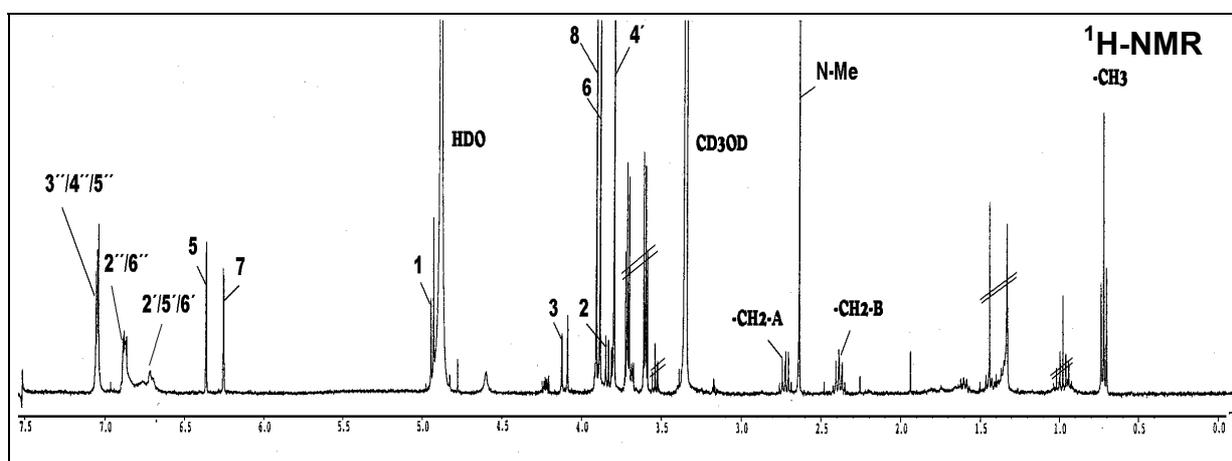
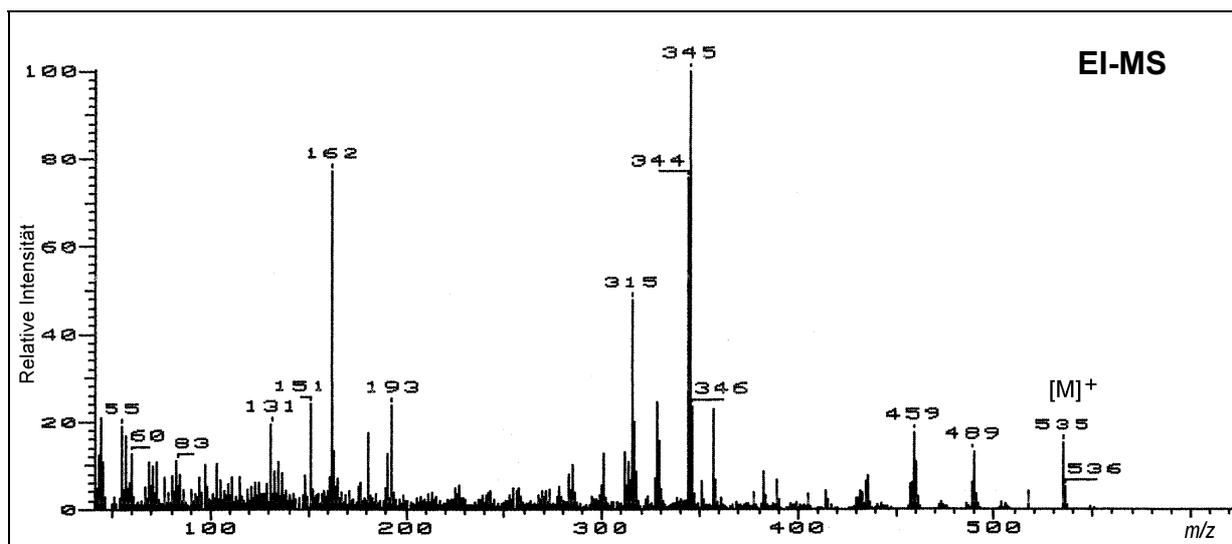


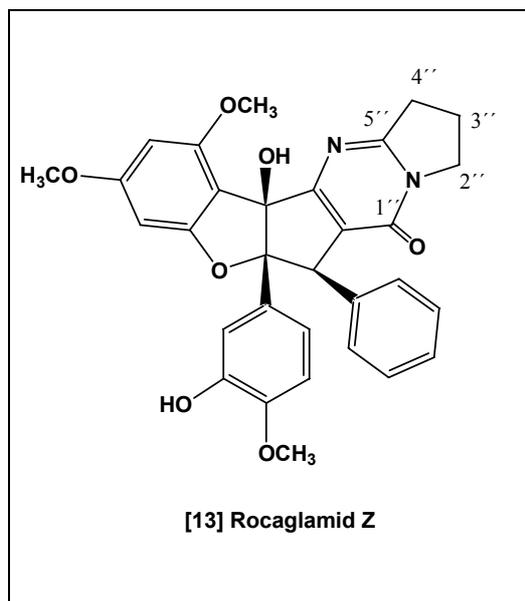
Abb. A.12 : Strukturdaten des Rocaglamids Y



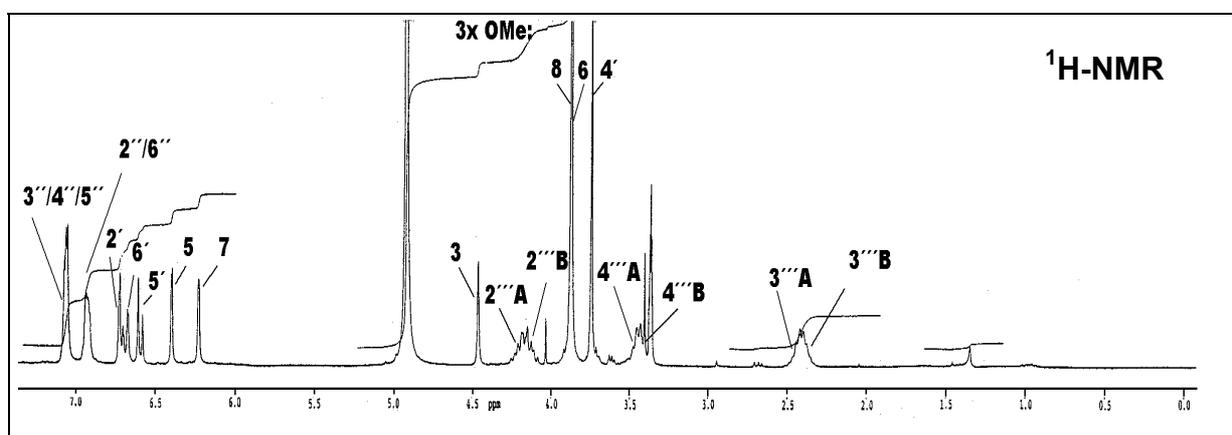
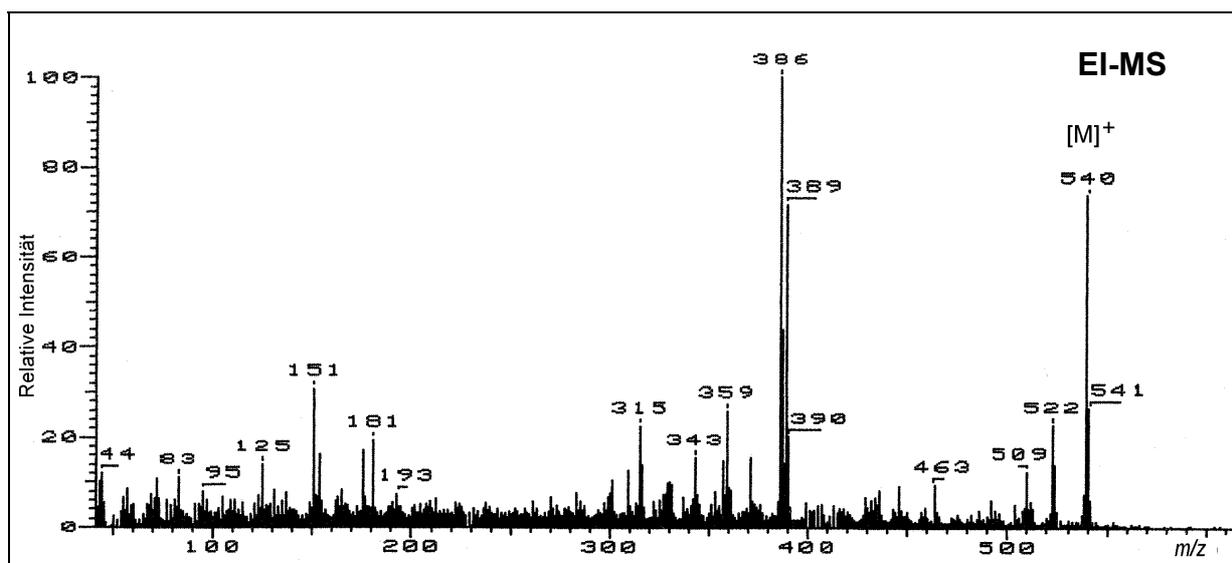
Summenformel :  $C_{30}H_{33}NO_8$   
 Molekulargewicht :  $M_r$  535  
 CD-Werte : 219 nm ( $\Delta\epsilon$ -5)  
 NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.6



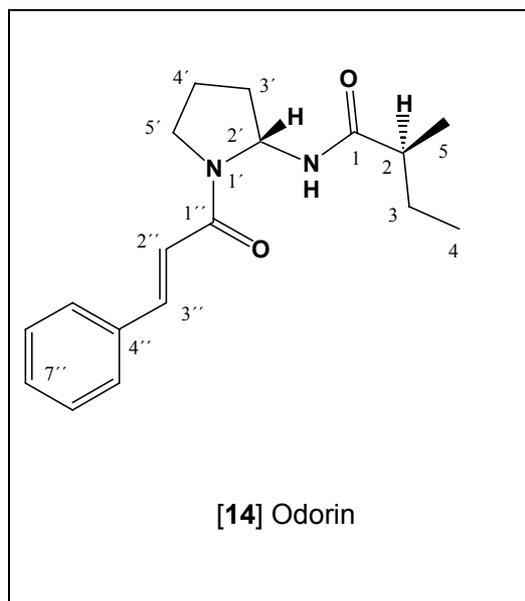
### Abb. A.13 : Strukturdaten des Rocaglamids Z



Summenformel :  $C_{31}H_{28}N_2O_7$   
 Molekulargewicht :  $M_r$  540  
 CD-Werte : 216 nm ( $\Delta\epsilon$ -4)  
 NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.7



### Abb. A.14 : Strukturdaten des Odorins



Summenformel :  $C_{18}H_{24}N_2O_2$   
 Molekulargewicht :  $M_r$  300  
 Optische Drehung :  $[\alpha]_D^{20} -37$   
 (c. 0.2,  $CHCl_3$ )  
 NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.8

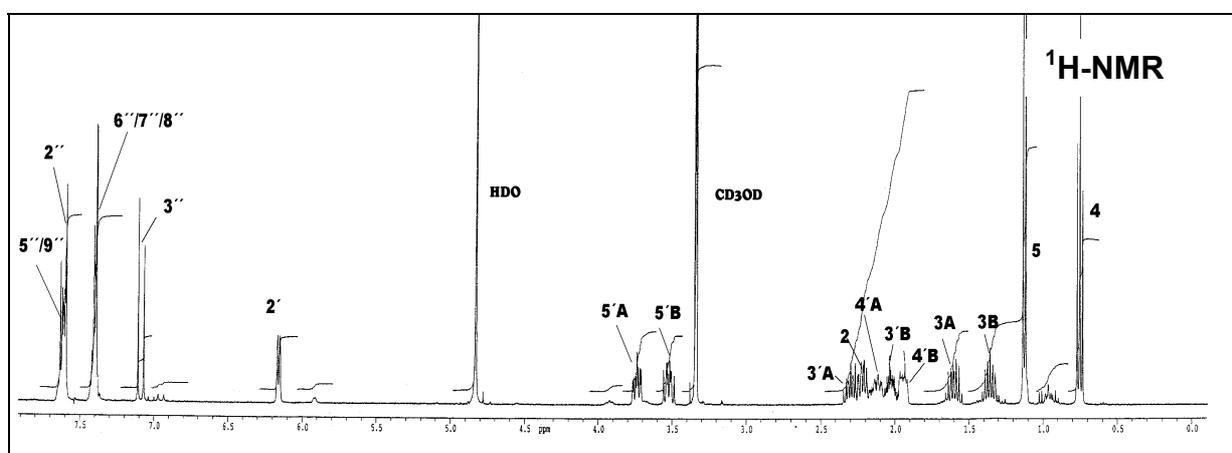
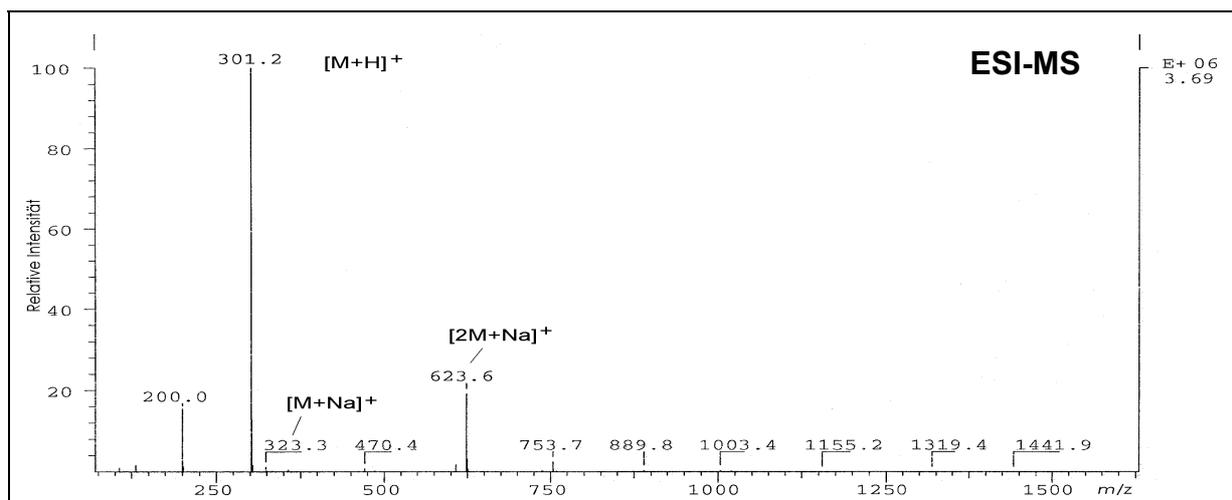


Tabelle A.14.1 : Kristalldaten und Angaben zur Strukturbestimmung und -verfeinerung für Odorin [14]

Strukturkennzeichen	Odorin
Summenformel	$C_{18}H_{24}N_2O_2$
Molmasse	300.39
Temperatur	293 (2) K
Wellenlänge	71.073 pm
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	C2
Zelldimensionen	$a = 1917.5(3)$ pm $\alpha = 90^\circ$ $b = 705.79$ (11) pm $\beta = 107.26(2)^\circ$ $c = 1361.2(3)$ pm $\gamma = 90^\circ$
Elementarzellenvolumen, Z	1.7592(5) nm <sup>3</sup> , 4
Berechnete Dichte	1.134 Mg/m <sup>3</sup>
Absorptionskoeffizient	0.074 mm <sup>-1</sup>
F(000)	648
Kristallgröße	0.01 x 0.19 x 0.41 mm
Gemessener $\theta$ -Bereich	3.08 bis 25.00°
Indexgrenzen	$-22 \leq h \leq 22$ , $-8 \leq k \leq 8$ , $-16 \leq l \leq 16$
Anzahl der gemessenen Reflexe	11437
Unabhängige Reflexe	3004 ( $R_{\text{int}} = 0.0627$ )
Vollständigkeit bis $\theta = 25.00^\circ$	95.6 %
Strukturverfeinerung	Vollmatrix-Least-Squares an $F^2$
Daten / Restraints / Parameter	3004 / 1 / 219
Goodnes-of-Fit an $F^2$	1.034
Endgültige R-Werte [ $l > 2\sigma(l)$ ]	$R_1 = 0.0469$ , $wR_2 = 0.1061$
R-Werte (sämtliche Daten)	$R_1 = 0.0631$ , $wR_2 = 0.1100$
Absolutparameter	0(2)
Größtes Maximum und Minimum	190 und -144 e.nm <sup>-3</sup>

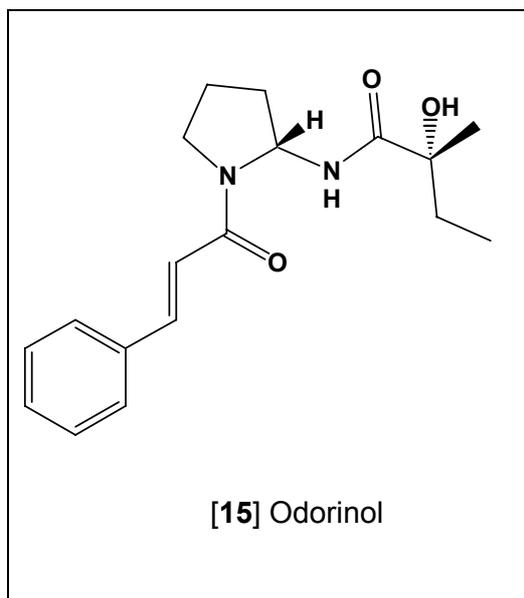
Tabelle A.14.2 : Bindungslängen [pm] und -winkel [°] für Odorin [14]

---

O(1)-C(1)	123.3(3)	O(2)-C(1'')	124.3(2)
N(1)-C(1)	134.7(3)	N(1)-C(2')	145.2(4)
C(1)-C(2)	151.6(4)	C(2)-C(5)	151.8(4)
C(2)-C(3)	155.6(5)	C(3)-C(4)	142.6(6)
N(1')-C(1'')	134.9(3)	N(1')-C(2')	147.4(3)
N(1')-C(5')	148.1(3)	C(2')-C(3')	153.0(4)
C(3')-C(4')	150.2(4)	C(4')-C(5')	151.5(3)
C(1'')-C(2'')	148.6(3)	C(2'')-C(3'')	132.6(3)
C(3'')-C(4'')	147.7(3)	C(4'')-C(9'')	137.5(3)
C(4'')-C(5'')	138.5(3)	C(5'')-C(6'')	138.8(3)
C(6'')-C(7'')	136.0(4)	C(7'')-C(8'')	135.9(4)
C(8'')-C(9'')	139.6(4)		
C(1)-N(1)-C(2')	123.5(2)	O(1)-C(1)-N(1)	121.6(3)
O(1)-C(1)-C(2)	121.8(2)	N(1)-C(1)-C(2)	116.6(2)
C(5)-C(2)-C(1)	108.7(3)	C(5)-C(2)-C(3)	108.2(3)
C(1)-C(2)-C(3)	114.0(3)	C(4)-C(3)-C(2)	116.9(4)
C(1'')-N(1')-C(2')	127.20(17)	C(1'')-N(1')-C(5')	120.58(18)
C(2')-N(1')-C(5')	112.18(16)	N(1)-C(2')-N(1')	111.1(2)
N(1)-C(2')-C(3')	114.7(2)	N(1')-C(2')-C(3')	101.69(19)
C(4')-C(3')-C(2')	105.0(2)	C(3')-C(4')-C(5')	104.6(2)
N(1')-C(5')-C(4')	103.95(18)	O(2)-C(1'')-N(1')	120.90(18)
O(2)-C(1'')-C(2'')	121.40(19)	N(1')-C(1'')-C(2'')	117.7(2)
C(3'')-C(2'')-C(1'')	121.9(2)	C(2'')-C(3'')-C(4'')	127.4(2)
C(9'')-C(4'')-C(5'')	117.6(2)	C(9'')-C(4'')-C(3'')	119.8(2)
C(5'')-C(4'')-C(3'')	122.6(2)	C(4'')-C(5'')-C(6'')	121.0(3)
C(7'')-C(6'')-C(5'')	120.4(3)	C(8'')-C(7'')-C(6'')	119.6(3)
C(7'')-C(8'')-C(9'')	120.4(3)	C(4'')-C(9'')-C(8'')	120.9(3)

---

### Abb. A.15 : Strukturdaten des Odorinol



Summenformel :  $C_{18}H_{24}N_2O_3$   
 Molekulargewicht :  $M_r$  316  
 Optische Drehung :  $[\alpha]_D^{20} -10$   
 (c. 0.2,  $CHCl_3$ )  
 NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.8

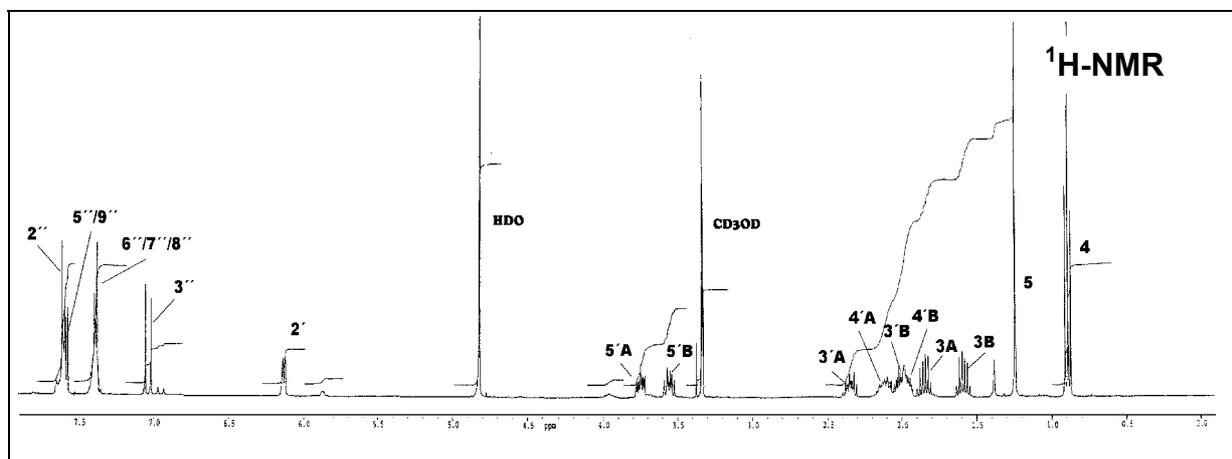
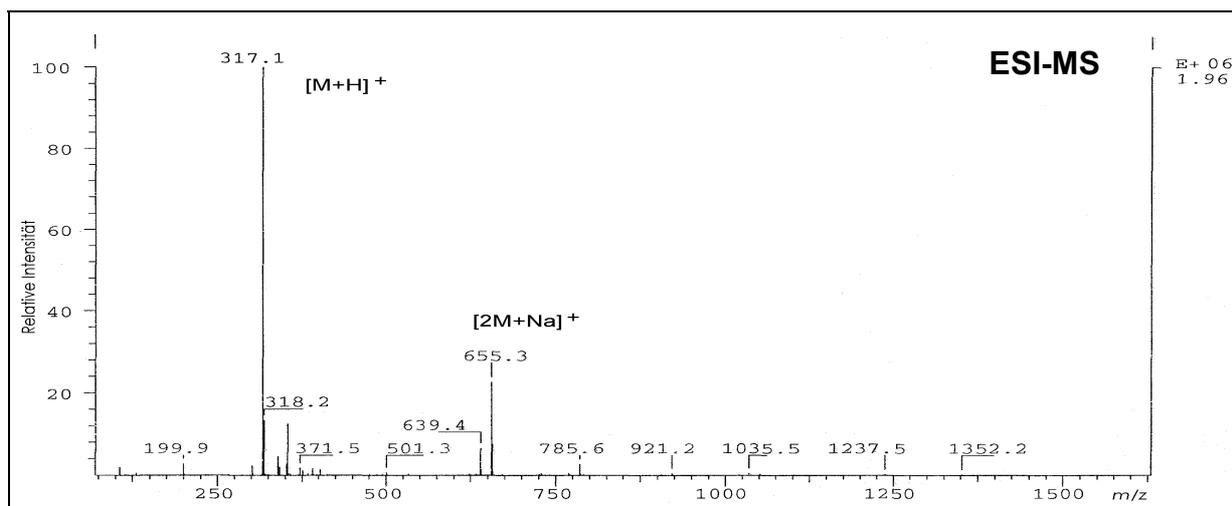
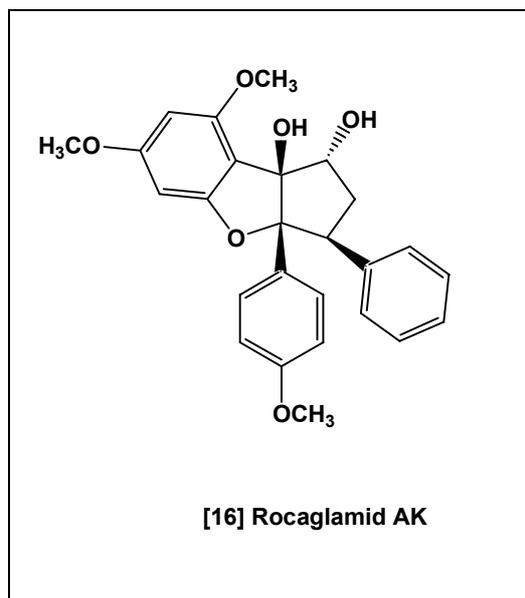


Abb. A.16 : Strukturdaten des Rocaglaols (Rocaglamid AK)



Summenformel :  $C_{26}H_{26}O_6$

Molekulargewicht :  $M_r$  434

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.9

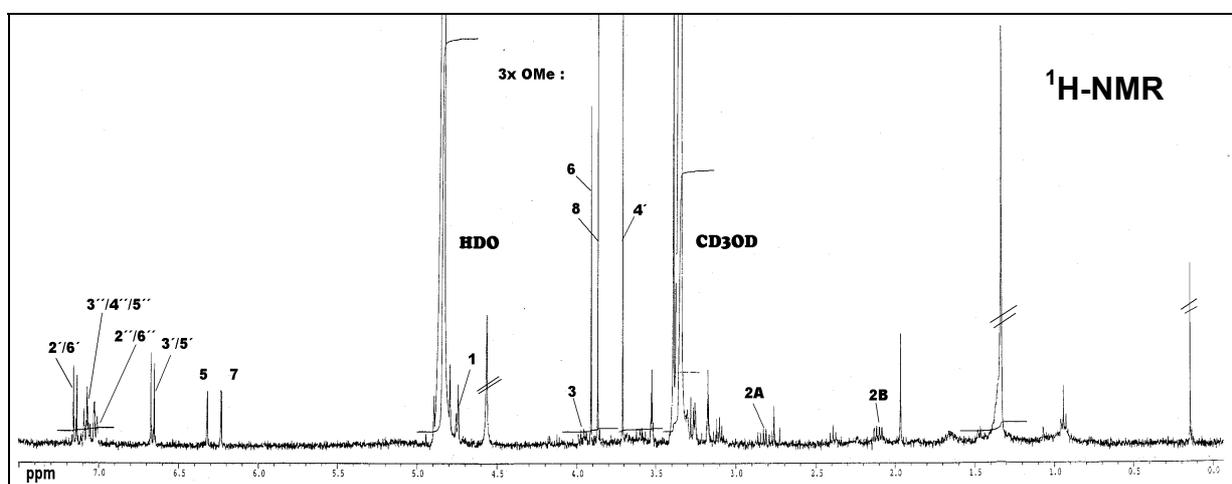
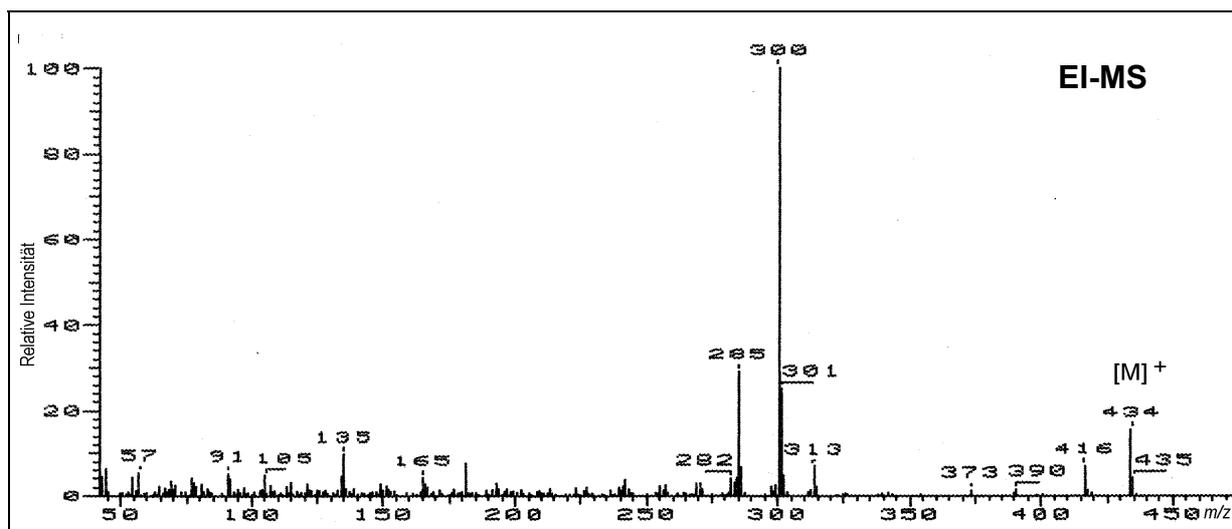
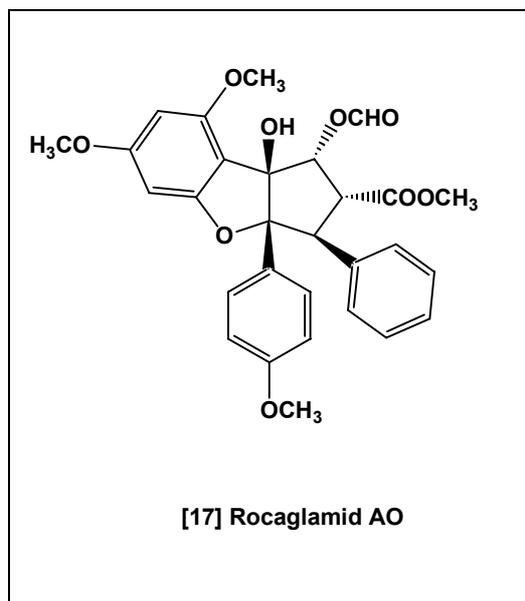


Abb. A.17 : Strukturdaten des Rocaglamids AO



Summenformel : C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>

Molekulargewicht : M<sub>r</sub> 520

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.9

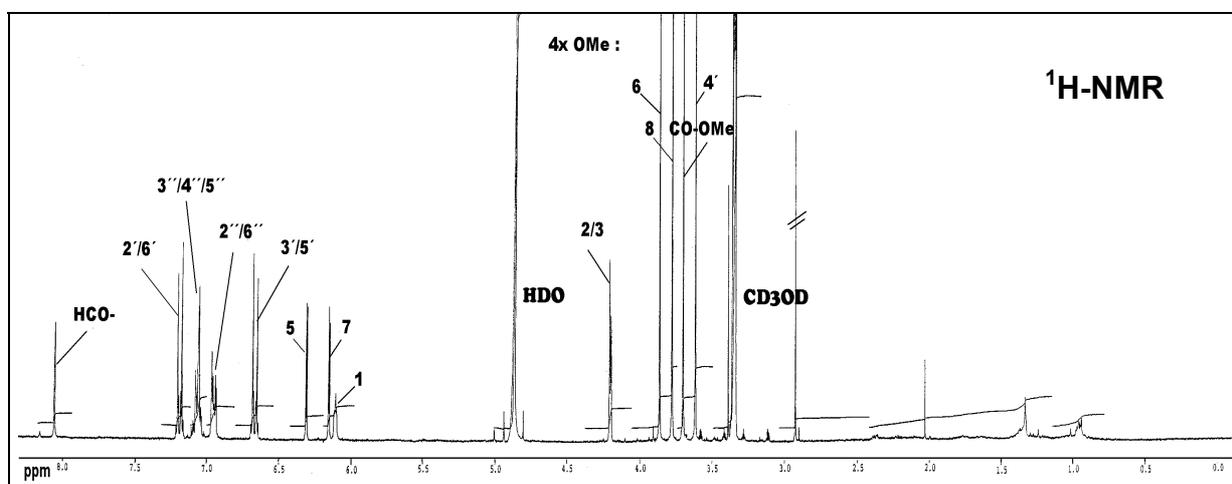
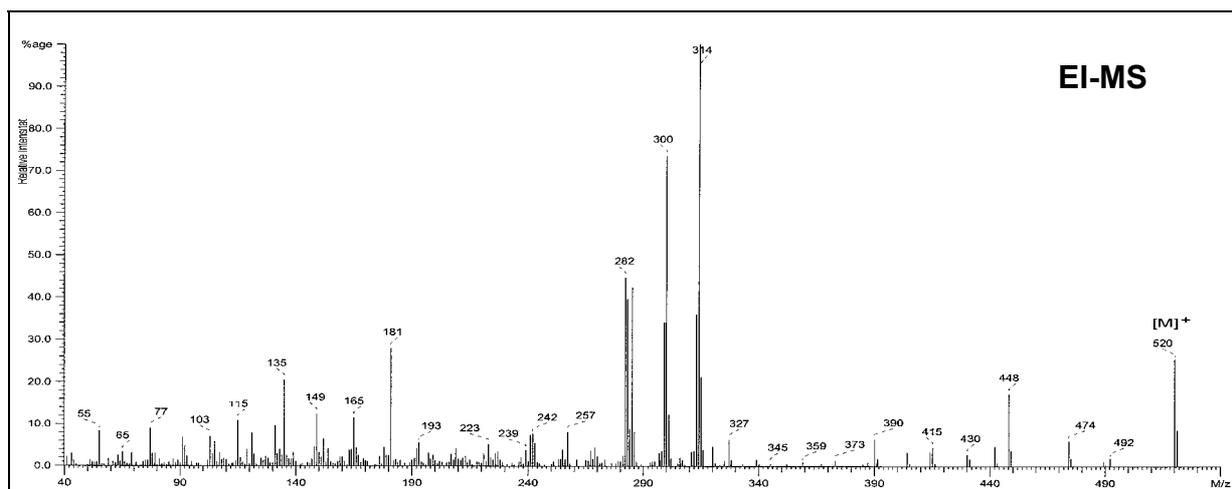
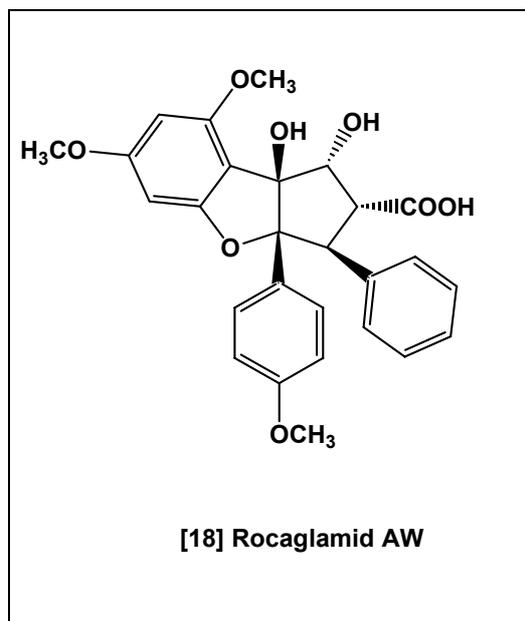


Abb. A.18 : Strukturdaten des Rocaglamids AW

Summenformel : C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>Molekulargewicht : M<sub>r</sub> 478

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.9

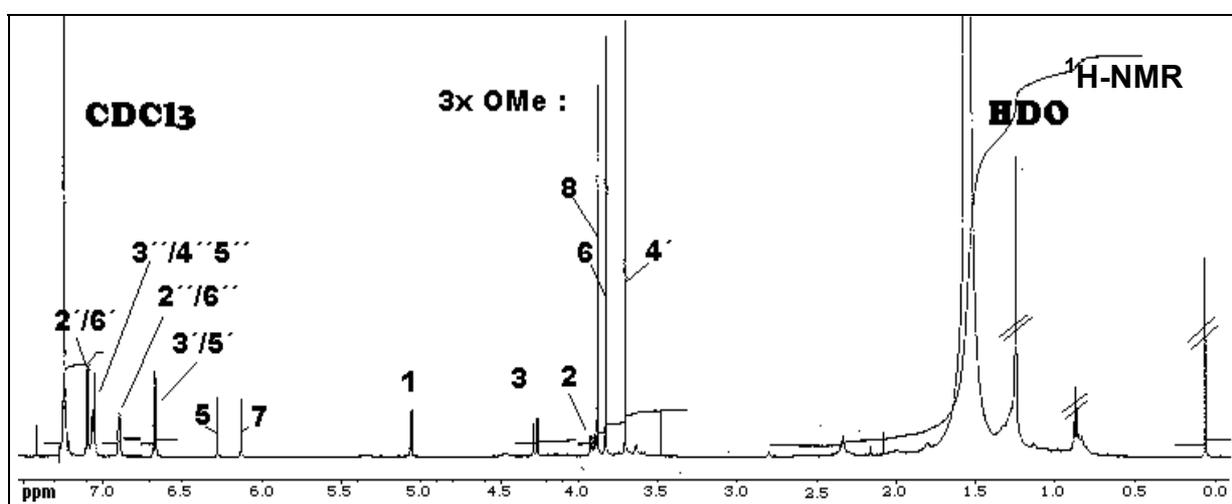
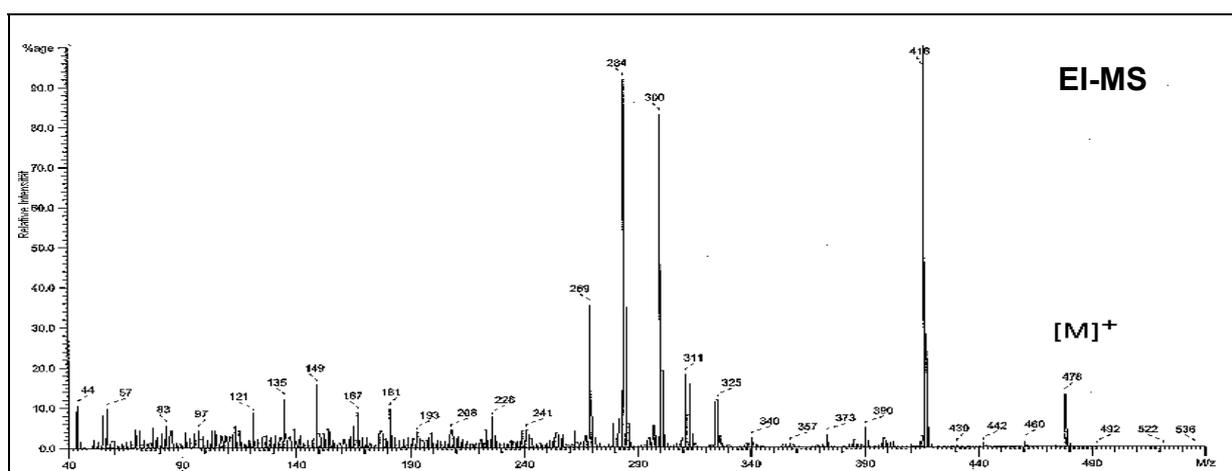
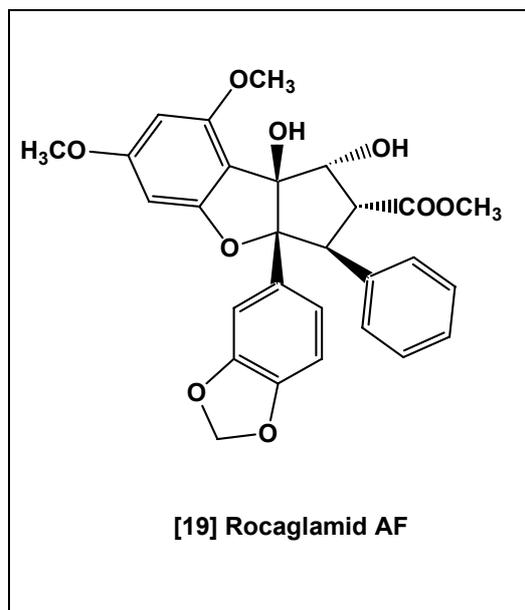


Abb. A.19 : Strukturdaten des Rocaglamids AF

Summenformel :  $C_{28}H_{26}O_9$ Molekulargewicht :  $M_r$  506

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.10

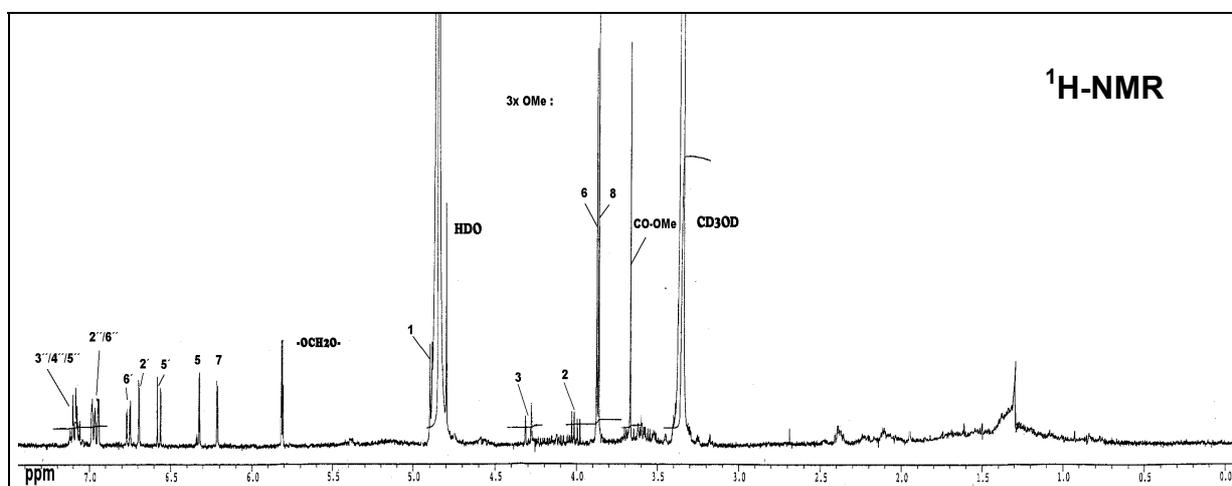
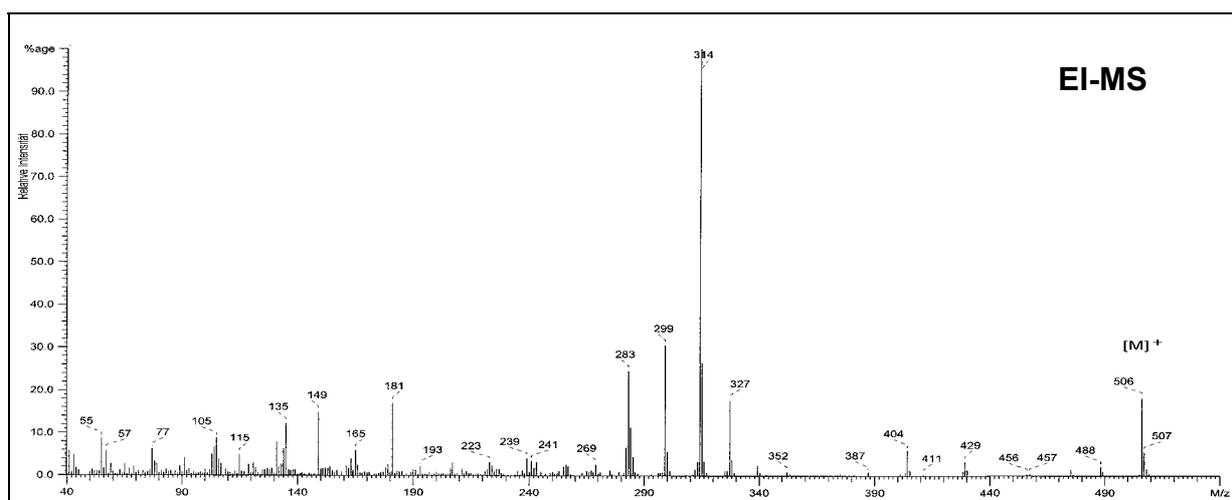
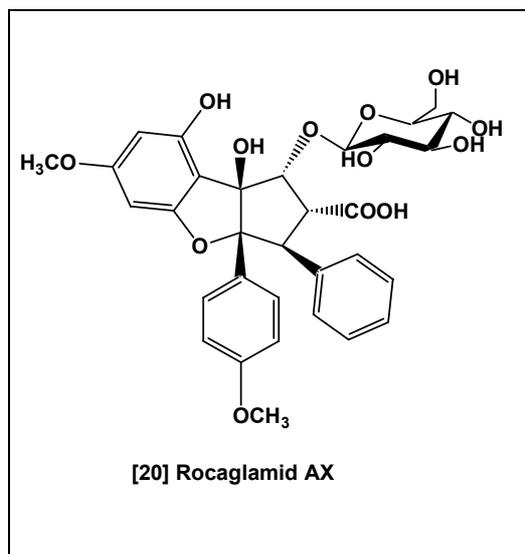


Abb. A.20 : Strukturdaten des Rocaglamids AX



Summenformel :  $C_{32}H_{34}O_{13}$

Molekulargewicht :  $M_r$  626

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.11

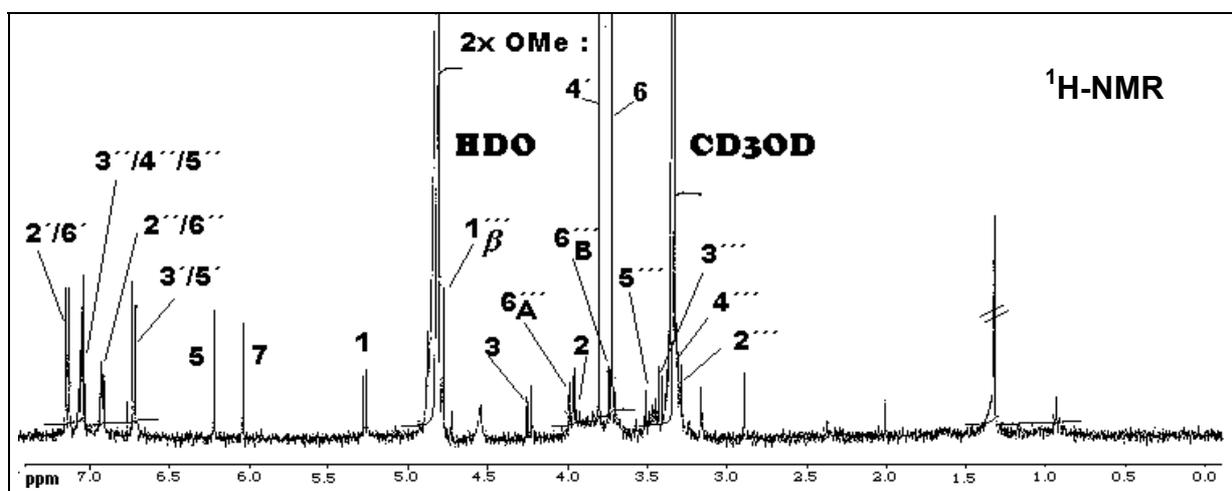
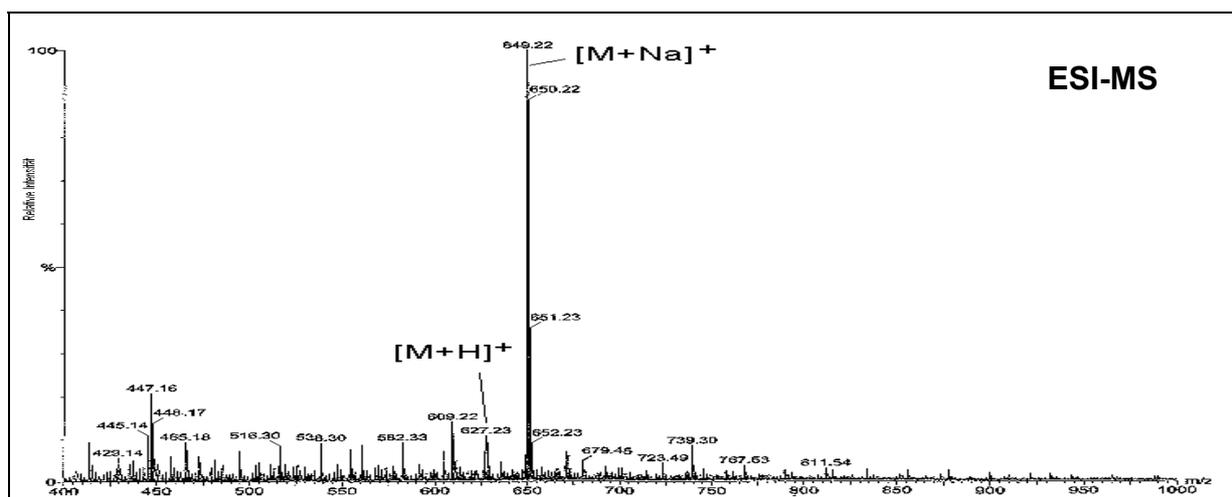
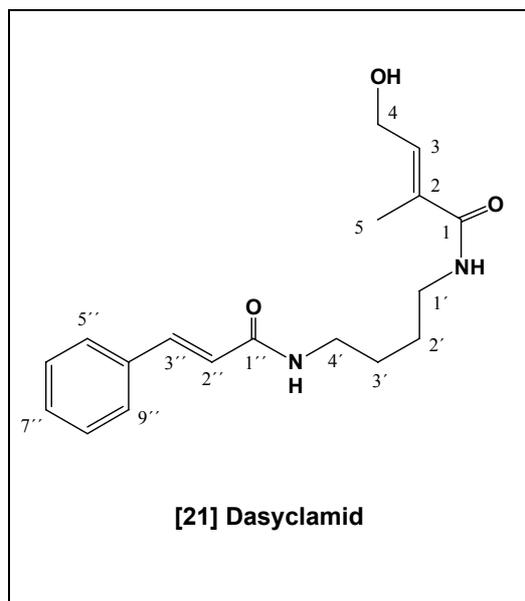


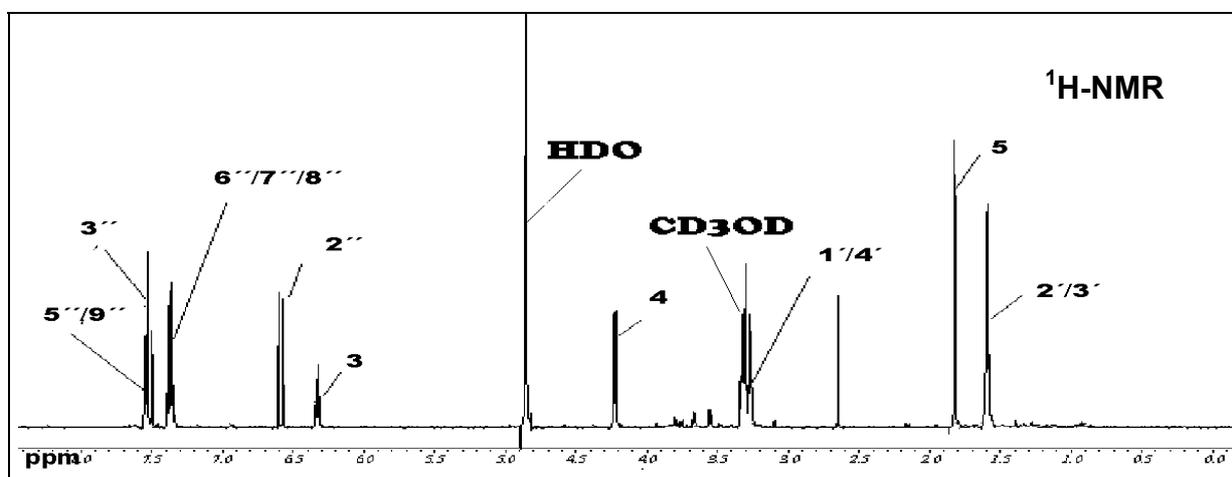
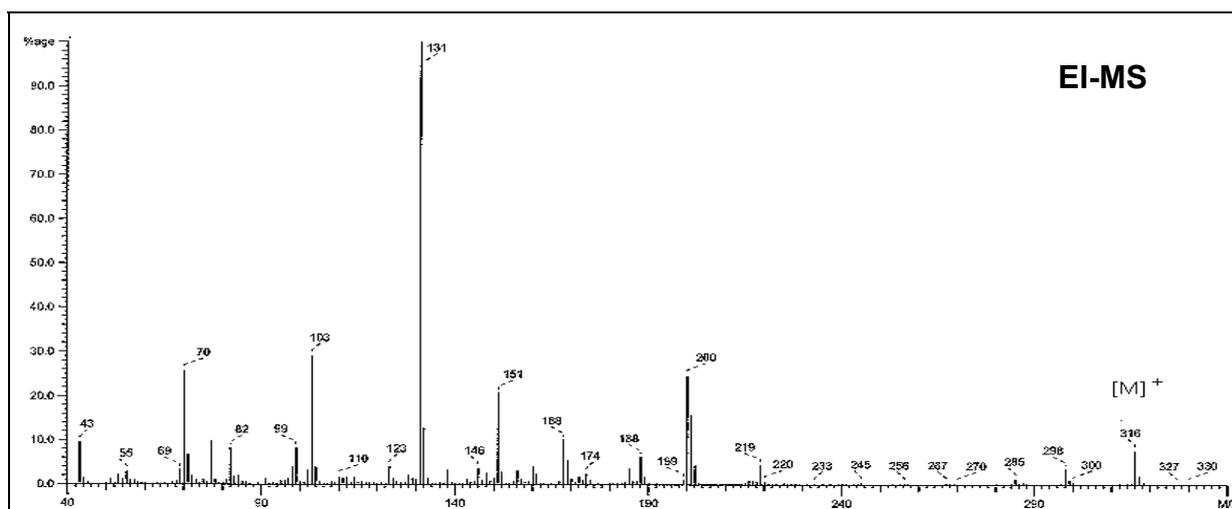
Abb. A.21 : Strukturdaten des Dasyclamids



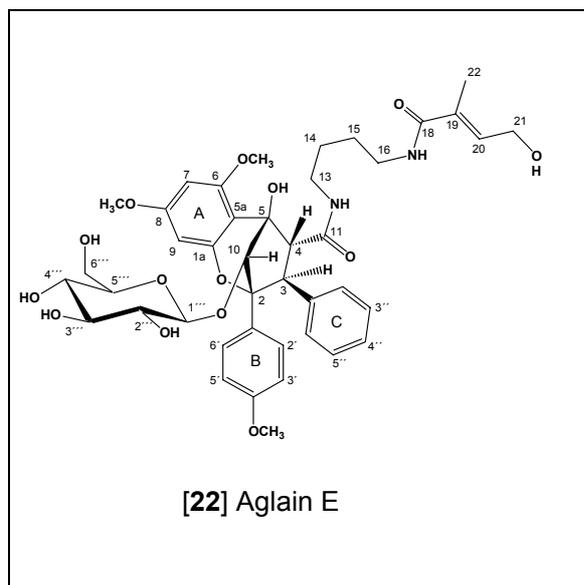
Summenformel :  $C_{18}H_{24}N_2O_3$

Molekulargewicht :  $M_r$  316

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.12



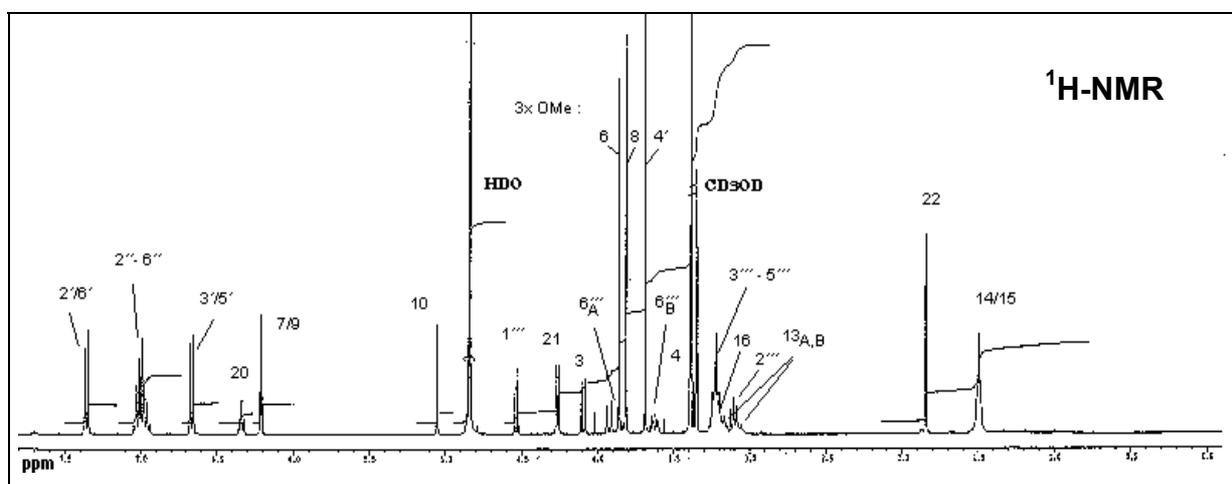
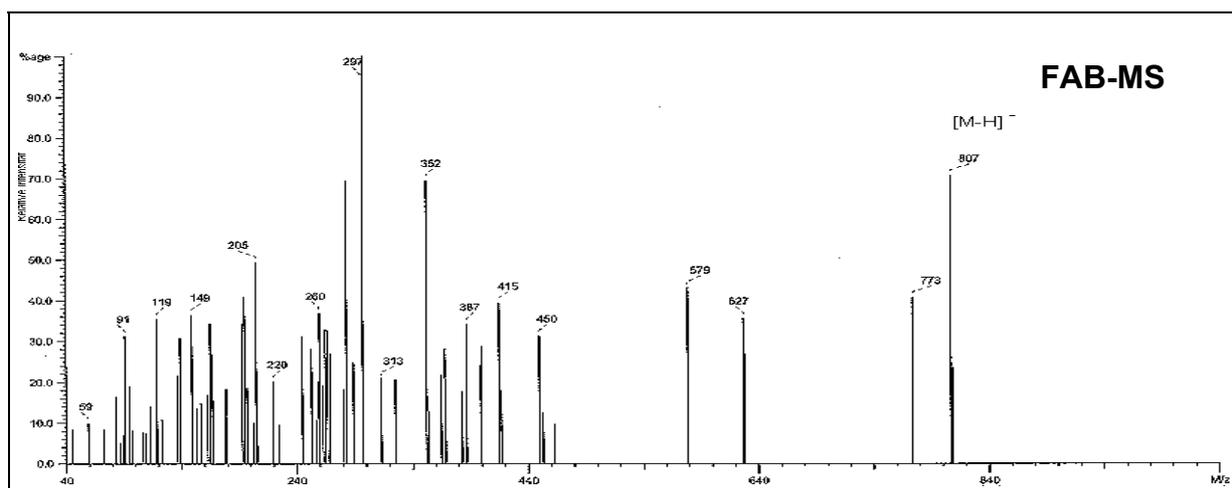
### Abb. A.22 : Strukturdaten des Aglains E



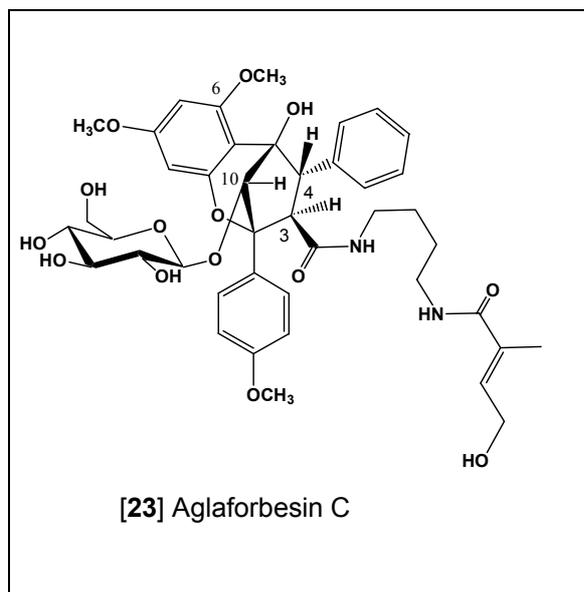
Summenformel :  $C_{42}H_{52}N_2O_{14}$

Molekulargewicht :  $M_r$  808

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.13



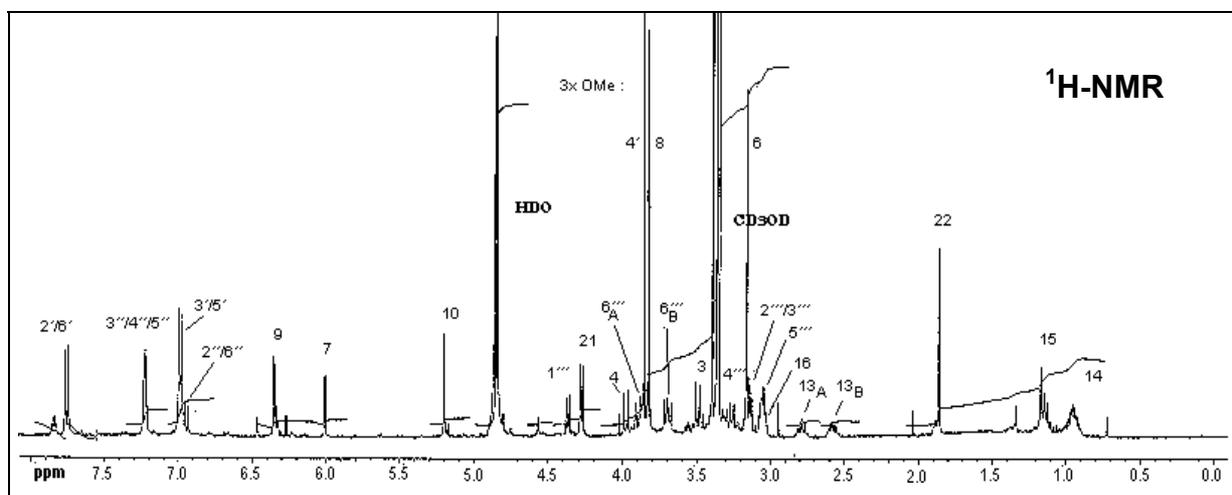
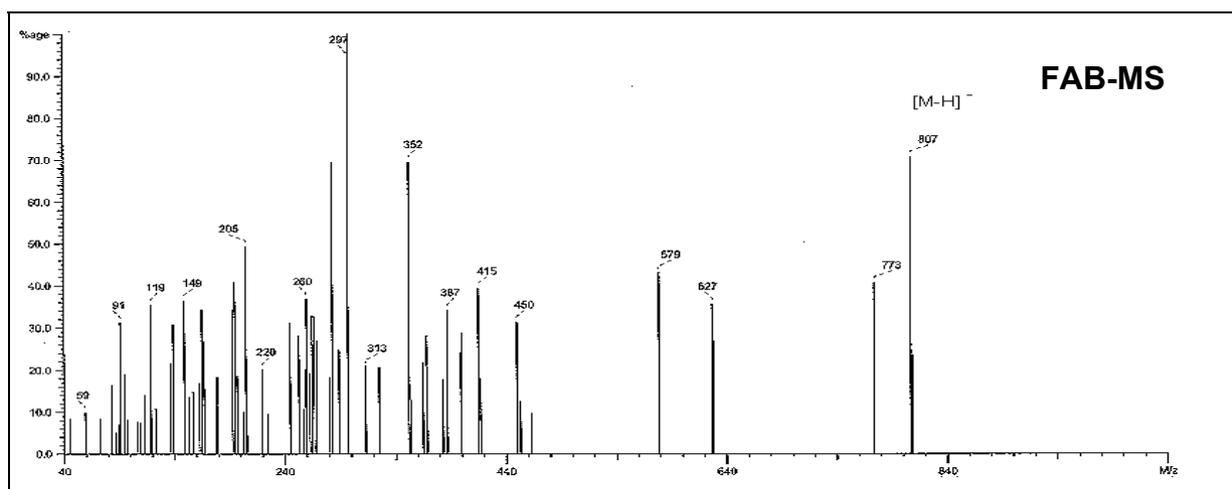
### Abb. A.23 : Strukturdaten des Aglaforbesins C



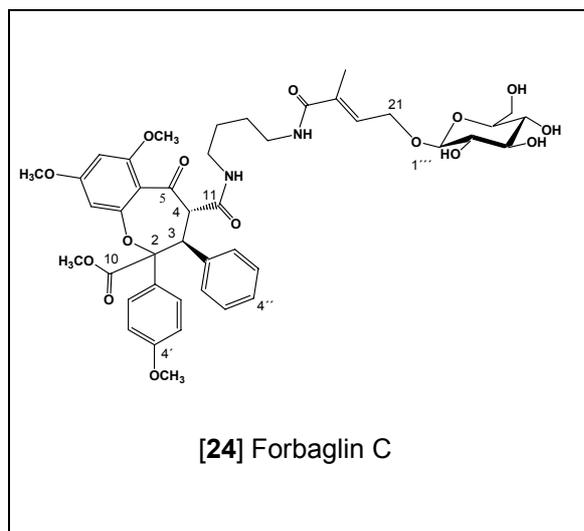
Summenformel :  $C_{42}H_{52}N_2O_{14}$

Molekulargewicht :  $M_r$  808

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.13



### Abb. A.24 : Strukturdaten des Forbaglins C



Summenformel :  $C_{43}H_{52}N_2O_{15}$

Molekulargewicht :  $M_r$  836

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.15

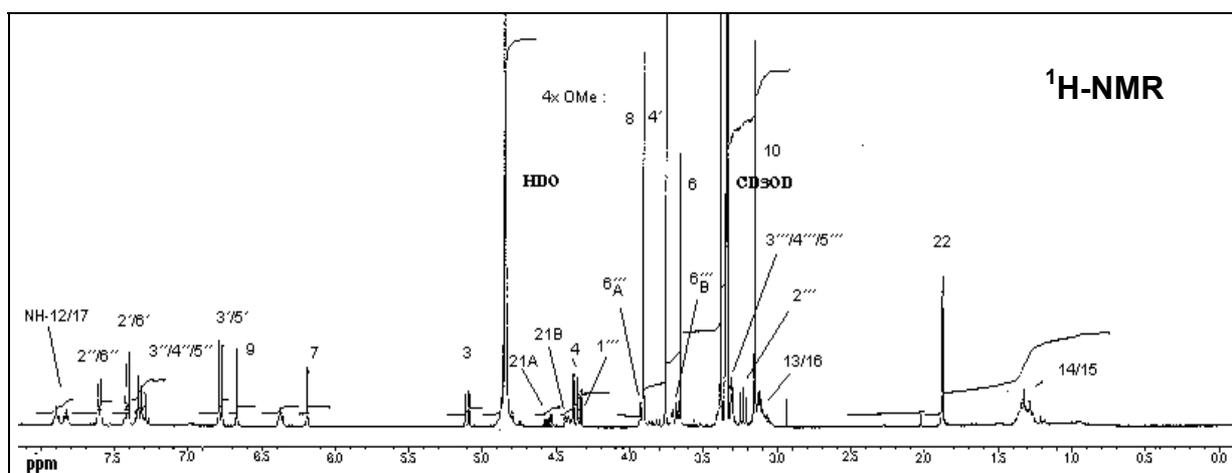
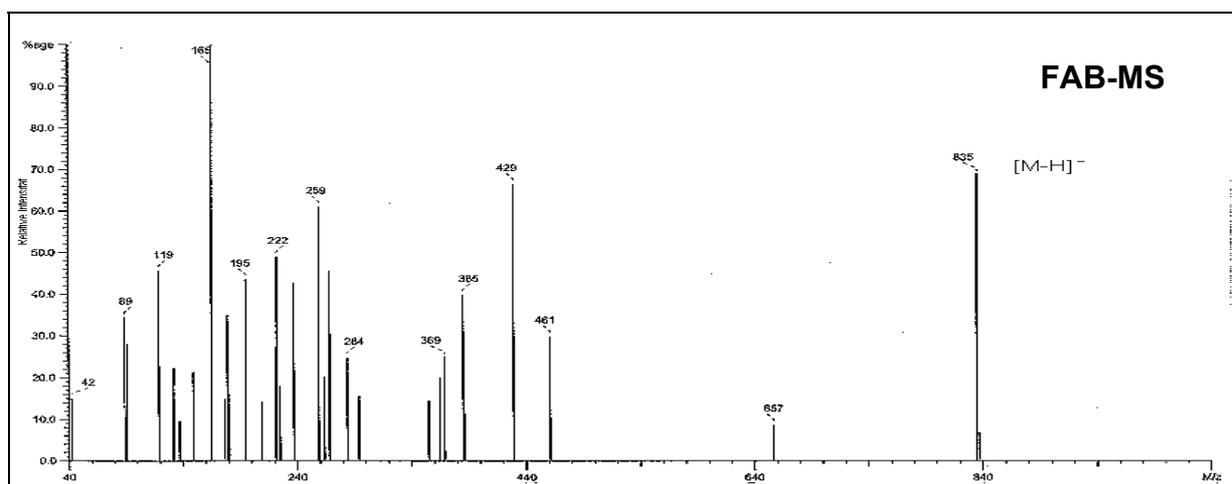
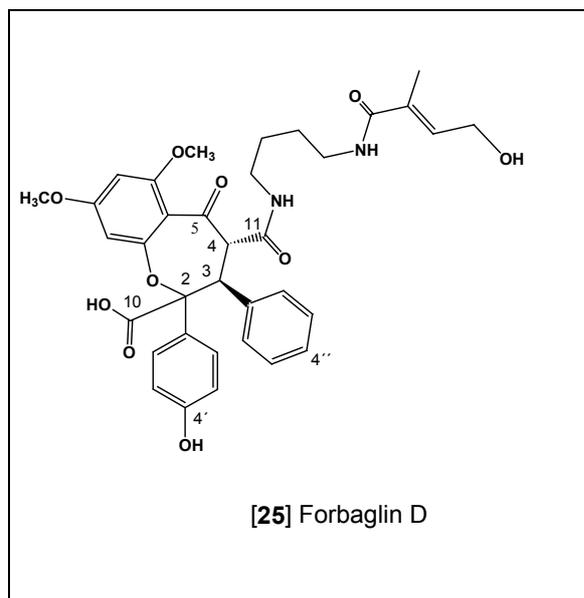


Abb. A.25 : Strukturdaten des Forbaglins D



Summenformel :  $C_{35}H_{38}N_2O_{10}$

Molekulargewicht :  $M_r$  646

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.16

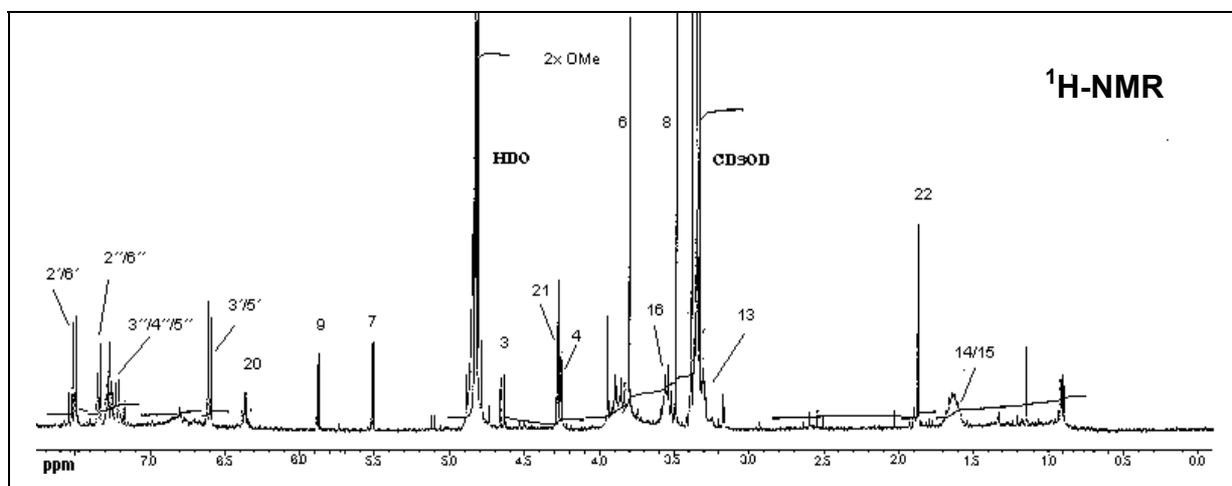
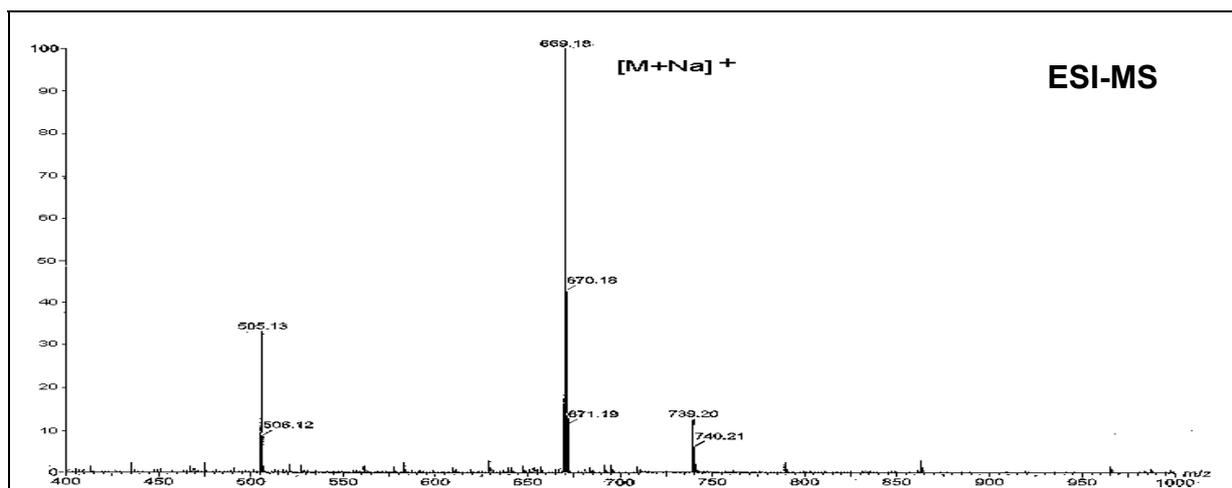
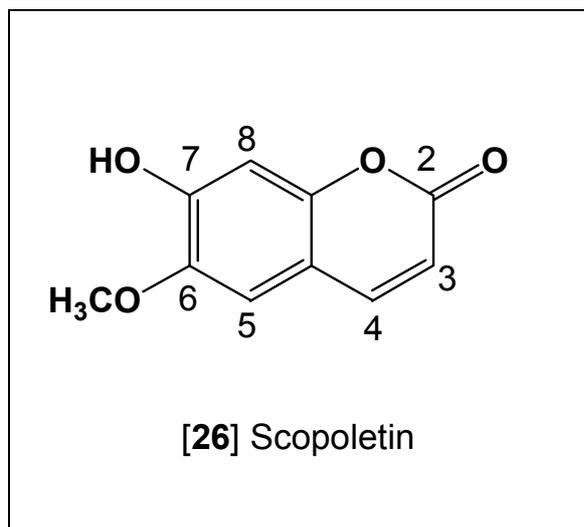


Abb. A.26 : Strukturdaten des Scopoletins



Summenformel :  $C_{10}H_8O_4$

Molekulargewicht :  $M_r$  192

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.17

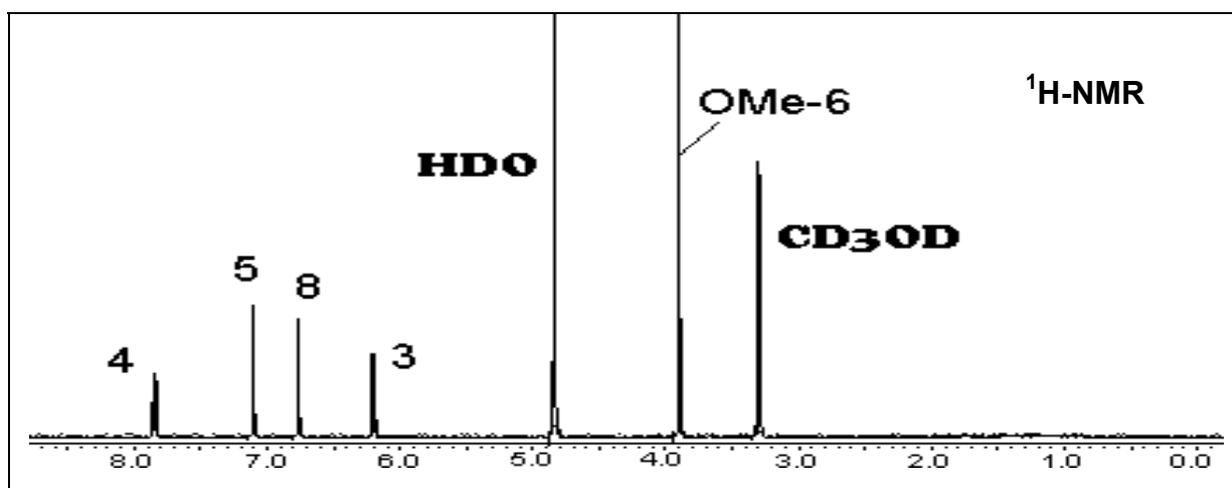
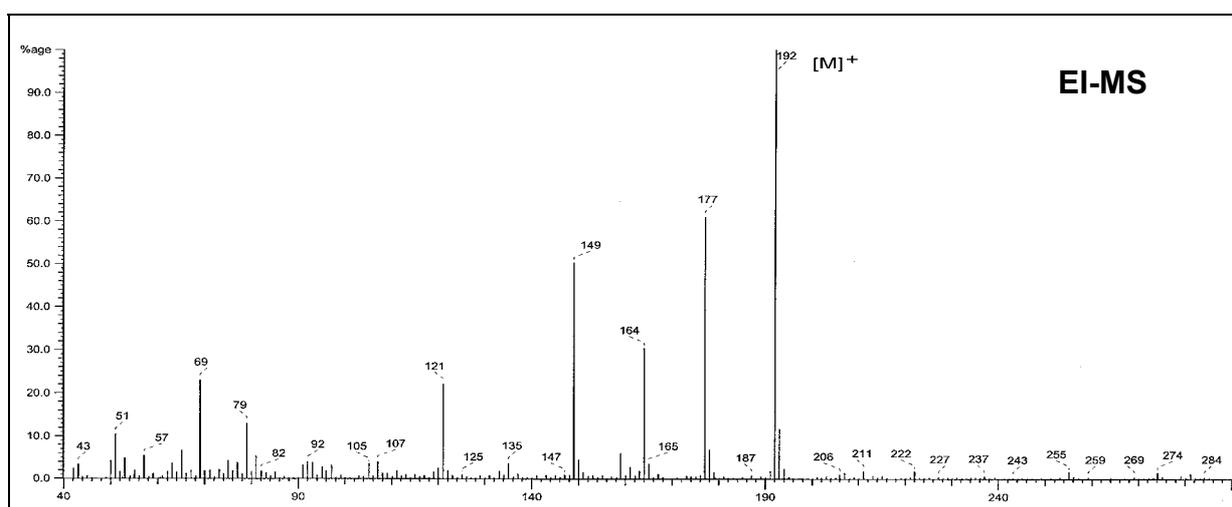
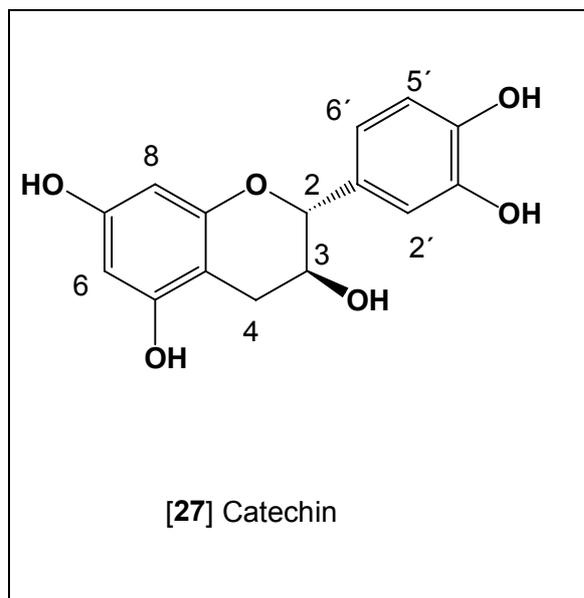


Abb. A.27 : Strukturdaten des Catechins



Summenformel :  $C_{15}H_{14}O_6$

Molekulargewicht :  $M_r$  290

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.18

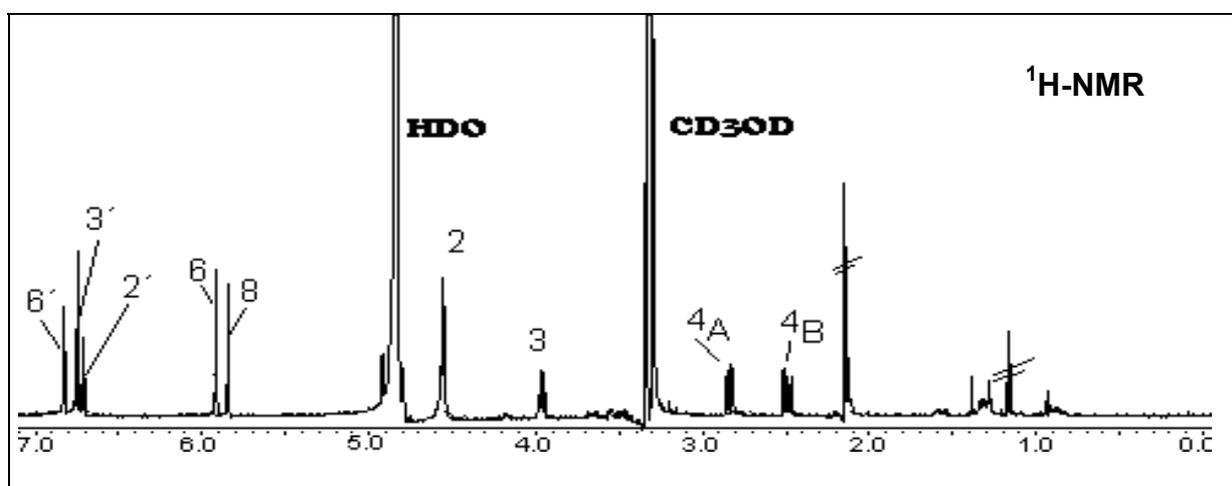
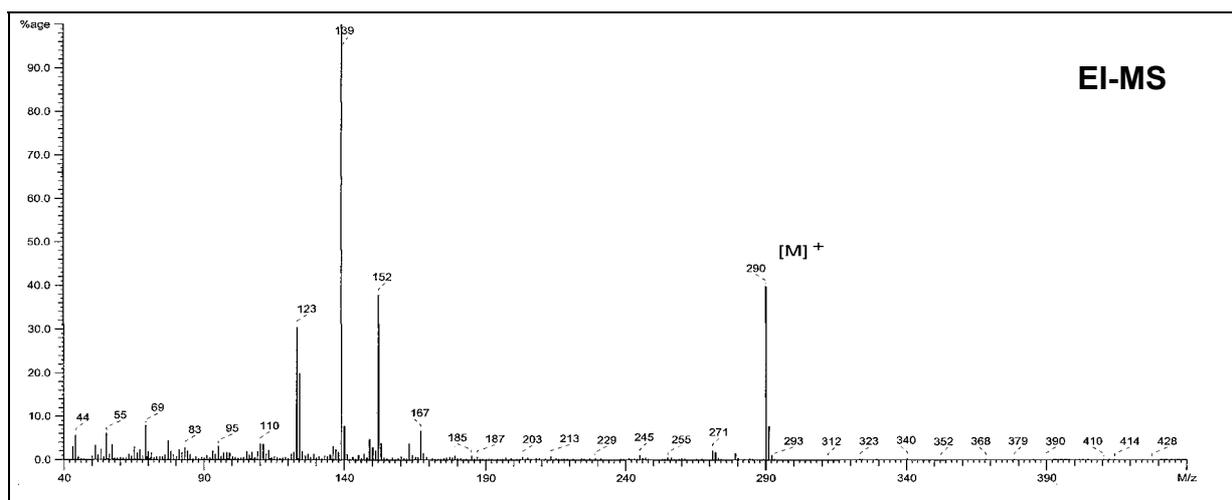
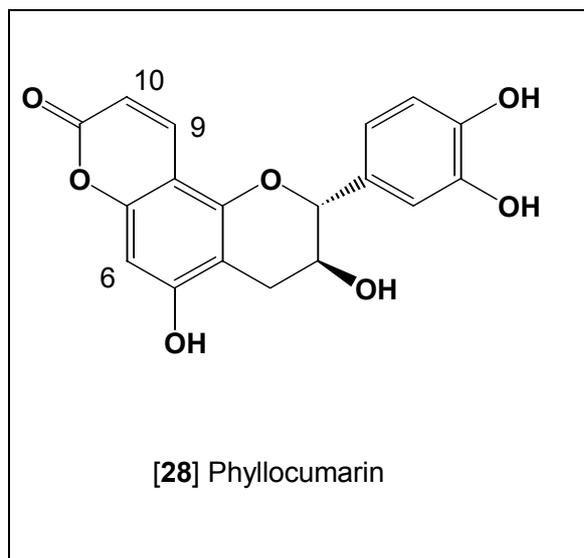


Abb. A.28 : Strukturdaten des Phyllocumarins



Summenformel :  $C_{18}H_{14}O_7$

Molekulargewicht :  $M_r$  342

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.19

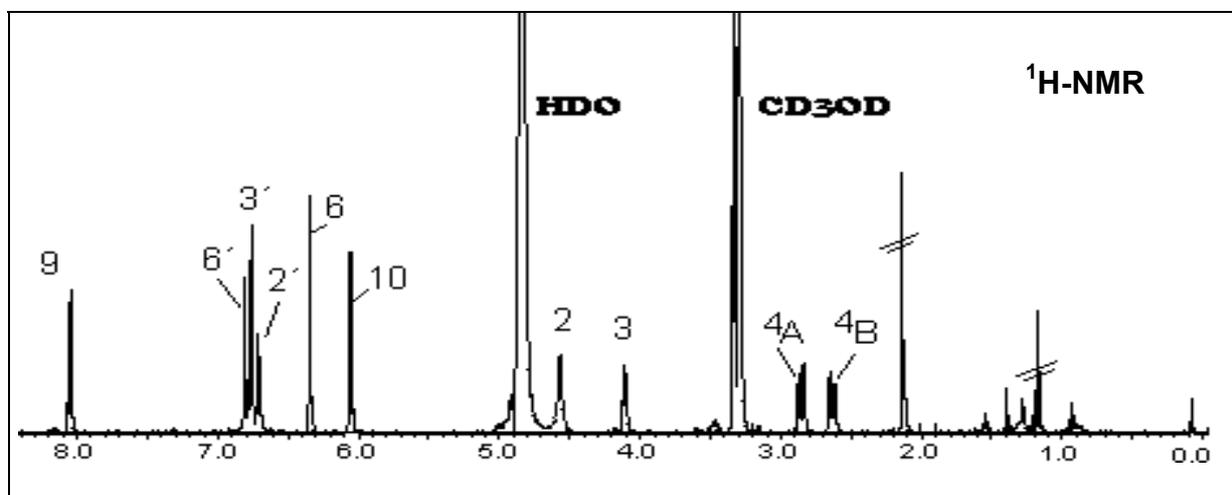
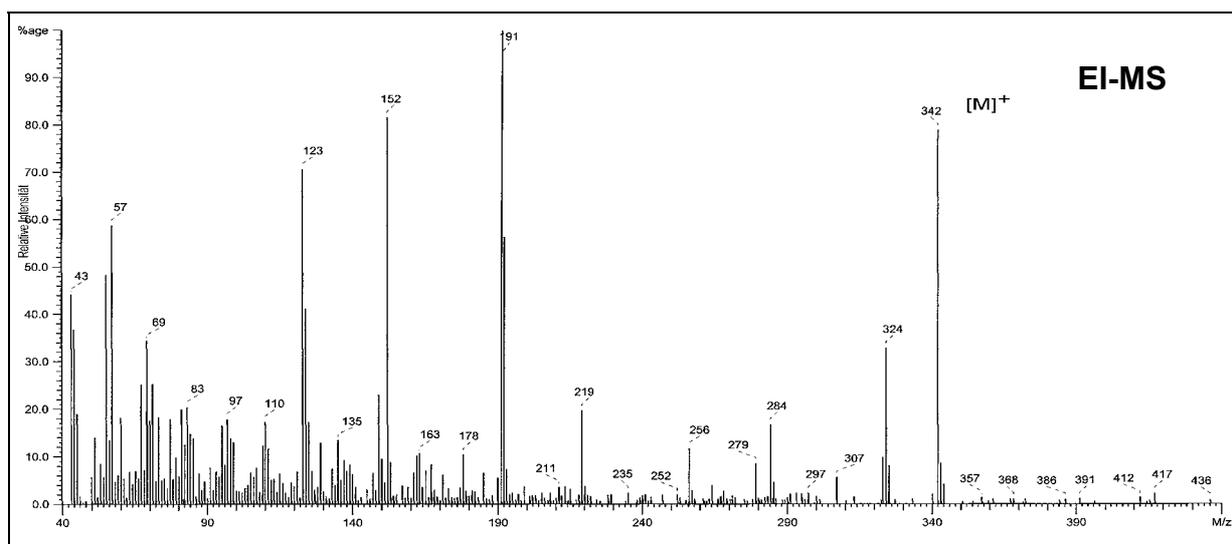
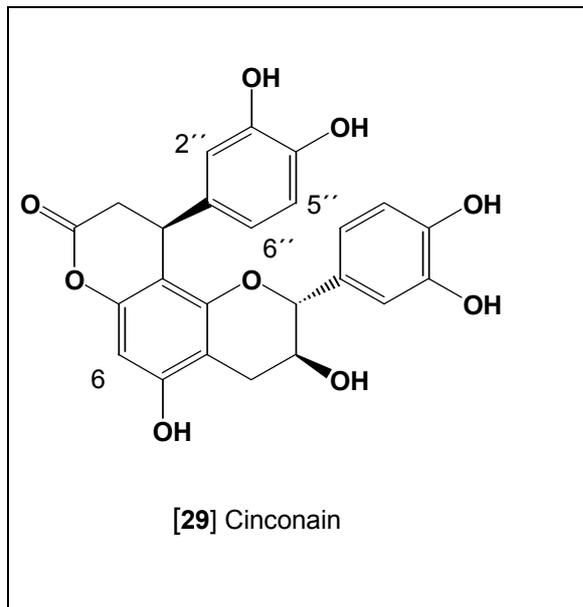


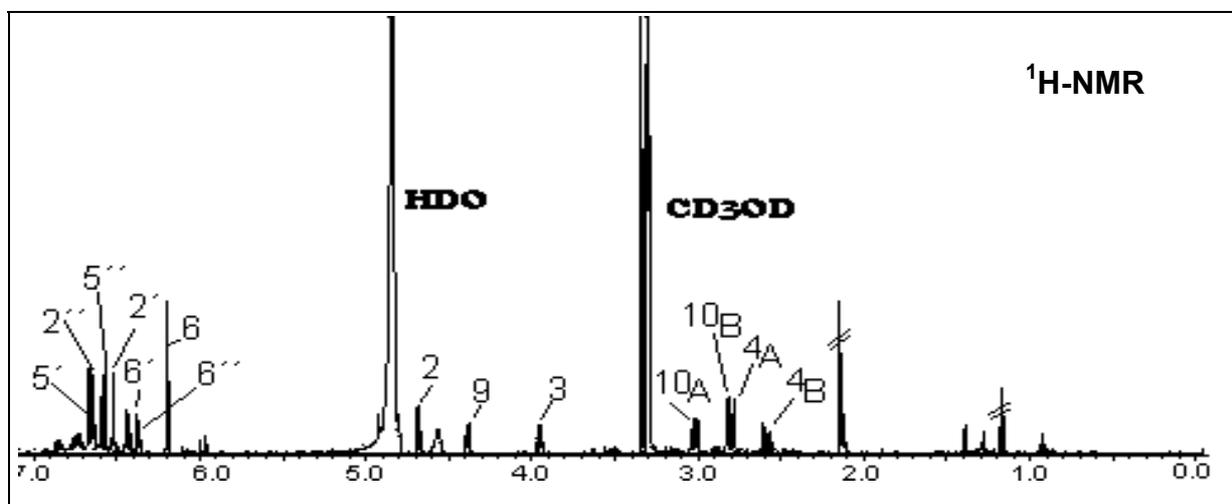
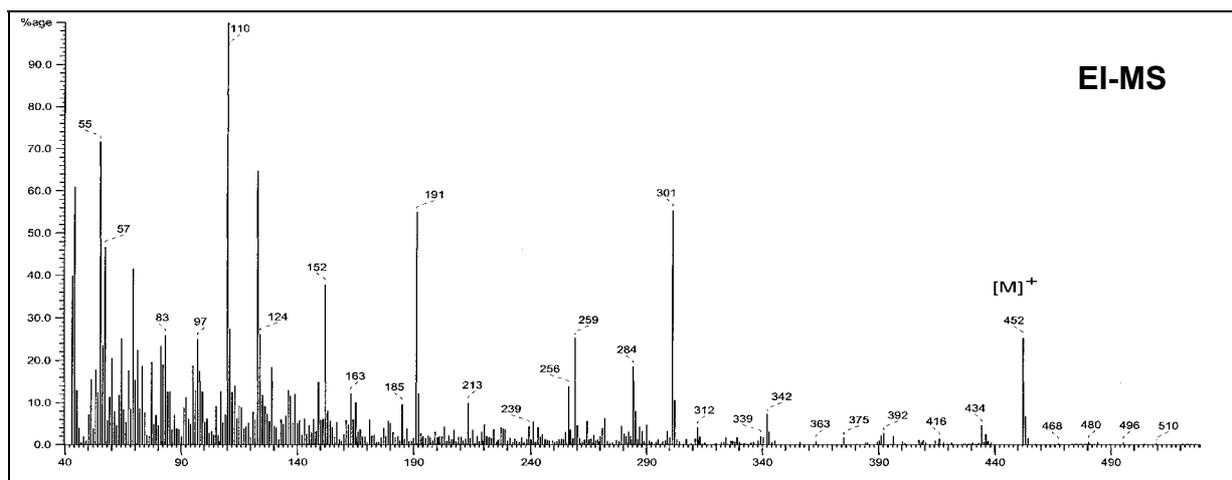
Abb. A.29 : Strukturdaten des Cinchonains-Derivat



Summenformel :  $C_{24}H_{20}O_9$

Molekulargewicht :  $M_r$  452

NMR-Daten : siehe auch Tab. 2.20



## Anhang B : Kulturmedien

Tabelle B.1 : Die Zusammensetzung der verwendeten Medien zur Züchtung von Zellkulturen aus *Aglaia*

	Basalmedium in mg/L (mM)		
	MS	WPM	RW
<b>Makroelemente</b>			
KNO <sub>3</sub>	1900 (18.8)	-	80 (0.8)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 (20.6)	400 (9.4)	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	556 (2.4)	300 (1.3)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	332.2 (2.3)	96 (0.7)	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370 (1.5)	370 (1.5)	740 (3.0)
KCl	-	-	65 (0.9)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 (1.3)	170 (1.3)	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	165 (1.2)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	200 (1.4)
<b>Mikroelemente</b>			
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8 (100)	27.8 (100)	27.8 (100)
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3 (100)	37.3 (100)	37.3 (100)
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9 (100)	29.4 (174)	5 (29)
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6 (30)	8.6 (30)	2.5 (8.7)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 (100)	6.2 (100)	1.5 (25)
KI	0.83 (5)	-	0.75 (5)
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025 (0.1)	0.25 (1)	0.01 (0.04)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25 (1)	0.25 (1)	-
NaMoO <sub>3</sub>	-	-	0.001 (0.001)
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025 (0.1)	-	-
<b>Organische Zusätze</b>			
Myo-inositol	100 (550)	100 (550)	-
Inositol	-	-	10 (55)
Glycine	2.0 (26.6)	2.0 (26.6)	-
Nicotinic acid	0.5 (4.1)	0.5 (4.1)	0.1 (0.82)
Pyridoxine HCl	0.5 (2.4)	0.5 (2.4)	0.1 (0.45)
Thiamine HCl	0.1 (0.3)	0.1 (0.3)	1.0 (3.0)
<b>Andere</b>			
Saccharose (%)	3	3	2
Agar (%)	0.8	0.8	0.87
pH	5.5 – 5.8	5.5 – 5.8	5.5 – 5.8

# Abkürzungsverzeichnis

Abb	: Abbildung
BAP	: 6-Benzyl-aminopurin (BAP)
<i>br</i>	: breit
COSY	: Correlation Spectroscopy
2,4-D	: (2,4-Dichlorophenoxy)-essigsäure
<i>d</i>	: Dublett
DC	: Dünnschichtchromatographie
DEPT	: Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	: Dimethylsulfoxid
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
EC	: Effektive Konzentration
ED	: Effektive Dosis
EI	: Elektronenstoß-Ionisation
ESI	: Electrospray Ionization
<i>et al.</i>	: <i>et altera</i> (und andere)
EtOAc	: Ethylacetat
EV	: Elektronenvolt
FAB	: Fast Atom Bombardment
HMBC	: Hetero Multinuclear Bond Coherence
HMQC	: Hetero Multinuclear Quantum Coherence
HPLC	: Hochleistungsflüssigchromatographie
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Schwefelsäure
Hz	: Herz
IAA	: Indol-3-essigsäure
IC	: Inhibitorische Konzentration
Kin	: Kinetin (6-Furfuryl-aminopurin)
LC	: Letale Konzentration
Lsg	: Lösung
<i>m</i>	: Multiplett
M	: Molar
MeOH	: Methanol

$\mu\text{g}$	: Mikrogramm
min	: Minute
$\mu\text{l}$	: Mikroliter
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
mRNA	: messenger-RNA
MS	: Massenspektrometrie
$m/z$	: Masse pro Ladung
ng	: Nanogramm
nm	: Nanometer
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
pH	: Waasserstoffionen-Exponent (potentia hydrogenii)
ppm	: Part per Million
q	: Quartett
RNA	: Ribonukleinsäure
RP	: Reversed Phase
rpm	: Umdrehung pro Minute
s	: Singulett
sek.	: Sekunde
$t$	: Triplett
Tab.	: Tabelle
UV	: Ultraviolet
Vgl.	: Vergleiche
VLC	: Vacuum liquid chromatography

## Publikationsliste

- Chaidir**, J. Hiort, B.W. Nugroho, F.I. Bohnenstengel, V. Wray, L. Witte, P.D. Hung, L.C. Kiet, W. Sumaryono, P. Proksch (1999) : New insecticidal rocaglamide derivatives from folwers of *Aglaia duperreana* (Meliaceae), *Phytochemistry*, **52**, 837 - 842.
- Chaidir**, W.H. Lin, R. Ebel, R.A. Edrada, V. Wray, L. Witte, M. Nimtz, W. Sumaryono, P. Proksch (2001) : Rocaglamides, Glycosides, and Putrescine Bisamides from *Aglaia dasyclada* (Meliaceae), *J. Nat. Prod.*, **64**, 1216 - 1220.
- J. Hiort, **Chaidir**, F.I. Bohnenstengel, B.W. Nugroho, C. Schneider, V. Wray, L. Witte, P.D. Hung, L.C. Kiet, P. Proksch (1999) : New insecticidal rocaglamide derivatives from roots of *Aglaia duperreana* (Meliaceae), *Phytochemistry*, **52**, 1632 - 1635.

# LEBENS LAUF

- Name : **Chaidir**
- Geburtsdatum : 08.03.1967
- Geburtsort : Cimahi, Indonesien
- Staatsangehörigkeit : Indonesisch
- Familienstand : Verheiratet
- Anschrift : Linienstr. 18  
40227 Düsseldorf
- Schulbildung : in Jakarta, Indonesien  
- 1973 – 1979 Staatliche Grundschule Kebon Kacang 01  
- 1979 – 1982 Staatliche Mittelschule SMPN IX  
- 1982 – 1985 Staatliche Oberschule SMAN IV
- Universitätsausbildung : 1985 – 1991 Pharmazie-Studien  
an der Universität Padjajaran (Bandung, Indonesien) ;  
Abschluß mit Diplom. Thema der Diplomarbeit :  
In Vitro Propagation of the Medicinal Plant  
*Curcuma mangga* Val & V. Zijp. (Zingiberaceae) and  
Analysis of Essential Oil Production
- Berufstätigkeit : 1991 - 1993 als wissenschaftlicher Mitarbeiter eines bio-  
technologischen Forschungsprojekts am Forschungs In-  
stitut (BPP Teknologi) Jakarta, Indonesien.  
1993 - 1996 als wissenschaftlicher Mitarbeiter der  
Pilotanlage für Agrarbiotechnologie im Zentrum für bio-  
technologische Forschung, PUSPIPTEK, Serpong, Indo-  
nesien.

1996 - 1997 als wissenschaftlicher Mitarbeiter des Laboratoriums für Sekundärstoffe im Zentrum für biotechnologische Forschung, PUSPIPTEK, Serpong, Indonesien.

1997 - heute : Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie bei Prof. Dr. P. Proksch.