



Manuka (*Leptospermum scoparium*)

(mit freundlicher Genehmigung von Erich Kuba, ZaKiwi)

Eigenschaften und antimikrobielle Wirksamkeit von β -Triketonen in ätherischen Ölen der Myrtaceae

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Cornelia Sojka
aus Rostock

Hamburg 2005

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2001 bis Mai 2005
am Institut für Pharmazie,
Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie
der Universität Hamburg
unter der Leitung von
Frau Prof. Dr. E. Stahl-Biskup,
der ich sehr herzlich danke für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis,
die interessante Themenstellung sowie besonders für ihre Unterstützung und
das fortwährende Interesse an dieser Arbeit.

1. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Stahl-Biskup
2. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kubeczka

Tag der Disputation: 27.01.2006

Für den kleinen Papa

„Wir sind nicht nur für das verantwortlich, was wir tun,
sondern auch für das, was wir nicht tun.“ (Molière)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.-H. Kubeczka danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Ko-referates.

Herrn Prof. Dr. P. Heisig danke ich für die Unterstützung bei den mikrobiologischen Fragestellungen sowie für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und -material. Mein Dank gilt vor allem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern seines Arbeitskreises für die freundliche Zusammenarbeit sowie die stete Hilfs- und Gesprächsbereitschaft. Frau Tatjana Clausen danke ich für ihre technische Assistenz besonders herzlich.

Herrn Prof. Dr. W. Hänsel, Pharmazeutisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis Untersuchungen zur Phototoxizität durchführen zu können. Dabei habe ich vor allem Herrn Dr. C. Bode zu danken für die Bereitschaft, mir seine Zeit und sein Wissen zur Verfügung zu stellen.

Herrn Prof. Dr. W. A. König, Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, danke ich für seine freundliche Unterstützung bei der Interpretation der Massenspektren und seinen technischen Mitarbeitern Herrn M. Preusse und Frau A. Meiners für die Durchführung der GC-MS-Messungen.

Bei Herrn Dr. V. Sinnwell, Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Der Graduiertenförderung der Universität Hamburg gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung über zwei Jahre.

Sehr herzlich danke ich der Firma CAMAG für die Bereitstellung der dünnschicht-chromatographischen Ausrüstung und für die überaus freundliche Betreuung im Rahmen der Geräteschulung in Muttenz (Schweiz).

Frau Yvonne Gland habe ich sehr zu danken für die technische Unterstützung im chemisch-analytischen Bereich.

Mein besonderer Dank gilt den Doktoranden meines Arbeitskreises:

Herrn H.-G. Mierendorff und Herrn Dr. A. Herde für zahlreiche fruchtbare Diskussionen und Anregungen sowie ihre moralische Unterstützung, vor allem in schwierigen Zeiten.

Frau S. Keyhanian und Herrn M. Heldmaier gilt mein Dank für ihre Hilfe und die freundlichen Gespräche in der Abschlussphase meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Herrn L. Schumann, der mir die Möglichkeit geboten hat, neben der Promotion in seiner Bahnhof-Apotheke in Hamburg-Bergedorf zu arbeiten, und zusammen mit meinen Kolleginnen für eine freundlich entspannte Atmosphäre und einen wohltuenden Ausgleich zum Universitätsalltag sorgte.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Papa für seine liebe Unterstützung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine hilfreichen Ratschläge bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata, Destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BA	Blutagar
Ber.	berechnet
BHT	Butylhydroxytoluol
CA	Caso-Agar
CB	Chinablau-Laktose-Agar
CFU	Colony Forming Unit
d	Dublett (NMR-Spektroskopie)
DAD	Dioden Array Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DIN	Deutsche Industrie Norm
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EI	Elektronenionisierung
eV	Elektronenvolt
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
Gef.	gefunden
h	Stunde
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPPD	<i>p</i> -Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
HSV	Herpes-simplex-Virus

IR	Infrarot-Spektroskopie
KBE	Koloniebildende Einheiten
Lsg.	Lösung
m	Multiplett (NMR-Spektroskopie)
M	Molar
m/z	Masse/Ionenladung
MHB	Mueller-Hinton-Bouillon
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mM	milliMol
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	plaque forming unit
Ph. Eur.	Europäische Pharmacopoe
ppm	parts per million
q	Quartett
quint	Quintett
RBC	red blood cell
R_f	Retentionsfaktor
R_i	Retentionsindex
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
sext	Sextett
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TC₅₀	toxic concentration 50%

t_R	Retentionszeit
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
ÜNK	Übernachtskultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett-Licht
VB	Vertrauensbereich
Vis	Sichtbares Licht
WK	Wachstumskontrolle

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung.....	1
1 Problemstellung und Ziel der Arbeit.....	1
2 Familie der Myrtaceae.....	4
2.1 Systematische Stellung und Verbreitung.....	4
2.1.1 Die Unterfamilie Myrtoideae.....	5
2.1.2 Die Unterfamilie Leptospermoideae.....	6
2.2 Morphologie und Anatomie.....	8
2.3 Pharmakologische Wirkung und Anwendung.....	8
2.3.1 Die Gattung <i>Eucalyptus</i>	9
2.3.2 Die Gattung <i>Leptospermum</i>	12
3 Chemie natürlicher Polyketone.....	15
3.1 Acylphloroglucin-Derivate.....	15
3.2 Cyclische Polyketone („ β -Triketone“)......	19
4 β-Triketone.....	25
4.1 Biosynthese der β -Triketone.....	25
4.2 Vorkommen natürlicher β -Triketone.....	26
4.2.1 Agglomeron.....	28
4.2.2 Flaveson.....	31
4.2.3 Isoleptospermon.....	33
4.2.4 Leptospermon.....	33
4.2.5 Papuanon.....	36
4.3 Triketone als Pestizide.....	37
B Ergebnisse.....	39
1 Isolierung des Triketon-Komplexes aus Manukaöl.....	39
1.1 Problemstellung.....	39
1.2 Säulenchromatographie.....	41
1.3 Isolierung durch Extraktion.....	42
2 Isolierung einzelner Triketone aus dem Triketon-Komplex.....	48
2.1 Kugelrohrdestillation.....	48
2.2 Niederdruck-Säulenchromatographie.....	53

3 Synthese von β-Triketonen.....	56
3.1 Problemstellung.....	56
3.2 Synthese nach Van Klink (1999).....	56
3.3 Synthese ausgewählter Triketone.....	59
3.4 Analytik der β -Triketone.....	63
3.4.1 Massenspektroskopie (MS).....	63
3.4.2 Infrarotspektroskopie (IR).....	63
3.4.3 ^1H -NMR-Spektroskopie.....	65
3.4.4 ^{13}C -NMR-Spektroskopie.....	68
4 Chromatographie der Triketone.....	69
4.1 Dünnschichtchromatographie.....	69
4.1.1 Fließmitteloptimierung.....	69
4.1.2 Detektion der Triketone.....	72
4.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC).....	73
4.3 Gaschromatographie (GC).....	77
5 Eigenschaften der β-Triketone.....	79
5.1 Untersuchungen zur Stabilität.....	79
5.1.1 Verhalten von Flaveson unter definierten Lagerbedingungen.....	80
5.1.2 Verhalten von Flaveson bei Bestrahlung mit UV-Licht.....	85
5.2 Untersuchungen zum phototoxischen Potential der β -Triketone.....	87
5.2.1 Klassifizierung der Photosensibilisierung.....	88
5.2.2 Photosensibilisatoren.....	88
5.2.3 Kombiniertes Erythrozyten-Phototoxizitätstest.....	91
5.2.3.1 Photohämolyse von porcinen Erythrozyten.....	91
5.2.3.2 Methämoglobin-Bildung.....	98
6 Mikrobiologische Untersuchungen.....	105
6.1 Einleitung.....	105
6.1.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen der Triketone.....	105
6.1.2 Literaturüberblick.....	107
6.2 Mikroorganismen.....	108
6.3 Nährmedium.....	109
6.4 Toleranz ausgewählter Bakterienstämme gegenüber	
Lösungsvermittlern.....	110
6.4.1 Einsatz von Lösungsvermittlern.....	110
6.4.2 Testsystem.....	111

6.4.3 Polysorbat 20 (Tween®20) und Polysorbat 80 (Tween®80).....	112
6.4.4 Dimethylsulfoxid (DMSO).....	114
6.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	116
6.5.1 Ergebnisse.....	117
6.5.2 MHK chinolonresistenter Escherichia coli-Stämme.....	122
6.6 Absterbekinetik von Staphylococcus aureus ATCC 25923.....	122
7 Antivirale Wirkung von Triketonen.....	126
7.1 Einleitung.....	126
7.2 Ermittlung der Zytotoxizität.....	127
7.3 Wirkung in verschiedenen Phasen der Virusinfektion.....	128
C Diskussion.....	133
D Material und Methoden.....	143
1 Isolierung von β-Triketonen aus Manukaöl.....	143
1.1 Untersuchungsmaterial.....	143
1.2 Isolierung des Triketon-Komplexes – Standard-Vorschrift.....	143
1.3 Isolierung des Triketon-Komplexes – Modifizierte Vorschrift.....	143
1.4 Isolierung nach HARKENTHAL (Zitat aus Dissertation).....	144
2 Kugelrohrdestillation.....	144
3 Chromatographische Methoden.....	145
3.1 Niederdruck-Säulenchromatographie.....	145
3.2 Trockensäulenchromatographie (TSC).....	145
3.2.1 Vortrennung des ätherischen Öls in fünf Fraktionen.....	145
3.3 Gaschromatographie (GC).....	147
3.4 Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS-Kopplung).....	148
3.5 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC).....	148
3.6 Dünnschichtchromatographie (DC).....	149
3.6.1 Fließmittel.....	150
3.6.2 Sprüh- und Tauchlösungen.....	150
4 Spektroskopische Methoden.....	151
4.1 Infrarotspektroskopie.....	151
4.2 ^1H -NMR-Spektroskopie.....	152
4.3 ^{13}C -NMR-Spektroskopie.....	152
5 Synthese / Analytische Daten.....	152
5.1 Synthese von Acylphloroglucin-Derivaten.....	152

5.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV1.....	152
5.1.1.1 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)propan-1-on.....	153
5.1.1.2 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)butan-1-on.....	153
5.1.1.3 3-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)butan-1-on.....	154
5.1.1.4 1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)hexan-1-on.....	154
5.1.1.5 1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)decan-1-on.....	155
5.2 Synthese von β -Triketonen.....	155
5.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV2.....	155
5.2.1.1 5-Hydroxy-4-isobutyryl-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion (Flaveson).....	156
5.2.1.2 5-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-(2-methylbutanoyl)cyclohex-4-en-1,3-dion (Isoleptospermon).....	157
5.2.1.3 5-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-(3-methylbutanoyl)cyclohex-4-en-1,3-dion (Leptospermon).....	158
5.2.1.4 4-Hexanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion (Papuanon).....	159
5.2.1.5 4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Decanoyl-Derivat“).....	160
5.2.1.6 4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Acetyl-Derivat“).....	161
5.2.1.7 3-Hydroxy-2-isobutyryl-5-methoxy-6,6-dimethylcyclohexa-2,4-dien-1-on (Agglomeron).....	162
5.3 Darstellung von Säurechloriden.....	162
5.3.1 2-Methylbutanoylchlorid.....	162
5.4 Geräte.....	163
6 Elementaranalyse.....	163
7 Kombiniertes Erythrozyten-Phototoxizitätstest.....	163
7.1 Gewinnung porciner Erythrozyten.....	163
7.2 Aufbereitung der Erythrozyten-Suspension.....	164
7.3 Einstellung der Zelldichte.....	164
7.4 Verwendete Lösungen und Suspensionen.....	164
7.5 Geräte.....	165
8 Untersuchungen zur Stabilität.....	166

9 Mikrobiologische Untersuchungen.....	166
9.1 Mikroorganismen.....	166
9.2 Nährmedien.....	168
9.3 Toleranz von Mikroorganismen gegenüber Lösungsvermittlern.....	168
9.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	169
9.5 Absterbekinetiken.....	170
9.6 Geräte.....	170
10 Untersuchungen zur antiviralen Aktivität.....	170
10.1 Zellkulturen.....	171
10.2 Virus.....	171
10.3 Testsubstanzen.....	171
10.4 Zytotoxizitätsprüfung.....	171
10.5 Untersuchungen in verschiedenen Phasen der Virusinfektion.....	172
11 Gefahrstoffe.....	174
E Zusammenfassung / Summary.....	177
F Anhang.....	184
1 Massenspektren.....	184
2 IR-Spektren.....	188
3 ¹H-NMR-Spektren.....	192
4 Abbildungsverzeichnis.....	196
5 Tabellenverzeichnis.....	199
G Literaturverzeichnis.....	201

A Einleitung

1 Problemstellung und Ziel der Arbeit

β -Triketone (cyclische Polyketone) leiten sich von Acylphloroglucinen ab, zu denen u.a. die Hopfenbitterstoffe Humulon und Lupulon sowie das antibiotisch wirksame Hyperforin des Johanniskrauts (*Hypericum perforatum*) zählen. Ihnen wird ebenso wie den Acylphloroglucinen zunehmend wissenschaftliches Interesse entgegengebracht, da sie – wie jene – ein phytotherapeutisches Potential bergen.

β -Triketone sind mit zahlreichen strukturellen Variationen in der Familie der Myrtaceae vertreten, bevorzugt in den Gattungen *Eucalyptus* und *Leptospermum*. Die Bedeutung der β -Triketone für die Pflanze ist bisher nicht abschließend geklärt, ebensowenig liegen experimentell abgesicherte Erkenntnisse zu ihrer Biosynthese vor.

In der Regel sind β -Triketone wasserdampfflüchtig und präsentieren sich somit als Komponenten ätherischer Öle. Von besonderem Interesse ist diesbezüglich das „Neuseeländische Teebaumöl“, das aus *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst. (Myrtaceae) gewonnen und international als „Manukaöl“ gehandelt wird. Im Vergleich zu anderen Teebaumölen wie dem „Australischen Teebaumöl“ (*Melaleuca alternifolia*), dem Cajuputöl (*M. cajuputi*), dem Niaouliöl (*M. viridiflora*, *M. quinquenervia*) und dem Kanukaöl (*Kunzea ericoides*) zeichnet sich das Manukaöl durch eine deutlich stärkere Wirkung gegen Gram-positive Bakterien aus. Diese wird in Verbindung gebracht mit dem sogenannten „Triketon-Komplex“, bestehend aus den β -Triketonen Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon, auf den sich im Rahmen dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit richten soll.

Ein zusätzliches Motiv für die Beschäftigung mit β -Triketonen im Rahmen dieser Arbeit ist die zunehmende Verarbeitung des praktisch geruchsneutralen Manukaöls in kosmetischen Produkten, vor allem im Austausch gegen das stark riechende „Australische Teebaumöl“. Dabei finden das Manukaöl selbst oder die isolierte ketonische Fraktion des Öls Verwendung. Deshalb erscheint es besonders wichtig, Kenntnisse

über die chemisch-physikalischen, toxikologischen und antimikrobiellen Eigenschaften der β -Triketone zu gewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen somit nachstehend aufgeführte Ziele verfolgt werden:

➤ **Isolierung von β -Triketonen aus ätherischen Ölen**

Es ist beabsichtigt, verschiedene Triketon-haltige Öle als Ausgangsbasis für die Isolierung einzelner Triketone zu verwenden. Im Falle des Manukaöls soll eine Methode erarbeitet werden, die dazu dient, den „Triketon-Komplex“ aufzutrennen und einzelne Triketone daraus zu isolieren. Angestrebt wird in diesem Zusammenhang die Entwicklung chromatographischer Methoden (GC und HPLC), die eine Quantifizierung der Triketone in ätherischen Ölen ermöglichen.

➤ **Synthese und Charakterisierung ausgewählter β -Triketone**

Um einzelne β -Triketone in für mikrobiologische Untersuchungen ausreichenden Mengen zur Verfügung zu haben, sollen diese synthetisiert werden. Des Weiteren ist die Synthese modifizierter Triketone geplant, um Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen vornehmen zu können. Darüber hinaus sollen die spektroskopischen Eigenschaften (MS, NMR, IR) der isolierten bzw. synthetisierten Triketone dokumentiert werden.

➤ **Untersuchungen zur Stabilität der β -Triketone**

Die Verwendbarkeit von ätherischen Ölen in kosmetischen und therapeutischen Zubereitungen hängt wesentlich von ihren Stabilitätseigenschaften ab. Für in der Phytotherapie gebräuchliche Öle, die überwiegend aus Terpenen und Phenylpropan-Derivaten bestehen, liegen diesbezüglich ausreichende Untersuchungen vor. Mit Triketon-haltigen Ölen hingegen hat man praktisch keine Erfahrung. Insofern bietet es sich an, mit den isolierten bzw. synthetisierten β -Triketonen Stabilitätsuntersuchungen (Einfluss von Licht oder erhöhten Temperaturen) vorzunehmen, zumal bei Lagerungsversuchen mit dem „Australischen Teebaumöl“ Umlagerungsprodukte mit hohem allergenen Potential nachgewiesen wurden, die die Aktualität dieser Fragestellung verdeutlichen.

➤ **Untersuchungen zum phototoxischen Potential von β -Triketonen**

Im Hinblick auf den in der Diskussion stehenden Einsatz von Triketonen in kosmetischen Produkten und der damit verbundenen topischen Anwendung ist es notwendig, photosensibilisierende Eigenschaften auszuschließen. Es ist beabsichtigt, hierfür den kombinierten Erythrozyten-Phototoxizitätstest einzusetzen, der qualitative und quantitative Aussagen über phototoxische Eigenschaften von Substanzen erlaubt und gleichzeitig unnötige Tierversuche vermeidet.

➤ **Mikrobiologische Untersuchungen an einzelnen β -Triketonen**

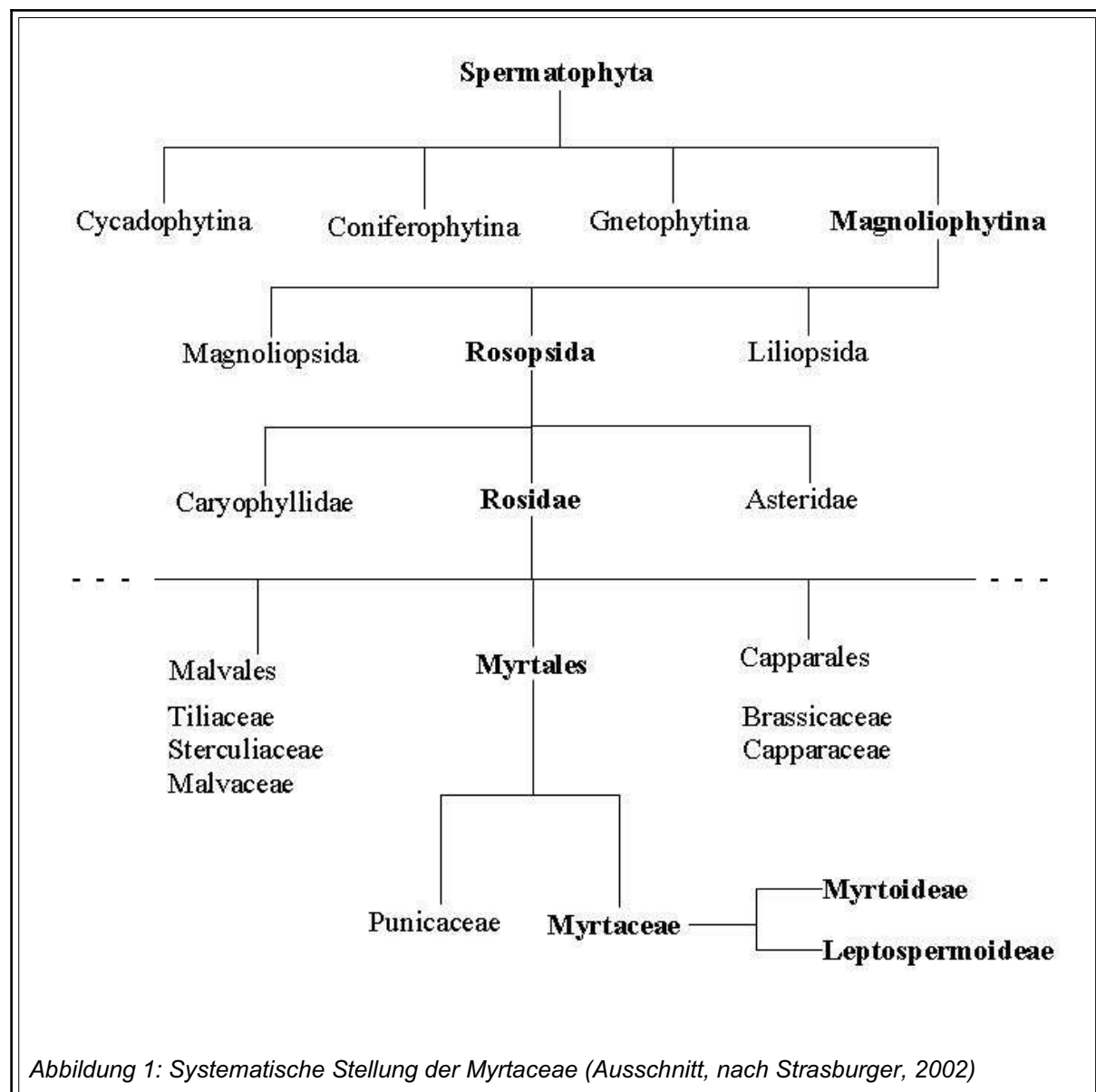
Während die antimikrobielle Wirksamkeit des „Triketon-Komplexes“ aus Manukaöl bereits untersucht wurde, ist im Rahmen dieser Arbeit die Testung einzelner Triketone geplant. Die Untersuchungen, in denen bevorzugt Gram-positive Mikroorganismen berücksichtigt werden, sollen Aufschluss darüber geben, inwieweit sich strukturelle Unterschiede auf die antimikrobielle Wirksamkeit auswirken.

In Kooperation mit dem Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie Heidelberg (Prof. Dr. Jürgen Reichling) soll die antivirale Wirkung einzelner β -Triketone untersucht werden, um deren möglichen Einsatz bei Lippenherpes (Herpes labialis), hervorgerufen durch Herpes-simplex-Viren, beurteilen zu können.

2 Familie der Myrtaceae

2.1 Systematische Stellung und Verbreitung

Die Familie der Myrtaceae (Myrtengewächse) gehört zur Ordnung der Myrtales (**Abb. 1**) und umfasst nach heutigen Erkenntnissen etwa 150 Gattungen mit ca. 3500 Arten. Diese kommen bevorzugt in tropischen und subtropischen Regionen vor, mehr als die Hälfte von ihnen sind allein auf dem australischen Kontinent anzu-



treffen. Etwa 73% der dort vorkommenden Myrtaceen-Gattungen sind endemisch. Dies ist auf die zu Beginn des Tertiär-Zeitalters stattgefundenene Abtrennung des heu-

tigen Australien vom sogenannten Südkontinent Gondwana und der damit verbundenen isolierten Evolution der Pflanzenwelt zurückzuführen.

Neben Australien und der Antarktis bildete das heutige Südamerika einen Teil des Urkontinents. Dieser Zusammenhang spiegelt sich bis zur Gegenwart in der Verbreitung der Myrtaceae in den tropischen Gebieten Südamerikas wider. Auf der nördlichen Erdhalbkugel sowie in Afrika (trotz dessen Zugehörigkeit zum Südkontinent) sind Vertreter der Myrtaceae nur in begrenztem Umfang anzutreffen. Für das Vorkommen in Asien wird vermutet, dass die Verbreitung der Myrtaceae ausgehend vom australischen Kontinent über die nahe gelegenen Inselketten von Indonesien und Neuguinea stattgefunden hat [WILSON, 1999].

Die Stellung der Myrtaceae im System der Pflanzen ist auszugsweise in **Abbildung 1** dargestellt. Grundlage zur Gliederung der Familie der Myrtaceae in die Unterfamilien der Myrtoideae und Leptospermoideae bilden die Früchte. Während bei den Myrtoideae die mit dem Fruchtknoten verwachsene Blütenachse im Laufe der Reifung fleischig wird, vertrocknet bei den Leptospermoideae der nur schwach mit dem Fruchtknoten verwachsene Achsenbecher und bildet einen holartigen Körper aus.

2.1.1 Die Unterfamilie Myrtoideae

Die Unterfamilie der Myrtoideae umfasst etwa 74 Gattungen und hat ihren Verbreitungsschwerpunkt mit 46 zumeist endemischen Gattungen in Mittel- und Südamerika. Ähnlich verhält es sich in Asien, Australasien und Indien. Von den 26 dort vorkommenden Gattungen sind 24 endemisch. Der afrikanische Kontinent beheimatet nur die Gattungen *Eugenia* und *Syzygium*, deren bekanntester Vertreter der Gewürznelkenbaum *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry ist. Der einzige europäische Vertreter der Myrtoideae, die Echte Myrte (*Myrtus communis* L.) wächst bevorzugt im Mittelmeerraum und stand Pate bei der Namensgebung für die gesamte Familie. Im Rahmen dieser Arbeit werden keine Arten dieser Unterfamilie untersucht.

2.1.2 Die Unterfamilie Leptospermoideae

Die bezüglich der Gattungszahl etwa gleich große Unterfamilie der Leptospermoideae weist die größere Artenvielfalt auf und ist mit über 70 Gattungen vor allem in Australasien, Ostasien und Ozeanien vertreten. Pflanzengeographische Beziehungen bestehen sowohl zum afrikanischen Kontinent als auch zur gemäßigten Zone Chiles (Südamerika), wo die Leptospermoideae mit zwei bzw. einer Gattung vertreten sind. Im Folgenden werden einige für die Arbeit relevante Gattungen näher beleuchtet.

Die Gattung *Eucalyptus*, von L'Héritier de Brutelle (1789) beschrieben, stellt ein sehr vielfältiges Taxon dieser Unterfamilie mit mehr als 500 Arten und Unterarten dar. Ihre natürliche Verbreitung erstreckt sich vor allem auf Australien und Tasmanien. Lediglich sieben Arten sind außerhalb dieses Kontinents beheimatet, und zwar vorrangig auf den Inseln von Papua-Neuguinea und Indonesien. Die hohe Anpassungsfähigkeit der *Eucalyptus*-Arten führte nichtsdestoweniger zu ihrer Etablierung in weltweit über 90 Ländern mit den verschiedensten klimatischen Bedingungen [GHISALBERTI, 1996].

Die Klassifizierung der *Eucalyptus*-Arten erweist sich auch heute noch als schwierig. Ursächlich hierfür ist u.a. die exzessive Hybridisierungstendenz innerhalb der Gattung, die sowohl zur Entstehung neuer Sippen als auch zur Reduktion der Biodiversität führt. Außerdem werden in botanischen Publikationen unterschiedliche taxonomische Systeme verwendet, wodurch eine vergleichende Bewertung stark erschwert wird [FULKERSON, 1996].

Die erste umfassende Klassifikation „A Key to the Eucalypts“, auf Forschungen von MAIDEN beruhend, wurde 1934 von BLAKELY veröffentlicht und seitdem mehrfach überarbeitet. Darauf aufbauend entwickelte das „Australian Forestry and Timber Bureau“ eine auf der äußerlichen Erscheinung der Rinde basierende Untergliederung in elf Hauptgruppen, zu denen u.a. die so genannten „Bloodwoods“, die „Stringybarks“ sowie die „Ironbarks“ gehören [HALL et al., 1970].

Mehr als dreißig Jahre lang war Blakely's System unumstritten, bis 1971 die Botaniker PRYOR und JOHNSON ein neues System „A Classification of the Eucalypts“ mit sieben (später neun) Untergattungen vorstellten. Dies berücksichtigte neben morphologischen Merkmalen auch die Fähigkeit zur Hybridisierung und bezog im Vergleich zu Blakely's System phylogenetische und evolutionäre Erkenntnisse mit ein. Da diese Klassifikation sowie nachfolgende Korrekturen durch JOHNSON nicht publiziert wurden, setzte sich das neue System in der botanischen Literatur nicht durch. Besonderes Aufsehen erregten JOHNSON und HILL, als sie 1995 die neue Gattung *Corymbia* postulierten, welche die ehemaligen *Eucalyptus*-Untergattungen *Corymbia* (die so genannten „Bloodwoods“) und *Blakella* (die sogenannten „Ghost Gums“) vereinigte. Unter Botanikern war diese Einordnung allerdings umstritten, so dass viele die alte Nomenklatur weiter verwendeten. Im Jahr 2000 wurde von BROOKER eine Klassifikation veröffentlicht, welche der umstrittenen Gattung *Corymbia* erneut den Status einer *Eucalyptus*-Untergattung zuordnete. Dem widersprachen die Genforscher LADRIGES und UDOVICIC (2000) und befürworteten das System von JOHNSON und HILL.

Die kontroversen Diskussionen der Wissenschaftler zeigen, dass es bisher nicht gelungen ist, eine verbindliche Klassifikation für die Gattung *Eucalyptus* zu erarbeiten. Der Grund hierfür liegt vor allem in der Schwierigkeit, eine präzise Definition des Taxons „Art“ bei *Eucalyptus* zu finden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Nomenklatur entsprechend der Klassifikation von BROOKER verwendet.

Die Gattung *Xanthostemon* umfasst etwa 45 immergrüne Baumarten. Der Name ist griechischen Ursprungs und bezieht sich auf das charakteristische Merkmal dieser Gattung: die auffallenden Blüten mit zahlreichen gelben (griech.: xanthos) Stamina (griech.: stemon). Das Verbreitungsgebiet reicht von Australien (14 Arten) über Neukaledonien (19 Arten) bis nach Indonesien und zu den Philippinen. Des Weiteren ist die Gattung *Leptospermum* mit 86 Arten zu nennen, von denen die 81 Arten in Australien endemisch sind. Weitere Vorkommen gibt es in Südostasien, Tasmanien und Neuseeland. Dort ist vor allem die als „Manuka“ bekannte Art *Leptospermum scoparium* zu finden. Die Gattung *Kunzea*, deren natürliche Verbreitung mit 40 Arten auf Australien beschränkt ist, gehört ebenfalls zu den Leptospermoideae. Die Ver-

breitung der 7 Arten umfassenden Gattung *Backhousia* beschränkt sich auf küstennahe Gebiete in New South Wales und Queensland. Die Gattung *Backea* umfasst 75 Arten, von denen 70 Arten in Australien endemisch sind.

2.2 Morphologie und Anatomie

Die Myrtengewächse sind Holzpflanzen (Bäume oder Sträucher) mit meist immergrünen, gegenständigen, krautigen oder ledrigen, immer nebenblattlosen Blättern. Häufig tritt eine ausgeprägte Heterophyllie auf. Die Familie zeichnet sich durch den Besitz schizolysigener rundlicher Ölbehälter aus, die in verschiedenen Geweben lokalisiert sein können. Auf den Blättern treten sie als durchscheinende Punktierung in Erscheinung. Ihre bikollateralen Leitbündel stellen eine anatomische Besonderheit dar. Die in Trugdolden, Ähren oder Rispen angeordneten Blüten sind radiär, überwiegend tetramer und bilden ein Hypanthium aus, so dass der Fruchtknoten unterständig oder zumindest tief eingesenkt ist. Das Androeceum weist durch sekundäre Vermehrung hervorgegangene, mehr oder weniger in Gruppen stehende Staubblätter auf (sekundäre Polyandrie). Bei vielen Myrtengewächsen sind die Blütenblätter wenig auffallend, die intensiv gefärbten Filamente der zahlreichen Stamina übernehmen dann die Schaufunktion. Die Blüten sind überwiegend diözisch und vermehren sich entomophil oder ornithophil. Als Früchte sind meist Beeren und Kapseln, seltener Steinfrüchte anzutreffen.

2.3 Pharmakologische Wirkung und Anwendung

Die Familie der Myrtaceae umfasst zahlreiche Pflanzen, deren traditionelle Verwendung in der Volksmedizin auch zu wissenschaftlichen Untersuchungen bezüglich ihres therapeutischen Nutzens geführt haben und noch führen. Das folgende Kapitel beschränkt sich auf die Betrachtung von *Eucalyptus*- und *Leptospermum*-Arten, da im Rahmen dieser Arbeit nur β -Triketone dieser Gattungen behandelt werden.

2.3.1 Die Gattung *Eucalyptus*

Die Nutzung verschiedener *Eucalyptus*-Arten für medizinische, technische und kulturelle Zwecke begann bereits vor 30 000 Jahren mit der Ankunft der Aborigines in Australien. Sie benutzten das Holz als Brennstoff, zur Herstellung von Speeren, Bumerangs, Didgeridoos und verwendeten die Rinde als Nahrung und zum Gerben sowie zum Bau von Kanus. Bis in die Gegenwart wird das harte, witterungsfeste, gegen Pilz- und Insektenbefall widerstandsfähige Holz als Bauholz in Form von Schwellen, Pfosten und Faserplatten sowie aufgrund seines schnellen Wachstums als Rohstoff zur Zellstoff- und Papierherstellung verwendet. Das Holz brennt gut, hinterlässt nur wenig Asche und eignet sich deshalb besonders zur Herstellung von Holzkohle. Zahlreiche *Eucalyptus*-Anpflanzungen übernehmen Funktionen im Rahmen einer Wasser- und Winderosionskontrolle.

Eine besondere Bedeutung kommt den aus den Blättern zahlreicher *Eucalyptus*-Arten gewonnenen ätherischen Ölen zu. In Europa wurden bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts *Eucalyptus*-Öle wegen ihrer antiseptischen Eigenschaften zur Desinfektion medizinischer Instrumente sowie in der Wundbehandlung eingesetzt. Stammpflanzen für das offizinelle ätherische Öl (*Eucalyptusöl*, *Eucalypti oleum*, Ph. Eur. 5.00) sind *Eucalyptus globulus* LABILL. und andere cineol-reiche *Eucalyptus*-Arten, namentlich *E. polybractea* R. T. Baker und *E. smithii* R. T. Baker. Wegen unerwünschter kardialer Wirkungen muss der Phellandren-Gehalt des Öls unter 1,5% liegen [BRACHER et al., 2005]. Zur Ölgewinnung werden die frischen adulten Blätter und Zweigspitzen eingesetzt, welche meist aus Kulturen stammen. Die Gewinnung des Rohöls erfolgt durch Wasserdampfdestillation. Nach Entfernen der wegen ihrer Reizwirkung auf den Respirationstrakt unerwünschten Aldehyde durch Rektifikation erhält man ein farbloses bis hellgelbes Öl mit aromatischem, kampferartigem Geruch. Seine Hauptkomponente ist mit 60-85% 1,8-Cineol (Synonym: *Eucalyptol*), daneben kommen geringe Konzentrationen an Monoterpenen wie α -Pinen, Limonen und Myrtenal sowie Sesquiterpene wie Globulol und Aromadendren vor.

Eucalyptusöl ist Bestandteil zahlreicher Fertigarzneimittel (z.B. Aspecton®Eukaps, Exeu®) und wird in Form von Kapseln, Einreibungen oder Inhalationen bei Erkrankungen der oberen Luftwege wie Tussis, Bronchitis, Rhinitis und Sinusitis ange-

wendet. Es zeigt sowohl aus dem Gastrointestinaltrakt als auch bei Inhalation eine gute Resorption und wird vorwiegend über die Lunge ausgeschieden. Dort wirkt es expektorierend, antiseptisch sowie schwach spasmolytisch und lindert so Beschwerden, die in Verbindung mit Erkältungskrankheiten auftreten. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass das häufig für *Eucalyptus globulus* LABILL. gebrauchte Synonym „Fieberbaum“ nicht auf seine fiebersenkende Wirkung zurückzuführen ist. Es verweist vielmehr auf die Eigenschaft von *Eucalyptus*-Bäumen, Feuchtgebiete durch ihr schnelles Wachstum auszutrocknen und damit die Vermehrung Malaria übertragender Stechmücken zu reduzieren (indirekte Malariabekämpfung). Durch den hohen Ölgehalt der Blätter wirken sie außerdem als Insekten vertreibendes Mittel, was bei der Verwendung des ätherischen Öls als Repellent genutzt wird.

Bei topischer Anwendung auf der Haut wird der hyperämisierende Effekt des Eucalyptusöls genutzt. So ist es in Einreibungen und Salben enthalten, die bei rheumatischen Beschwerden zur Wärmetherapie eingesetzt werden. Das Öl findet außerdem in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie Verwendung, wo es wegen seiner erfrischenden, belebenden Wirkung Hustenbonbons, Zahncremes, Mundwässern, Entspannungsbädern oder Parfums (hier vor allem *Eucalyptus citriodora*) zugesetzt wird. In der Volksmedizin kommt Eucalyptusöl zur Behandlung von Lippenbläschen (Herpes labialis) zum Einsatz. In diesbezüglichen wissenschaftlichen Studien konnte *in vitro* eine antivirale Wirksamkeit gegenüber Herpes-simplex-Viren vom Typ 1 und 2 nachgewiesen werden, sofern das ätherische Öl außerhalb der Wirtszelle mit diesen in Kontakt kommt [SCHNITZLER, 2001; REICHLING et. al, 2003].

Im Tierversuch konnte für das ätherische Öl eine Blutzucker senkende Wirkung [SWANSTON-FLATT et al., 1990] sowie eine Induktion Fremdstoff abbauender Enzymsysteme in den Leberzellen gezeigt werden [JORI et al., 1969 und 1970]. Letzteres kann zu einer abgeschwächten oder verkürzten Wirksamkeit anderer Arzneimittel führen. Detaillierte Studien dazu stehen noch aus.

Bedeutung kommen den aus dem ätherischen Öl gewonnenen Substanzen Aromadendren und Piperiton zu. Ersteres dient als „chiral pool“ für die Sesquiterpensen- synthese, letzteres ist Ausgangsverbindung für die Synthese von Thymol und Menthol.

Die Blattdroge selbst (*Eucalyptus*blätter, *Eucalypti folium*, Ph. Eur. 5.02) spielt heute nur noch eine untergeordnete Rolle. Sie besteht aus den adulten Folgeblättern von *Eucalyptus globulus* LABILL. und enthält neben ätherischem Öl (1 bis 3%), Euglobale, Gerbstoffe (Tannine), Triterpene (Ursolsäurederivate) und Flavonoide. Der aus den Blättern bereite Tee wird bei Bronchitis angewendet. Sein Nutzen beruht vor allem auf den oben beschriebenen Wirkungen des ätherischen Öls. Bei der Anwendung von Tee bei Rachenentzündungen kommen sowohl die antiseptischen Eigenschaften des Öls als auch die adstringierende Wirkung der Gerbstoffe zum Tragen. Die Ureinwohner Australiens verwenden *Eucalyptus*-Blätter (und -Rinde) u.a. zur Behandlung von Malaria, Zahnschmerzen, Kopfschmerzen und Durchfall sowie bei schlecht heilenden Wunden und Insektenstichen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Verwendung der Blätter von *Eucalyptus papuana* als Fischgift. Der Einsatz beschränkt sich dabei auf sehr kleine Gewässer wie z.B. Wasserlöcher. Ins Wasser geworfene Blätterbündel geben „toxische“ Substanzen ab, die dazu führen, dass die Fische an die Wasseroberfläche treiben und anschließend von dort eingesammelt werden können. Der Verzehr dieser Fische gilt als unbedenklich [HAMILTON, 1986].

Eine weitere, ebenfalls Verwendung findende Droge stellt Eucalyptus Kino (engl: Eucalyptus Gum, Red Gum) dar. Dabei handelt es sich um eine gummiartige, dunkel rot-braune Ausscheidung, die als Reaktion auf pathologische oder mechanische Verletzung ihres Holzes von einigen *Eucalyptus*-Arten gebildet wird. Eucalyptus Kino enthält Catechin-Gerbstoffe und wird in Form von Tinkturen oder Lösungen bei Diarrhoe sowie bei Rachenentzündungen eingesetzt [GRIEVE, 1995]. Des Weiteren findet es als Puder oder Paste zur Versorgung offener Wunden Verwendung [GHISALBERTI, 1995].

2.3.2 Die Gattung *Leptospermum*

Die zahlreichen *Leptospermum*-Arten werden genau wie die *Eucalyptus*-Arten in der Volksmedizin gegen verschiedene Erkrankungen eingesetzt. Die größte Bedeutung kommt dabei dem Manukastrauch *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst. zu. Bereits die Ureinwohner Neuseelands, die Maori, nutzten Zubereitungen des Saftes, der Kapselfrüchte, der Blätter, der Rinde und der Blüten. Diese wurden sowohl intern zur Behandlung von Koliken, Obstipation, Fieber und Husten als auch extern zur Behandlung von Wunden und Hautinfektionen eingesetzt [CARR, 2003]. In Europa wurde die Pflanze durch Kapitän James Cook und dessen Botaniker Joseph Banks eingeführt. Sie hatten sie 1769 auf einer Expedition in Neuseeland kennen gelernt und bereiteten aus den aromatischen Blättern ein Teegetränk zu, um sich vor Skorbut zu schützen. Seitdem ist der Manukastrauch ebenfalls unter dem Namen „Teebaum“ (nicht zu verwechseln mit dem „echten“ Tee *Camellia sinensis*, Camelliaceae) bekannt.

Cave: Der Begriff „Teebaum“ fasst verschiedene Bäume und Sträucher der Gattungen *Leptospermum*, *Kunzea*, *Baeckea* und *Melaleuca* zusammen, deren aromatische Blätter zur Bereitung von Teegetränken genutzt wurden. In Analogie dazu sind im Handel unter der Bezeichnung „Teebaumöl“ ätherische Öle unterschiedlicher Zusammensetzung erhältlich, so dass eine ergänzende Angabe der Stammpflanze unverzichtbar ist.

Das ätherische Öl des Manukastrauches (nicht offizinell) wird durch Wasserdampfdestillation aus den Blättern und Zweigspitzen mit einer Ausbeute von nur 0,4 – 0,5% gewonnen, eine Erklärung für den vergleichsweise hohen Preis. Es handelt sich um ein klares gelbes bis braunes Öl relativ dickflüssiger Konsistenz, das in Abhängigkeit vom Anbaugebiet einen honigartig süßen bis aromatischen Duft ausströmt. Die Zusammensetzung des ätherischen Öls ist je nach dem geographischen Standort der Pflanze sehr variabel, so dass die Einteilung in mindestens drei Chemotypen (Pinenreich, Sesquiterpenreich, Triketonreich) vorgeschlagen wurde (siehe auch 4.2). Im Hinblick auf die kommerzielle Nutzung nimmt das neuseeländische „East Cape Manukaöl“ mit einem Triketongehalt von 25 - 30% eine exponierte Stellung ein. Das Öl zeichnet sich durch ein gutes perkutanes Penetrationsverhalten bei gleichzeitig guter

Adhäsion auf der Haut sowie einer guten Hautverträglichkeit aus, auch bei unverdünnter Anwendung. Aufgrund seiner desinfizierenden und antiseptischen Wirkung wird es gerne Körper- und Hautpflegemitteln zugesetzt [KIM et al., 2000]. Darüber hinaus spielt es als natürliches Konservierungsmittel eine Rolle. Wegen seiner antibakteriellen und entzündungshemmenden Eigenschaften findet es in der Aknebehandlung sowie als Zusatz von Seifen und Deodorantien Verwendung. Die fungiziden Eigenschaften des Öls kommen besonders in Shampoos und Fußcremes zum Tragen. Lösungen des Öls in 70%igem Alkohol werden zu Desinfektionszwecken eingesetzt.

Ursächlich für den Einsatz des unverdünnten Öls bei Herpes-Infektionen ist die antivirale Wirksamkeit der enthaltenen Triketone, auf die zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit noch genauer eingegangen wird. Im Zusammenhang mit der Anwendung des unverdünnten Öls soll die Studie von LIS-BALCHIN (2000) erwähnt werden, die gezeigt hat, dass Manukaöl am Uterus von Ratten (*in vitro*) zur Reduktion der Kontraktionen und deren Stärke führt.

Wegen seiner antiphlogistischen Wirkung wird das ätherische Öl auch bei Erkrankungen des Respirationstraktes verwendet. Pharmakologische Studien konnten außerdem eine spasmolytische Wirkung des Öls auf die glatte Muskulatur („Eingeweidemuskulatur“, auch in den Atemwegen lokalisiert) gezeigt werden [LIS-BALCHIN, 2000]. Die starke antibakterielle Aktivität des Öls gegenüber parodontalpathogenen und kariogenen Keimen konnte bereits für 0,2%ige Lösungen des ätherischen Öls gezeigt werden [TAKARADA et al., 2004] und begründet dessen Verwendung in Mundwässern und Zahnpasten. Im Bereich der Tiermedizin werden ölhaltige Dermatika bei Euterentzündungen von Kühen und ölhaltige Shampoos zur Insektenabwehr verwendet.

Oral applizierte Extrakte aus Blüten, Knospen, Blättern und Stängeln sollen über die Aktivierung der natürlichen Abwehrkräfte zur Bekämpfung degenerativer Vorgänge wie Arthrose und Multipler Sklerose sowie zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere von Leukämie, geeignet sein. Ein diesbezügliches Patent für verschie-

dene Darreichungsformen mit *Leptospermum scoparium* ist erteilt worden [Fa. Alfred Stirnadel, Deutsches Patent 1987, Europäisches Patent 1989].

Für den kommerziellen Einsatz des Manuka-Öls ist es wegen seiner stark variierenden Zusammensetzung unerlässlich, chemische Spezifikationen zu definieren. Insbesondere muss dabei auf die Konzentration der Triketone Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon geachtet werden, da diese die antimikrobielle Wirksamkeit des Öls stark beeinflussen. Deshalb sind unter dem Namen TAITONE™ mit Triketonen angereicherte Extrakte der Konzentrationen 10%, 20% und 30% im Handel. Eine Weiterentwicklung stellt der Tairawhiti Manukaöl-Extrakt dar, der einen Triketon-Gehalt von mehr als 96% aufweist. Die antimikrobielle Wirksamkeit ist maximiert, der von Mono- und Sesquiterpenen ausgehende, in topischen Formulierungen häufig unerwünschte Geruch minimiert.

Die Rinde von *Leptospermum scoparium* wird in Form von Dekokten oder Infusen volksheilkundlich bei Durchfall und Entzündungen im Magen-Darm-Bereich verwendet. Dafür sind vor allem die dort enthaltene Ellagsäure und deren Ester verantwortlich, deren adstringierende Wirkung hier genutzt wird. Daneben finden weiße gummiartige Ausschwitzungen der Pflanze, die als „pia manuka“ bezeichnet werden, äußerlich zur Behandlung von Verbrühungen und Verbrennungen Verwendung. Außerdem wird das „Gummi“ bei Husten gekaut und zur Behandlung von Obstipationen bei Kindern eingesetzt.

Der Fluidextrakt aus gekochten Samenkapseln dient der Behandlung von Prellungen und Entzündungen. Innerlich angewendet wirkt er gegen Diarrhoe und Dysenterie. Umschläge von gemahlenen und zu Brei verarbeiteten Kapseln fördern das Abtrocknen offener Wunden und wirken schmerzlindernd [BROOKER et al., 1987 und BLUM, 1995].

In den letzten Jahren hat der Einsatz des antimikrobiell wirksamen Manukahonigs im Rahmen der Apitherapie zur Behandlung von Hautdefekten (u.a. Ulcera, Dekubitus), Verbrennungen und Wunden stark zugenommen. Verantwortlich für die antibakterielle Aktivität des Honigs sind eine hohe Osmolarität, die Azidität, der Wasserstoff-

peroxid-Gehalt sowie der Gehalt an Pflanzenstoffen [CARR, 2003]. Die Wirksamkeit des Honigs wird mit Hilfe des sogenannten „UMF“ („Unique Manuka Factor“) definiert, einem in Neuseeland eingetragenen Warenzeichen. In der Apitherapie sollen nur Honigsorten mit einem Wert von 10 (entspricht der Wirkung einer 10%igen Phenol-Lösung) eingesetzt werden. Zahlreiche Studien belegen die antibakterielle Wirksamkeit gegen verschiedene Mikroorganismen [u.a. ALLEN et al., 1991 und RUSSELL et al., 1990]. Dabei kommt der Wirkung gegen *Helicobacter pylori* (syn: *Campylobacter pylori*), der an der Entstehung von Magenschleimhautschäden und Geschwüren im oberen Magen-Darm-Trakt maßgeblich beteiligt ist, eine besondere Bedeutung zu [SOMAL et al., 1994].

Neuere Studien deuten darauf hin, dass verschiedene Komponenten des Öls zur Inhibierung von Cystein-Proteasen führen. Diese Enzyme spielen im Rahmen von Muskelatrophie-Erkrankungen, Tumorinvasionen und Metastasenbildung eine Rolle und stellen somit eine therapeutisch wichtige Zielgruppe dar [CARR, 2003].

3 Chemie natürlicher Polyketone

3.1 Acylphloroglucin-Derivate

Als Acylphloroglucine bezeichnet man Phloroglucin-Derivate, welche direkt am Ring eine Acyl-Seitenkette tragen. Strukturelle Variationen betreffen das Methylierungsmuster am Ring und an den Hydroxyl-Gruppen. Mehrere Ringe können über Methylenbrücken verknüpft sein. Vertreter dieser Gruppe sind vor allem in Farnpflanzen verbreitet. Bisher konnten mehr als fünfzig Acylphloroglucine aus Rhizomen zahlreicher *Dryopteris*-Farne isoliert werden. Sie sind von taxonomischem Interesse und dienen als chemische Markersub-

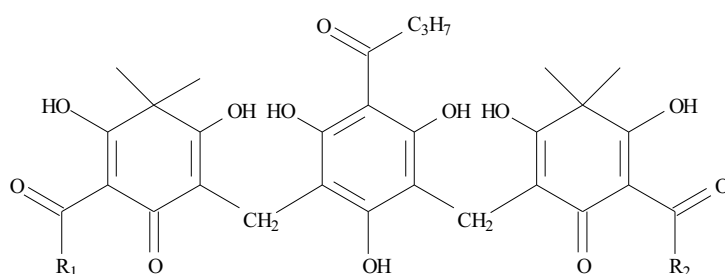
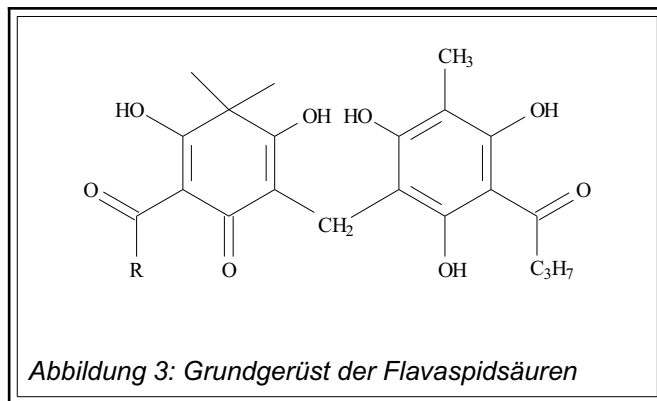


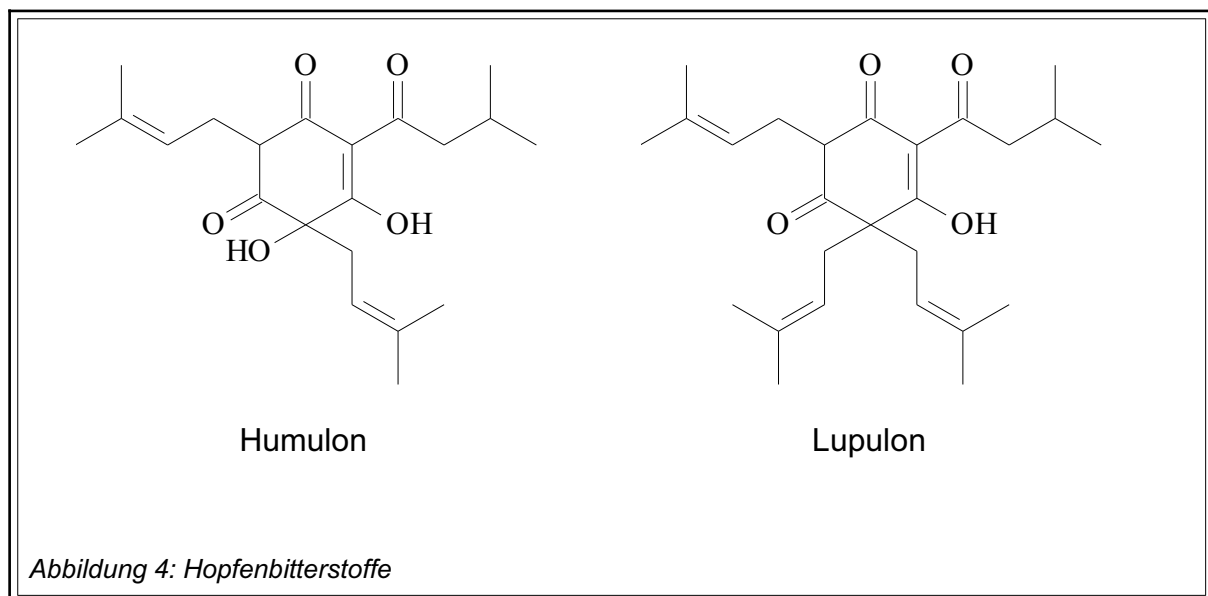
Abbildung 2: Grundgerüst der Filixsäuren



stanzen zur Abgrenzung gegenüber verwandten Gattungen. Als Beispiel für Acylphloroglucine von pharmazeutischem Interesse seien die aus dem Rhizom von *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott (Gemeiner Wurmfarne, Aspidiaceae) isolierten Filixsäuren (**Abb. 2**) und Flavaspidsäuren (**Abb. 3**) angeführt, welche

früher aufgrund ihrer anthelmintischen Wirkung in Kombination mit Laxanzien als Wurmmittel eingesetzt wurden.

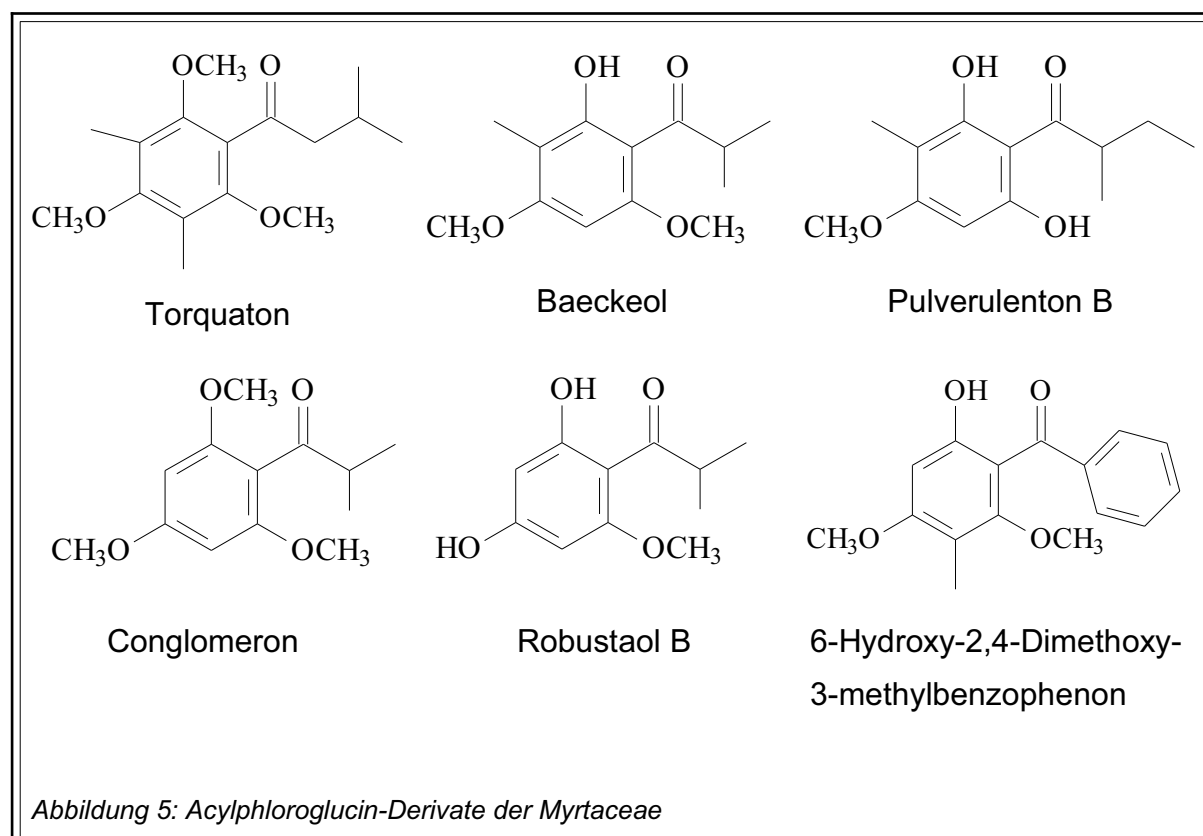
Ein weiteres Beispiel stellen die aus den weiblichen Blüten des Hopfens (Hopfenzapfen; *Humulus lupulus* L. / Cannabaceae) gewonnenen charakteristischen „Bittersäuren“ dar. Dabei handelt es sich um Monoacylphloroglucine, die sich durch das Vorhandensein von zwei (α -Bittersäuren) oder drei (β -Bittersäuren) am Ring be-



findlichen Dimethylallyl-Seitenketten auszeichnen. Bekannte α -Bittersäuren sind Humulon und Cohumulon, die - ebenso wie die Vertreter der β -Bittersäuren Lupulon und Colupulon - beim Erhitzen durch Ringverengung in die stärker bitteren Isosäuren übergehen (**Abb. 4**). Darin begründet sich die Verwendung des Hopfens zur

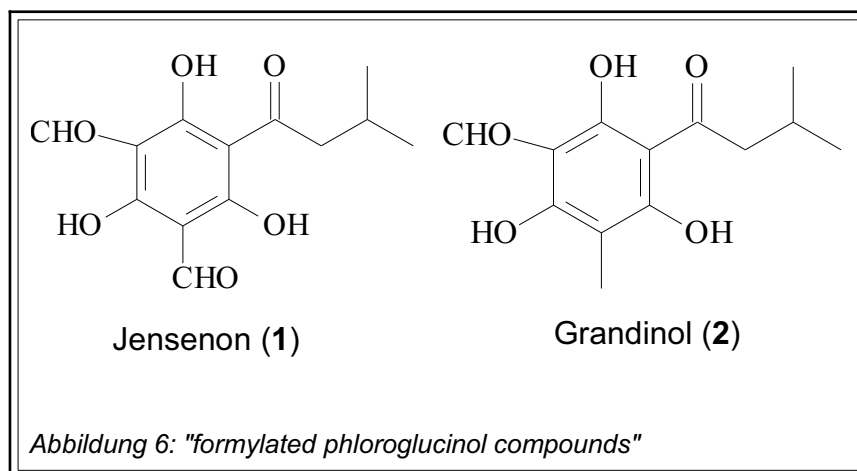
Aromatisierung des Bieres. Hopfenzapfen und daraus hergestellte Extrakte werden in der Phytotherapie in Kombination mit Baldrian als Beruhigungsmittel eingesetzt.

Die Myrtaceae weisen ein breites Spektrum einfacher Acylphloroglucin-Derivate auf, die sich im Methylierungsgrad der Hydroxylgruppen und im Methylierungsmuster der Kohlenstoff-Atome im Ring sowie in der Struktur der Acyl-Seitenkette unterscheiden. Eine Auswahl dieser Substanzen ist in **Abbildung 5** dargestellt.



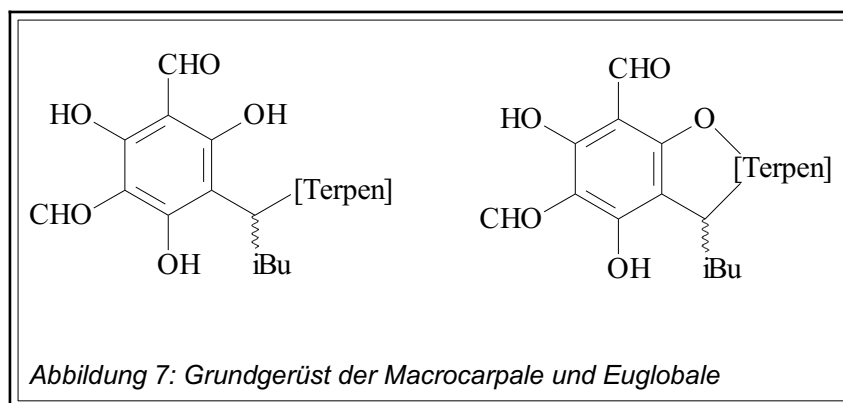
Eine relativ neu entdeckte und interessante Gruppe sind die so genannten „formylated phloroglucin compounds“ (FPCs). Das Vorkommen dieser sekundären Metaboliten ist auf die Familie der Myrtaceae, insbesondere auf *Eucalyptus*-Arten, beschränkt [LAWLER et al., 2000; EYLES et al., 2003]. FPCs konnten bisher vor allem in Knospen und Blättern sowie in Holzverletzungen von *Eucalyptus*-Pflanzen nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um aromatische, vollständig substituierte Acylphloroglucin-Derivate mit mindestens einer Formylgruppe. Strukturvariationen beziehen sich auf das Substitutionsmuster und die Acylseitenkette. Die einfachsten FPCs wie Jensenon und Grandinol (**Abb. 6**), deren Seitenkette aus einer

C₅-Einheit besteht, bilden die biogenetische Basis für die Entstehung dimerer Derivate wie Robustaol A (isoliert aus *Eucalyptus robusta* Smith) oder Sideroxylonal A und B (isoliert aus *Eucalyptus sideroxylon* A. Cunn. ex Wools). FPCs, deren Ring mit einem Terpen verknüpft ist, bilden die Substanzklassen der Macrocarpale und Euglobale (**Abb. 7**). Deren



aus C₁₀- oder C₁₅-Einheiten bestehenden Seitenketten leiten sich von Mono- (C₁₀-Einheiten) oder Sesquiterpenen (C₁₅-Einheiten) wie α-Pinen, β-Phellandren oder Bicyclogermacren ab [FOLEY & LASSAK, 2004].

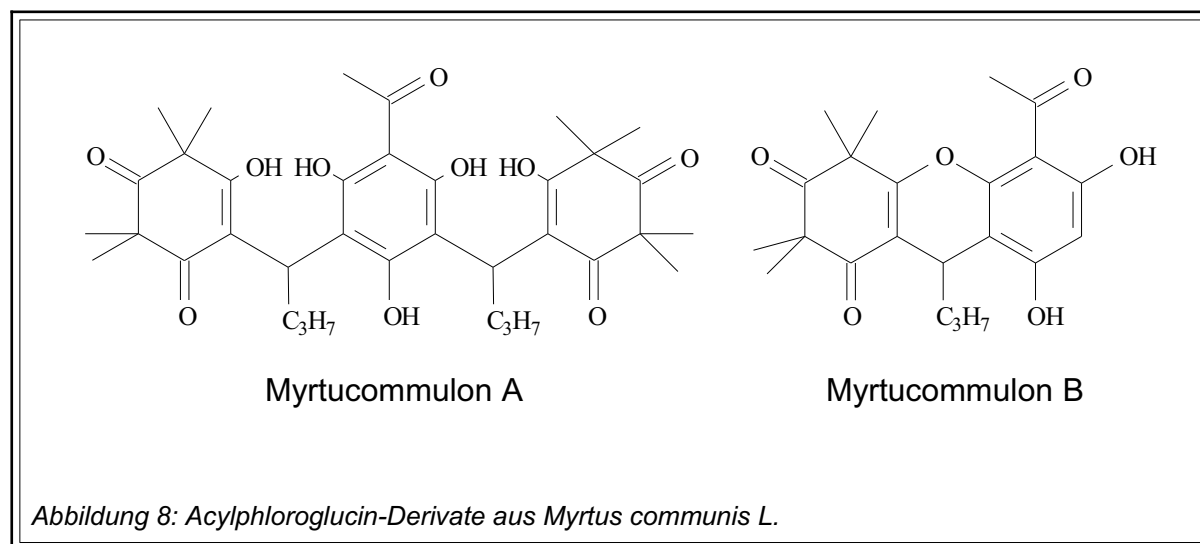
Bei den FPCs handelt es sich um eine biologisch aktive Substanzgruppe, deren Bedeutung noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Für Jensenon (**1 in Abb. 6**), Macrocarpal G und Sideroxylonal konnte eine effektive fraßhemmende Wirkung auf pflanzenfressende Säuger wie die Beuteltiere (*Pseudocheiros peregrinus*,



Trichosurus vulpecula, *Phascolarctos cinereus*) gezeigt werden [LAWLER et al., 1999; EYLES et al., 2003]. Außerdem haben verschiedene Studien die antibakterielle Wirksamkeit der FPCs vor allem gegenüber Gram-positiven Bakterien [u.a. YAMAKOSHI et al., 1992] nachgewiesen. Eine insektizide Wirkung ist im Hinblick auf die Akkumulationsorte der FPCs (in Knospen, Blättern und Holzverletzungen) ebenfalls vorstellbar. Des Weiteren wird eine antioxidative Wirkung gegenüber bei Verletzungen entstehenden freien Radika-

le gezeigt werden [LAWLER et al., 1999; EYLES et al., 2003]. Außerdem haben verschiedene Studien die antibakterielle Wirksamkeit der FPCs vor allem gegenüber Gram-positiven Bakterien [u.a. YAMAKOSHI et al., 1992] nachgewiesen. Eine insektizide Wirkung ist im Hinblick auf die Akkumulationsorte der FPCs (in Knospen, Blättern und Holzverletzungen) ebenfalls vorstellbar. Des Weiteren wird eine antioxidative Wirkung gegenüber bei Verletzungen entstehenden freien Radika-

len diskutiert [VAN DOORSLAER et al., 1999]. Außerdem liegen *in vitro* Studien über Antifouling-Eigenschaften [TERADA et al., 1999], eine Hemmung der HIV-reversen Transkriptase [NISHIZAWA et al., 1992] und eine Hemmung von Tumorwachstum [TAKASAKI et al., 1995] vor.

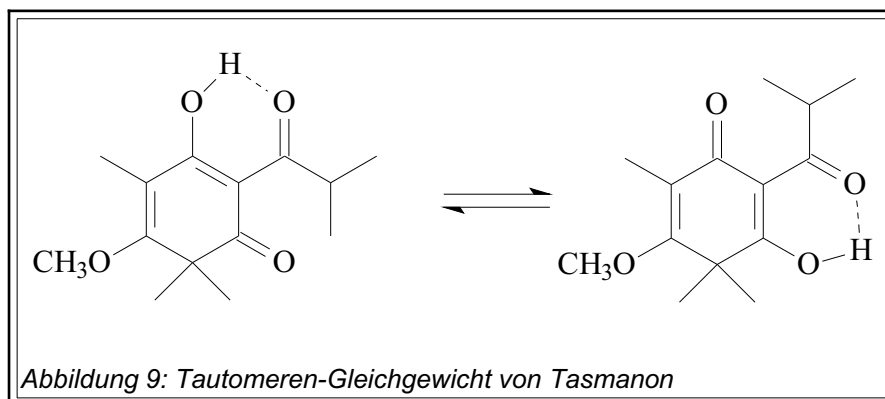


Ein Beispiel für komplexere Acylphloroglucin-Derivate in Myrtaceen stellen die aus *Myrtus communis* L. (Brautmyrte) isolierten Substanzen Myrtucommulon A und B (**Abb. 8**) dar. Sie weisen chemische Ähnlichkeit mit den bereits erwähnten Acylphloroglucin-Derivaten der *Dryopteris*-Arten sowie mit den aus höheren Pflanzen isolierten Uliginosinen (aus *Hypericum uliginosum* Kunth / Hypericaceae) und Kosinen (aus *Hagenia abyssinica* Willd. / Rosaceae) auf. Für Myrtucommulon A konnte eine hohe antibakterielle Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven Bakterien gezeigt werden [ROTSTEIN et al., 1974].

3.2 Cyclische Polyketone („β-Triketone“)

Charakteristisch für die Familie der Myrtaceae ist das Vorkommen zahlreicher cyclischer Polyketone, welche im Grad der Oxidation, der Anzahl ringständiger Methylgruppen sowie in der Struktur ihrer Seitenkette variieren. Sie sind sowohl von chemotaxonomischem als auch strukturellem Interesse.

Die erste zu dieser Klasse gehörende Substanz, das Tasmanon (**8 in Abb. 10**), wurde bereits 1914 aus *Eucalyptus delegatensis* subsp. *tasmaniensis* Boland (syn. *E. tasmanica* Blakely; syn. *E. risdoni* var. *elata* Benth.) isoliert. Die zunächst postulierte phenolische Struktur und der daraus resultierende Name „Tasmanol“ wurden Ende der sechziger Jahre durch BIRCH und ELLIOT (1956) korrigiert. Nach

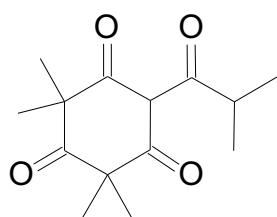


vollständiger Aufklärung der Struktur [HELLYER et al., 1963; BICK & HORN, 1965] konnte das Vorhandensein zweier tautomerer Formen gezeigt werden (**Abb. 9**). Die biogenetische Betrachtung der Struktur des Tasmanons unter Einbeziehung verwandter Substanzen führte erstmals zur Hypothese und später zum Nachweis der biologischen C-Methylierung von Naturstoffen.

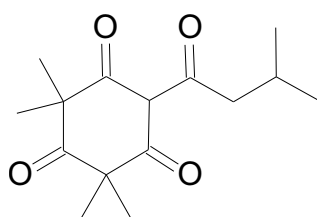
Unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden Ringstruktur lassen sich die cyclischen Polyketone in drei Gruppen einteilen, wobei die Reihenfolge der Aufzählung mit deren natürlicher Häufigkeit korreliert:

- Derivate des Phloroglucins (**Abb. 10**)
- Derivate des Resorcins (**Abb. 12**)
- Derivate des Cyclopentandions (**Abb. 13**)

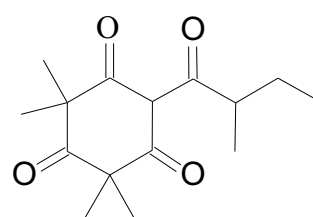
Die Substanzen der ersten Gruppe leiten sich formal von einem Phloroglucin-Grundkörper ab. Man bezeichnet sie vereinfacht auch als β -Triketone. Sie weisen in Lösung die Eigenschaft der Keto-Enol-Tautomerie auf, wobei das Gleichgewicht zu Gunsten der Enol-Form verschoben ist. **Abbildung 11** stellt das Tautomerie-Gleichgewicht am Beispiel von Isoleptospermon dar. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass die Stereochemie des an Position 2 befindlichen C-Atoms von Isoleptospermon bisher nicht geklärt werden konnte, da die Isolierung eines reinen



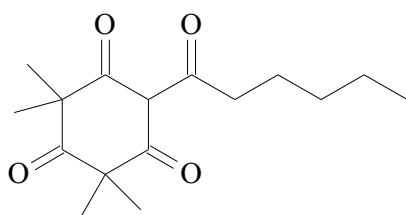
Flaveson (1)



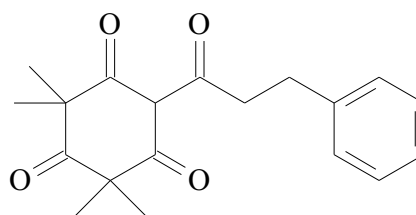
Leptospermon (2)



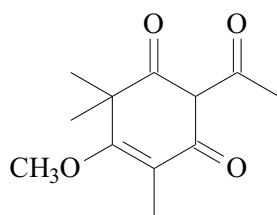
Isoleptospermon (3)



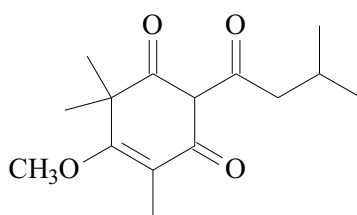
Papuanon (4)



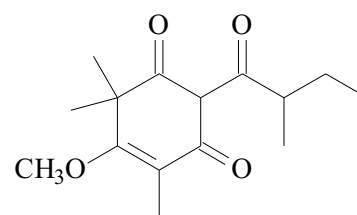
Grandifloron (5)



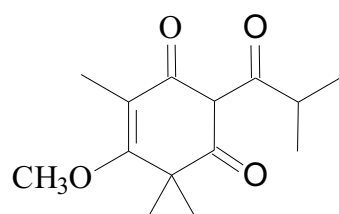
Platyphyllol (5)



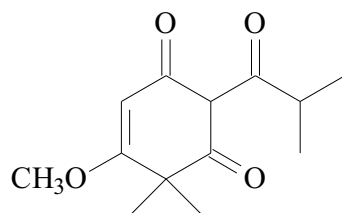
Lateriticon (6)



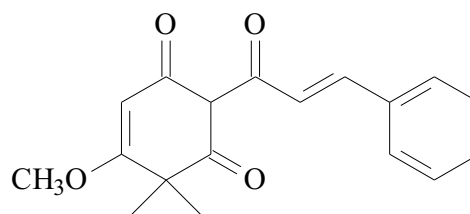
Isolateriticon (7)



Tasmanon (8)



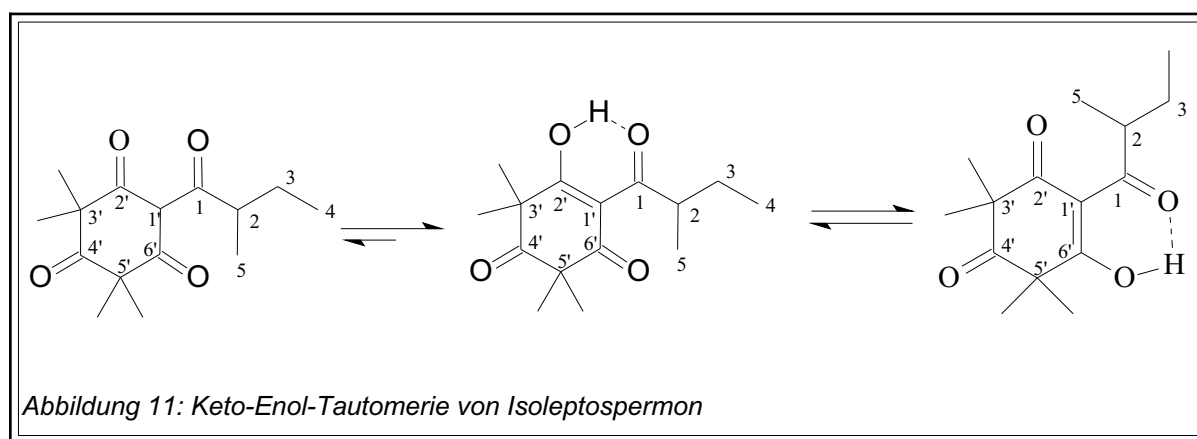
Agglomeron (10)



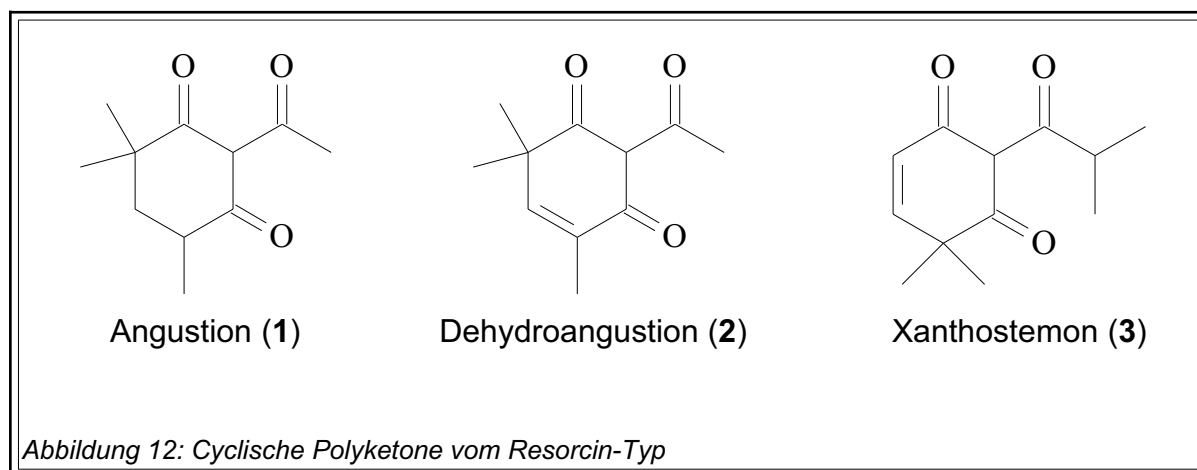
Ceropten (9)

Abbildung 10: Cyclische Polyketone vom Phloroglucin-Typ (β -Triketone)

Enantiomers noch nicht gelungen ist. Ursächlich hierfür sind die Extraktionsbedingungen, welche zu einer Razemisierung führen [VAN KLINK et al., 1999]. Die Carbonyl-Gruppen bilden ein ausgeprägtes konjugiertes System, das zur Ausbildung chelatähnlicher Struktur neigt. Dadurch erklärt sich u.a. die typische Farbreaktion der β -Triketone mit Eisen(III)-chlorid (orange-rot bis braun) sowie die Ausbildung von in organischen Lösungsmitteln löslichen Kupfer-Salzen [BIRCH & ELLIOTT, 1956; HELLYER & PINHEY, 1966].



Die Basis für die Acylketten der β -Triketone bilden normalerweise einfach verzweigte Carbonsäuren wie Isobuttersäure und Isovaleriansäure oder unverzweigte Carbonsäuren wie Capronsäure. Das β -Triketon Grandifloron (**5 in Abb. 10**), das u.a. aus dem ätherischen Öl von *Leptospermum flavescens* Smith var. *grandiflora* (Lodd.) Benth. und *Leptospermum lanigerum* (Ait.) Smith isoliert wurde, stellt bisher das einzige β -Triketon mit einer Dihydrocinnamoyl-Seitenkette dar. Eine Cinnamoyl-Seitenkette weisen neben Ceropten (**9 in Abb. 10**), einem aus den Blattschuppen des

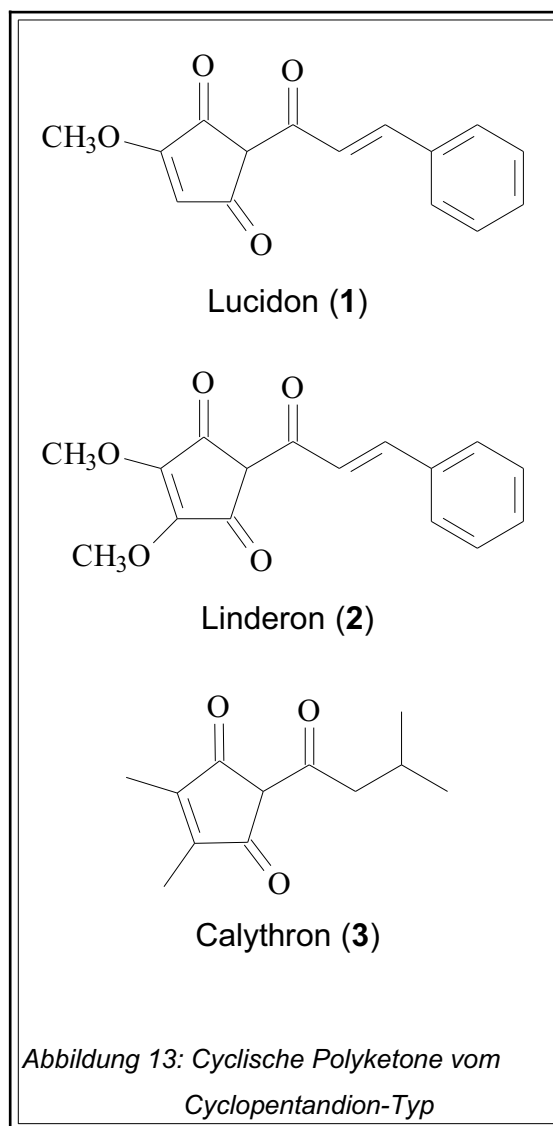


amerikanischen Farnes *Pityrogramma triangularis* Kaulp. isolierten β -Triketon, die Cyclopentandion-Derivate Linderon (**2 in Abb. 13**) und Lucidon (**1 in Abb. 13**) auf. Ersteres stammt aus den Wurzeln von *Lindera pipericarpa* (Miq.) Boerl. (Lauraceae), Letzteres wurde erstmals aus den Früchten von *Lindera lucida* (Blume) Boerl. (Lauraceae) gewonnen.

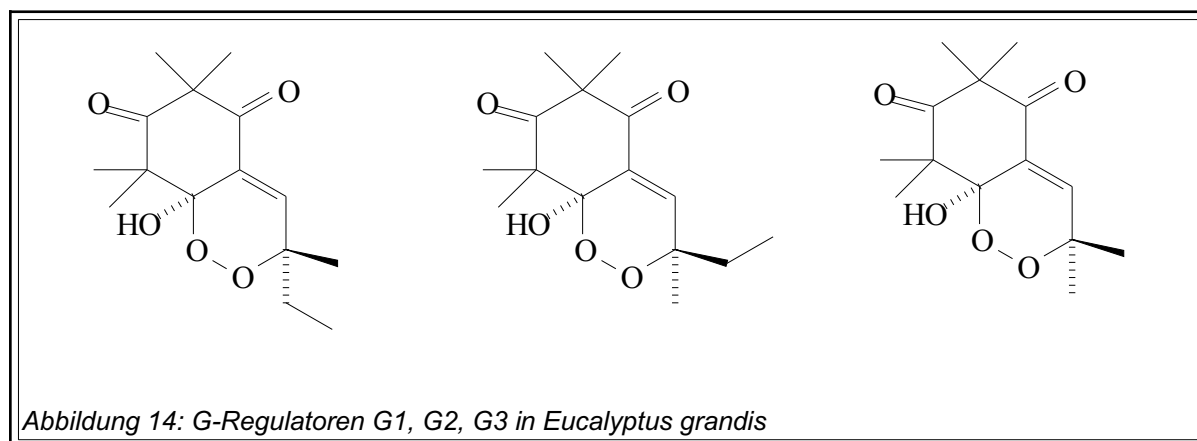
Die oben beschriebene Eigenschaft der Keto-Enol-Tautomerie ist – in Analogie zu den β -Triketonen – ebenfalls für die Derivate des Resorcins (**Abb. 12**) und des Cyclopentandions typisch (**Abb. 13**). Auch sind für diese Derivate Farbreaktionen mit Eisen(III)-chlorid sowie die Ausbildung von Kupfer-Salzen beschrieben [BIRCH, 1951]. Aus diesem Grund werden Substanzen dieser beiden Gruppen in der Literatur häufig ebenfalls als β -Triketone bezeichnet [HELLYER & PINHEY, 1966; LAKHVICH & KHLEBNIKOVA, 1966].

Angustion (**1 in Abb. 12**) und Dehydroangustion (**2 in Abb. 12**) gehören zu den cyclischen Polyketonen, die sich vom Resorcin-Grundgerüst ableiten. Sie konnten aus dem ätherischen Öl von *Backhousia angustifolia* F. Muell. isoliert werden, wo sie in Konzentrationen bis zu 75% bzw. 85% (in Abhängigkeit vom Chemotyp) enthalten sind [BROPHY & GOLDSACK, 1995]. Für Xanthostemon (**3 in Abb. 12**), ebenfalls dieser Gruppe zugehörig, wurden im Öl von *Xanthostemon oppositifolius* F. M. Bailey Konzentrationen bis zu 20% gefunden.

Die Bedeutung der cyclischen Polyketone für die Pflanzen konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Für die β -



Triketone Leptospermon (**2 in Abb. 10**) und Isoleptospermon (**3 in Abb. 10**) wird angenommen, dass sie im Rahmen der Biosynthese von G-Regulatoren als Precursor fungieren. Dabei könnte formal nach Reduktion der Carbonylfunktion des Acyl-Restes und nachfolgender Wasserabspaltung ein reaktives Hydroxybutadien-Zwischenprodukt gebildet werden, welches in Gegenwart von Sauerstoff die für G-Regulatoren typische Epidioxid-Funktion ausbilden kann [GHISALBERTI, 1996]. Bei den G-Regulatoren handelt es sich um endogene Keimungs- oder Wachstumsinhibitoren, die bevorzugt in Blättern, älteren Geweben und an Schnittstellen akkumulieren. Sie inhibieren den photosynthetischen Elektronentransport zwischen dem Photosystem II und Plastochinon in Gegenwart von Grandinol und Homograndinol. Die Bezeichnung „G“ leitet sich von „grandis“ ab und nimmt Bezug auf die an *Eucalyptus*

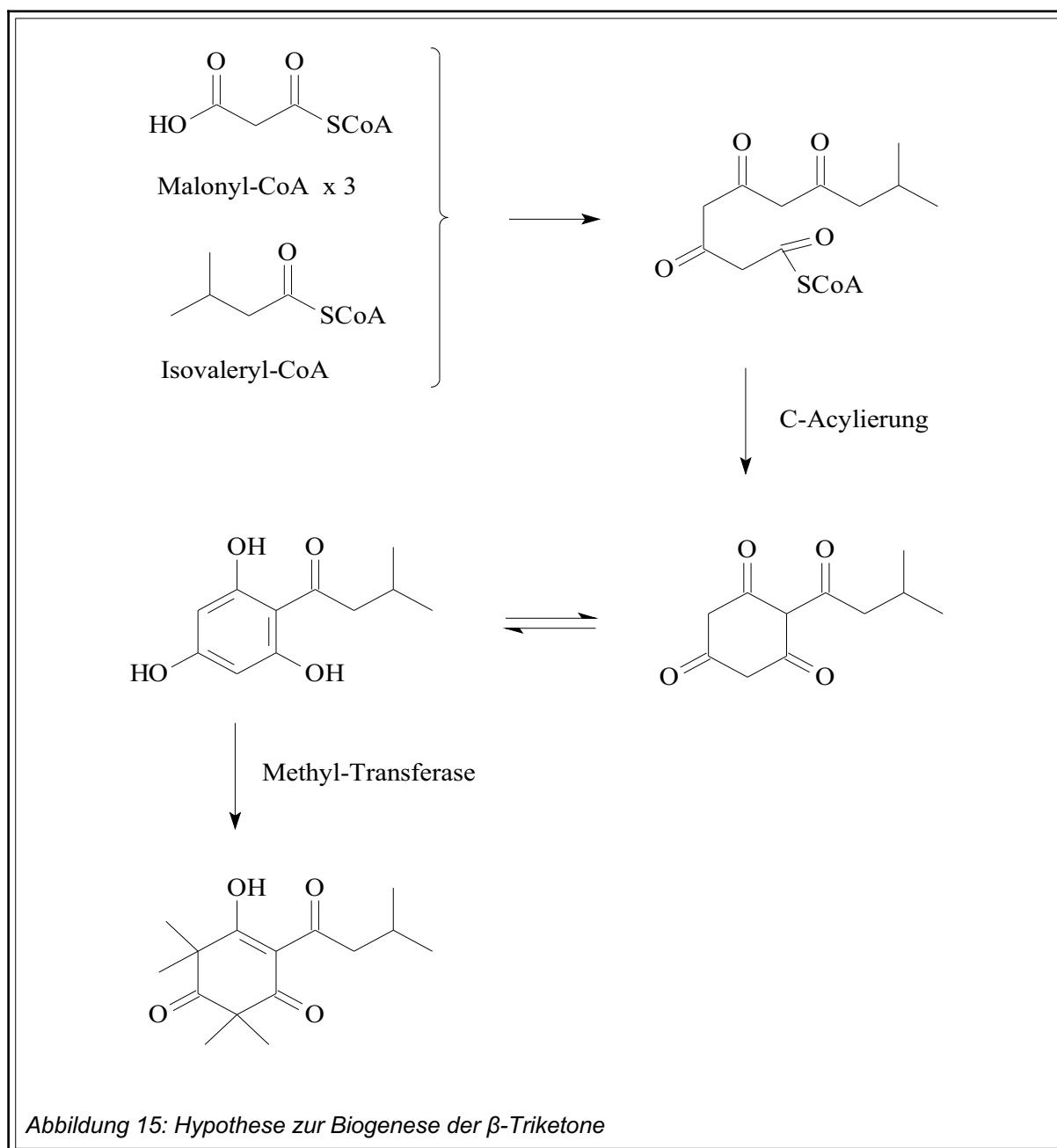


grandis W. Hill ex Maiden durchgeführten Untersuchungen. Hierbei wurden aus dem Blattgewebe drei solche G-Regulatoren isoliert und mit G1, G2 und G3 (**Abb. 14**) benannt. Während in alten Blättern von *Eucalyptus grandis* G-Regulatoren in einer Konzentration von 7500 µg/g gefunden wurden, wiesen junge Blätter lediglich 18,6 µg/g auf. Diese stark differierenden Konzentrationen korrelieren mit der Bewurzelungsfreudigkeit von *Eucalyptus*-Stecklingen. Während bei aus älterem Pflanzenmaterial stammenden Stecklingen nur selten ein Auskeimen von Wurzelgewebe erfolgte, konnte bei jungen Pflanzen eine verstärkte Wurzelbildung beobachtet werden.

4 β -Triketone

4.1 Biosynthese der β -Triketone

Experimentell abgesicherte Erkenntnisse liegen zur Biosynthese der Triketone nicht vor. Die alternierenden Substituenten des Ringgerüsts lassen jedoch die Schlussfolgerung zu, dass ihre Biosynthese über den Acetat-Malonat-Weg mit Polyketosäuren als Zwischenprodukte verläuft. Am Beispiel von Leptospermon wird der vermutete Reaktionsverlauf erläutert (**Abb. 15**). Über Kondensationsreaktionen von drei Ma-



lonyl-CoA-Einheiten und anschließender Verknüpfung mit Isovaleryl-CoA kann zunächst ein Tetraketid-Intermediat (Polyketosäure) gebildet werden, welches anschließend über eine C-Acylierung (CLAISEN-Kondensation) unter Ausbildung eines aromatischen Ringsystems cyclisiert. Das so entstandene Acylphloroglucin-Derivat kann durch mehrere Folgereaktionen wie Oxidation, Reduktion, O- und C-Methylierungen oder Umlagerungen weiter variiert werden. Im Falle von *Leptospermum* ist eine C-Methylierung in Gegenwart von Methyl-Transferasen vorstellbar.

4.2 Vorkommen natürlicher β -Triketone

Das Vorkommen cyclischer Triketone ist vor allem für die Familie der Myrtaceae beschrieben. Sie kommen dort bevorzugt in *Eucalyptus*- und *Leptospermum*-Arten vor, sind aber auch sporadisch in den Gattungen *Kunzea*, *Xanthostemon*, *Backhousia*, *Melaleuca*, *Baeckea* und *Callistemon* gefunden worden. In den **Tabellen 1 bis 5** ist das Vorkommen von Triketonen in Samenpflanzen der Myrtaceae zusammengestellt, wobei nur die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Triketone Berücksichtigung fanden. Um botanische Verwechslungen zu vermeiden, wurden die in den jeweiligen Publikationen verwendeten Pflanzennamen übernommen und ggf. durch ihre Synonyme ergänzt.

Bei den cyclischen β -Triketonen handelt es sich um eher lipophile, wasserdampf-flüchtige Verbindungen, die bei der Destillation von Blättern und Zweigspitzen in das ätherische Öl übergehen. Die in den Tabellen angegebenen Konzentrationen beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf ihre Konzentration im ätherischen Öl. In einigen Untersuchungen wurden die Triketone in ethanolischen Blattextrakten nachgewiesen [MUSTAFA et al., 2003]. Daten bezüglich des Vorkommens in anderen Pflanzenteilen (Blüte, Wurzel, Samen) liegen bisher nicht vor. Versuche, Triketone im antibakteriell wirksamen Manuka-Honig nachzuweisen, sind bislang gescheitert [MOLAN, 2004].

Vergleicht man den Triketongehalt innerhalb einer Pflanzenart, so werden zum Teil große Schwankungen deutlich. Dies zeigt sich besonders am Beispiel von Flaveson

im ätherischen Öl von *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst., wo Konzentrationen von 0,1 bis 8,3% in den ätherischen Blattölen von Pflanzen gefunden wurden, die aus verschiedenen geographischen Gebieten stammen. Dies gab Anlass für die Definition vierer verschiedener Chemotypen [PERRY et al., 1997 und PORTER et al., 1999]. Sie basiert auf dem signifikanten Vorhandensein charakteristischer Komponenten im ätherischen Öl:

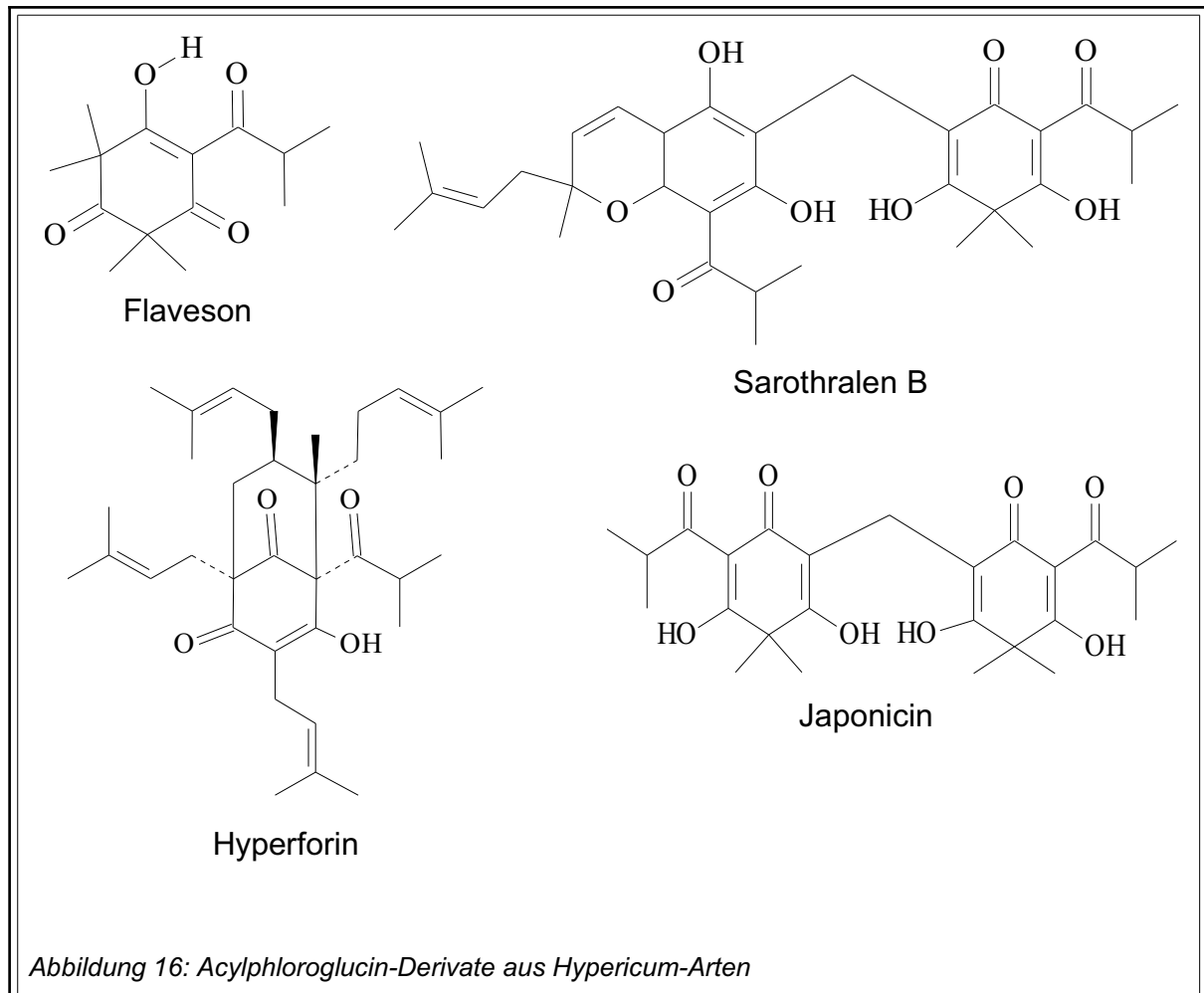
Chemotyp I :	reich an Triketonen
Chemotyp II :	reich an Linalool und Eudesmol, kaum Triketone
Chemotyp III :	reich an Pinen, kaum Triketone
Chemotyp IV :	kein Linalool, kein Eudesmol, keine Triketone

Vor allem im Hinblick auf die antimikrobielle Wirksamkeit, welche mit der Anwesenheit der Triketone in Verbindung gebracht wird, und den daraus resultierenden medizinischen Anwendungsmöglichkeiten ist diese Differenzierung relevant. Die postulierten Chemotypen gelten zunächst nur für die Art *Leptospermum scoparium* in Neuseeland und eingeschränkt in Australien. Eine systematische Analyse, welche die Gesamtheit geographischer und chemischer Variationen berücksichtigt, steht noch aus.

Der prozentuale Anteil der Triketone in den Ölen verschiedener Arten variiert von Spuren (<0,5%) bis hin zu 90% (*Xanthostemon chrysanthus* F. Muell.). In der Regel stellen Triketone jedoch Minorkomponenten dar. Häufig kommt nur ein Triketon im ätherischen Öl vor. *Leptospermum scoparium* mit drei Triketonen im Öl ist daher die Ausnahme.

Bemerkenswert ist, dass Flaveson außerhalb der Familie der Myrtaceae im Kraut von *Hypericum japonicum* (Hypericaceae) nachgewiesen werden konnte [Hu et al., 2000]. **Abbildung 16** zeigt die Strukturen von Hyperforin aus *Hypericum perforatum* sowie von Sarothralen B und Japonicin, welche ebenfalls aus *Hypericum japonicum* isoliert wurden. Die vergleichende Betrachtung dieser Strukturen macht deutlich, dass alle Verbindungen, ebenso wie das Flaveson, ein Acylphloroglucin-Grundgerüst

aufweisen. Unter diesem Aspekt erscheint das Auftreten von Flaveson durchaus nicht überraschend.



Im Folgenden werden die in der Arbeit verwendeten natürlich vorkommenden β -Triketone in alphabetischer Reihenfolge besprochen.

4.2.1 Agglomeron

Die Arten *Eucalyptus mckieana* Blakely und *Eucalyptus agglomerata* Maiden stellen die natürlichen Quellen für Agglomeron dar (**Tab. 1**). *Eucalyptus mckieana* bildet bis zu 25 m hohe, immergrüne Bäume, deren Rinde eine rotbraun-graue Textur aufweist und für die Einordnung in die Gruppe der so genannten „Stringybarks“ verantwortlich ist. Bei ihnen ist die Heterophyllie besonders ausgeprägt. So sind die Jugendblätter

lanzettlich, 7 cm lang, 1 mm breit und von glänzend grüner Farbe. Die ganzrandigen, lanzettlichen Adultblätter sind gestielt, sichelförmig, glänzend grün bis graugrün und können bei einer Breite von 1 - 2 mm eine Länge von 6 - 9 cm erreichen. Die Blüten- und Kelchblätter sind zu einem holzigen, starkrandigen, deckelförmigen Gebilde, dem Operculum, verwachsen, welches beim Aufblühen von den sich entfaltenden Staubblättern abgeworfen wird. Die Gattungsbezeichnung *Eucalyptus* weist auf dieses Merkmal hin (griech.: „eu“ = gut, „calyptein“ = bedecken). Der doldenförmige Blütenstand besteht aus 11 oder mehr achselständigen, weißen oder cremefarbenen Einzelblüten. Die 3 - 4 - fährigen, eiförmigen Kapsel Früchte sind 5 - 7 mm lang und haben einen Durchmesser von 5 - 7 mm.

Tabelle 1: Natürliches Vorkommen von Agglomeron

Art*	Konzentration [%]**	Literatur
<i>Eucalyptus mckieana</i> Blakely	60,0	HELLYER (1964)
<i>Eucalyptus agglomerata</i> Maiden	40,0	HELLYER (1964) HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus agglomerata</i> <i>Eucalyptus mckieana</i>	keine Angabe	BICK und HORN (1965)
<i>Baeckea diosmifolia</i> Rudge <i>Eucalyptus cameronii</i> Blakely & McKie <i>Eucalyptus oblonga</i> D.C. (syn.: <i>Eucalyptus sparsifolia</i>) <i>Xanthostemon oppositifolius</i> F. M. Bailey	Spuren	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus jacksonii</i> Maiden <i>Eucalyptus johnsoniana</i> Brooker & Blaxell <i>Eucalyptus lateritica</i> Brooker & Hopper <i>Eucalyptus ligulata</i> Brooker <i>Eucalyptus marginata</i> Donn ex. Smith sub- sp. <i>marginata</i> <i>Eucalyptus suberea</i> Brooker & Hopper	bis 1,0	BIGNELL et al. (1997)
<i>Eucalyptus insularis</i> Brooker	19,2	BIGNELL et al. (1997)
<i>Eucalyptus aequioperta</i> Brooker & Hopper	Spuren	BIGNELL et al. (1997)
<i>Eucalyptus agglomerata</i> Maiden	3,2	BIGNELL et al. (1998)
<i>Eucalyptus dawsonii</i> R. T. Baker <i>Eucalyptus nova-anglica</i> H. Deane & Maiden	bis 1,0	BIGNELL et al. (1998)

A Einleitung

Art*	Konzentration [%]**	Literatur
<i>Baeckea frutescens</i> L.	1,8 (geographisch unterschiedlich)	TAM et al. (2004)
<i>Eucalyptus globulus</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<i>Eucalyptus strzeleckii</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<i>Eucalyptus ovata</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<i>Eucalyptus viminalis</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<p>* Botanische Bezeichnung wie in der Veröffentlichung angegeben</p> <p>** prozentuale Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf den Gehalt im ätherischen Öl</p>		

In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass die Art *Eucalyptus mckieana* in die ROTAP–Liste („The Rare or Threatened Australian Plants“) aufgenommen worden ist. Die dort aufgeführten Arten sind gefährdet oder vom Aussterben bedroht und bedürfen eines besonderen Schutzes.

Bei *Eucalyptus agglomerata* Maiden („blue-leaved stringybark“) handelt es sich um bis zu 40 m hohe Bäume, die das Phänomen der in Australien „mallee“ genannten Wuchsform aufweisen und eine Anpassung an häufige Brände darstellen. Dabei wachsen mehrere Stämme aus einem Lignotuber oder „mallee-root“, einer verholzenden Anschwellung mit schlafenden Knospen an der Sprossbasis. Diese sind schon als Keimling angelegt und treiben aus, wenn der oberirdische Sprossteil mehr oder weniger durch Feuer zerstört wurde [WALTER & BRECKLE, 1991]. Das Epitheton „agglomerata“ verweist auf die gedrängt stehenden Köpfe der Früchte. Die Rinde ist faserig, bei einer dunkelgrauen bis graubraunen Textur. Die juvenilen, filzig behaarten Blätter (Sternhaare) haben eine ovale Form und erreichen bei einer Breite von 2 - 4 cm eine Länge von 4 - 7 cm. Während die Zwischenblätter dunkelgrüner Farbe gerade lanzettlich, 5 - 8 cm lang, 2 - 4 cm breit und unbehaart sind, zeigen die wechselständigen adulten Blätter eine sichelförmig-lanzettliche Form. Sie sind 10 - 15 cm lang, 2 - 3,5 cm breit. Der doldenförmige Blütenstand besteht aus 11 bis 15 weißen oder cremefarbenen, aufsitzenden Einzelblüten mit zahlreichen ungleichmäßig gebogenen Stamina. Die kugelförmigen 3 - 4 -fährigen Kapselfrüchte bringen

schwarzbraune, pyramidal geformte Samen mit einem Durchmesser bis 8 mm hervor.

4.2.2 Flaveson

Für Flaveson ist die Art *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst., in deren Blattölen Konzentrationen bis 13% gefunden wurden (**Tab. 2**), die natürliche Quelle. Diese Öle („Manuka-Öl“) werden u.a. unter dem Namen Manex® gehandelt. Das hauptsächliche Verbreitungsgebiet von *Leptospermum scoparium* ist Neuseeland, wo die Pflanze ubiquitär vorkommt. Des Weiteren finden sich Populationen auf einigen Inseln Südostasiens sowie vereinzelt im äußersten Südosten Australiens. Die geringen Ansprüche von *Leptospermum scoparium* an den Boden und die hohe Variabilität bezüglich klimatischer Ansprüche begünstigen die Ausbreitung. Durch Anpassung entstandene, morphologisch und anatomisch differierende Ökotypen ermöglichen dieser Art das Besiedeln klimatisch unterschiedlicher Standorte von der Küste bis in subalpine Regionen [PORTER et al., 1998]. Dies spiegelt sich auch im Habitus dieser ausdauernden, immergrünen Holzpflanze wider, welcher von niedrigen, dicht verzweigten Sträuchern bis hin zu 5 m hohen Bäumen reicht. Die wechselständigen, keilförmig zugespitzten Blätter sind linear-lanzettlich bis linear-elliptisch, gelegentlich eiförmig. Sie riechen aromatisch, haben einen bitteren, herben Geschmack und weisen eine Größe von 9 - 20 mm in der Länge sowie 1,5 - 6 mm in der Breite auf. Die süßlich duftenden, weißen oder hellrosa Einzelblüten erreichen einen Durchmesser bis zu 15 mm und sind durch je 5 freie, alternierend zueinander angeordnete Sepalen (bis 3,5 mm) und Petalen (bis 7 mm) gekennzeichnet. Aus dem fünfblättrigen unterständigen Gynoeceum entwickelt sich eine holzige Kapsel, aus welcher nach Reifung zahlreiche federleichte Samen ausgestreut werden. Während der aus dem Griechischen stammende Gattungsname („leptos“ = dünn, fein und „sperma“ = Samen) darauf Bezug nimmt, spiegelt der deutsche Name „Südseemyrte“ die Heimat und die Verwandtschaft (Familie der Myrtaceae) dieser Pflanze wider. Andere gebräuchliche Namen für *Leptospermum scoparium* sind „Red Manuka“, „Red Tea Tree“ sowie „Kahikatoa“, eine von den Maori verwendete Bezeichnung.

A Einleitung

Tabelle 2: Natürliches Vorkommen von Flaveson

Art*	Konzentration [%]**	Literatur
<i>Leptospermum grandiflorum</i>	keine Angabe	PENFOLD (1921)
<i>Eucalyptus decorticans</i> Maiden	5,6	BICK et al. (1965)
<i>Leptospermum flavescens</i> Smith	2,1	BICK et al. (1965)
<i>Leptospermum lanigerum</i> (Ait.) Sm. (Chemische Varietäten: „Green leaf“ and „Silver Leaf“)	Spuren	HELLYER und PINHEY (1966)
<i>Leptospermum flavescens</i> var. <i>grandiflora</i> (Lodd.) Benth.		
<i>Eucalyptus oblonga</i> D.C.	Spuren	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden	13,0	BOLAND et. al. (1991)
<i>Leptospermum scoparium</i> J. R. et G. Forst. (Populationen aus Neuseeland und Australien)	0,1 - 8,3 (geographisch unterschiedlich)	PERRY et al. (1997)
<i>Callistemon viminalis</i> (Sol. ex Gaertner) G.-Don ex Loudon	Spuren	BROPHY et al. (1997)
<i>Leptospermum scoparium</i> (Manex Oil®)	4,9	PORTER und WILKINS (1998)
<i>Leptospermum glabrescens</i> N. A. Wakef.	2,0 – 4,0	BROPHY et al. (1998)
<i>Hypericum japonicum</i>	keine Angabe (acetonlösliche Fraktion eines Hexanextraktes)	HU et al. (2000)
<i>Leptospermum scoparium</i> J. R. et G. Forst.	1,3 – 4,8	CHRISTOPH (2001)
<i>Leptospermum polygalifolium</i> subsp. <i>polygalifolium</i> (syn. <i>Leptospermum flavescens</i>)	keine Angabe (ethanolischer Extrakt und Chloroformextrakt des Rückstandes)	MUSTAFA et al. (2003)
<i>Eucalyptus globulus</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<i>Eucalyptus viminalis</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<p>* Botanische Bezeichnung wie in der Veröffentlichung angegeben</p> <p>** prozentuale Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf den Gehalt im ätherischen Öl</p>		

4.2.3 Isoleptospermon

Isoleptospermon wird – in mit Flaveson vergleichbaren Quantitäten – vorrangig in *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst. gefunden (**Tab. 3**). Eine Beschreibung dieser Pflanzenart ist unter 4.2.2 zu finden.

Tabelle 3: Natürliches Vorkommen von Isoleptospermon

Art*	Konzentration [%]**	Literatur
<i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden	3,0	BOLAND et al. (1991)
<i>Leptospermum scoparium</i> J.R. et G. Forst. (Populationen aus Neuseeland und Australien)	0,1 – 5,3 (geographisch unterschiedlich)	PERRY et al. (1997)
<i>Leptospermum scoparium</i> (Manex Oil®)	4,6	PORTER und WILKINS (1998)
<i>Eucalyptus grandis</i>	keine Angabe	VAN KLINK et al. (1999)
<i>Leptospermum scoparium</i> J. R. et G. Forst.	1,4 – 4,4	CHRISTOPH (2001)
<i>Leptospermum polygalifolium</i> subsp. <i>polygalifolium</i> (syn. <i>Leptospermum flavescens</i>)	keine Angabe (ethanolischer Extrakt und Chloroformextrakt des Rückstandes)	MUSTAFA et al. (2003)
<p>* Botanische Bezeichnung wie in der Veröffentlichung angegeben</p> <p>** prozentuale Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf den Gehalt im ätherischen Öl</p>		

4.2.4 Leptospermon

Die natürliche Verbreitung von *Xanthostemon chrysanthus* F. Muell., in dessen Öl Leptospermon in einer Konzentration von ca. 90% gefunden wurde (**Tab. 4**), erstreckt sich von den küstennahen Regenwäldern im Nordosten Australiens über die malaiische Inselgruppe bis nach Neukaledonien. Die Größe der immergrünen Holzpflanze variiert von verzweigten Sträuchern bis zu 20 m hohen Bäumen. Die ledrigen, gegenständigen Blätter sind linear-lanzettlich bis linear-elliptisch und erreichen eine Länge von bis zu 15 cm. Das auffälligste Merkmal sind die von zahlreichen (bis zu 100) gelben Stamina dominierten hellgelben Blüten, welche in Büscheln an den Zweigenden angeordnet sind. Darauf nimmt der Gattungsname Bezug; er setzt sich aus den beiden griechischen Worten „xanthos“ (gelb) und „stemon“

A Einleitung

(Stamen) zusammen. Das artspezifische Epitheton „chrysanthus“ leitet sich von „chrysos“ (Gold) und „antho“ (Blüte) ab. Ein anderer gebräuchlicher Name ist „Golden Penda“. Charakteristisch sind die hölzernen, kugelförmigen Kapselfrüchte, welche nach der Reifung durch Aufplatzen wenige flache Samen hervorbringen.

Tabelle 4: Natürliches Vorkommen von *Leptospermon*

Art*	Konzentration [%]**	Literatur
<i>Leptospermum flavescens</i>	0,2 – 14,0	PENFOLD (1921)***
<i>Leptospermum scoparium</i>	7,2 – 11,0	BRIGGS et al. (1938)***
<i>Leptospermum scoparium</i>	2,8	GARDNER (1925)***
<i>Leptospermum ericoides</i> („manuka-rauriki“) syn.: <i>Kunzea ericoides</i>	0,9 – 25,0	JOHNSON und SHORT (1923)***
<i>Leptospermum scoparium</i>	8,0	SHORT (1926)***
<i>Eucalyptus michaeliana</i> Cabbage	Spuren	HELLYER und MCKERN (1963)
<i>Xanthostemon chrysanthus</i> F. Muell.	90,0	BICK et al. (1965)
<i>Eucalyptus decorticans</i> Maiden	8,4 (im isolierten Komplex)	BICK et al. (1965)
<i>Leptospermum flavescens</i>	3,9 (im isolierten Komplex)	BICK et al. (1965)
<i>Leptospermum lanigerum</i> (Ait.) Sm. (Chemische Varietäten: „Green leaf“ and „Silver Leaf“)	Spuren	HELLYER und PINHEY (1966)
<i>Leptospermum flavescens</i> var. <i>grandiflora</i> (Lodd.) Benth. <i>Leptospermum lanigerum</i> (Ait.) Sm.	Spuren	HELLYER und PINHEY (1966)
<i>Leptospermum flavescens</i> Smith	5,0	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus nitens</i> Maiden	1,0	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus notabilis</i> Maiden	0,5	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus oblonga</i> D.C. (syn.: <i>Eucalyptus sparsifolia</i>)	Spuren	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus phaeotricha</i> Blakely & McKie	Spuren	HELLYER (1968)
<i>Melaleuca nodosa</i> Sm.	Spuren	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus froggatti</i> Blakely	Spuren	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus caliginosa</i> Blakely & McKie	Spuren	HELLYER (1968)
<i>Eucalyptus nigra</i> R. Baker		BOLAND et. al. (1991)
<i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden	24,0	BOLAND et. al. (1991)
<i>Callistemon viminalis</i> (Sol. Ex Gaertner) G.-Don ex Loudon	Spuren	BROPHY et al. (1997)

Art*	Konzentration [%]**	Literatur
<i>Leptospermum scoparium</i> J.R. et G. Forst. (Populationen aus Neuseeland und Australien)	0,5 – 18,9 (geographisch unterschiedlich)	PERRY et al. (1997)
<i>Kunzea ericoides</i> New Zealand <i>Kunzea ericoides</i> Australia <i>Kunzea flavescens</i> <i>Kunzea pauciflora</i> <i>Kunzea sinclairii</i>	bis 1,0	PERRY et al. (1997)
<i>Kunzea ericoides</i> x <i>Kunzspermum hirakimata</i>	1,3	PERRY et al. (1997)
<i>Leptospermum scoparium</i> (Manex Oil®)	15,5	PORTER und WILKINS (1998)
<i>Leptospermum glabrescens</i> N. A. Wakef.	16,0 – 30,0	BROPHY et al. (1998)
<i>Leptospermum scoparium</i> J. R. et G. Forst.	8,7 – 19,4	CHRISTOPH (2001)
<i>Leptospermum polygalifolium</i> subsp. <i>polygalifolium</i> (syn. <i>Leptospermum flavescens</i>)	keine Angabe (ethanolischer Extrakt und Chloroformextrakt des Rückstandes)	MUSTAFA et al. (2003)
<i>Eucalyptus globulus</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<i>Eucalyptus strzeleckii</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<i>Eucalyptus ovata</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<i>Eucalyptus viminalis</i>	keine Angabe	MOORE et. al. (2004)
<p>* Botanische Bezeichnung wie in der Veröffentlichung angegeben</p> <p>** prozentuale Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf den Gehalt im ätherischen Öl</p>		
<p>In den mit *** gekennzeichneten Veröffentlichungen wird noch der ursprünglich verwendete Name „Leptospermol“ gebraucht. Dieser wurde nach Erhalt neuer struktureller Erkenntnisse [Short, 1926] in „Leptospermon“ abgeändert [Briggs, Penfold et al., 1938].</p>		

Eine weitere Möglichkeit, Leptospermon aus natürlichen Ressourcen zu gewinnen, bietet die Art *Leptospermum glabrescens* N. A. Wakef. („smooth tea tree“), in deren Öl Konzentrationen von bis zu 30% nachgewiesen werden konnten. Die Art *Leptospermum ericoides* („white tea tree“) wurde aufgrund androecischer Merkmale der Gattung *Kunzea* zugeordnet [CONNOR & EDGAR, 1987], das ätherische Öl dieser Pflanze ist unter dem Namen „Kanukaöl“ bekannt. Die darin gefundenen Lepto-

spermon-Konzentrationen von bis zu 25% [JOHNSON & SHORT, 1923] konnten in neueren Publikationen nicht bestätigt werden [PERRY et al., 1997 & CHRISTOPH, 2001], Leptospermon wurde nicht oder in Konzentrationen bis 1% nachgewiesen.

4.2.5 Papuanon

Das natürliche Vorkommen von Papuanon wurde bisher nur für *Eucalyptus papuana* F. v. Mueller beschrieben (**Tab. 5**), eine ausschließlich in Australien und Papua-Neuguinea vorkommende Pflanzenart. Der 9 - 18 m hohe Baum besitzt eine auffällig kalkweiße, gepudert wirkende Rinde, welche sich in kurzen Strähnen oder polygonalen Stücken schält. Ihr verdankt der Baum den Beinamen „Ghost Gum“. (Cave: In den Aborigines-Sprachen Uw Olkola, Uw Oygangand und Pakanh findet man für *Eucalyptus papuana* und *Eucalyptus confertiflora* die gleiche Bezeichnung).

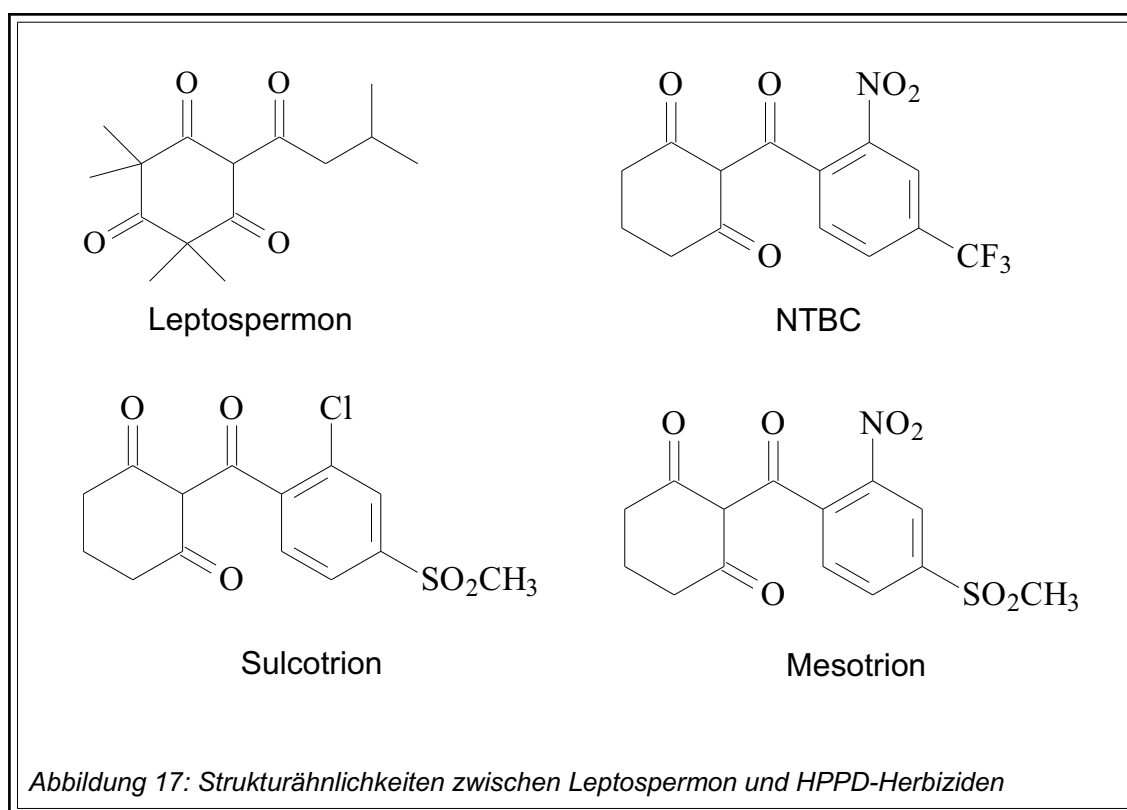
Tabelle 5: Natürliches Vorkommen von Papuanon

Art*	Konzentration [%]**	Literatur
<i>Eucalyptus papuana</i> F. v. Muell. syn: <i>Corymbia dallachiana</i> (Benth.) K.D. Hill and L.A.S. Johnson	26,0 – 38,0	van Klink, Brophy et al. (1999)
<p>* Botanische Bezeichnung wie in der Veröffentlichung angegeben</p> <p>** prozentuale Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf den Gehalt im ätherischen Öl</p>		

Die juvenilen Blätter sind oval bis lanzettlich, die Zwischenblätter linear-lanzettlich, ganzrandig, 24 cm lang und 5 mm breit. Die Form der adulten Blätter reicht von schmal-lanzettlich bis breit-lanzettlich bei einer Länge von 8 - 18 cm. Bis zu 7 weiße oder cremefarbene Einzelblüten bilden den doldenförmigen Blütenstand. Die dreifächrige, zylindrisch bis ovale Kapsel Frucht bringt rotbraune, abgeflachte Samen ovaler Form hervor.

4.3 Triketone als Pestizide

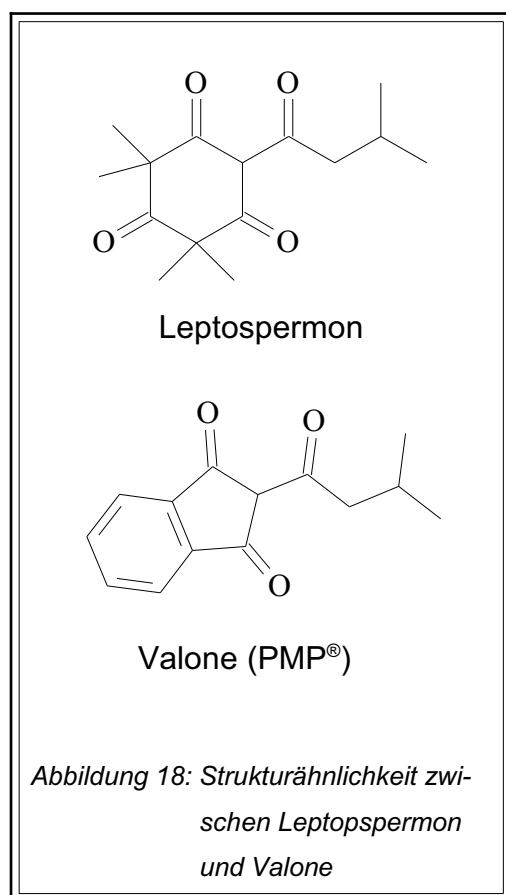
Herbizide stellen eine Untergruppe der Pestizide dar und umfassen Substanzen, mit deren Einsatz selektiv (Selektivherbizid) oder nicht selektiv (Totalherbizid) wirtschaftlich uninteressante Begleitkräuter abgetötet werden sollen, ohne die Nutzpflanzen dabei zu schädigen. Bei den aus natürlichen Verbindungen entwickelten Herbiziden handelt es sich in der Regel um relativ einfache Moleküle, da sie für den kommerziellen Einsatz leicht und kostengünstig synthetisierbar sein müssen [DAYAN et al., 1999]. Das im ätherischen Öl von *Leptospermum scoparium* vorkommende Triketon Leptospermon bildete den Ausgangspunkt zur Entwicklung der sogenannten HPPD-Herbizide (HPPD = *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase). **Abbildung 17** zeigt die Strukturähnlichkeiten zwischen Leptospermon und den HPPD-Inhibitoren NTBC = 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexan-1,3-dion, Sulcotrion (Mikado®) und Mesotrion (Callisto®), wobei Letztere bevorzugt in Maiskulturen als Herbizide gegen dikotyle Pflanzen angewendet werden. Bei der *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase



handelt es sich um ein Enzym, welches von Pflanzen für die Biosynthese von Plastochinonen, Cofaktoren der Carotenoid-Biosynthese, benötigt wird. Carotinoide sind akzessorische Pigmente im Dienste der Photosynthese und übernehmen zusätzlich

eine wichtige Schutzfunktion. Sie verhindern die photoinduzierte Bildung der im Sonnenlicht vermehrt auftretenden aggressiven Formen von molekularem Sauerstoff und schützen so das Chlorophyll vor photooxidativer Zerstörung [SEITZ et al., 2003].

Pflanzen, die mit HPPD-Herbiziden behandelt werden, akkumulieren außerdem in verstärktem Maße Tyrosin, welches in hohen Konzentrationen als Zellgift wirkt und zu einer Wuchsdepression führt. Hinzu kommt eine Hemmung der natürlichen Synthese von α -Tocopherolen, welche ebenfalls dem Schutz des Blattes vor zu starker Sonneneinstrahlung dienen. Aus diesen phytotoxischen Effekten resultiert eine oxidative Chlorophyllzerstörung, die sich besonders im meristematischen Gewebe bemerkbar macht und zum Ausbleichen (Weißchlorosen) und „Abbrennen“ der behandelten Pflanzen führt. Die Hemmung der HPPD, welche mit einer Tyrosin-Akkumulation sowie einer reduzierten Carotinoid- bzw. α -Tocopherol-Synthese einhergeht, wird auch als „triketone effect“ bezeichnet [PRISBYLLA et al., 1993 und LEE et al., 1996 und LEE et al., 1998].



Als weitere Eigenschaft des Leptospermons ist dessen anthelmintische Wirkung zu nennen [LIS-BALCHIN, 2000], erklärbar mit seiner Strukturähnlichkeit zu den aus *Dryopteris*-Arten isolierten Phloroglucinen. Diese wurden früher therapeutisch zur Bekämpfung von Bandwürmern beim Menschen eingesetzt.

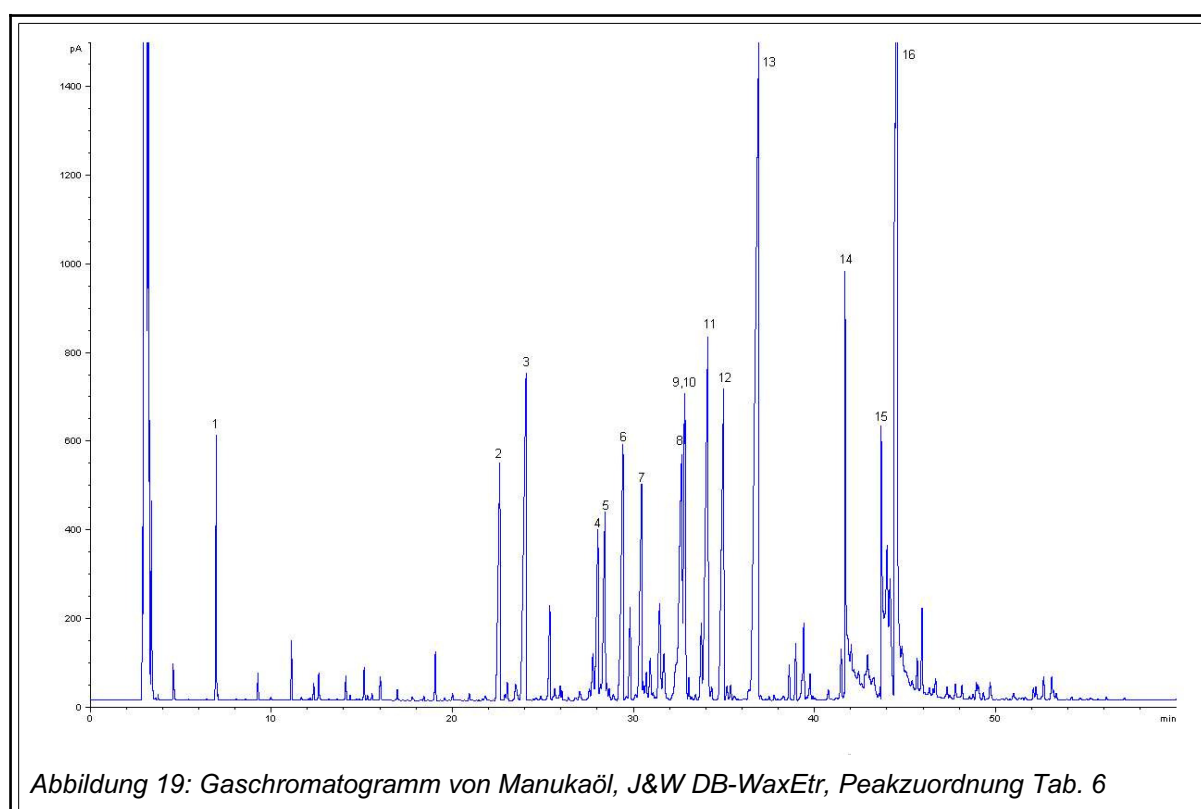
Strukturähnlichkeiten zeigt auch das Pestizid Valone (PMP® = 2-Isovalerylindan-1,3-dion), welches in Form von Fraßködern als Rodentizid eingesetzt wird und dessen Wirkung auf einer Blutgerinnungshemmung beruht (Abb. 18).

B Ergebnisse

1 Isolierung des Triketon-Komplexes aus Manukaöl

1.1 Problemstellung

Bei den β -Triketonen, die im Rahmen dieser Arbeit auf antimikrobielle Wirksamkeit getestet werden sollten, handelt es sich um Komponenten ätherischer Öle, die in isolierter Form nicht käuflich zu erwerben sind. Aus diesem Grund sollten die β -Triketone mit Hilfe einer geeigneten Methode aus dem jeweiligen ätherischen Öl isoliert werden, wobei sich das besondere Augenmerk auf eine schnelle und einfache Durchführung bei größtmöglicher Reinheit und Ausbeute richtete. Als Ausgangsbasis für diesbezügliche Versuche bot sich das aus *Leptospermum scoparium* gewonnene Manukaöl (siehe Kapitel 2.3.2) an, welches in unterschiedlichen Qualitäten relativ



preisgünstig im Handel erhältlich ist. Es enthält die β -Triketone Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon. In der Summe machen sie 12 - 29% des Öls aus und werden im weiteren Verlauf der Arbeit als „Triketon-Komplex“ bezeichnet. Das Konzentrationsverhältnis der Triketone untereinander schwankt von Charge zu Charge, folgt aber in der Regel einem Verhältnis von 1:1:3 [CHRISTOPH, 2001]. **Abbil-**

dung 19 zeigt das Gaschromatogramm eines repräsentativen Manukaöls. Die Sesquiterpenkohlenwasserstoffe stellen mit 60-70% den höchsten Anteil am Gesamtöl (**Tab. 6**). Charakteristisch für die β -Triketone (**Peak-Nr. 14, 15 und 16 in Abb. 19**) im Gaschromatogramm sind ihre hohe Retentionszeit sowie ein ausgeprägtes Peak-Tailing, das insbesondere bei GC-Säulen mit polarer stationärer Phase zu beobachten ist.

Tabelle 6: Komponenten des Manukaöls

<i>Nr.</i>	<i>Komponente</i>	<i>RI</i>	<i>Nr.</i>	<i>Komponente</i>	<i>RI</i>
1	α -Pinen	1021	9	β -Selinen	1724
2	α -Cubeben	1460	10	α -Selinen	1728
3	α -Copaen	1494	11	δ -Cadinen	1756
4	β -Caryophyllen	1600	12	Cadina-1,4-dien	1782
5	Aromadendren	1608	13	(-)-trans-Calamenen	1835
6	(-)-Cadina-3,5-dien	1635	14	Flaveson	1986
7	(+)- δ -Amorphen	1662	15	Isoleptospermon	2049
8	α -Muurolen	1716	16	Leptospermon	2078

Da der Triketongehalt in Handelsölen stark schwankt, wurden für die Isolierungen des Triketon-Komplexes Manukaöle von elf verschiedenen Anbietern zu gleichen Teilen gemischt. **Tabelle 7** führt die Konzentrationen der einzelnen Triketone in den verwendeten Handelsölen auf (Angabe in unkorrigierten Peakflächenprozenten). Der durchschnittliche Anteil der Triketone Flaveson, Leptospermon und Isoleptospermon am Gesamtöl betrug in der Summe 21,9%.

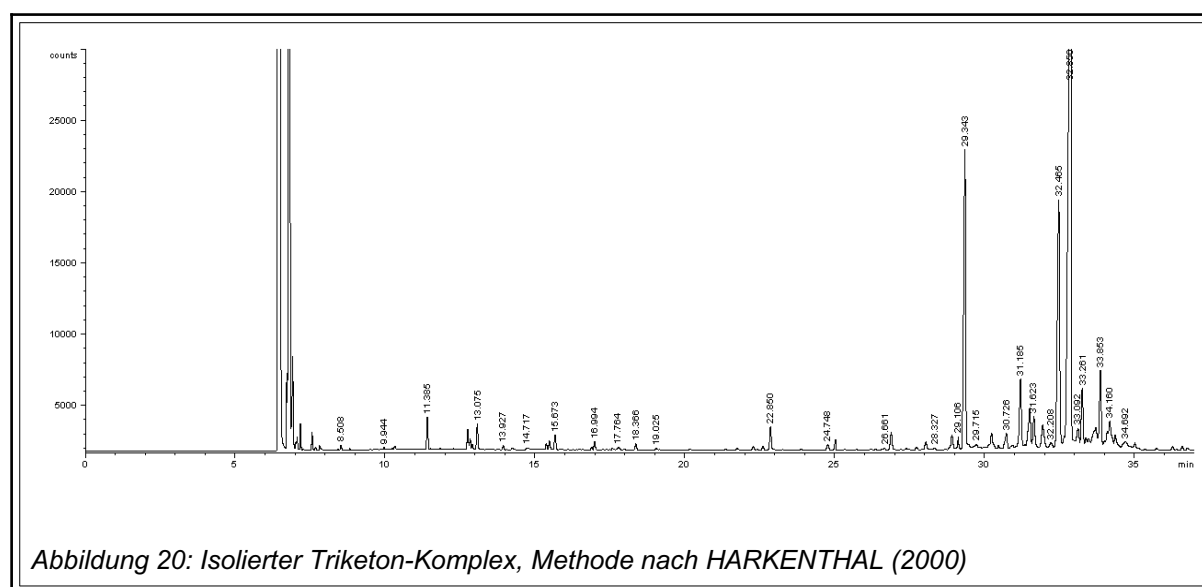
Nach der Isolierung des Triketon-Komplexes sollte dieser dann in seine Komponenten aufgetrennt werden, mit dem Ziel, mehrere Gramm der einzelnen Triketone für die nachfolgend geplanten Untersuchungen zu erhalten.

Tabelle 7: Konzentration der Triketone in ausgewählten Handelsölen (%)

Handelsöl	Fläche (Area) in %			
	Flaveson	Isoleptospermon	Leptospermon	Triketon-Komplex im Gesamtöl
M01	3,3	4,2	15,9	23,4
M02	3,1	4,4	15,5	23,0
M03	2,5	2,5	10,7	15,7
M04	2,0	2,6	10,7	15,3
M05	3,2	4,6	18,4	26,2
M06	4,7	4,5	19,4	28,6
M07	1,2	1,4	8,9	11,5
M08	4,7	3,3	16,7	24,7
M09	3,5	3,3	15,6	22,4
M10	4,0	4,8	17,2	26,0
M11	4,0	4,4	15,4	23,8
				Ø 21,9

1.2 Säulenchromatographie

Für die Isolierung des Triketon-Komplexes aus Manukaöl wurde zunächst die von HARKENTHAL (2000) vorgeschlagene Methode hinsichtlich ihrer Eignung überprüft. Hierbei findet eine mit Hexan konditionierte Kieselgelsäule Verwendung. Nach Auf-



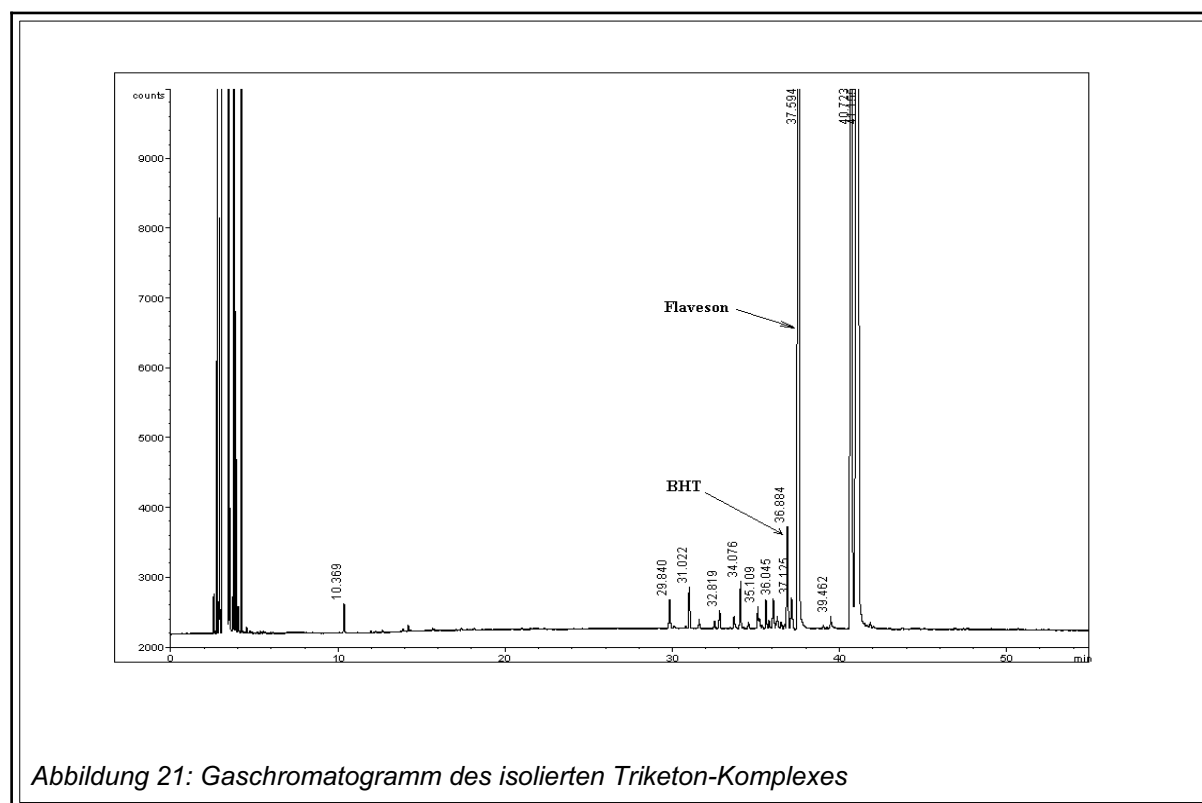
gabe des Manukaöls wird solange mit Hexan eluiert, bis keine Terpene mehr im Eluat nachweisbar sind. Anschließend werden die auf dem Kieselgel verbliebenen Triketone mit Methanol eluiert und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt.

Die vorgeschlagene Methode konnte nachvollzogen und der Triketon-Komplex isoliert werden. Das entsprechende Gaschromatogramm ist in **Abbildung 20** dargestellt. Die Methode erwies sich vor allem im Hinblick auf die oben angeführten Ziele als wenig geeignet. Insbesondere das Herstellen der Kieselgelsäule, deren Konditionierung sowie der Elutionsvorgang selbst erfordern einen hohen Zeitaufwand und die sehr geringe Ausbeute macht diese Methode unter dem Aspekt der Kosten-Nutzen-Relation zusätzlich wenig interessant. Nachteilig war überdies, dass bei der Elution mit Hexan das Triketon Flaveson bereits coeluiert wird und es somit teilweise verloren geht. Des Weiteren ist es nicht gelungen, die Konzentration unerwünschter Nebenkompenten auf weniger als 30% zu reduzieren.

1.3 Isolierung durch Extraktion

In der Literatur [u.a. COURTNEY et al., 1983] wird eine weitere, relativ leicht durchzuführende Vorgehensweise zur Isolierung des Triketon-Komplexes vorgeschlagen. Dazu wird das Manukaöl zunächst in Diethylether gelöst und die Etherphase mit wässriger Natriumcarbonat-Lösung extrahiert. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit konzentrierter Salzsäure erfolgt ein zweiter Extraktionsschritt mit Diethylether. Die Etherphase wird über Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Triketon-Komplex liegt dann als gelblich ölige Flüssigkeit vor.

Die beschriebene Methode konnte nachvollzogen werden und erwies sich besonders im Hinblick auf die Ausbeute und den Zeitaufwand als gut geeignet. Sie musste aber insofern modifiziert werden, als die Verwendung großer Mengen Diethylether zu einer unerwünschten Anreicherung des darin befindlichen Stabilisators BHT (Butylhydroxytoluol bzw. 2,6-di-tert-Butyl-4-methylphenol) im Triketon-Komplex führt. Diese Gefahr bestand vor allem bei der Isolierung großer Triketon-Komplex-Mengen. Um

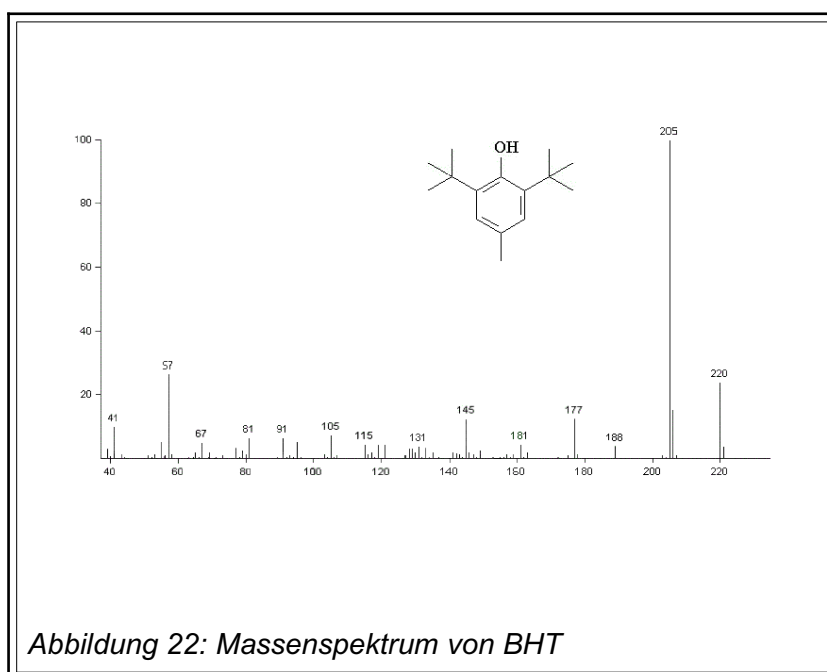


zu überprüfen, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß eine Anreicherung stattfindet, wurden zunächst ca. 10g Triketon-Komplex aus Manukaöl isoliert. Die gaschromatographische Analyse des Triketon-Komplexes zeigte, dass der Komplex neben den drei gewünschten Triketonen eine weitere Verbindung in Konzentrationen bis zu 1,2% enthält. Diese stellt sich im Gaschromatogramm (**Abb. 21**) immerhin als vierstärkstes Signal mit einem R_i -Wert von 1511 ($R_i = 36,884$ min) dar. Bei Überprüfung der Verbindung mit Hilfe der Massenspektroskopie konnte diese als BHT identifiziert werden. **Abbildung 22** zeigt das erhaltene Massenspektrum und die zugehörige Strukturformel. Wie erwartet handelt es sich dabei um eine Kontamination aus dem verwendeten Diethylether. Das synthetische Antioxidations- und Konservierungsmittel (E321) wird zur Stabilisierung des Diethylethers in Konzentrationen von 5 bis 10 ppm eingesetzt und reichert sich offenbar bei der Isolierung größerer Mengen des Triketon-Komplexes an.

Bei der weiteren Aufarbeitung des Komplexes mit dem Ziel, das Flaveson in reiner Form zu isolieren, ließ sich BHT nicht abtrennen. Der Versuch, mit Hilfe einer fraktionierten Destillation unter Ausnutzung einer Siedepunktdifferenz zwischen BHT und

Flaveson ($R_f = 1528$, $R_t = 37,594$ min) eine Abtrennung zu erreichen, schlug ebenfalls fehl. In der erhaltenen Fraktion wurden sowohl Flaveson als auch BHT gefunden. Bei einem Druck von 10 Torr weist BHT einen Siedepunkt von 131°C und Flaveson einen Siedepunkt von 134°C auf. Die Siedepunktdifferenz von 3°C ist zu gering, um BHT und Flaveson mit Hilfe einer Kugelrohrdestillation zu trennen.

Für den weiteren Verlauf der Isolierungsversuche war es zwingend erforderlich, das auch bei hohen Temperaturen stabile BHT abzutrennen, weil es ebenfalls pharmakologische Eigenschaften besitzt (u.a. KUPP et al., 1985 und VELIKONJA et al., 1987). Da eine Verwendung von nicht stabilisiertem Diethylether aufgrund möglicher Peroxidbildung und daraus resultierendem Gefahrenpotential vermieden werden sollte, wurde dieser durch das in der Handhabung weniger problematische Ethylacetat ersetzt.



Im Vergleich zur Extraktion mit Diethylether wird bei der Verwendung von Ethylacetat als Extraktionsmittel deutlich mehr Zeit bis zur Phasentrennung benötigt. Dies zeigt sich insbesondere im zweiten Extraktionsschritt und ist auf die deutlich geringeren Polaritätsunterschiede zwischen Ethylacetat-Phase / wässriger Phase im Vergleich zur Diethylether-Phase / wässriger Phase zurückzuführen. Als entscheidender Vorteil erwies sich jedoch die Reinheit des mit Ethylacetat isolierten Triketon-Komplexes. **Abbildung 23** zeigt vergleichend die Chromatogramme der Triketon-Komplexe, welche mit den zwei unterschiedlichen Extraktionsmitteln erhalten wurden. Es wird deutlich, dass unerwünschte Begleitsubstanzen, die im Diethylether-Extrakt vor allem im

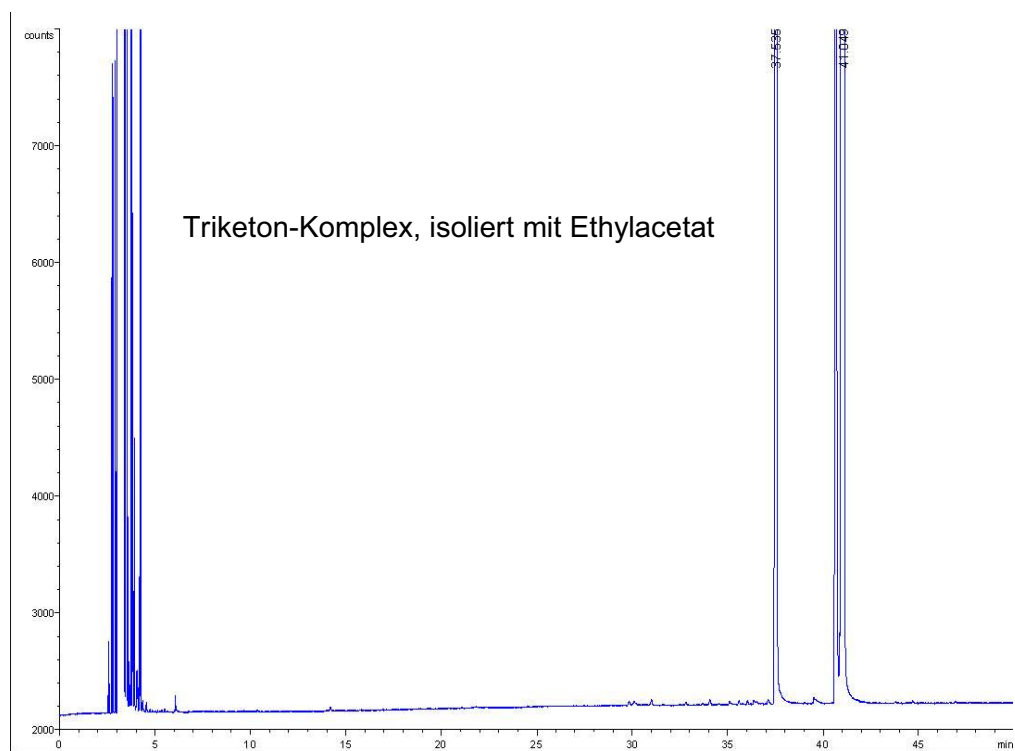
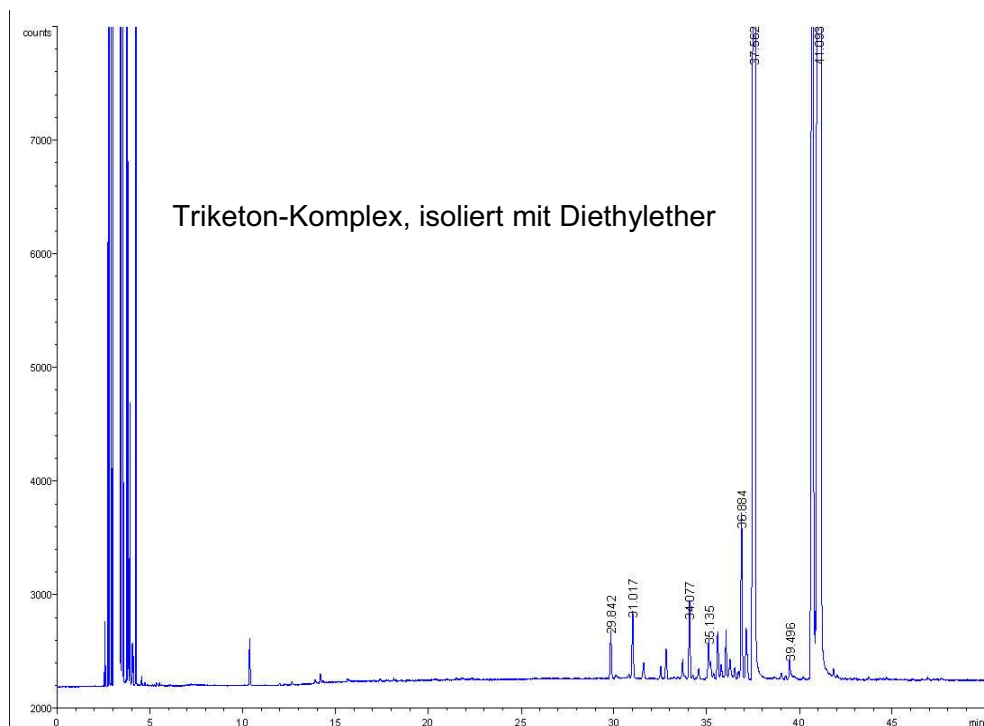


Abbildung 23: Gaschromatographischer Vergleich der Extraktion mit Diethylether und Ethylacetat

B Ergebnisse

Bereich der Retentionszeiten von 29 bis 40 min auftreten und insgesamt 6,3% betragen, im Ethylacetat-Extrakt mit 1,1% erheblich reduziert sind.

Um zu überprüfen, ob die Variation des Extraktionsmittels Auswirkungen auf die Qualität und vor allem auf die Ausbeute des isolierten Triketon-Komplexes hat, wurden sowohl mit Diethylether als auch mit Ethylacetat Extraktionen durchgeführt. Ausgehend von je 5 mL Manukaöl-Gemisch wurden zunächst zehn Extraktionen mit jedem der beiden Extraktionsmittel durchgeführt und die daraus isolierten Triketon-Komplexe gaschromatographisch analysiert. **Tabelle 8** stellt die für die Extraktionen mit Diethylether erhaltenen Werte und die ermittelte durchschnittliche Peakfläche für die einzelnen Triketone sowie deren statistische Auswertung dar.

Tabelle 8: Isolierung des Triketon-Komplexes mit Diethylether (n = 10)

Extraktion	Peakflächen (Area)		
	Flaveson	Isoleptospermon	Leptospermon
1	17983	16045	63235
2	21627	20396	70332
3	20113	18006	67340
4	21270	18654	66961
5	17275	15584	56535
6	19322	16975	57362
7	21060	17183	62109
8	21047	17268	71429
9	20336	17212	67169
10	20751	17349	66853
Mittelwert	20078	17467	64933
relative Standard-abweichung [%]	7,25	7,70	7,76
absoluter Fehler	20078 ± 1381	17467 ± 1276	64933 ± 4782
relativer Fehler [%]	6,88	7,31	7,36

Die Mittelwerte der Peakflächen weisen ein Verhältnis von 1,0 : 0,9 : 3,2 auf und bestätigen die von CHRISTOPH (2001) gemachte Aussage. Die relativen Standardabweichungen liegen im Bereich von 7,25 - 7,76%, so dass die Reproduzierbarkeit der Methode gewährleistet ist.

Die Ergebnisse für die Extraktionen mit Ethylacetat sind in **Tabelle 9** aufgeführt. Das Verhältnis der Triketone untereinander beträgt 1,0 : 0,9 : 3,0 und entspricht – ebenso wie die Standardabweichungen von 7,03 - 7,42% – den Ergebnissen bei der Extraktion mit Diethylether. Bezüglich der Peakflächen der jeweiligen Triketone lässt sich feststellen, dass diese bei der Extraktion mit Ethylacetat im Vergleich zur Extraktion mit Diethylether durchschnittlich um 16 - 26% größer sind. Die Ursache hierfür liegt vor allem im Fehlen der unerwünschten Begleitsubstanzen, welche im Diethyletherextrakt bei Retentionszeiten von 29 bis 40 min auftraten. Durch den Wechsel des Lösungsmittels wurden diese NebenkompONENTEN auf ein Minimum reduziert (**Abb. 23**). Werden die Verunreinigungen in beiden Extrakten bei der Integration nicht berücksichtigt und die Flächen der Triketone miteinander verglichen, lässt sich kein Unterschied feststellen.

Tabelle 9: Isolierung des Triketon-Komplexes mit Ethylacetat ($n = 10$)

Extraktion	Peakflächen (Area)		
	Flaveson	Isoleptospermon	Leptospermon
1	24627	21396	75332
2	27119	23911	80934
3	24746	21409	72220
4	21960	19069	66939
5	22794	20689	69255
6	25127	22021	79391
7	24554	21390	75301
8	28017	24007	83994
9	25202	22056	73011
10	26774	23697	78164
Mittelwert	25092	21965	75454
relative Standardabweichung [%]	7,42	7,11	7,03
absoluter Fehler	25092 ± 1767	21965 ± 1481	75454 ± 5032
relativer Fehler [%]	7,04	6,74	6,67

Die relativen Fehler, die in den **Tabellen 8** und **9** für die einzelnen Triketone angegeben und als das Verhältnis von absolutem Fehler zum Mittelwert definiert sind, weisen sowohl bei der Diethylether- als auch der Ethylacetat-Extraktion ähnliche

Werte auf. Sie geben Auskunft über die Unsicherheit des Messergebnisses, wobei interessanterweise festzustellen ist, dass diese bei der Extraktion mit Diethylether von Flaveson über Isoleptospermon zum Leptospermon zunehmen. Beim Ethylacetat-Extrakt hingegen verhält es sich genau umgekehrt. Eine Erklärung für diesen Umstand konnte nicht gefunden werden, möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen der Polarität des Extraktionsmittels und der zu extrahierenden Substanz.

Die Ausbeute an Triketon-Komplex bei Einsatz von 5 mL Manukaöl-Gemisch betrug im Mittel 1,02g für die Diethylether- und 0,99g für die Ethylacetat-Extraktionen. Bei der Extraktion mit Ethylacetat muss somit im Schnitt eine Reduktion der Ausbeute von 3% in Kauf genommen werden, was aber durch die höhere Reinheit des Triketon-Komplexes kompensiert wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich der Austausch von Diethylether als Extraktionsmittel gegen Ethylacetat als praktikabel erwiesen hat. Die beim Einengen notwendige höhere Wärmebelastung hat keine Veränderung der Komplex-Zusammensetzung zur Folge. Die Ausbeute ist praktisch gleich, der Vorteil besteht in einer deutlich reduzierten Coelution von Nebenkomponten und daraus resultierend einer verbesserten Reinheit. Der Nachteil einer verlängerten Extraktionsdauer fällt dagegen kaum ins Gewicht. Die Extraktion mit Ethylacetat wurde für sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Triketon-Isolierungen eingesetzt. Die Anwendbarkeit dieser Isolierungsmethode auf andere Triketon-enthaltende ätherische Öle kann nur angenommen werden, da keine weiteren Öle für diesbezügliche Untersuchungen zur Verfügung standen.

2 Isolierung einzelner Triketone aus dem Triketon-Komplex

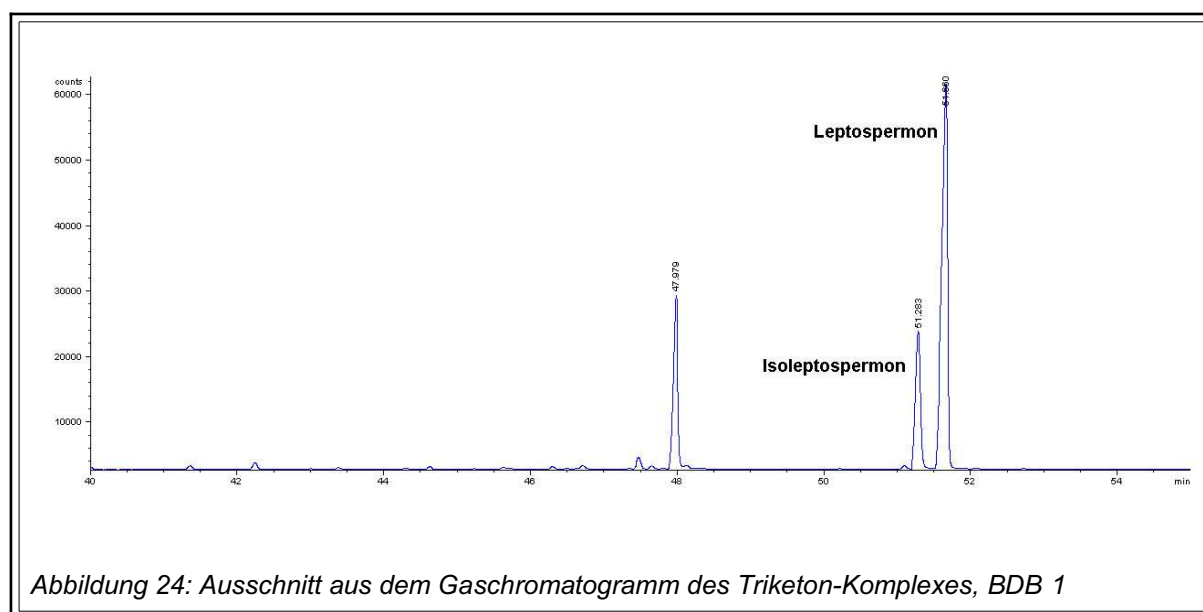
2.1 Kugelrohrdestillation

Der Triketon-Komplex des Manukaöls sollte im weiteren Verlauf mit Hilfe einer geeigneten Methode in seine Einzelkomponenten Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon getrennt werden. Dabei bot sich die fraktionierte Destillation an, die unter

Ausnutzung der unterschiedlichen Siedepunkte aller Einzelkomponenten eine Auftrennung erreicht. Durch das zusätzliche Anlegen eines Vakuums werden außerdem die jeweiligen Siedepunkte der Einzelkomponenten gesenkt und die thermische Belastung reduziert. In der Literatur sind für die Triketone die folgenden Siedepunkte angegeben:

- Flaveson 134°C bei 10 mm Hg [BICK et al., 1965]
- Isoleptospermon 93°C bei 0,3 mm Hg [ASHURST, 1966]
- Leptospermon 146°C bei 10 mm Hg [BRIGGS et al., 1938 und 1945; GARDNER, 1924]

Die Angaben für Isoleptospermon und Leptospermon bei unterschiedlichen Druckbedingungen erlauben keine Aussage bezüglich einer Siedepunktdifferenz zwischen diesen beiden Triketonen und daraus folgend einer möglichen Trennbarkeit der Isomere. Das Gaschromatogramm des Triketon-Komplexes (stationäre Phase:



BDB - 1), welches ausschnittsweise in **Abbildung 24** dargestellt ist, zeigt die basisliniengetreunten Peaks von Isoleptospermon und Leptospermon. Diese Trennung ließ vermuten, dass die fraktionierte Destillation eine geeignete Möglichkeit zur Auftrennung des Triketon-Komplexes darstellen könnte.

Die relativ kleine Menge an Triketon-Komplex schloss allerdings eine Destillation mit Hilfe herkömmlicher Apparaturen aus. Außerdem war mit sehr geringen Siedepunktdifferenzen (insbesondere bei Leptospermon und Isoleptospermon) zu rechnen, so dass ein Kugelrohrdestillationsgerät der Firma BÜCHI (**Abb. 25**) eingesetzt wurde. Das Gerät besteht aus zwei ineinander liegenden Borosilikatglas-Rohren, wobei die Außenseite des innen liegenden Rohres mit einer elektrisch leitfähigen, transparenten Halbleiterschicht bedampft ist (Heizrohr), die eine direkte Heizung des Ofenraumes gewährleistet.

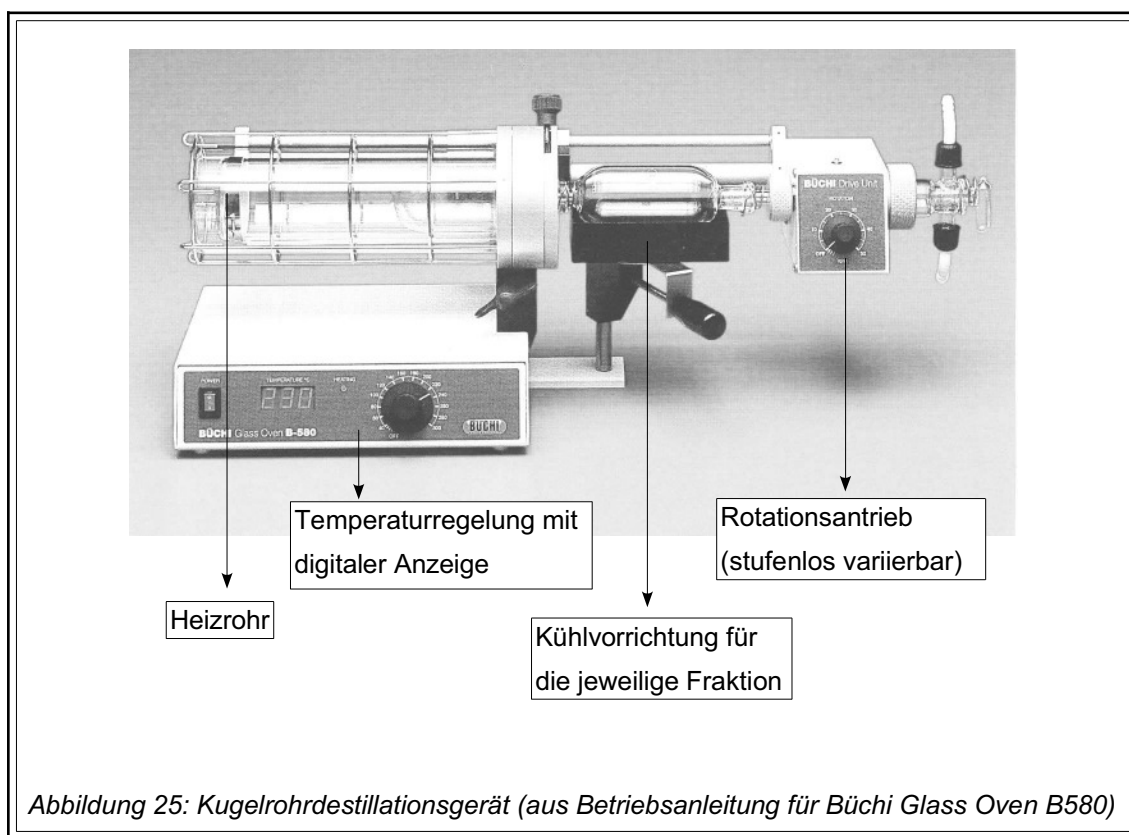
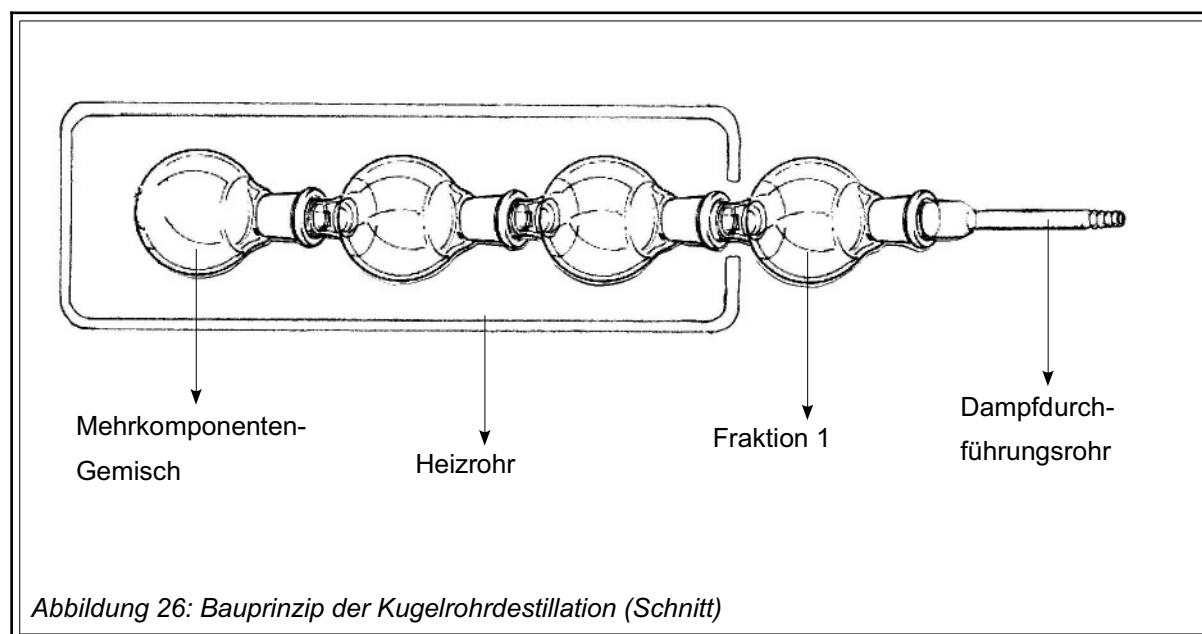


Abbildung 26 zeigt schematisch den Aufbau einer Kugelrohrdestillation. Im Prinzip wird eine Glaskugel, die das zu trennende Gemisch enthält, mit so vielen Glaskugeln verbunden, wie Komponenten in diesem Gemisch vorhanden sind (hier drei). Mit Ausnahme der rechten Glaskugel, in der die erste Fraktion kondensieren soll, werden alle Glaskugeln in das Heizrohr geschoben. Anschließend wird bei rotierendem Kugelrohr die Temperatur in kleinen Intervallen so lange erhöht, bis die Destillation einsetzt. Das rotierende Kugelrohr wird im Verlauf der Destillation Kugel um Kugel aus dem Heizrohr herausgezogen, so dass die jeweils tiefer siedende

Komponente in der außen stehenden rechten Glaskugel kondensiert (in Abbildung 26 = Fraktion 1) und so eine Fraktionierung des Mehrkomponenten-Gemisches erfolgt. Die Destillation einer Fraktion ist beendet, wenn das Volumen in der äußeren Glaskugel nicht mehr zunimmt.



Der "Triketon-Komplex" wurde unverdünnt in die linke Glaskugel überführt und anschließend nach Vorschrift destilliert. Zum Schutz der Substanzen vor zu hoher thermischer Belastung wurde außerdem ein Vakuum von 10 - 20 mbar angelegt. Nach abgeschlossener Vakuumdestillation, d.h. nach fast vollständigem Verschwinden des Triketon-Komplexes aus der linken Glaskugel, lagen zwei Fraktionen vor. Die gaschromatographische Analyse ergab, dass es sich zum einen um Flaveson (Fraktion 1) und zum anderen um ein Gemisch aus Isoleptospermon und Leptospermon (Fraktion 2) handelte. Auch wiederholte Destillationsversuche, in denen die Destillationszeit verlängert und die Temperaturerhöhung (in Schritten von 1°C) besonders langsam vollzogen wurde, erbrachten keine weitere Auftrennung der zweiten Fraktion.

Um zu prüfen, ob Veränderungen einzelner Destillationsparameter das Trennergebnis beeinflussen, wurde die Auswirkung folgender Modifikationen auf das Destillationsergebnis untersucht:

- Temperierung der außen stehenden Glaskugel auf 0°C
- Variation der Rotationsgeschwindigkeit
- Variation der eingesetzten Triketon-Komplex-Menge
- Variation der Glasgefäß-Form

Für die Temperierung der außen stehenden Glaskugel auf 0°C wurde Eis in die Kühlvorrichtung gegeben und die Destillation unter fortwährender Eiskühlung wiederholt. Eine Verbesserung des Trennergebnisses konnte jedoch nicht erreicht werden. Trotzdem wurden alle weiteren im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Destillationen unter Eiskühlung durchgeführt, um den Einfluss wechselnder Raumtemperaturen zu minimieren und standardisierte Bedingungen zu gewährleisten.

Um den Einfluss der Gefäßrotation beurteilen zu können, wurden jeweils drei Destillationen bei Stillstand des Kugelrohres, bei 20 U/min (= Standardbedingung) und bei 50 U/min (= Maximum) durchgeführt. Während die Destillationen bei 20 U/min und bei 50 U/min keine Unterschiede bezüglich der Trennergebnisse und der Ausbeute aufwiesen, kam es bei Stillstand des Kugelrohres neben unveränderter Trennleistung zu einer stark verringerten Destillationsgeschwindigkeit, die sich in einer deutlich reduzierten Destillatmenge pro Zeiteinheit äußerte. Als Ursache hierfür ist das Fehlen der durch die Rotationsbewegung erzwungenen Konvektion anzusehen. Für weitere im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Destillationen wurde eine Rotationsgeschwindigkeit von 20 U/min als Standardbedingung festgelegt.

Für die Durchführung der Kugelrohrdestillation standen zwei Kolbenformen mit verschiedenen Volumina zur Verfügung: die in **Abbildung 26** dargestellten Glaskugeln mit einem Volumen von ca. 25 mL sowie längliche Glaskolben mit einem Volumen von ca. 60 mL. Das reale Fassungsvermögen dieser Glasgefäße von nur 5 mL bzw. 20 mL Flüssigkeit resultiert aus deren horizontaler Anordnung bei der Destillation. Zunächst wurden jeweils drei Destillationen mit je 2 mL Triketon-Komplex unter Verwendung der beiden unterschiedlichen Glasgefäße durchgeführt, anschließend wurde die eingesetzte Triketon-Komplex-Menge variiert. Eine bessere Trennung wurde jedoch nicht erreicht.

Im Ergebnis lässt sich festhalten, dass für die Isolierung von Flaveson aus dem Triketon-Komplex die fraktionierte Destillation mittels Kugelrohr eine gut geeignete Methode darstellt. Das Triketon kann bei 135°C (17 mbar) mit einer Ausbeute von 130 mg (bezogen auf 1g Triketon-Komplex) leicht abgetrennt werden. Für die Auftrennung von Isoleptospermon und Leptospermon reicht die Trennleistung dieses Systems nicht aus, da die Siedepunkte der beiden Isomere zu ähnlich sind, so dass sie bei 170°C (18 mbar) eine gemeinsame Fraktion bilden.

2.2 Niederdruck-Säulenchromatographie

Für die Auftrennung der zwei verbleibenden Komponenten des Triketon-Komplexes, Isoleptospermon und Leptospermon, wurde die Niederdruck-Säulenchromatographie als mögliches Trennverfahren überprüft. Sie eignet sich besonders für chemisch-präparative Trennungen; ihr Trennprinzip beruht auf Adsorptions- oder Verteilungsvorgängen bzw. einem Zusammenwirken beider Phänomene.

Für die Trennversuche wurde als stationäre Phase RP-18-Material gewählt, da es sich in dünnschichtchromatographischen Vorversuchen als am besten geeignet erwies. RP-18 bietet außerdem den Vorteil, dass mit wässrigen Elutionsmitteln gearbeitet werden kann. Sie zeichnet sich durch eine geringere Verdunstung aus, was für offene Systeme wie die Niederdruck-Säulenchromatographie vorteilhaft ist. Die Säule wurde mit dem jeweils gewählten Elutionsmittel konditioniert, wobei alle Elutionsmittel vor ihrer Verwendung für ca. 15 Minuten im Ultraschallbad entgast wurden, um Bläschenbildung auf der Säule und daraus resultierende Trennfehler zu vermeiden. Anschließend wurde die aus der Kugelrohrdestillation erhaltene, mit Methanol verdünnte Fraktion 2 (Isoleptospermon und Leptospermon) auf die Säule gegeben und bei konstanter Flussrate isokratisch eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt, wobei die einzelnen Auffanggefäße in einem Zeitabstand von einer Minute gewechselt wurden. Die Detektion erfolgte durch Absorption im UV-Licht bei 314 nm; der Trennungsverlauf (Intensität des Detektorsignals in Abhängigkeit von der Zeit) wurde mittels eines Flachbettschreibers dokumentiert.

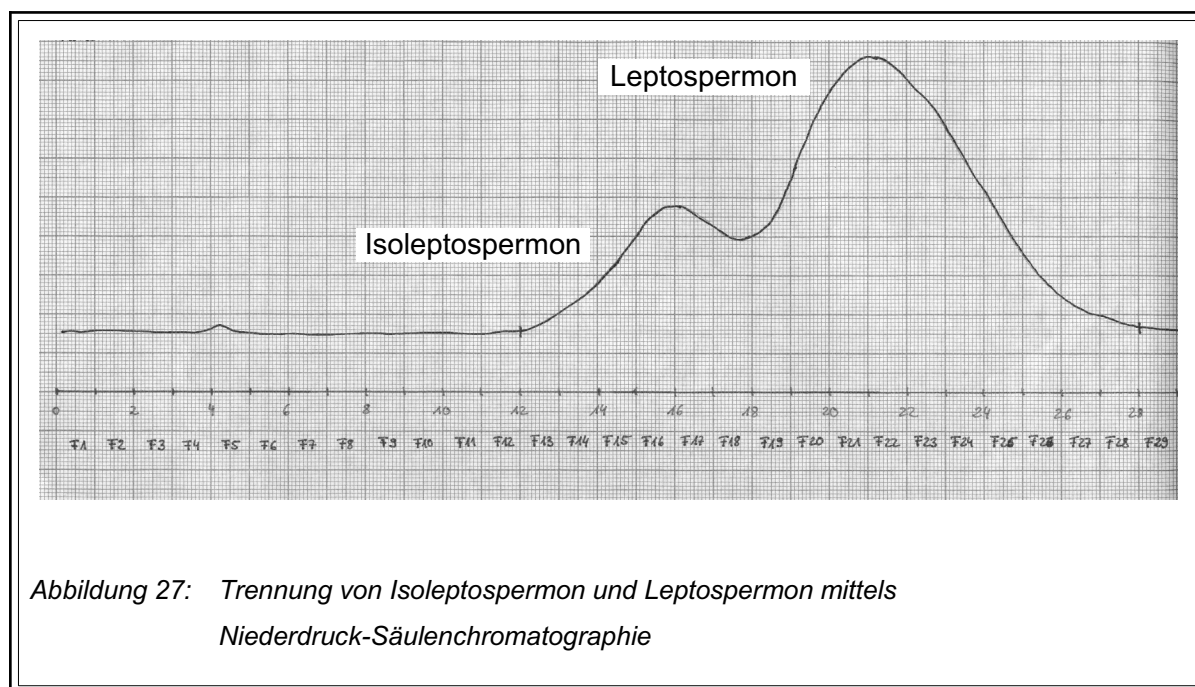


Abbildung 27 stellt das Trennergebnis dar, bei einem Elutionsmittelgemisch aus Acetonitril / Wasser / Methanol im Verhältnis 55 : 40 : 5. Auf der Abszisse sind sowohl die Zeit in Minuten als auch die aufgefangenen Fraktionen F1 bis F29 aufgetragen. Eine Basislinientrennung der Peaks von Isoleptospermon und Leptospermon konnte trotz zahlreicher Optimierungsversuche weder mit isokratischer Elution noch mit Gradientenelution erreicht werden. Die Fraktionen F12 bis F28 wurden gaschromatographisch ausgewertet (**Abb. 28**), mit dem Ergebnis, dass reines Isoleptospermon in geringer Konzentration nur in Fraktion F12, reines Leptospermon nur in den Fraktionen F24 bis F28 enthalten war. In den Fraktionen F13 bis F23 wurden sowohl Isoleptospermon als auch Leptospermon in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen nachgewiesen. Damit erwies sich die Niederdruck-Säulenchromatographie für dieses Trennproblem als nicht effektiv genug.

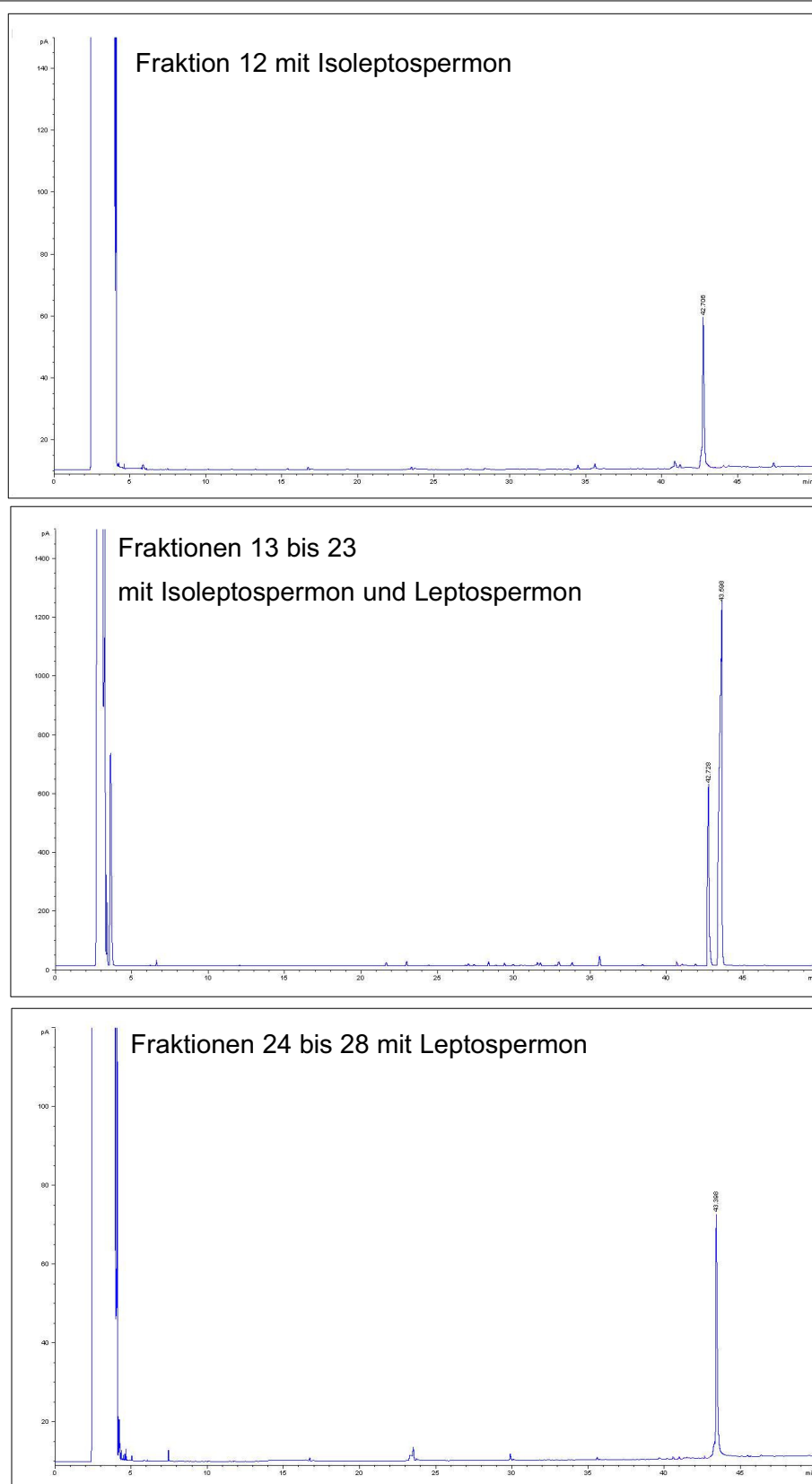


Abbildung 28: Gaschromatographische Auswertung der Niederdruck-Säulenchromatographie

3 Synthese von β -Triketonen

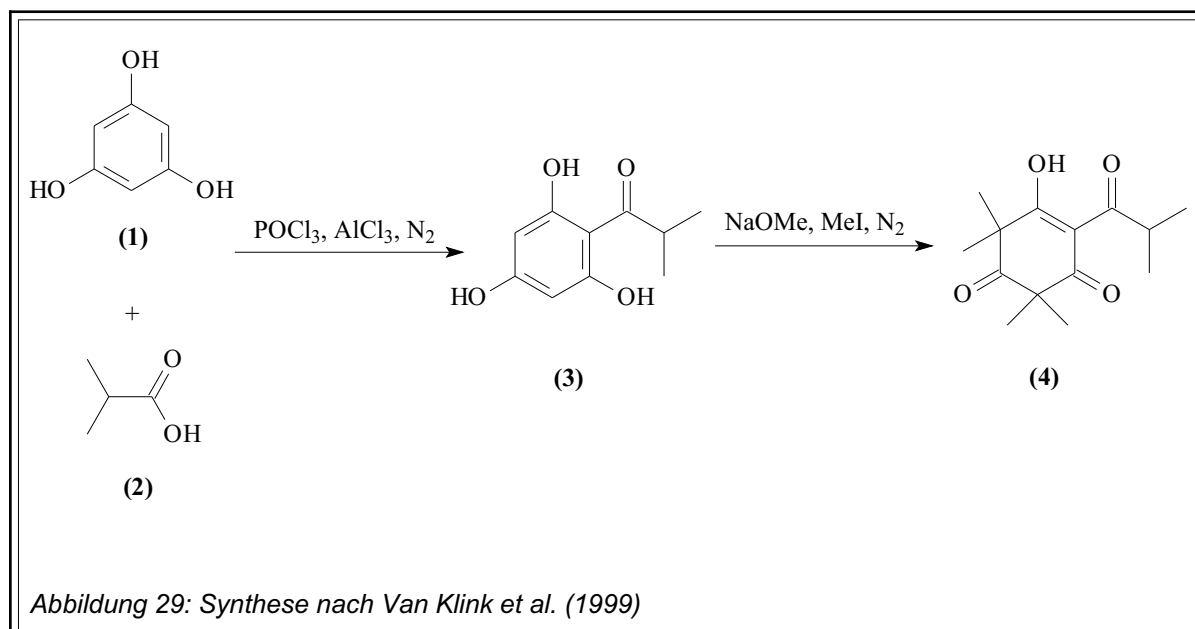
3.1 Problemstellung

Die Versuche, einzelne Triketone zu isolieren, blieben zunächst auf das Manukaöl mit den drei Triketonen Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon beschränkt. Dabei konnte lediglich das Flaveson in ausreichender Menge von den beiden übrigen Triketonen abgetrennt werden. Die Beschaffung anderer triketonhaltiger Öle erwies sich als unmöglich, da es sich um nicht im Handel befindliche Öle handelt. Auch gab es keine Möglichkeit, die entsprechenden Pflanzen zu beschaffen, da diese teilweise dem Artenschutz sowie ausfuhrrechtlichen Bestimmungen unterliegen, was sich vor allem im Hinblick auf die für die Destillation benötigten Pflanzenmaterial-Mengen als blockierend erwies. Die in dieser Hinsicht einzige Unterstützung fand die Arbeit durch Herrn E. V. Lassak, der mir freundlicherweise das Triketon Agglomeron zur Verfügung stellte, welches er in ausreichender Menge (ca. 10g) aus *E. agglomerata* Maiden gewonnen hatte. Die aufgezeigten Schwierigkeiten machen deutlich, dass die Synthese der benötigten Triketone für eine Weiterführung der Arbeit unerlässlich war.

3.2 Synthese nach Van Klink (1999)

Die Darstellung von Triketonen vom Phloroglucin-Typ wurde von VAN KLINK et al. (1999) beschrieben und sollte hinsichtlich ihrer Eignung zur Gewinnung ausreichender Mengen der Triketone überprüft werden. Das Verfahren wurde am Beispiel von Flaveson nachvollzogen und ist in **Abbildung 29** dargestellt. Zunächst erfolgt die Synthese des entsprechenden Acylphloroglucin-Derivates, im Fall von Flaveson handelt es sich dabei 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy-phenyl)-propan-1-on (**3 in Abb. 29**). Unter Stickstoffatmosphäre wird zu einer Suspension aus Phosphorylchlorid und wasserfreiem Aluminiumchlorid getrocknetes Phloroglucin (**1 in Abb. 29**) zugefügt. Anschließend erfolgt unter Rühren die Zugabe der benötigten Carbonsäure (hier: 2-Methylpropionsäure = Isobuttersäure, **2 in Abb. 29**). Unter Erhalt der Stickstoffatmosphäre wird zunächst bei 0°C für 8 Stunden und anschließend bei ca. 6°C für weitere 40 Stunden gerührt. Dabei findet eine Friedel-Crafts-Acylierung statt, bei der in Gegenwart von Phosphorylchlorid und Aluminiumchlorid *in situ* ein Carbonsäurechlorid gebildet wird [SOWMITHRAN und PRASAD, 1985]. Das erhaltene Re-

aktionsgemisch wird auf zerkleinertes Eis gegeben und anschließend mit Diethylether extrahiert. Im Anschluss an verschiedene Wasch- und Trocknungsvorgänge wird der ölige Rückstand über eine Kieselgelsäule (Elutionsmittel: Cyclohexan / Ethylacetat) gegeben, um ihn von unerwünschten Diacyl- und Triacylderivaten zu befreien. Das so gewonnene Monoacylderivat wird in Gegenwart von Natriummethanolat und Jodmethan unter Stickstoff mehrere Stunden am Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel und Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure wird zunächst mit Diethylether, dann mit Natriumcarbonat-Lösung und erneut mit Diethylether extrahiert. Nach Entfernen des Diethylethers liegt Flaveson (**4 in Abb. 29**) vor, das durch Vakuumdestillation weiter gereinigt wird.



Obwohl es gelang, Flaveson nach obiger Synthese in hoher Reinheit herzustellen, bereitete das Verfahren, insbesondere die Synthese des Zwischenproduktes 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy-phenyl)-propan-1-on (**3 in Abb. 29**), erhebliche experimentelle Schwierigkeiten. Vor allem die Gewährleistung einer konstanten Kühlung über 48 Stunden stellte ein Problem dar. Bei dem Versuch, die Synthese bei Raumtemperatur (ca. 20°C) durchzuführen, wurde eine deutliche Zunahme der unerwünschten Diacyl- und Triacylderivate bei gleichzeitiger Reduktion der Ausbeute an 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy-phenyl)-propan-1-on auf 5% verzeichnet. Somit erwies sich eine Kühlung des Reaktionsansatzes als unverzichtbar.

Eine weitere Schwierigkeit lag in der ständig zu gewährleistenden Stickstoffatmosphäre. Es wurde allerdings festgestellt, dass die Zufuhr von Stickstoff nur zu Beginn der Reaktion (etwa 1 h lang) erforderlich ist. Anschließend kann auf die Stickstoffatmosphäre ohne signifikante Einbußen bei der Ausbeute verzichtet werden. Der hohe zeitliche Aufwand, der insbesondere aus der eigentlichen Reaktionszeit von 48 h sowie der nachfolgenden Reinigung des Monoacylderivates (Kieselgelsäule) resultiert, erwies sich vor allem im Hinblick auf die Ausbeuten als nachteilig.

Die von VAN KLINK et al. für das Monoacylderivat angegebenen Ausbeuten von 40 - 54% konnten auch unter Einhaltung der beschriebenen Bedingungen für das Zwischenprodukt des Flavesons, 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy-phenyl)-propan-1-on, nicht reproduziert werden. Für dieses Monoacylderivat wurden lediglich Ausbeuten von 28 - 30% erzielt. Auch eine Verlängerung der Reaktionszeit und eine Erhöhung der Konzentration an Phosphorylchlorid und Aluminiumchlorid brachten keine Verbesserung.

Der zweite Syntheseschritt, die Methylierung des Zwischenproduktes mit Natriummethylat und Jodmethan, soll nach VAN KLINK et al. ebenfalls in Gegenwart von Stickstoff durchgeführt werden. Eine halbstündige Stickstoffzufuhr zu Beginn der Reaktion erwies sich aber auch hier als ausreichend und führte zu gleichen Ausbeuten wie bei dauerhafter Stickstoff-Begasung. Wird die Reaktion ohne Zufuhr von Stickstoff durchgeführt, muss mit einer Reduktion der Ausbeuten an Flaveson um ca. 5% gerechnet werden.

Für die Extraktionen, die zur Aufarbeitung des Reaktionsansatzes notwendig sind, wird nach VAN KLINK et al. Diethylether eingesetzt. Dies führte, ähnlich wie bei der Isolierung des Triketon-Komplexes aus Manukaöl (Kapitel B 1), zu einer Anreicherung des im Diethylether befindlichen Stabilisators BHT, die gaschromatographisch ($R_f = 1511$) nachgewiesen werden kann. Die dabei beobachteten Konzentrationen (0,1 bis 0,3%) sind im Vergleich zu denen, die bei der Isolierung auftraten, allerdings deutlich reduziert. Für die Umsetzung des Monoacyl-Derivates mit Natriummethylat und Jodmethan wird von VAN KLINK et al. eine Marge von 70 bis 85% angegeben, die für das Flaveson bestätigt werden konnte. Wurde der

Diethylether in Analogie zur modifizierten Isolierung des Triketon-Komplexes (siehe Kapitel B1.3) gegen Ethylacetat ausgetauscht, betrugen die Ausbeuten 68 bis 75%. Die Reduktion der Ausbeute um etwa 10% musste – zumindest für das Flaveson – akzeptiert werden, da die Siedepunktdifferenz zwischen Flaveson und BHT nicht ausreicht, um die beiden Substanzen im letzten Reinigungsschritt mittels einer Vakuumdestillation zu trennen.

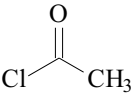
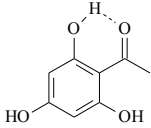
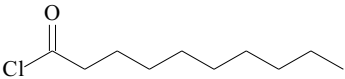
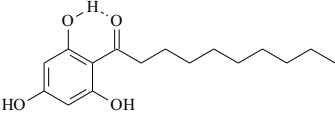
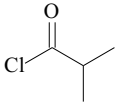
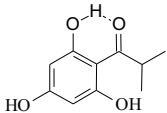
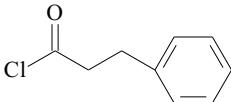
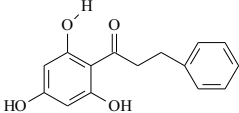
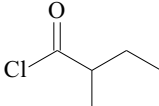
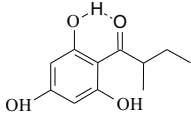
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Synthese nach VAN KLINK et al. zwar grundsätzlich geeignet ist, Flaveson (und somit andere Triketone vom Phloroglucin-Typ) herzustellen. Dem Vorteil einer hohen Reinheit der Zielstruktur (bereits vor dem letzten Reinigungsschritt) stehen jedoch einige Nachteile gegenüber. An erster Stelle steht dabei der zeitliche und apparative Aufwand für die Synthese und Reinigung des Zwischenproduktes, gefolgt von der erforderlichen Temperierung über einen Zeitraum von zwei Tagen. Die Gesamtausbeute an Flaveson betrug nach entsprechender Reinigung nur etwa 0,5 g (ausgehend von 2,6 g Phloroglucin). Auch die oben angeführten Modifikationen ergaben keine Verbesserungen, so dass dieser Syntheseweg im weiteren Verlauf der Arbeit nicht verwendet wurde.

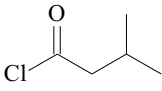
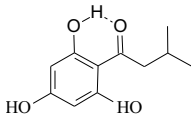
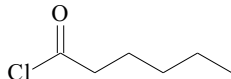
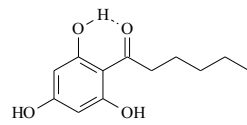
3.3 Synthese ausgewählter Triketone

Die Synthese der β -Triketone wurde in Anlehnung an die von CROMBIE et al. (1985 und 1987) beschriebene Darstellung von *Mammea*-Cumarinen wie folgt durchgeführt: Getrocknetes Phloroglucin wurde in Schwefelkohlenstoff suspendiert und mit der vierfachen Menge Aluminiumchlorid versetzt. Unter intensivem Rühren wurde tropfenweise Nitrobenzol sowie in Nitrobenzol gelöstes Säurechlorid zugegeben. Welches Säurechlorid bei den einzelnen Triketonen zugesetzt und welches Zwischenprodukt jeweils erwartet wurde, ist **Tabelle 10** zu entnehmen. Mit Ausnahme der als „Acetyl-Derivat“ und „Decanoyl-Derivat“ bezeichneten Triketone handelt es sich um naturidentische Triketone. Das „Acetyl-Derivat“ stellt ebenso wie das „Decanoyl-Derivat“ eine Strukturmodifikation dar, die synthetisiert wurden, um antimikrobielle Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen.

B Ergebnisse

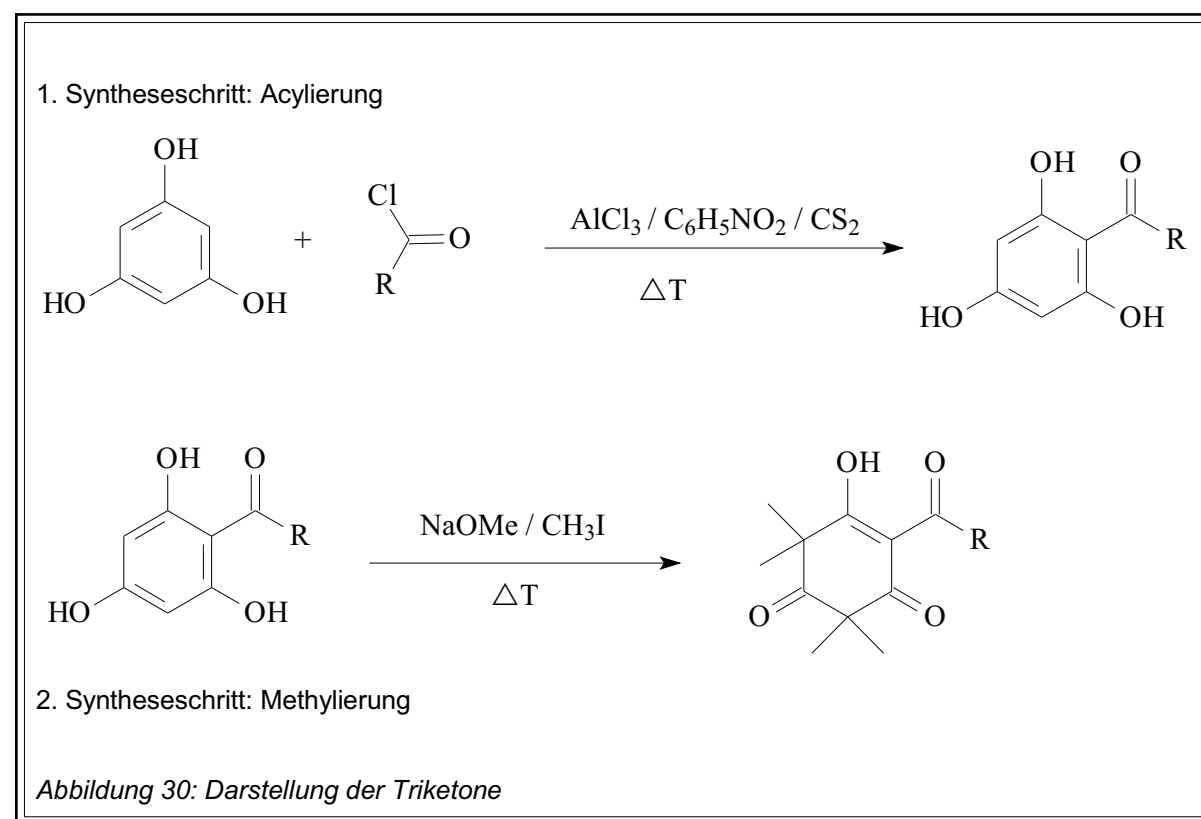
Tabelle 10: Säurechloride und Zwischenprodukte der Triketon-Synthese

Nr.	Triketon	Name u. Struktur des Säurechlorids	Name u. Struktur des Zwischenproduktes
1	„Acetyl- Derivat“*	Acetylchlorid 	1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)ethanon 
2	„Decanoyl- Derivat“*	Caprinsäurechlorid, (Decanoylchlorid) 	1-(2,4,6-Trihydroxy-phenyl)-decan- 1-on 
3	Flaveson	Isobuttersäurechlorid 	2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy- phenyl)-propan-1-on 
4	Grandifloron	2-Phenylpropionsäurechlorid, (Hydrocinnamoylchlorid) 	3-Phenyl-1-(2,4,6-trihydroxy- phenyl)-propan-1-on 
5	Isoleptospermon	2-Methylbuttersäurechlorid 	2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy- phenyl)-butan-1-on 

Nr.	Triketon	Name u. Struktur des Säurechlorids	Name u. Struktur des Zwischenproduktes
6	Leptospermon	Isovaleriansäurechlorid 	3-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy-phenyl)-butan-1-on 
7	Papuanon	Capronsäurechlorid 	1-(2,4,6-Trihydroxy-phenyl)-hexan-1-on 
* Triketon-Derivate, die für antimikrobielle Untersuchungen synthetisiert wurden			

Nach Zugabe des Säurechlorids wurde der Reaktionsansatz am Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen in kalte, verdünnte Salzsäure überführt. Anschließend konnte das Zwischenprodukt, ein Acylphloroglucin-Derivat, abgetrennt und weiter gereinigt werden.

Der zweite Reaktionsschritt besteht in der Methylierung des Acylphloroglucin-Derivates. Zu einer Mischung, bestehend aus Natriummethanolat und Jodmethan, wurde unter Rühren das Acylphloroglucin-Derivat gegeben und durch zweistündiges Erhitzen unter Rückfluss umgesetzt. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel lag ein brauner, öliges Rückstand vor, der zuerst angesäuert (pH 1-2) und anschließend mehrfach mit Natriumcarbonat-Lösung und Ethylacetat extrahiert wurde. Der Rückstand, der nach Entfernung des Ethylacetats vorlag, wurde auf eine mit Hexan-Ethylacetat (9:1) äquilibrierte Kieselgelsäule gegeben. Nach Abschluss der säulenchromatographischen Reinigung und Entfernung der Lösungsmittel folgte der letzte Reinigungsschritt, die Vakuumdestillation, mit Hilfe der unter B 2.1 beschriebenen Kugelrohrdestillation.



In **Abbildung 30** sind die beiden Teilreaktionen der Synthese dargestellt. Auf diesem Weg konnten mit Ausnahme des Grandiflorons, einem Triketon in *Leptospermum lanigerum* (Ait.) Sm. [HELLYER und PINHEY, 1966], alle in **Tabelle 10** aufgeführten Triketone synthetisiert werden. Die dazu gehörigen Ergebnisse der Elementar-Analysen und die Ausbeuten sind in „Material und Methoden“ (Kapitel 5) aufgeführt. Als Ursache für die fehlgeschlagene Grandifloron-Synthese kommen Konkurrenzreaktionen in Betracht, die sich auf eine erhöhte Reaktivität des Phenylpropionsäurechlorids zurückführen lassen.

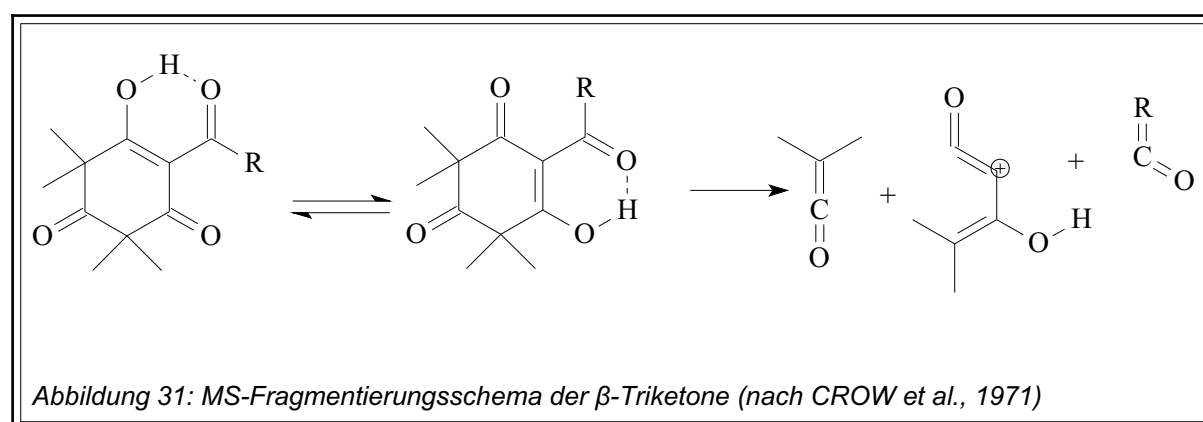
Im Folgenden wird auf einige Aspekte im Zusammenhang mit der Synthese näher eingegangen. Es hat sich herausgestellt, dass Phloroglucin vor dessen Einsatz unbedingt getrocknet werden muss. Wurde darauf verzichtet, so mussten bei der Ausbeute des Zwischenproduktes Verluste von bis zu 5% in Kauf genommen werden. Des Weiteren hat sich die Verwendung der vierfachen Menge an Aluminiumchlorid (bezogen auf das Phloroglucin) als optimal erwiesen. Geringere Mengen schmälerten die Ausbeute, größere Mengen erhöhten sie nicht wesentlich. Sämtliche Zwischenprodukte lagen als braune, zähflüssige bis harzige Massen vor, die durch Aus-

kochen mit Wasser gereinigt wurden und deren Ausbeuten im Bereich von 60 bis 70% lagen. Die im Rahmen der Methylierung durchgeführten Extraktionen mit Ethylacetat setzen die Erkenntnisse um, die schon bei der Isolierung des Triketon-Komplexes aus Manukaöl gewonnen wurden. Auf den Einsatz von Diethylether wurde verzichtet, um den Stabilisators BHT nicht abtrennen zu müssen.

3.4 Analytik der β -Triketone

3.4.1 Massenspektroskopie (MS)

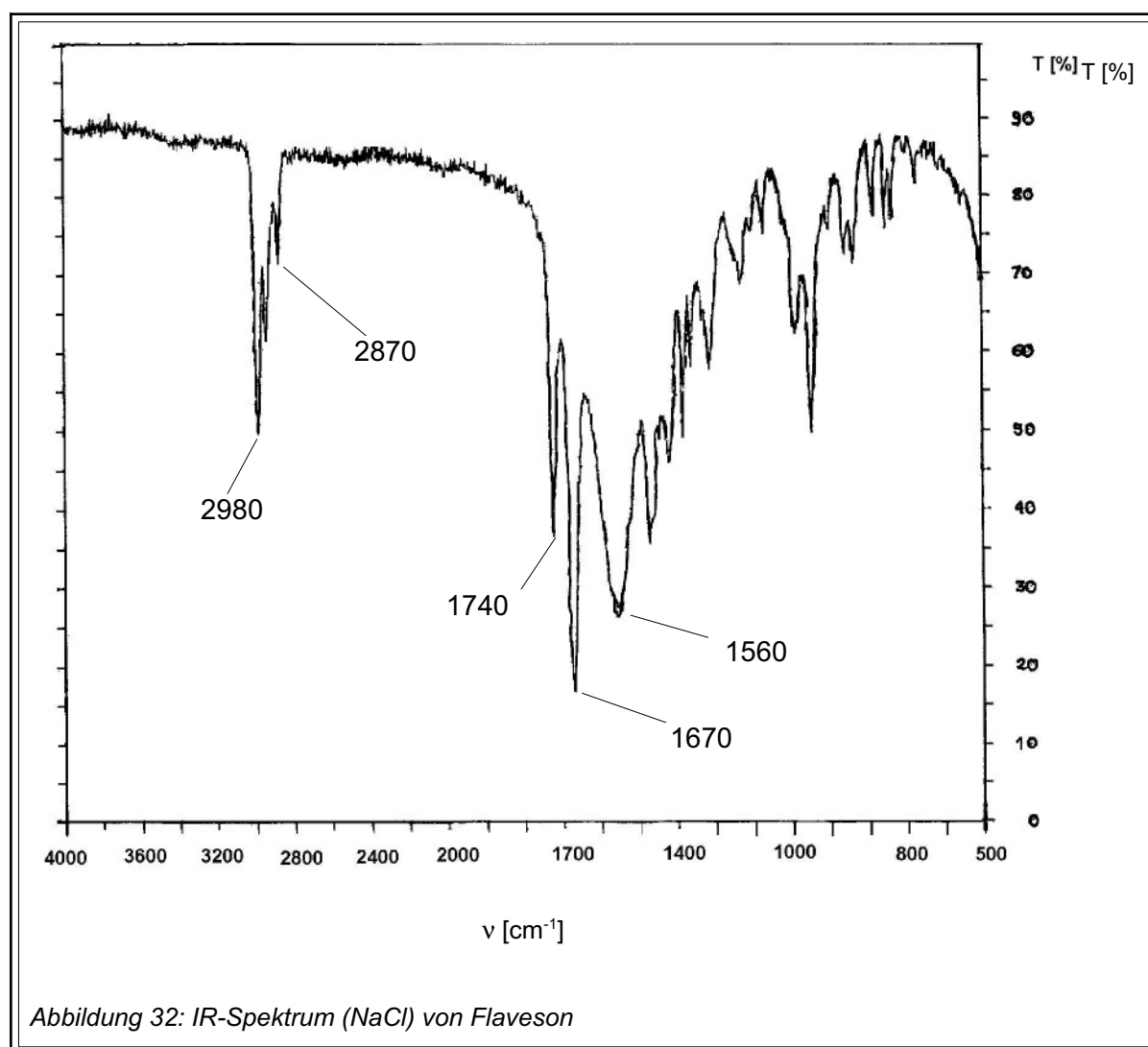
β -Triketone sind durch einen spezifischen Massenzerfall gekennzeichnet. Die charakteristischen Fragmente, welche bei β -Triketonen mit einem Tetramethyldion-Grundgerüst entstehen, sind in **Abbildung 31** dargestellt. Durch Abspaltung von Dimethylketen entsteht das typische Fragment mit der Massenzahl m/z 70, dessen positive Ladung am π -Bindungssystem lokalisiert ist. Die Massenspektren der sieben synthetisierten Triketone sind im Anhang (F1, Nr. 1 - 7) dargestellt.



3.4.2 Infrarotspektroskopie (IR)

Fast alle synthetisierten β -Triketone liegen als farblose bis gelblich gefärbte, ölige Substanzen vor, so dass die IR-Spektren als Film zwischen NaCl-Platten aufgenommen werden konnten. Agglomeron und 4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Acetyl-Derivat“) fielen in Form weißer Kristalle an und wurden als KBr-Presslinge vermessen. Sämtliche Messungen erfolgten im Bereich von

4000 cm^{-1} bis 500 cm^{-1} . **Abbildung 32** stellt exemplarisch das IR-Spektrum von Flaveson dar. Es zeigt im Bereich von 3000 bis 2870 cm^{-1} Banden für C - H-Valenzschwingungen, die sich in den Spektren aller Triketone wiederfinden. Dies trifft auch auf die starken Absorptionen bei 1740 cm^{-1} und 1670 cm^{-1} zu, die typisch für nicht konjugierte und konjugierte Carbonyl-Funktionen sind. Die breite Bande bei 1560 cm^{-1} ist mit wasserstoffbrückenbildenden, konjugierten Ketonen assoziiert und weist auf die Ausbildung einer enolischen Struktur hin. Die IR-Spektren der sieben synthetisierten Triketone sind im Anhang aufgeführt (F2, Nr. 1 - 7).

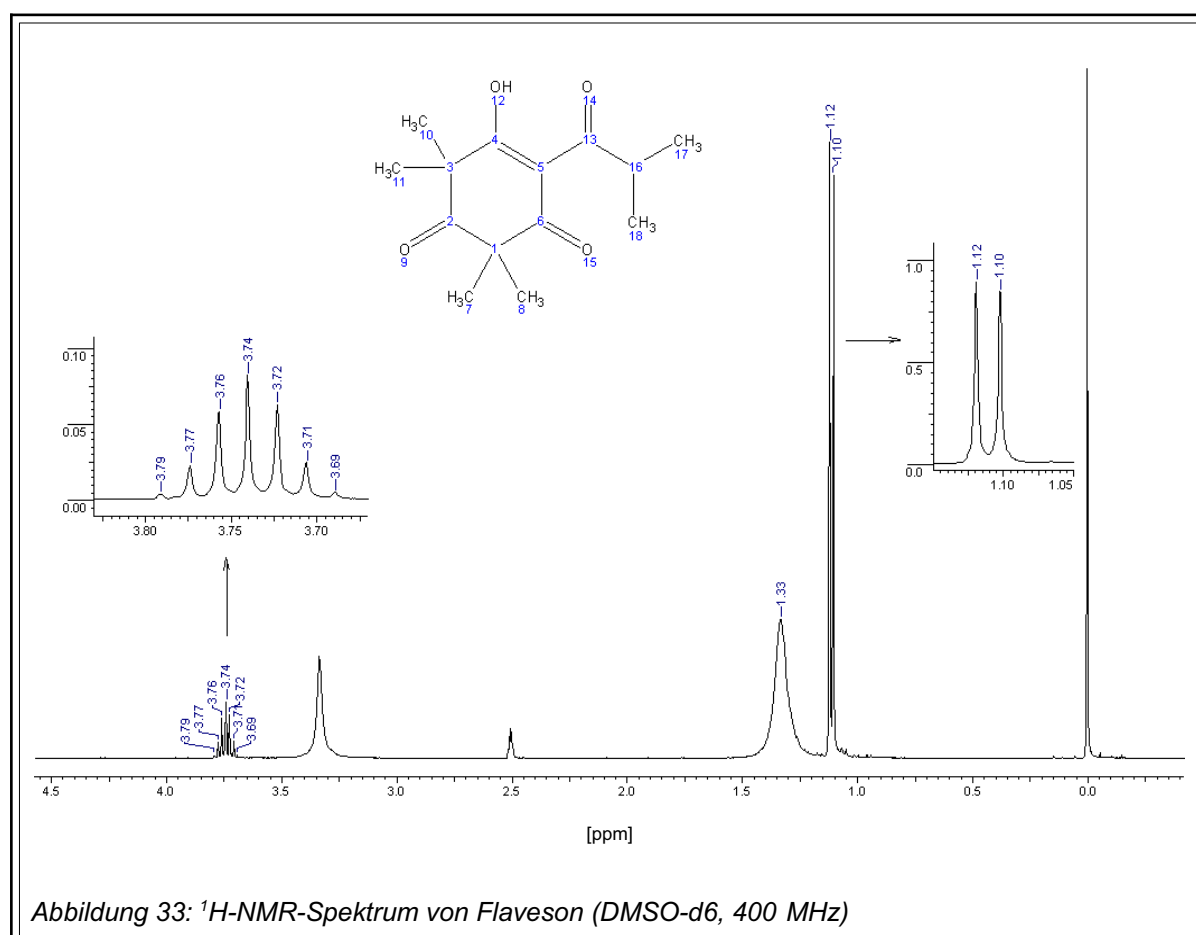


Im Rahmen der Arbeiten zur Synthese wurden ebenfalls die IR-Spektren der jeweiligen Zwischenprodukte aufgenommen. Über den Vergleich dieser Spektren mit den Spektren der zugehörigen Endprodukte wurde die erfolgreiche Durchführung des

zweiten Synthese-Schritts dokumentiert. Die im IR-Spektrum der Zwischenprodukte auftretende breite OH-Valenzschwingung des Phloroglucin-Restes im Bereich von 3600 cm^{-1} bis 2600 cm^{-1} verschwindet nach der Umsetzung des Zwischenproduktes mit Natriummethanolat und Jodmethan vollständig.

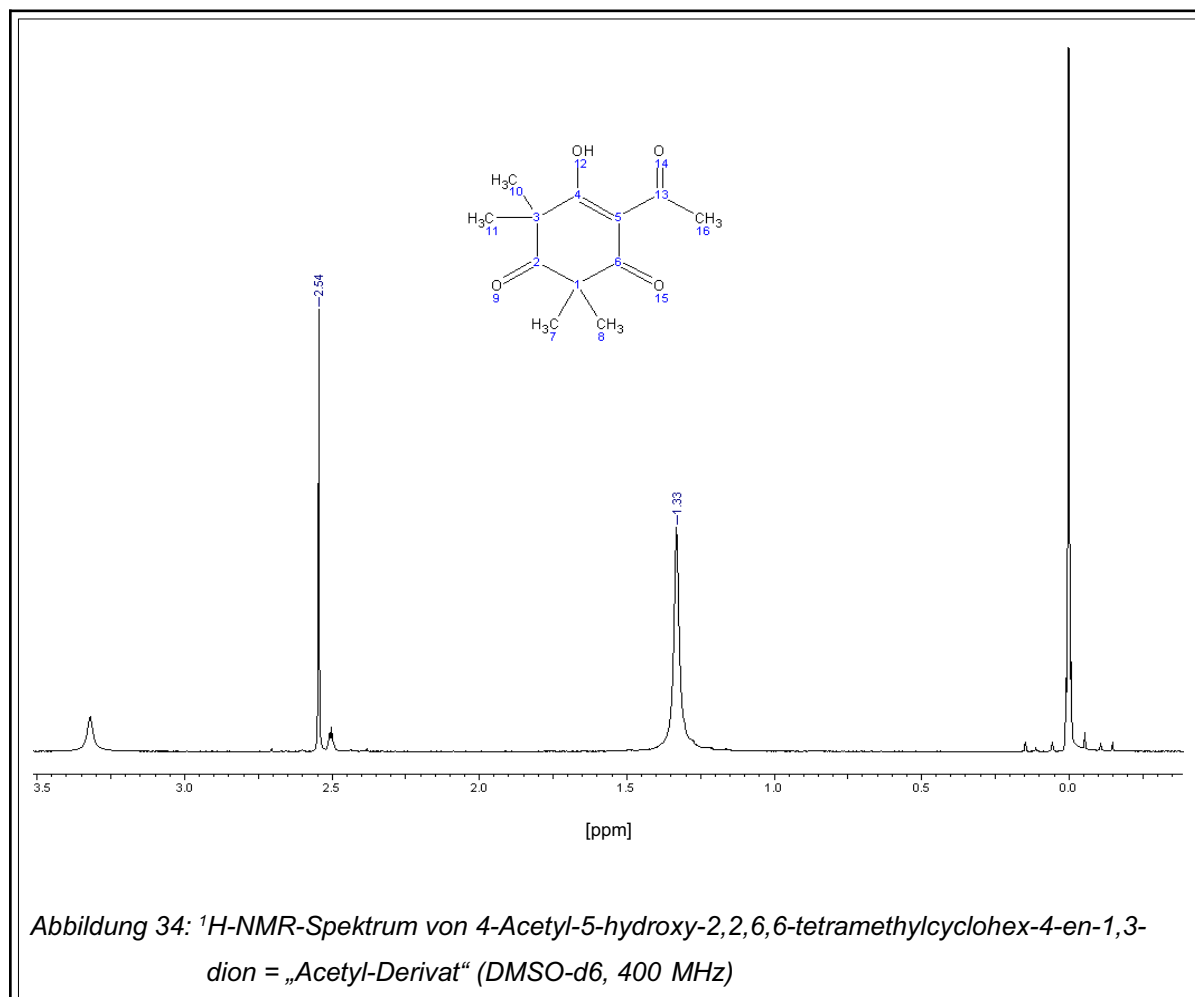
3.4.3 ^1H -NMR-Spektroskopie

Das in $\text{DMSO-}d_6$ aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum von Flaveson (**Abb. 33**) zeigt ein symmetrisches Septett bei 3,74 ppm, welches dem am C-16-Atom befindlichen Proton der Isobutyryl-Seitenkette zuzuordnen ist. Im Bereich von 1,10 bis 1,12 ppm wird ein Dublett beobachtet, für das die sechs benachbarten Protonen der Dimethylgruppe (C-17, C-18) des Acylrestes verantwortlich sind. Die zwölf Protonen der am



Ring befindlichen Methylgruppen (C-7, C-8, C10, C11) bilden ein Singulett bei 1,33 ppm. Das Singulett-Signal des Wasserstoff-Atoms der Hydroxylgruppe (O-12)

ist zu größeren δ -Werten (im Bereich von 18 ppm, nicht abgebildet) verschoben, da sich die Hydroxyl-Gruppe an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt (Keto-Enol-Tautomerie), was zu einer Verringerung der Elektronendichte und somit zu einer Verschiebung in das tiefere Feld führt.



Die Messergebnisse decken sich mit den für Flaveson in der Literatur gefundenen Angaben. Ergänzend sei darauf hingewiesen, dass BICK et al. (1965) für die zwölf Protonen der Methylgruppen am Ring zwei Signale gleicher Intensität bei 1,43 ppm und 1,37 ppm gefunden haben. Das Signal bei 1,37 ppm wurde den Protonen der zwei Methylgruppen zwischen den Carbonylgruppen zugeordnet, die Protonen der verbleibenden Methylgruppen ergeben das Signal bei 1,43 ppm. Damit bestätigten die Autoren das Vorhandensein der stabilen Enol-Form. Im vorliegenden Spektrum wurden diese zwei Signale nicht aufgelöst, hier präsentieren sich die zwölf Protonen als ein Signal bei 1,33 ppm.

Es wurden die ^1H -NMR-Spektren aller synthetisierten Triketone aufgenommen. Sie bestätigen bzw. ergänzen vorhandene Literaturangaben und sind im Anhang abgebildet. Im Folgenden werden nur die Spektren der zwei nicht natürlich vorkommenden Triketon-Derivate diskutiert. Das relativ einfache Spektrum von 4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion (**Abb. 34**) ist durch zwei Singuletts gekennzeichnet, wobei der Peak bei 1,33 ppm den Protonen der Ringmethylgruppen (C-7, C-8, C-10, C-11) zuzuordnen ist. Für das scharfe Singulett bei 2,54 ppm sind die Protonen des Acetylrestes verantwortlich. Das Signal für das Proton der Hydroxylgruppe ist – wie beim 4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion – wegen seiner Beteiligung an einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung in das tiefere Feld verschoben (nicht abgebildet).

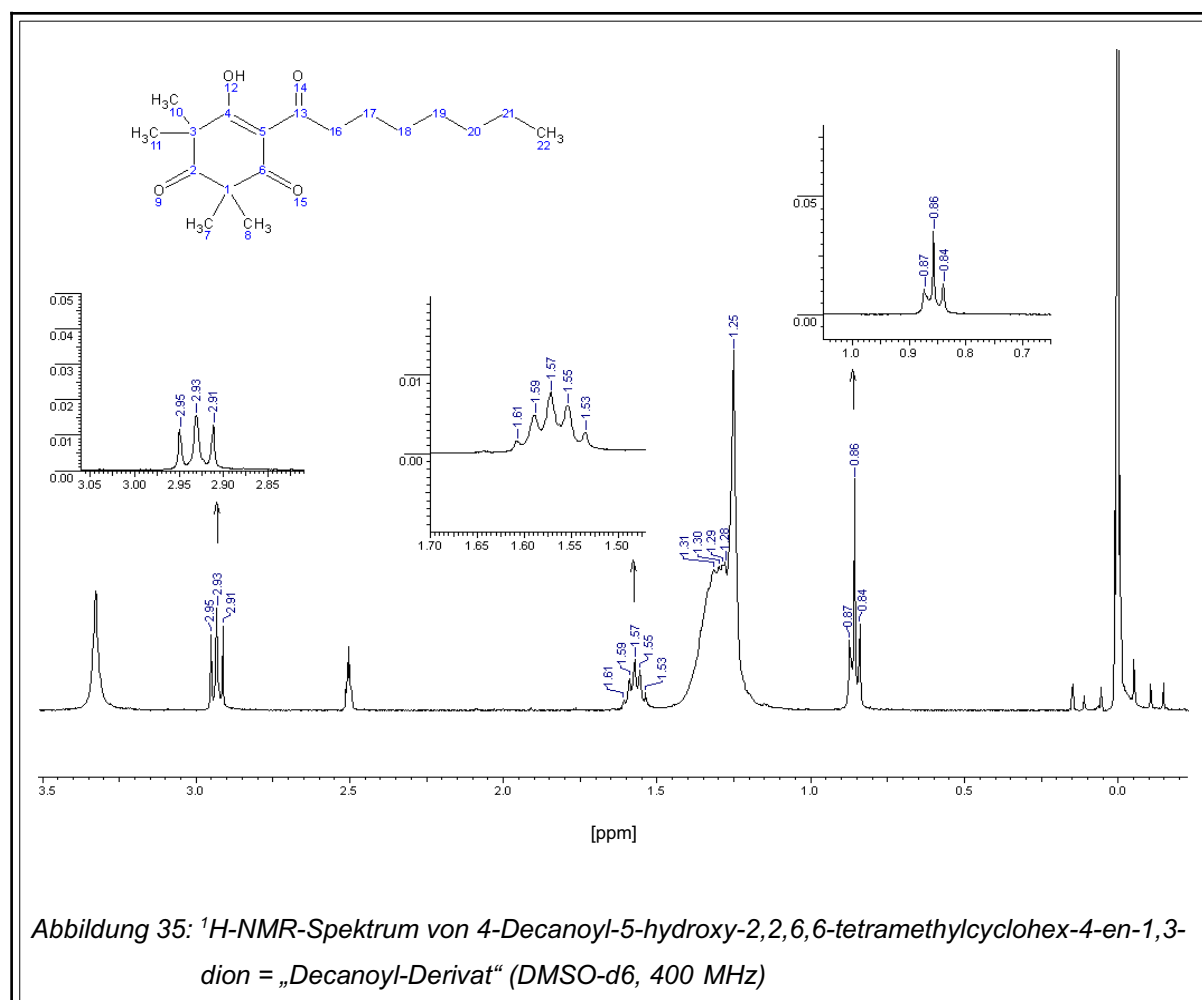


Abbildung 35 stellt das ^1H -NMR-Spektrum von 4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion dar. Die Protonen der Decanoyl-Seitenkette ergeben ein breites Multiplett-Signal im Bereich von 1,2 bis 1,4 ppm, das von dem Signal der Ringmethyl-Protonen überlagert wird. Das Triplet bei 2,93 ppm und das Quintett bei 1,57 ppm wird den Protonen der Methylgruppen 16 und 17 zugeordnet, sie sind durch die Nähe des Carbonyl-Sauerstoffes stärker entschirmt und somit in das tiefere Feld verschoben.

3.4.4 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C -NMR-Daten der natürlich vorkommenden β -Triketone wurden bereits von VAN KLINK et al. (1999) publiziert und werden hier zur Vervollständigung der analytischen Daten in **Tabelle 11** wiedergegeben.

Tabelle 11: ^{13}C -NMR-Daten (CDCl_3 , 75 MHz) für β -Triketone (VAN KLINK et al., 1999)

Position	Flaveson	Isoleptospermon	Leptospermon	Papuanon
1'	108,2	109,0	109,5	109,1
2'	199,3	199,6	199,5	199,1
3'	52,3	52,6	52,4	52,1
3'-CH ₃ (2x)	24,3	24,6 / 24,2	24,3	24,4
4'	209,9	209,9	210,0	210,1
5'	57	57,0	56,9	56,9
5'-CH ₃ (2x)	23,9	23,8 / 23,6	23,9	23,9
6'	196,8	197,1	196,9	196,8
1	208,6	207,8	203,6	204,8
2	35,2	41,5	47,2	39,2
3	19,1	26,9	26,1	24,8
4	19,1	11,9	22,7	31,5
5		16,9	22,7	22,5
6				14,0

Sie basieren auf HMBC- (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) sowie HMQC- (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) Experimenten und erlauben unter anderem eine Zuordnung der Signale für die am C-3' und C-5' befindlichen Methylgruppen. Es wird für alle β -Triketone mit Ausnahme von Isoleptospermon jeweils ein Signal für die Methylgruppen am C-3' und am C-5' beobachtet. Bei Isoleptospermon hingegen führt das Chiralitätszentrum am C-2 zu jeweils zwei unterschiedlichen Signalen dieser beiden Methylgruppen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen ^{13}C -NMR-Spektren standen die oben angeführten Techniken nicht zur Verfügung. Sie waren demzufolge weniger detailliert, bestätigten aber weitgehend die von VAN KLINK et al. (1999) veröffentlichten Ergebnisse.

4 Chromatographie der Triketone

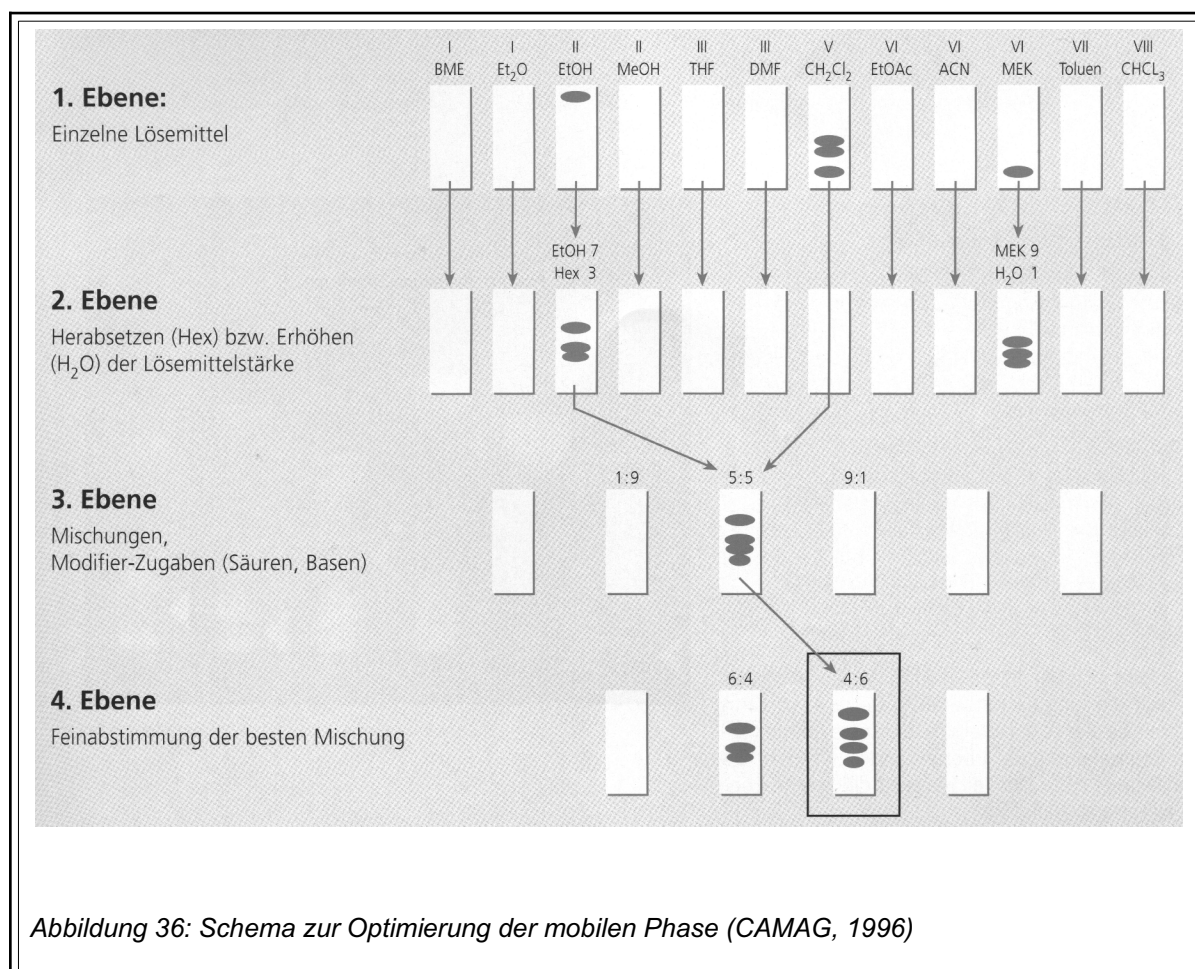
4.1 Dünnschichtchromatographie

4.1.1 Fließmitteloptimierung

Die Dünnschichtchromatographie ist eine schnelle und kostengünstige, sehr gut dokumentierbare Trennmethode, die eine einfache visuelle Auswertung aller Proben ermöglicht. Die Variationsmöglichkeit der stationären (Kieselgel, RP, NH_2 und Polyamid) und mobilen Phase sowie die verschiedenen Detektionsverfahren machen diese Methode flexibel. Damit bot sie sich für die Trennung der isolierten/synthetisierten Triketone an. Vorversuche mit den stationären Phasen Kieselgel, RP-8, RP-18, Polyamid und NH_2 ließen die RP-18 F_{254} -Phase für diese Trennung als besonders geeignet erscheinen. Für die Optimierung der Trennung wurde ein Gemisch aus den natürlich vorkommenden Triketonen Agglomeron, Flaveson, Leptospermon, Isoleptospermon und Papuanon sowie den Derivaten 4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Acety-Derivat“) und 4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Decanoyl-Derivat“) hergestellt. Alle Triketone sind gut in Hexan löslich und unterscheiden sich – mit Ausnahme des Agglomerons – in der Länge und Struktur ihrer Acyl-Seitenkette. Es wurden sowohl die einzelnen Triketone als auch eine alle Triketone enthaltende Mischung in Hexan ge-

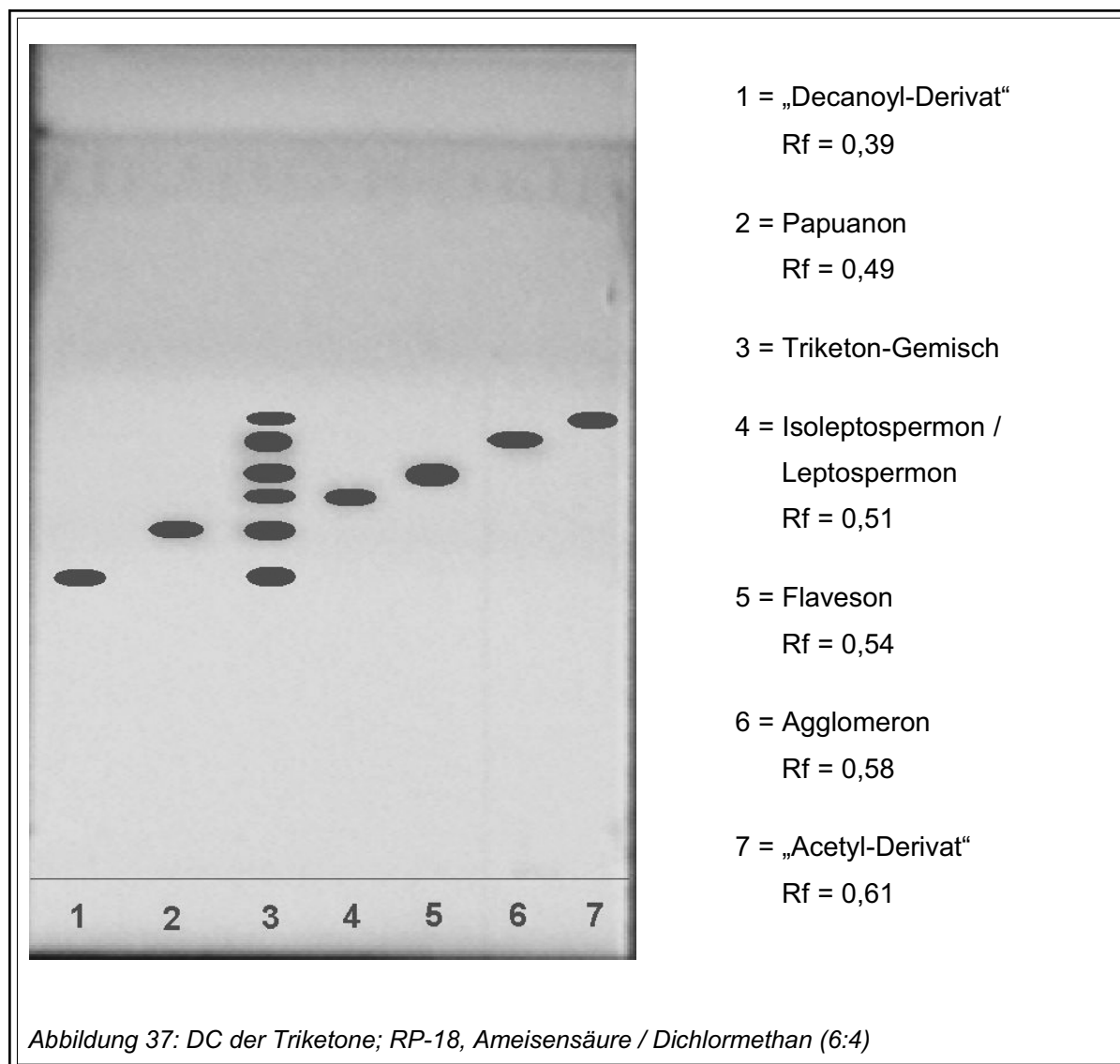
B Ergebnisse

löst und bandenförmig (vollautomatisch) mit dem CAMAG DC-Probenautomaten aufgetragen. Anschließend wurden die Platten in ungesättigter Atmosphäre in Doppeltrogkammern vertikal chromatographiert. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 254 nm, die Fluoreszenzminderung wurde mit dem CAMAG VideoStore System dokumentiert.



Die Optimierung der mobilen Phase erfolgte in Anlehnung an ein von der Firma CAMAG entwickeltes Schema mit vier Ebenen (**Abbildung 36**). In der ersten Ebene wird das aufzutrennende Gemisch zunächst mit reinen Lösungsmitteln aus acht verschiedenen Selektivitätsgruppen (I bis VIII) nach Snyder chromatographiert, wobei die Lösungsmittel innerhalb einer Selektivitätsgruppe ähnliche Trennergebnisse hervorbringen. Für das vorliegende Trennproblem wurden mit den Lösungsmitteln Methanol (II), n-Butanol (II), Methylfuran (III), Essigsäureanhydrid (IV), Ameisensäure (IV), Dichlormethan (V), Xylol (VII) und Toluol (VII) gute Ergebnisse erzielt.

Vor allem Dichlormethan und Ameisensäure ergaben bereits gute Auftrennungsergebnisse im mittleren R_f -Bereich, so dass in diesem Fall auf die zweite Ebene verzichtet wurde. Diese dient der Optimierung von Lösungsmitteln, bei denen die Substanzen im Start- oder Frontbereich liegen. Durch Zugabe von z.B. n-Hexan wird



eine Erniedrigung, durch Zugabe von z.B. Wasser oder Methanol eine Erhöhung der Elutionskraft der eingesetzten Lösungsmittel erreicht. In der dritten Ebene wurden binäre Mischungen aus Ameisensäure und Dichlormethan im Verhältnis von 1 : 1, 1 : 9 sowie 9 : 1 hergestellt. Dabei wies die Fließmittelmischung zu gleichen Teilen eine gute Trennung auf, die im Rahmen der vierten Ebene auf eine Zusammensetzung von Ameisensäure : Dichlormethan 6 : 4 optimiert wurde (**Abbildung 37**). Lediglich die Isomeren Leptospermon und Isoleptospermon konnten nicht getrennt werden.

Versuche, die Trennung in gesättigter Atmosphäre oder durch Verwendung von RP- 8 als stationäre Phase zu optimieren, brachten keine Verbesserung des Trennergebnisses.

4.1.2 Detektion der Triketone

Im Anschluss an die Fließmittelloptimierung wurden verschiedene Reagenzien hinsichtlich ihrer Eignung überprüft, die postchromatographische Detektierbarkeit der Triketone zu verbessern. Hierbei wurden sowohl Universal-Reagenzien wie Molybdato-Phosphorsäure und Jod als auch gruppenspezifische Reagenzien wie Echtblausalz-Lösung verwendet. Die Triketone und deren Derivate wurden auf RP18-Platten ohne Fluoreszenzindikator aufgetragen und mit dem in Kapitel 4.1.1 optimierten Fließmittelgemisch aus Ameisensäure und Dichlormethan (6:4) entwickelt.

Tabelle 12: Postchromatische Detektion der Triketone

Reagenz	1	2	3	4	5	6	7
Bedampfen mit Jod	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
Alkoholische Eisen(III)-chlorid-Lösung 3%	braun-rot	braun-rot	braun-rot	braun-rot	braun-rot	braun-rot	braun-rot
Echtblausalz B-Lösung, NaOH 0,1M	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	orange-rot	gelb
Eisen(III)chlorid-Eisencyanid-Reagenz	blau-grau	blau-grau	blau-grau	blau-grau	blau-grau	dunkelblau	blau-grau
Kaliumhexacyanoferrat(III)-Eisen(III)chlorid-Lösung	orange	orange	orange	orange	orange	rot	orange
Kaliumhexacyanoferrat(III)-Eisen(III)chlorid-Lösung + ΔT	braun-beige	braun-beige	braun-beige	braun-beige	braun-beige	blau	braun-beige
1 = „Decanoyl-Derivat“, 2 = Papuanon, 3 = Isoleptospermon, 4 = Leptospermon, 5 = Flaveson, 6 = Agglomeron, 7 = „Acetyl-Derivat“							

Nachdem die Fließmittelreste vollständig von der Platte abgedampft waren, wurde das jeweilige Reagenz mit einem elektropneumatischen Sprühgerät aufgegeben. Es erzeugt eine Aerosol-Versprühung mit Partikeln von 0,3 bis 10 μm und ermöglicht so einen homogenen Auftrag des Sprühreagenzes bei gleichzeitig geringem Verbrauch.

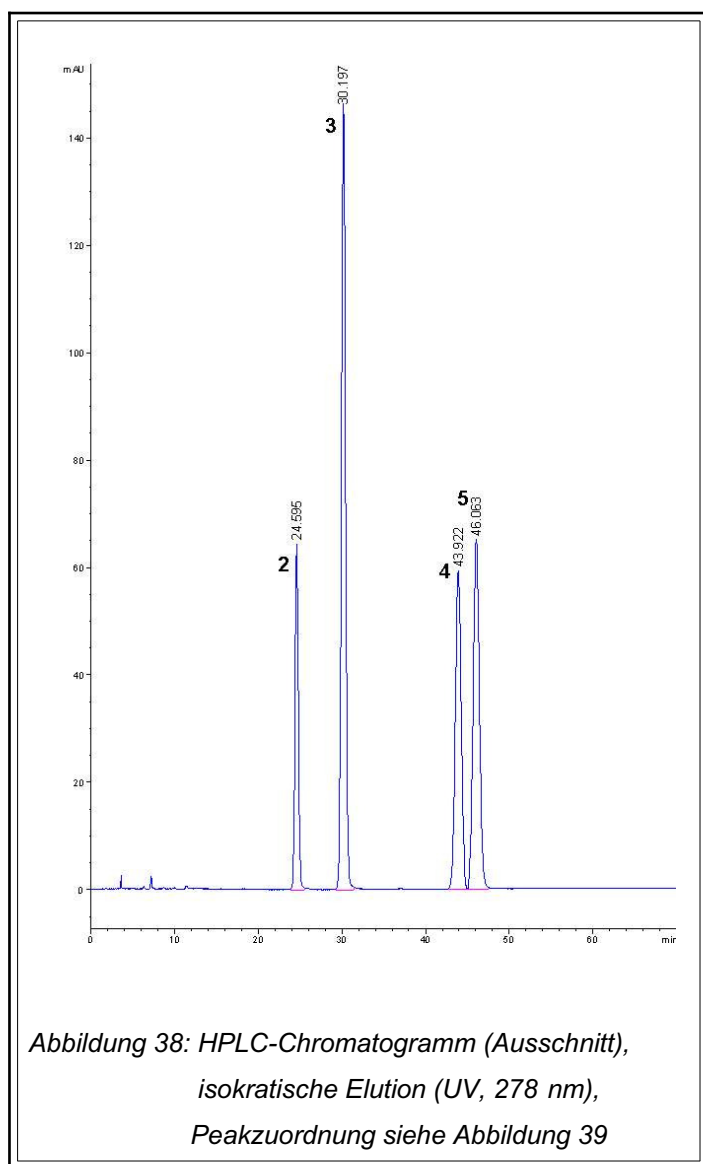
Tabelle 12 stellt eine Auswahl der Ergebnisse dar, welche für die Triketone mit ausgewählten Sprühreagenzien erzielt wurden. Die Ausführungen beschränken sich auf diejenigen Reagenzien, mit denen eine Anfärbung der Substanzzonen erfolgreich war. Das Bedampfen mit Jod ist eine relativ unspezifische Nachweisreaktion für viele Substanzen und somit nur eingeschränkt aussagekräftig. Die für Triketone typische rötlich-braune Farbreaktion mit alkoholischer Eisen(III)chlorid-Lösung ergibt sich aus deren Bestreben, chelatähnliche Strukturen auszubilden. Durch diese Eigenschaft wird die Bildung innerer Komplexsalze mit den Eisen-Ionen ermöglicht. Eine Differenzierung der einzelnen Triketone gelang mit keinem der eingesetzten Reagenzien. Lediglich das Agglomeron wies – begründet durch seine abweichende Struktur – häufig eine intensivere Färbung oder, wie im Fall von Kaliumhexacyanoferrat-Eisenchlorid-Reagenz in Kombination mit Wärme, eine gänzlich andere Färbung auf.

4.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC gehört heute zu den meist genutzten chromatographischen Routine-techniken, so dass im Rahmen dieser Arbeit auch eine HPLC-Methode zur Auftrennung der Triketone entwickelt werden sollte. In der Literatur fand sich zu dieser Trennproblematik lediglich eine koreanische Veröffentlichung [KIM und RHEE, 1999], in der die Chromatographie der Ketofraktion aus dem Manukaöl beschrieben wird. KIM und RHEE verwendeten dazu eine Aminophase (Mikrosäule: 300 μm x 25 cm, 5 μm Amino FUS-25-05-NH) und trennten mit Dichlormethan/Methanol (50 / 50) bei einem Fluss von 3 μL / min die Triketone Flaveson, Leptospermon und Isoleptospermon. Da eine solche Säule nicht zur Verfügung stand und Amino-Phasen eher selten Verwendung finden, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Ausgehend von den DC-Ergebnissen wurde als stationäre Phase eine RP-18-Säule gewählt. Eine direkte Übertragung des Fließmittels, welches für die planarchromatographische Trennung auf der RP-18-Phase entwickelt wurde (siehe Kapitel 4.1.1), war wegen der hohen Konzentration an Ameisensäure nicht möglich. Es wurden verschiedene Elutionsmittelzusammensetzungen getestet, wobei sowohl die Gra-

dentienelution als auch die isokratische Elution Berücksichtigung fanden. Um die Vergleichbarkeit der bei verschiedenen Umgebungstemperaturen aufgenommenen Chromatogramme zu gewährleisten, wurde die Trennsäule auf 25°C temperiert. Bei den getesteten Elutionsmitteln handelte es sich um Gemische aus Acetonitril, Methanol, Wasser und Eisessig. Die Triketone wurden zu je 15 mg in 50 mL Acetonitril gelöst, auf die Säule gegeben und mittels eines Diodenarray-Detektors (DAD) bei vier verschiedenen Wellenlängen (245 nm, 254 nm, 278 nm und 314 nm) detektiert, wobei die meisten Triketone Absorptionsmaxima im Bereich von 245 nm und 278 nm aufweisen.



Zunächst wurde mit einem Gemisch aus Acetonitril / Wasser / Eisessig im Verhältnis 50 / 49,5 / 0,5 (V/V) isokratisch mit einem Fluss von 1 mL / min eluiert. Im Ergebnis lag eine gute Trennung vor, die ausschnittsweise in **Abbildung 38** dargestellt ist. Sie zeichnet sich insbesondere durch die basisliniengetrenten Peaks der beiden Isome-

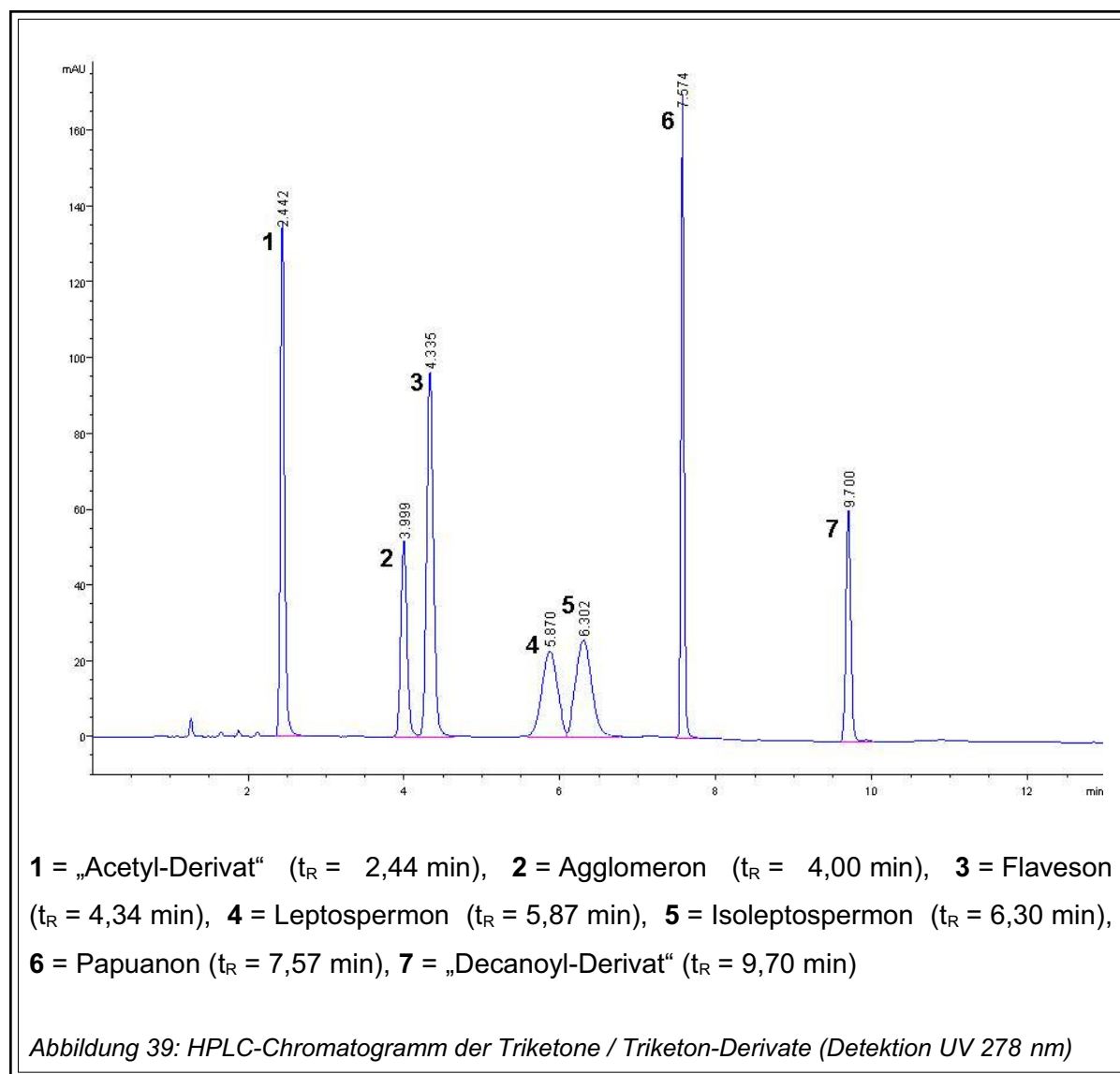
re Leptospermon (Peak 4 in Abb. 38, $t_R = 43,92$ min) und Isoleptospermon (Peak 5 in Abb. 38, $t_R = 46,06$ min) aus, erforderte aber in Bezug auf die Analysenzeit (für das Decanoyl-Derivat bis zu 120 min) eine weitere Optimierung.

Das beste Ergebnis lieferte ein Gradienteneluent aus Acetonitril, Wasser und Eisessig, dessen Zusammensetzung in **Tabelle 13** aufgeführt ist. Das dazuge-

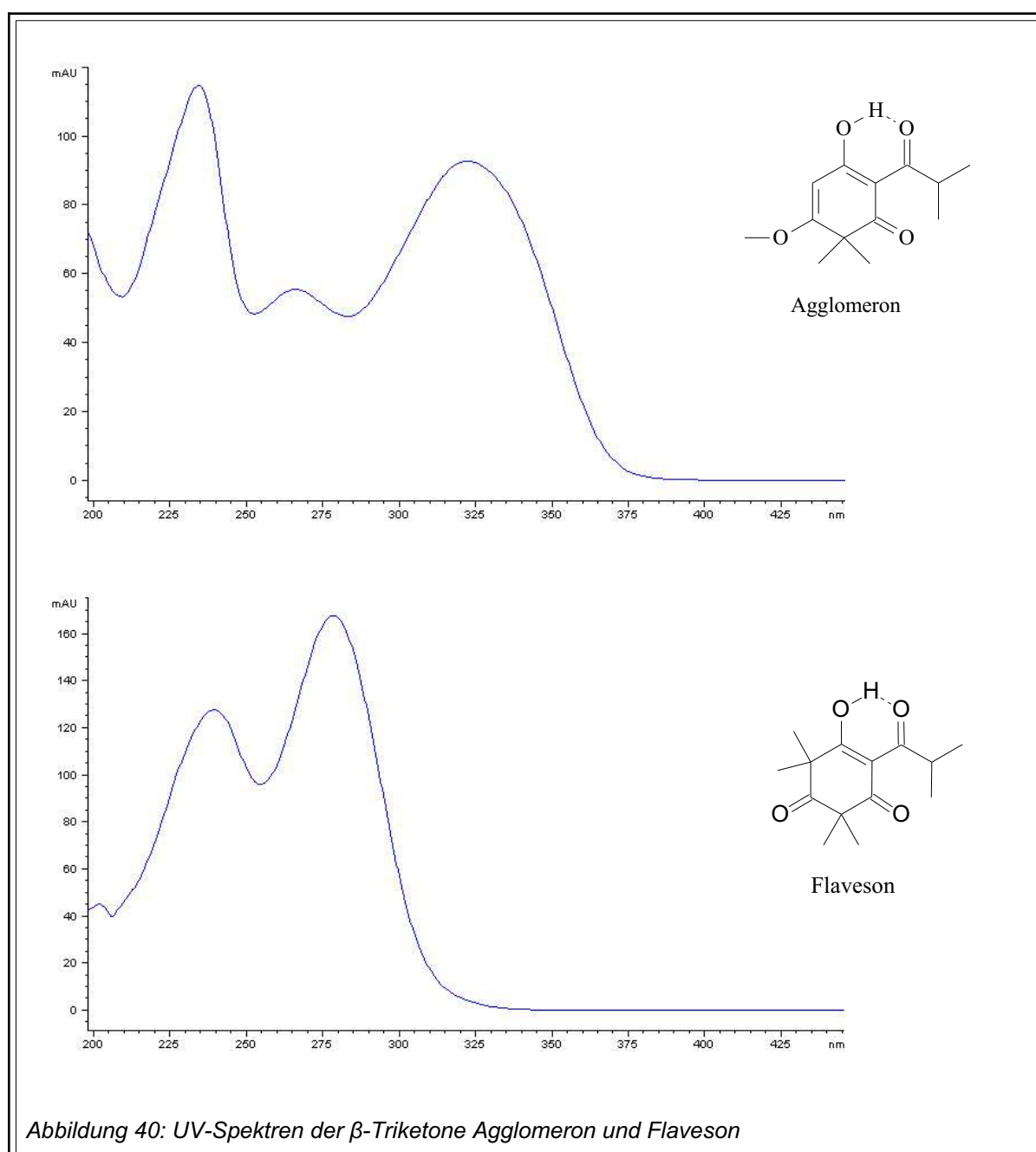
Tabelle 13: Gradientenzusammensetzung

Zeit [min]	Acetonitril [%]	Wasser[%]	Eisessig [%]
0	70	29,7	0,3
4	60	39,6	0,4
6	97,5	2,48	0,02

hörige Chromatogramm mit einer Flussrate von 2 mL / min ist in **Abbildung 39**



dargestellt und zeigt eine deutliche Verkürzung der Analysenzeit auf etwa zehn Minuten. Im Vergleich zur isokratischen Elution (**Abb. 38**) muss aber für die Isomere Leptospermon (Peak 4 in Abb. 38 und 39) und Isoleptospermon (Peak 5 in Abb. 38 und 39) eine geringfügig schlechtere Trennung in Kauf genommen werden. Auffällig sind die im Vergleich zu den Signalen der anderen Triketone (sowohl mit niedrigeren als auch höheren Retentionszeiten) deutlich verbreiterten Peaks von Leptospermon und Isoleptospermon, ein Phänomen, das sowohl bei isokratischer Elution als auch



bei Gradientenelution auftritt. Eine zufriedenstellende Erklärung hierfür wurde nicht gefunden.

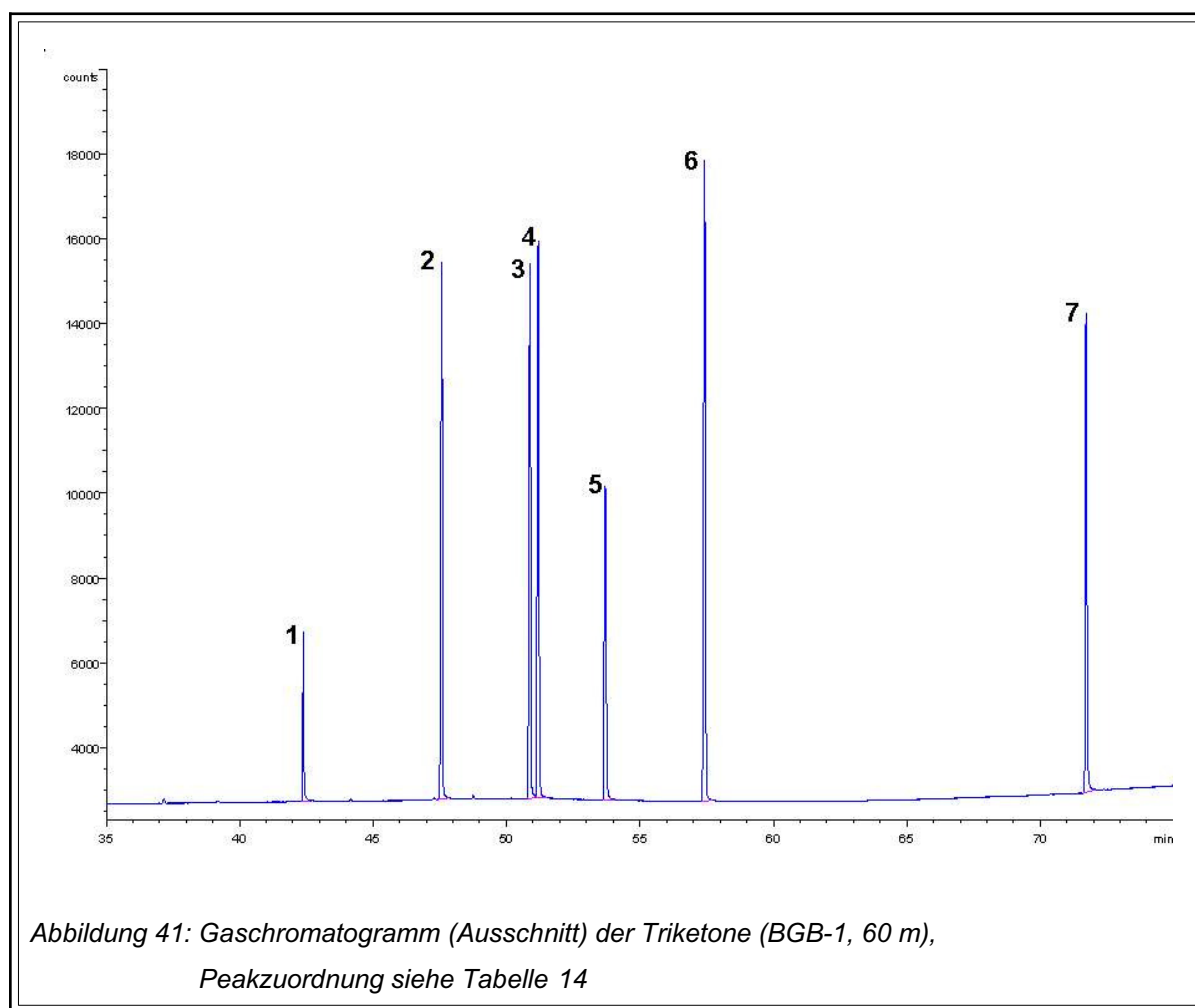
Die Identifizierung einzelner Triketone anhand ihrer UV-Spektren (DAD) erwies sich als schwierig, da sich die Spektren der Triketone nur geringfügig unterscheiden. Nur das strukturell abweichende Agglomeron zeigte ein spezifisches UV-Spektrum. **Abbildung 40** stellt das UV-Spektrum für Agglomeron dem UV-Spektrum des Flavensons (exemplarisch für alle anderen Triketone) gegenüber. Die UV-Maxima der einzelnen Triketone sind in den analytischen Daten (Kapitel D) aufgeführt.

Im Ergebnis liegt eine Methode vor, die zur Analyse von β -Triketonen sowie ihrer im Acylrest variierenden Derivate gut geeignet ist. Insbesondere die kurze Analysenzeit ermöglicht ein schnelles Screening ätherischer Öle auf das Vorhandensein der hier vorgestellten Triketone, die anschließend leicht quantifiziert werden können. Letzteres ist vor allem im Hinblick auf die damit verbundene antimikrobielle Wirksamkeit wichtig.

4.3 Gaschromatographie (GC)

Die gaschromatographische Auftrennung der isolierten bzw. synthetisierten Triketone erfolgte auf unterschiedlich polaren Säulen. Bei Verwendung von GC-Säulen mit polarer stationärer Phase (Polyethylenglycol) zeigen die Peaks der Triketone ein typisches Tailing, so dass für die weiteren Versuche eine unpolare stationäre Phase (100% Dimethylpolysiloxan) zur Anwendung kam. **Abbildung 41** zeigt das Gaschromatogramm, das mit einer solchen Phase (BGB-1) erhalten wurde. Die Identifizierung der einzelnen Triketone erfolgte massenspektroskopisch mittels einer GC-MS-Kopplung sowie unter Berücksichtigung einer von Temperaturgradienten und Elutionszeit unabhängigen Kennzahl, dem Retentionsindex (R_i).

Die Ermittlung der Retentionsindices für die Triketone erfolgte nach MIERENDORFF (2002). Dazu wurden die Retentionszeiten einer homologen Reihe der *n*-Alkane gegen für diese definierten Retentionsindices (Anzahl der Kohlenstoffe multipliziert



mit 100) graphisch aufgetragen. Aus einer Regressionskurve dritten Grades resultierte ein Korrelationskoeffizient von $R = 0,999995$, welcher für die nachfolgenden Berechnungen als ausreichend angesehen wurde.

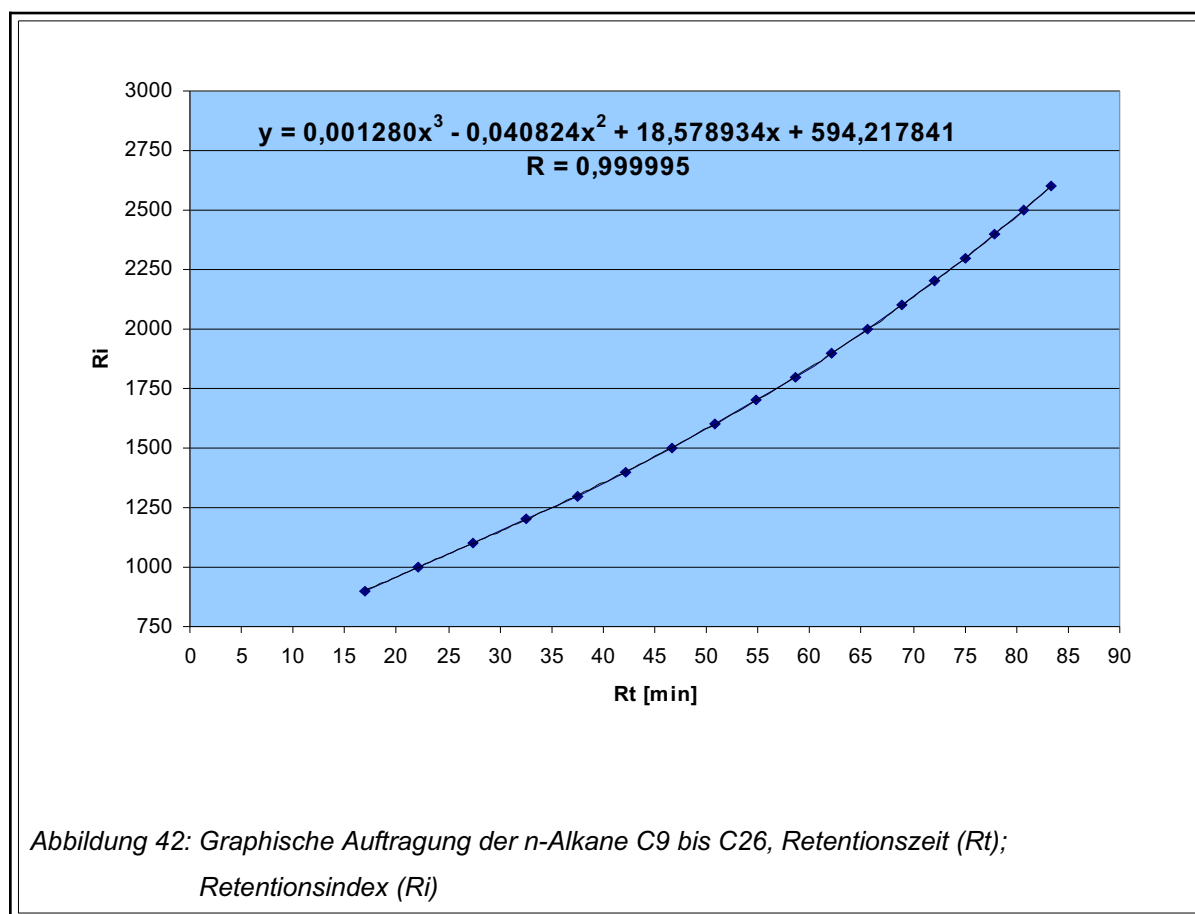
Tabelle 14: Retentionszeiten (t_R) und Retentionsindices (R_i) der Triketone (BGB-1)

Peak-Nummer (Abb. 41)	Triketon	t_R [min]	R_i
1	„Acetyl-Derivat“	42,38	1405
2	Flaveson	47,57	1523
3	Isoleptospermon	50,88	1602
4	Leptospermon	51,19	1610
5	Agglomeron	53,71	1672
6	Papuanon	57,42	1769
7	„Decanoyl-Derivat“	71,72	2189

Die aus der Kurve berechnete Funktion (**Abb. 42**)

$$y = 0,001280 x^3 - 0,040824 x^2 + 18,578934 x + 594,217841$$

ermöglichte dann die Ermittlung der Retentionsindices aus den Retentionszeiten der einzelnen Triketone. Diese sind in **Tabelle 14** aufgeführt.



5 Eigenschaften der β -Triketone

5.1 Untersuchungen zur Stabilität

Eine Stabilitätsprüfung der Triketone erschien aus mehreren Gründen sinnvoll. In der Literatur finden sich im Zusammenhang mit der Anwendung von Teebaumöl (aus *Melaleuca alternifolia*) zunehmend Berichte über das Auftreten von Hautirritationen

bis hin zu allergischen Reaktionen. Dies trifft insbesondere auf das Australische Teebaumöl zu [RUBEL et al., 1998 und DE GROOT & WEYLAND, 1992]. Einige Autoren machen das 1,8-Cineol [APTED, 1991 und RUBEL et al., 1998] verantwortlich, andere zählen δ -Limonen, Aromadendren und α -Terpinen zu den wichtigsten allergisierenden Inhaltsstoffen [KNIGHT et al., 1994]. Beobachtet wurde außerdem, dass das Allergisierungspotential während der Lagerung des Öls zunahm. Daraufhin wurde australisches Teebaumöl künstlich gealtert. Dabei erhöhten sich die Peroxidzahl und der *p*-Cymen-Gehalt bei gleichzeitiger Abnahme von α -Terpinen, γ -Terpinen und Terpinolen [HARKENTHAL et al., 1998]. Es wird heute davon ausgegangen, dass vor allem die durch Autoxidation entstehenden Peroxide wie Ascaridol und die oxidativen Folgeprodukte wie das *p*-Cymen oder das 1,2,4-Trihydroxymenhan die Kontaktekzeme beziehungsweise Hautirritationen verursachen [HARKENTHAL et al., 2000].

Obwohl vermutet werden konnte, dass β -Triketone aufgrund ihrer Oxidationsstufe relativ stabil sind, sollte dies mit einer Langzeit-Stabilitätsprüfung nachgewiesen werden. Diese wurde so ausgerichtet, dass sie auch die Bedingungen der geplanten antimikrobiellen Tests (37°C) und der Untersuchungen zur Phototoxizität (Bestrahlung mit UV-Licht) berücksichtigte. Da nur von Flaveson genügend Reinsubstanz vorhanden war, wurden die Versuche exemplarisch mit diesem Triketon durchgeführt und eine Übertragbarkeit auf die anderen Triketone aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit angenommen.

5.1.1 Verhalten von Flaveson unter definierten Lagerbedingungen

Für die Stabilitätsuntersuchung wurden jeweils 5,0 g gereinigten Flavesons (99,2%) in Flaschen aus braunem und weißem Glas gegeben und über einen Zeitraum von 60 Wochen bei verschiedenen Temperaturen gelagert.

Je zwei Braunglas- und Weißglasflaschen wurden einer Raumtemperatur von 20 bis 29°C dem Tageslicht (Fenster mit Sonneneinstrahlung) ausgesetzt. Weitere zwei Flaschen aus Braunglas wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert, um das Verhalten von Flaveson unter den im Labor herrschenden Lagerbedingungen zu testen. Zwei Braunglasflaschen wurden im Dunkeln bei 37°C sowie zwei Weißglasflaschen bei

Tageslicht und 37°C aufbewahrt, um die Bedingungen für die geplanten antimikrobiellen Untersuchungen zu simulieren, bei denen die Triketone über einen längeren Zeitraum einer konstanten Temperatur von 37°C ausgesetzt sein würden. **Tabelle 15** fasst die einzelnen Bedingungen zusammen.

Tabelle 15: Lagerbedingungen für Flaveson

Probe	Temperatur	Glasart	Standort
A	Raumtemperatur (20°C – 29°C)	Braunglas	Fenster
B	Raumtemperatur (20°C – 29°C)	Weißglas	Fenster
C	4°C	Braunglas	Kühlschrank (dunkel)
D	37°C	Braunglas	Trockenschrank (dunkel)
E	37°C	Weißglas	Trockenschrank

Die Entnahme der Proben fand in folgenden Zeitintervallen statt:

- zum Zeitpunkt 0 (Start)
- nach 1 Woche
- nach 4 Wochen
- nach 8 Wochen
- nach 12 Wochen
- nach 24 Wochen
- nach 48 Wochen
- nach 60 Wochen

Vor jeder Probenahme wurden sämtliche Glasgefäße für etwa zwei Stunden bei -25°C ausgefroren, um evtl. in der Gasphase befindliche Substanzen zu kondensieren. Bei der Probenahme wurden aus jedem Gefäß zwei Proben von je 100 µL entnommen. Nach Verdünnung mit Hexan wurden die einzelnen Proben gaschromatographisch analysiert. In den **Tabellen 16** und **17** sind die Ergebnisse für die beiden Glasarten bei Tageslicht und Raumtemperatur aufgeführt (pro Zeitpunkt 4 Werte aus zwei Ansätzen).

B Ergebnisse

Tabelle 16: Reinheit von Flaveson (Peakflächenprozent), Braunglas, RT, Tageslicht

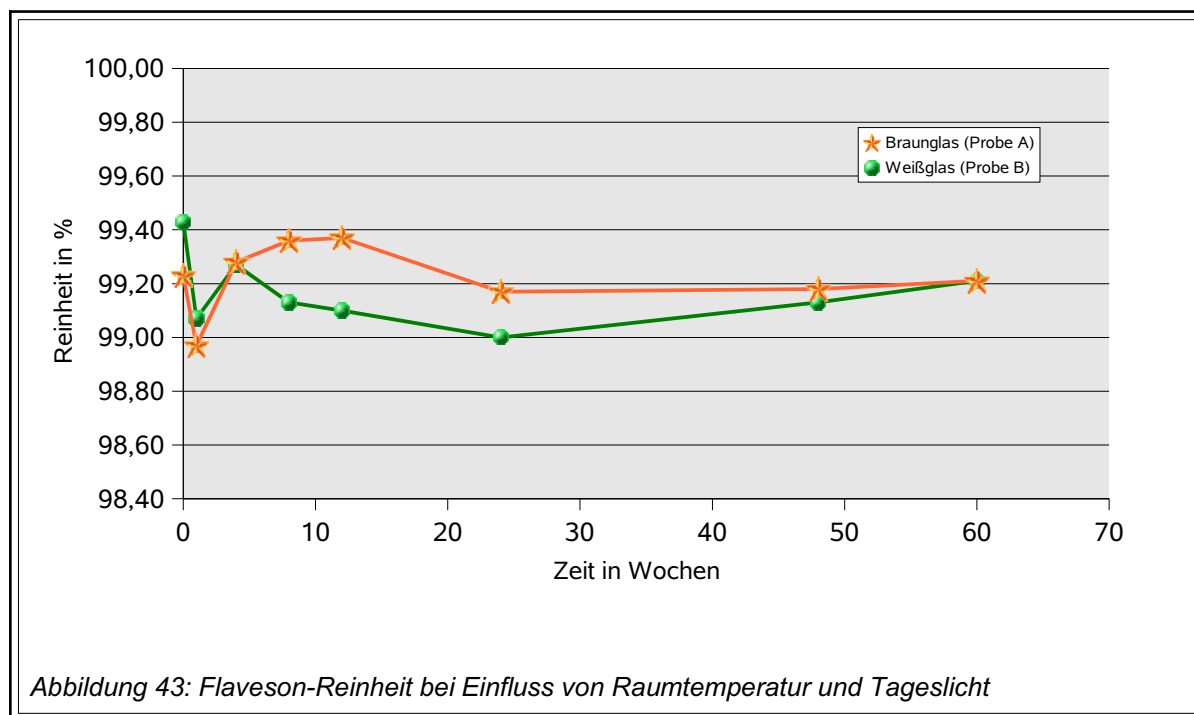
Zeitpunkt	A1 [%]	A2 [%]	A3 [%]	A4 [%]	Mittelwert [%]
0 (Start)	99,28	99,25	99,17	99,23	99,23
nach 1 Woche	98,96	98,98	98,92	99,00	98,97
nach 4 Wochen	99,25	99,36	99,25	99,26	99,28
nach 8 Wochen	99,37	99,39	99,37	99,32	99,36
nach 12 Wochen	99,39	99,35	99,37	99,37	99,37
nach 24 Wochen	99,28	99,01	99,22	99,16	99,17
nach 48 Wochen	99,21	99,17	99,09	99,25	99,18
nach 60 Wochen	99,16	99,31	99,23	99,13	99,21

Tabelle 17: Reinheit von Flaveson (Peakflächenprozent), Weißglas, RT, Tageslicht

Zeitpunkt	B1 [%]	B2 [%]	B3 [%]	B4 [%]	Mittelwert [%]
0 (Start)	99,30	99,23	99,24	99,96	99,43
nach 1 Woche	99,08	99,04	99,05	99,12	99,07
nach 4 Wochen	99,14	99,35	99,26	99,31	99,27
nach 8 Wochen	99,13	99,07	99,12	99,21	99,13
nach 12 Wochen	99,13	99,17	99,08	99,03	99,1
nach 24 Wochen	99,04	98,96	99,01	99,00	99,00
nach 48 Wochen	99,21	99,02	99,11	99,16	99,13
nach 60 Wochen	99,25	99,18	99,16	99,24	99,21

Aus den Ergebnissen der vier Einzelwerte wurde jeweils der Mittelwert gebildet und gegen die Zeit in einem X,Y-Diagramm aufgetragen (**Abb. 43**). Der Mittelwert aller Einzelwerte der Probe A beträgt 99,22% und für die Einzelwerte der Probe B 99,17%. Das Diagramm zeigt deutlich, dass der Flaveson-Gehalt bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 60 Wochen unabhängig von der Art des Glases konstant bleibt. Dieses Ergebnis wurde gestützt durch die relative Standardabweichung sämtlicher Einzelwerte von 0,14% für Probe A und 0,18% für Probe B. Die geringen Schwankungen der Mittelwerte waren angesichts einer Gerätepräzision sowie der Messungenauigkeiten durch das Pipettieren zu vernachlässigen. Es wurden keine flüchtigen Artefakte oder Spaltprodukte im Gaschromatogramm nachgewiesen; die Kontrolle mittels DC ergab keinen Hinweis auf mögliche Substanzveränderungen.

Die β -Triketone wurden im Labor standardmäßig im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, was mit der Probe C simuliert wurde. Auf eine detaillierte Aufführung der für Probe C erhaltenen Ergebnisse wird hier verzichtet, da sie denen der Proben A und



B sehr ähnlich waren. Der Mittelwert aller Einzelmessungen beträgt 99,12% bei einer relativen Standardabweichung von 0,11%. Der Flaveson-Gehalt veränderte sich über den gewählten Zeitraum nicht, es wurden keine Artefakte oder Spaltprodukte beobachtet.

Tabelle 18: Reinheit von Flaveson (Peakflächenprozente), 37°C, Dunkelheit

Zeitpunkt	D1 [%]	D2 [%]	D3 [%]	D4 [%]	Mittelwert [%]
0 (Start)	99,08	99,03	99,07	99,26	99,11
nach 1 Woche	98,97	98,99	98,82	99,12	98,98
nach 4 Wochen	99,12	98,85	98,95	99,09	99,00
nach 8 Wochen	99,13	99,11	99,10	99,28	99,16
nach 12 Wochen	98,93	99,31	98,93	99,14	99,08
nach 24 Wochen	99,23	99,16	99,16	99,31	99,22
nach 48 Wochen	99,11	99,24	99,32	99,26	99,23
nach 60 Wochen	99,21	99,13	99,09	99,11	99,14

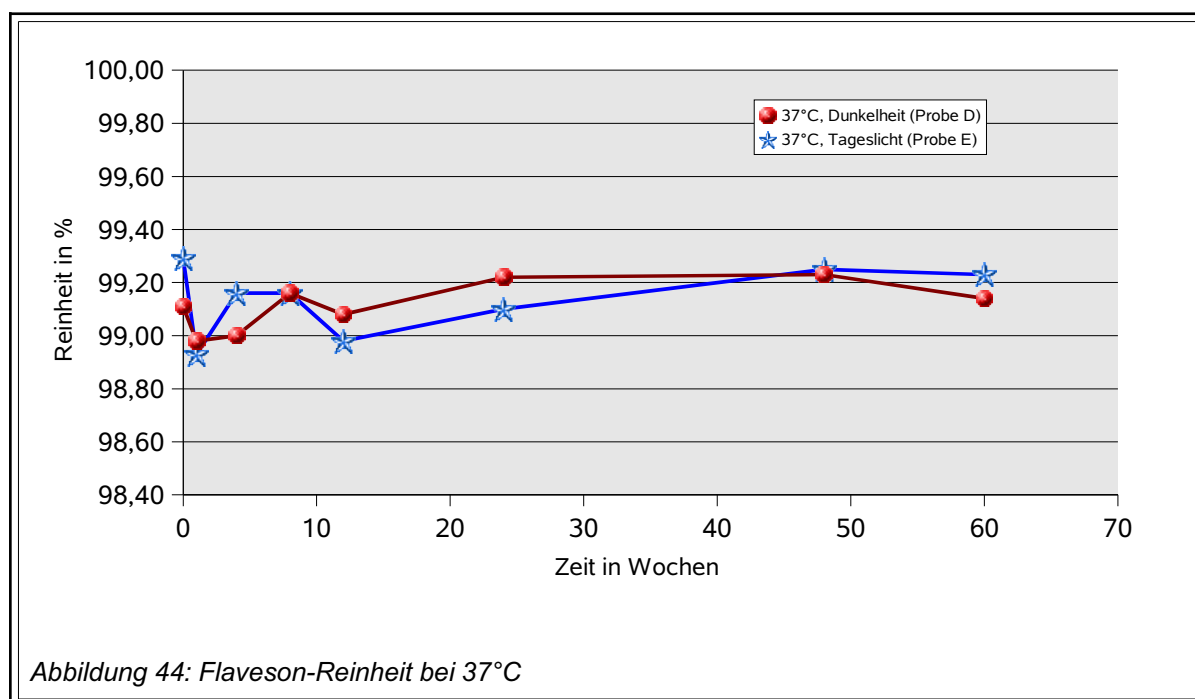
B Ergebnisse

Die im Rahmen mikrobiologischer Untersuchungen herrschenden Bedingungen sollten mit den Proben D und E nachvollzogen werden. Aufgrund der Versuche mit der Kugelrohrdestillation war davon auszugehen, dass die β -Triketone bei einer Temperatur von 37°C – auch über einen längeren Zeitraum – keinerlei chemische Veränderungen aufweisen würden. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den **Tabellen 18** und **19** aufgeführt.

Tabelle 19: Reinheit von Flaveson (Peakflächenprozentage), 37°C, Tageslicht

Zeitpunkt	E1 [%]	E2 [%]	E3 [%]	E4 [%]	Mittelwert [%]
0 (Start)	99,23	99,20	99,47	99,25	99,29
nach 1 Woche	98,83	98,94	98,95	99,01	98,93
nach 4 Wochen	99,16	99,05	99,20	99,23	99,16
nach 8 Wochen	99,16	99,14	99,16	99,18	99,16
nach 12 Wochen	98,76	98,73	99,16	99,25	98,86
nach 24 Wochen	99,09	99,1	99,04	99,18	99,10
nach 48 Wochen	99,19	99,21	99,35	99,26	99,25
nach 60 Wochen	99,24	99,19	99,29	99,21	99,23

Als Mittelwert aller Einzelmessungen ergab sich für die Probe D 99,11% und für die Probe E 99,14% erhalten. Die relativen Standardabweichungen betragen 0,13%



bzw. 0,16% und bestätigten somit die eingangs geäußerte Vermutung zur Stabilität der Triketone. Über einen Zeitraum von 60 Wochen ließ sich kein Einfluss der Temperatur (37°C) nachweisen, auch nicht im Zusammenwirken mit Tageslicht. Die Werte wurden graphisch aufgetragen und sind in **Abbildung 44** dargestellt. Auch hier waren die geringen Schwankungen der Mittelwerte unter Berücksichtigung der Gerätepräzision sowie der Messungenauigkeiten durch das Pipettieren zu vernachlässigen.

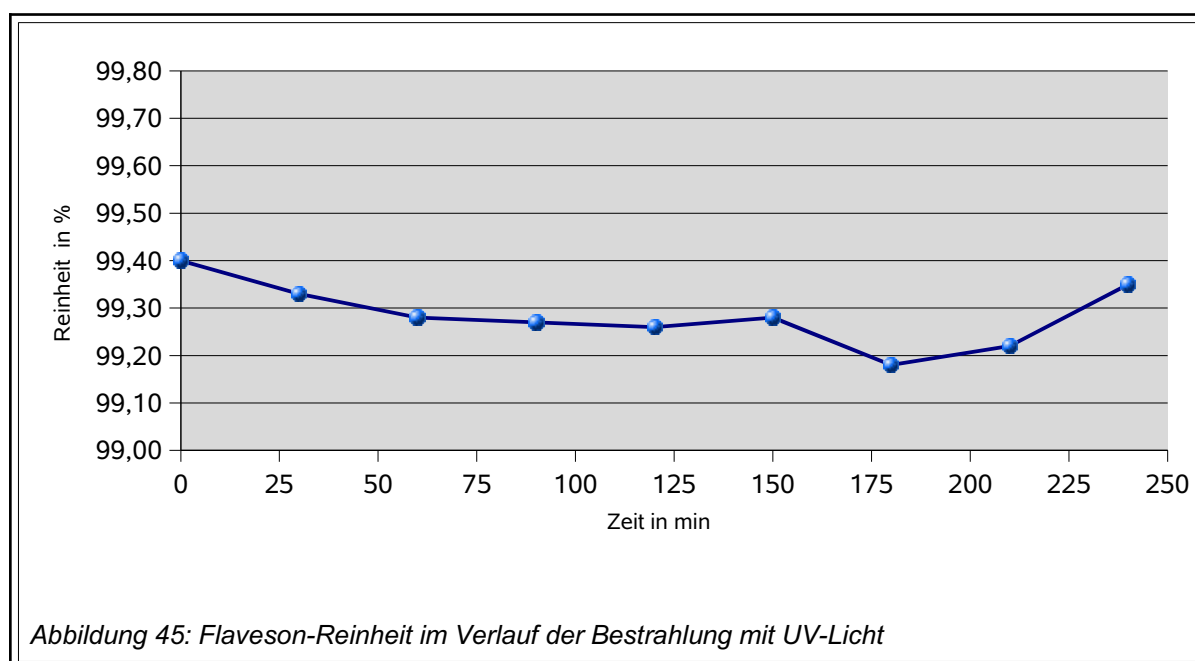
5.1.2 Verhalten von Flaveson bei Bestrahlung mit UV-Licht

Vor der Durchführung eines Phototoxizität-Tests musste sichergestellt werden, dass die Triketone durch die Bestrahlung mit UV-Licht keine strukturellen Veränderungen oder Zersetzungsreaktionen erfahren. Deshalb wurden zwei Proben (A und B) mit je 5,0 g gereinigtem Flaveson (99,4%) in Mikrotiterplatten überführt und vier Stunden einer Bestrahlung durch den Dr. Hönle Sonnensimulator SOL-500 ausgesetzt, dessen Hauptemissionsbereich zwischen 300 und 700 nm liegt. Um Verluste durch Verdunstung zu vermeiden, wurde die Mikrotiterplatte UV-durchlässig abgedeckt und auf 25°C temperiert. In Zeitintervallen von 30 min wurden jeder Probe zweimal 100 µL entnommen, in Hexan gelöst und gaschromatographisch ausgewertet. **Tabelle 20** stellt die so erhaltenen Reinheitsgrade für Flaveson dar (Peakflächenprozentage).

Tabelle 20: Reinheit von Flaveson während der Bestrahlung mit UV-Licht (Peakflächenprozentage)

Zeit in min	A1 [%]	A2 [%]	B1 [%]	B2 [%]	Mittelwert [%]
0	99,48	99,53	99,26	99,33	99,40
30	99,31	99,36	99,39	99,27	99,33
60	99,37	99,40	99,14	99,19	99,28
90	99,05	99,12	99,41	99,48	99,27
120	99,38	99,34	99,19	99,13	99,26
150	99,29	99,21	99,32	99,29	99,28
180	99,11	99,09	99,23	99,27	99,18
210	99,36	99,31	99,07	99,15	99,22
240	99,42	99,35	99,29	99,35	99,35

Aus den vier Einzelmessungen wurde jeweils der Mittelwert gebildet und in **Abbildung 45** gegen die Zeit aufgetragen. Die Flaveson-Konzentration blieb über den Zeitraum von 240 min konstant, im Gaschromatogramm und auf der DC wurden keine Artefakte oder Spaltungsprodukte nachgewiesen. Flaveson war unter den gewählten Bedingungen stabil, was zusätzlich durch den Mittelwert aller Einzelmessungen von 99,28% bei einer relativen Standardabweichung von 0,13% bestätigt wurde.



Ergänzend wurde das Verhalten von Flaveson im UV-Licht bei 254 nm überprüft, da es sich hierbei um eine typische Messwellenlänge handelt. Eine Doppelprobe von jeweils 1,5 g Flaveson (99,8%) wurde in verschließbare Quarzküvetten gegeben und mit der gewünschten Wellenlänge bestrahlt. Der Zeitraum betrug 80 min, wobei alle 10 min aus beiden Proben je 100 µL Flaveson entnommen und auf die oben beschriebene Weise analysiert wurde. Erwartungsgemäß wurden keine Veränderungen gefunden. Der Mittelwert der Peakflächenprozente betrug 99,76% bei einer relativen Standardabweichung von 0,15%.

Im Ergebnis lässt sich festhalten, dass es sich bei Flaveson um eine sehr stabile Substanz handelt. Es ließ sich weder der Einfluss von UV-Strahlung noch eine Veränderung durch Wärme nachweisen. Aufgrund der Strukturähnlichkeit der im

Rahmen dieser Arbeit behandelten β -Triketone wurde davon ausgegangen, dass sich das Ergebnis von Flaveson auf diese übertragen lässt und somit keine Stabilitätsprobleme bei den nachfolgenden Untersuchungen zu befürchten sind.

5.2 Untersuchungen zum phototoxischen Potential der β -Triketone

Die Bestimmung photosensibilisierender Eigenschaften von Stoffen ist vor allem dann bedeutsam, wenn diese lokal auf die Haut appliziert werden, längerfristigen Hautkontakt haben oder nach systemischer Gabe die Haut erreichen. Vor allem neue Arzneistoffe erfordern das Festlegen von Vorschriften und Methoden zur Erkennung und Bestimmung möglicher photosensibilisierender Eigenschaften [PUTMAN et al., 2003]. Hierzu sind in den USA die „Guidance for Industry – Photosafety Testing“ (2003) und in der Europäischen Union die „Note for Guidance on Photosafety Testing“ (2002) veröffentlicht worden. Beide Richtlinien verfolgen das Ziel, Arzneistoffe, die für den Einsatz am Menschen bestimmt sind, auf mögliche photosensibilisierende Eigenschaften zu untersuchen und diese gegebenenfalls zu beurteilen. Zur Vermeidung unnötiger Kosten sind die Untersuchungen auf Stoffe beschränkt, die in einem Bereich von 260 bis 700 nm UV- oder sichtbares Licht absorbieren. Dabei werden vier Kategorien unterschieden: Photoirritation (akute Hautreaktion), Photoallergie (durch Photoprodukte ausgelöste immunologische Reaktion), Photogenotoxizität (genotoxische Reaktion) und Photokarzinogenität (Induktion von Hauttumoren).

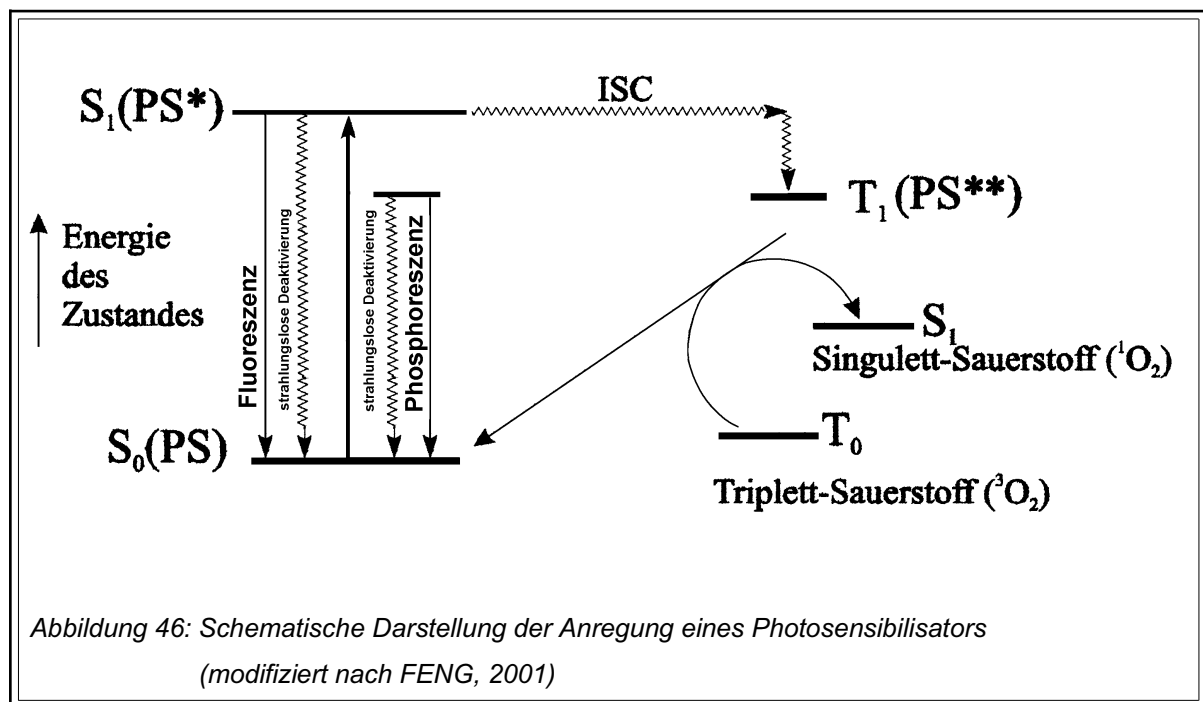
Die β -Triketone erfüllen die oben genannten Bedingungen und rechtfertigen daher eine Untersuchung auf mögliche photosensibilisierende Eigenschaften. Sie absorbieren UV-Licht im Bereich von 200 bis 360 nm, womit sie sich im unteren Viertel des in den Richtlinien geforderten Bereiches befinden, und sie werden topisch appliziert. Dies geschieht in reiner Form oder als Zusatz zu kosmetischen Mitteln, Pflegeprodukten und anderen dermatologischen Externa.

5.2.1 Klassifizierung der Photosensibilisierung

Die Photosensibilisierung ist als ein Prozess definiert, bei dem durch Verbindungen endogenen oder exogenen Ursprungs (sogenannte Photosensibilisatoren) die Empfindlichkeit der Haut gegenüber Sonnenlicht - nach Exposition einer normalerweise ineffektiven Strahlungsdosis - erhöht ist [SPIELMANN et al., 2000 und LEHMANN, 2004]. Besonders häufig werden Photosensibilisierungsreaktionen durch den UVA-Anteil des Sonnenlichts ausgelöst, gefolgt vom sichtbaren Licht und der UVB-Strahlung. Die Photosensibilisierung wird in verschiedene klinisch relevante Kategorien unterteilt. Reaktionen, bei denen es zum Angriff und zur Schädigung zellulärer Bestandteile kommt, werden als phototoxische Reaktionen bezeichnet. Hierzu gehört auch die Photoirritation, welche die akute phototoxische Hautreaktion beschreibt, die durch Photosensibilisatoren hervorgerufen wird. Außerdem sind photogenotoxische Reaktionen und photoallergische Reaktionen zu nennen, wobei letztere immunologisch vermittelt werden und eine Induktionszeit von ein bis zwei Wochen besitzen. Es erfolgt zunächst die Bildung eines Photoadduktes aus einem Protein und einem Photosensibilisator. Erst nach erneutem Kontakt mit dem Photosensibilisator und Licht-Exposition kommt es zu einer photoallergischen Reaktion [SPIELMANN et al., 2000]. Eine weitere Kategorie stellt die Photokarzinogenität dar. Sie bezeichnet die Eigenschaft einer Substanz, in Kombination mit Licht die Bildung von Hauttumoren zu induzieren [NOTE, 2002]. Hierbei werden vor allem drei Krebsarten gefunden: nicht-melanomartige Hautkarzinome (Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome), nicht-kutane Karzinome und bösartige Melanome [STERN, 1998].

5.2.2 Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren sind Substanzen, die sich nach Absorption von UV/Vis-Strahlung in einem angeregten Zustand befinden, aus dem sie wieder in den Grundzustand relaxieren können. Die dabei frei werdende Energie steht für verschiedene Vorgänge zur Verfügung, die schematisch in **Abbildung 46** dargestellt sind. Durch Absorption von Photonen erfolgt zunächst der Übergang des Photosensibilisators (PS) vom Singulett-Grundzustand (S_0) in den angeregten Singulett-Zustand (S_1). Hierbei handelt es sich um einen sehr kurzlebigen Zustand, der über eine Spinkkehr (ISC = intersystem crossing) in den angeregten langlebigen Triplett-Zustand (T_1) übergeht.



Ausgehend vom energiereichen angeregten Triplett-Zustand können direkt photochemische Prozesse ablaufen oder es erfolgt die Übertragung der Energie und des Spins auf andere Moleküle, zum Beispiel auf molekularen Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$). Dieser wird dann in den angeregten Singulett-Zustand ($^1\text{O}_2$) überführt und geht so leicht Reaktionen mit verschiedensten im Organismus vorhandenen Molekülen wie Aminosäuren, Proteinen, DNA und Lipiden ein. Weitere nicht-photodynamische Reaktionen und Photomodifikationen können folgen, wobei in beiden Fällen Reaktionsprodukte mit toxischen oder phototoxischen Eigenschaften entstehen [SPIELMANN et al., 2000]. Die durch Absorption aufgenommene Energie kann auch in Form von Fluoreszenz, Phosphoreszenz oder durch strahlungslose Deaktivierung wieder abgegeben werden.

Für viele Substanzen verschiedenster Arzneistoffklassen wurden phototoxische Reaktionen als unerwünschte Arzneimittelwirkung (UAW) nachgewiesen. Als Beispiele für häufig systemisch phototoxische Medikamente seien hier nichtsteroidale Anti-Phlogistika wie Piroxicam und Naproxen [DIFFEY et al., 1983], Phenothiazine wie Chlorpromazin und Promethazin [SCHULZ et al., 1956] sowie Amiodaron [FERGUSON et al., 1985] und Furosemid [BURRY, 1976] angeführt. Mit zunehmender Verwendung von Pflanzenextrakten in dermatologischen Externa ge-

winnen auch pflanzliche Photosensibilisatoren mit ihren UAW an Bedeutung. Eine Auswahl von Pflanzen mit photosensibilisierenden Eigenschaften ist in **Tabelle 21** aufgeführt, wobei die Furanocumarine, hier Psoralene, am häufigsten für phototoxische Reaktionen verantwortlich sind.

Tabelle 21: Pflanzen mit photosensibilisierenden Eigenschaften (Auswahl)

Stoffgruppe	Pflanze	Familie
Psoralene	• <i>Ammi majus</i> L. (Knorpelmöhre)	<i>Apiaceae</i>
	• <i>Heracleum</i> -Arten (Bärenklau)	<i>Apiaceae</i>
	• <i>Apium graveolens</i> L. (Sellerie)	<i>Apiaceae</i>
	• <i>Citrus</i> -Arten, wie <i>Citrus bergamia</i> Risso et Poit. (Bergamotte)	<i>Rutaceae</i>
	• <i>Ficus carica</i> L. (Feigenbaum)	<i>Moraceae</i>
	• <i>Psoralea corylifolia</i> L. (Asphaltklee)	<i>Fabaceae</i>
	• <i>Ruta graveolens</i> L. (Gartenraute)	<i>Rutaceae</i>
Naphthodianthrone	• <i>Hypericum</i> -Arten, wie <i>Hypericum perforatum</i> L. (Johanniskraut)	<i>Hypericaceae</i>
	• <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench (Buchweizen)	<i>Polygonaceae</i>

Die photosensibilisierenden Substanzen können durch unbeabsichtigtes Berühren der Pflanzen, bei der Verarbeitung von Pflanzen und Pflanzenteilen oder als Bestandteil von Externa auf die Haut gelangen. Die nachfolgende Belichtung führt zu Photodermatiden, die häufig mit einer länger anhaltenden Hyperpigmentierung der Haut verbunden ist. Ein bekanntes Beispiel ist die Berloque-Dermatitis, die früher nach Verwendung von Kölnischwasser auftrat, in welchem cumarinhaltiges Bergamottöl enthalten war. Auch für den Kontakt mit Blättern und Pflanzensaft von *Heracleum*-Arten und *Ruta graveolens* L. ist das häufige Auftreten von Photodermatiden dokumentiert. Für *Apium graveolens* L. (Sellerie) wurde gezeigt, dass er bei Infektion mit dem Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* zu dessen Abwehr photosensibilisierende Furanocumarine ausbilden kann [FROHNE und PFÄNDER, 2004].

In der Photodynamischen Therapie (PDT) macht man sich die oben beschriebenen Prozesse zu Nutze, um in Tumorzellen selektiv aktivierten Sauerstoff zu generieren, anzureichern und so gezielt entartetes Gewebe zu schädigen oder zu zerstören. Bei-

spiele hierfür sind die Porphyrin-Derivate und die Psoralene, wobei Letztere bevorzugt in der so genannten PUVA-Therapie bei Psoriasis und Vitiligo eingesetzt werden.

5.2.3 Kombiniertes Erythrozyten-Phototoxizitätstest

Zur Bestimmung photosensibilisierender Eigenschaften von Stoffen werden *in vivo*-, *in vitro*- und *in silico*-Testsysteme verwendet. Gemäß der europäischen „Richtlinie des Rates 86/609/EWG vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedsstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“ sollen vorrangig *in vitro*-Methoden eingesetzt werden, um unnötige Tierversuche zu vermeiden. Eine solche Methode stellt der kombinierte Erythrozyten-Phototoxizitätstest dar, der qualitative und quantitative Aussagen über phototoxische Eigenschaften von Substanzen erlaubt. Das Testprinzip besteht in der Aufnahme von Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die phototoxisch induzierte Hämolyse porciner Erythrozyten (Nachweis der Membranschädigung) sowie die Methämoglobin-Bildung (Nachweis von Oxidationen).

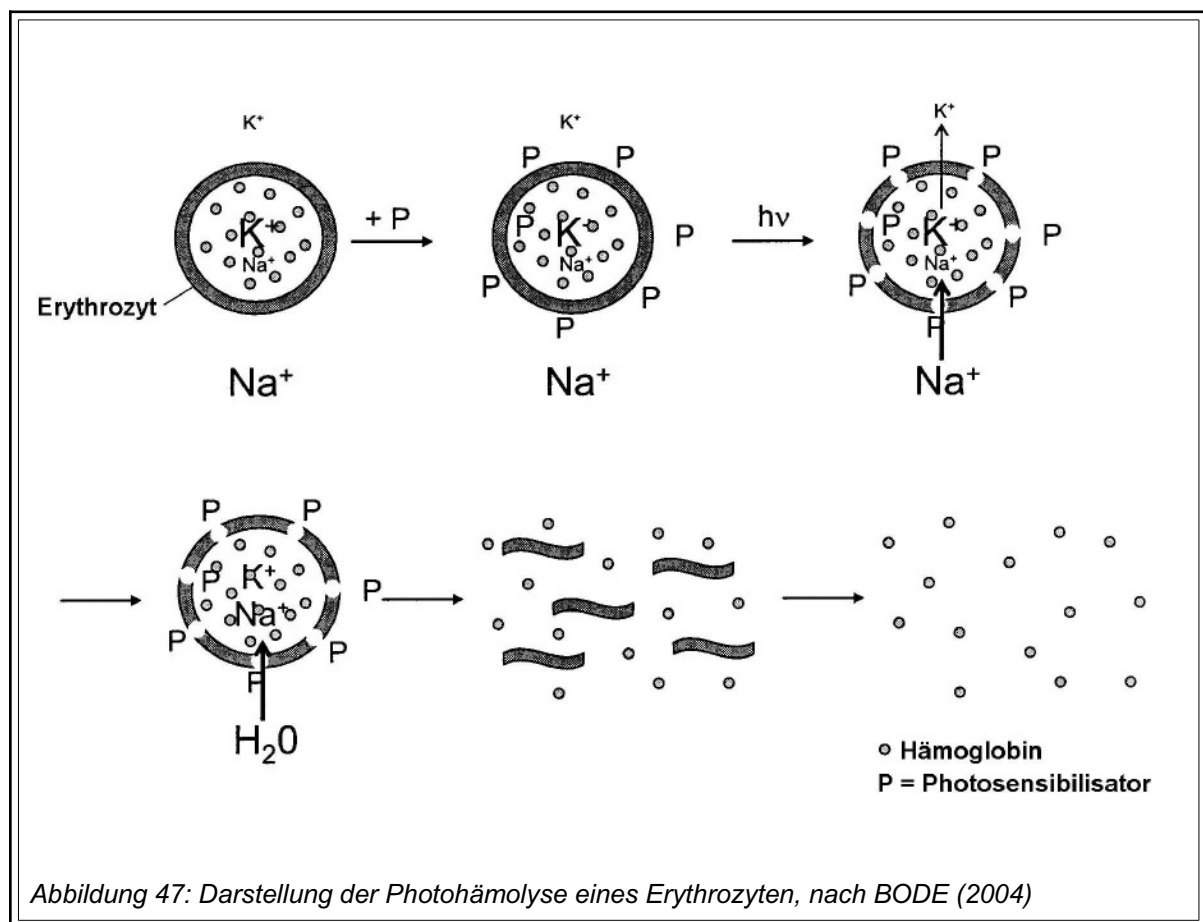
5.2.3.1 Photohämolyse von porcinen Erythrozyten

Erythrozyten stellen ein geeignetes Modell zur Bestimmung von Schädigungen an Zellmembranen dar. Sie besitzen eine Biomembran, die einen wichtigen Angriffsort für photochemische Prozesse darstellt [ZAREBSKA, 1994]. Nach dem Kontakt der Erythrozyten mit dem Photosensibilisator kann das Auflösen der Membran durch Messung des freigesetzten Hämoglobins leicht quantifiziert werden. Da sie keinen Zellkern besitzen, kann das Auflösen der Membran infolge von DNA-Schäden ausgeschlossen werden.

Die Gewinnung der Erythrozyten-Suspension erfolgte aus dem arteriellen Blut von gerade gekeulten deutschen Hausschweinen. Nach ihrer Aufarbeitung (Waschvorgänge, Einstellen der Zelldichte) wurden durch Verdünnung mit PBS-Puffer („phosphate buffered saline“) bzw. bidestilliertem Wasser die Arbeitssuspensionen herge-

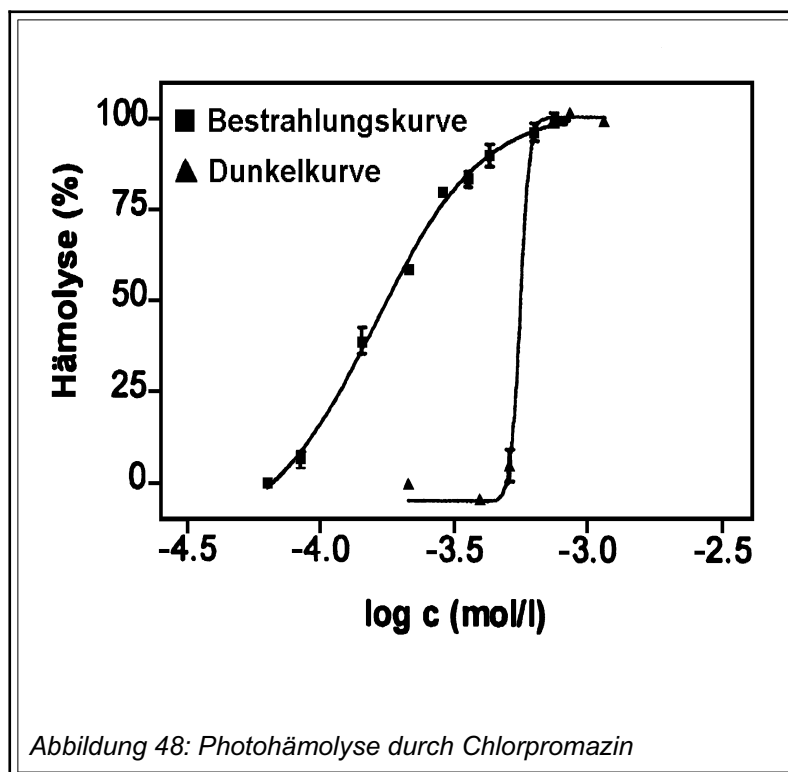
stellt, welche im Folgenden als RBC1-Suspension („red blood cell“) und BidestRBC-Suspension bezeichnet werden.

Abbildung 47 stellt das Prinzip der Photohämolysen eines Erythrozyten schematisch dar. Nach Zugabe des Photosensibilisators P werden die Erythrozyten bestrahlt, wobei es zu einer Perforierung der Erythrozytenmembran kommt. In der Folge davon strömen Natrium-Ionen (Na^+) in die Zelle ein und es kommt gleichzeitig zum Verlust von Kalium-Ionen (K^+). Mit den Natrium-Ionen strömt ebenfalls Wasser in die Zelle, welches die Membran zunächst dehnt und sie schließlich zum Platzen bringt. Dabei wird das intrazelluläre Hämoglobin freigesetzt und nach dem Abzentrifugieren der Membranbestandteile photometrisch im sichtbaren Licht bei 524 nm vermessen.



Als Beispiel für einen Arzneistoff mit phototoxischen Eigenschaften sei hier das Neuroleptikum Chlorpromazin angeführt. Das Ergebnis der Photohämolysen für einen definierten Konzentrationsbereich ist in einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung in

Abbildung 48 dargestellt. Zur Bestimmung des phototoxischen Potentials wird der Photohämolysefaktor gebildet, der Quotient aus den 50%-Hämolyse-Werten für die Dunkelkurve und die Bestrahlungskurve. Dieser Faktor erlaubt eine Beurteilung der



Photoreaktivität gegenüber Membranen [PAPE et al., 2001]. Überschreitet er den Wert 3,0 (wie in diesem Fall), handelt es sich nach PAPE et al. (2001) um eine auch *in vivo* phototoxische Substanz.

Die Auswahl der untersuchten Substanzen beschränkte sich auf die Triketone Flaveson (kurzer Acylrest), Papuanon (langer Acylrest) und Ag-

glomeron (abweichende Struktur) sowie den Triketon-Komplex aus Manukaöl. Das Manukaöl selbst konnte hier nicht überprüft werden, da es aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften nur unzureichend im PBS-Puffer löslich war.

In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass sich die Triketone Flaveson, Papuanon und Agglomeron sowie der Triketon-Komplex in ausreichendem Maße in PBS-Puffer lösen. Anschließend wurden jeweils von den einzelnen Triketonen und dem Triketon-Komplex Lösungen mit Konzentrationen von 0,01 mg / mL bis 10 mg / mL in Ethanol Uvasol® (Lösungen 1 bis 7, L1 bis L7 in **Tabelle 22**) hergestellt. Die verwendeten Konzentrationsbereiche wurden zuvor in einer Grobtitration ermittelt. Die Substanzlösungen wurden in Mikrotiterplatten überführt; das Schema der Befüllung ist in **Tabelle 22** dargestellt. Die Kavitäten A1 bis A6 sowie B1 enthalten neben den Substanzlösungen L1 bis L7 eine Suspension aus PBS-Puffer und eingestellter RBC-Suspension, woraus die angegebenen Konzentrationen resultieren. Die Kavitäten

B Ergebnisse

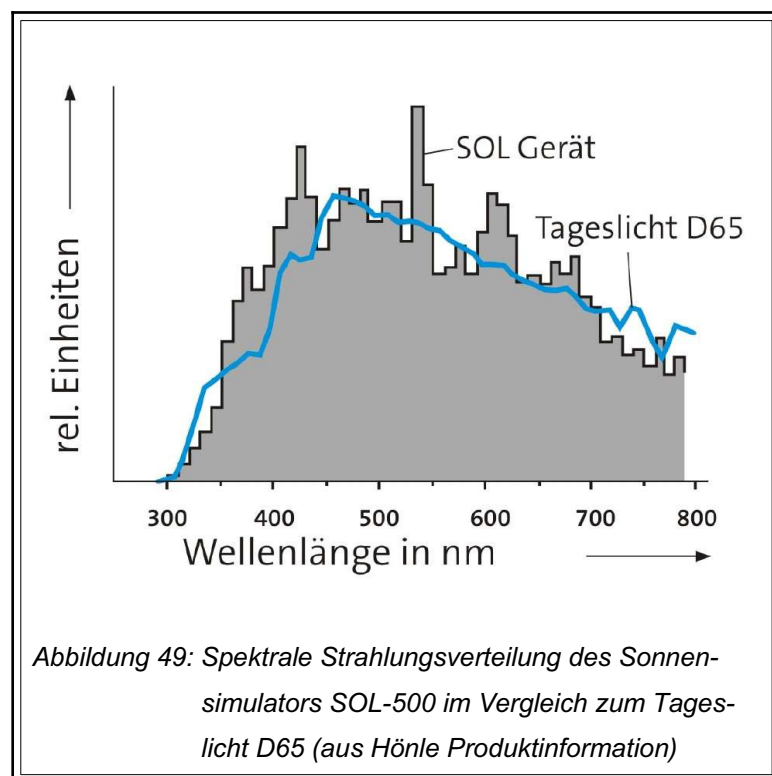
B2, B3, und B4 enthalten die Kontrollproben für 0% Hämolyse, wobei die Substanzlösung durch reines Ethanol ersetzt wurde. Die Proben für 100% Hämolyse befinden sich in den Kavitäten B5 und B6. Hier wurde die Substanzlösung ebenfalls durch Ethanol ersetzt und eine Suspension aus bidestilliertem Wasser und RBC-Suspension verwendet. Anschließend wurde die Mikrotiterplatten eine halbe Minute geschüttelt, um eine optimale Durchmischung zu erreichen.

Tabelle 22: Beschickung der Mikrotiterplatte für die Bestimmung der Photohämolyse

	1	2	3	4	5	6
A	1 mg/L Hämolyse	3 mg/L Hämolyse	10 mg/L Hämolyse	30 mg/L Hämolyse	100 mg/L Hämolyse	300 mg/L Hämolyse
	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1
	100 µL L1	100 µL L2	100 µL L3	100 µL L4	100 µL L5	100 µL L6
B	1000 mg/L Hämolyse	PBS 0% Hämolyse	PBS 0% Hämolyse	PBS 0% Hämolyse	Bidest 100% Hämolyse	Bidest 100% Hämolyse
	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL BidestRBC	900 µL BidestRBC
	100 µL L7	100 µL EtOH	100 µL EtOH	100 µL EtOH	100 µL EtOH	100 µL EtOH
L1 bis L7 = Lösungen der Triketone unterschiedlicher Konzentrationen PBS = PBS-Puffer RBC1 = Suspension aus eingestellter RBC-Suspension und PBS-Puffer BidestRBC = Suspension aus eingestellter RBC-Suspension und bidestilliertem Wasser						

Die Bestrahlung der auf 25°C temperierten abgedeckten Mikrotiterplatte erfolgte mit einem Dr. Hönle Solar Simulator SOL-500, der ein nahezu kontinuierliches Spektrum emittiert, das der natürlichen Sonnenstrahlung angepasst ist (**Abbildung 49**). Die Bezeichnung „Tageslicht D65“ beschreibt ein für derartige Prüfungen genormtes natürliches Strahlungsspektrum. Für Untersuchungen zur Photohämolyse werden normalerweise Sonnensimulatoren eingesetzt, die keine UVC-Strahlung und eine abgeschwächte UVB-Strahlung emittieren. Dies wurde durch Verwendung eines entsprechenden Filters erreicht. Die Bestrahlungsstärke betrug für die UVA-Strahlung 1,6 mWatt / cm² und für die UVB-Strahlung 0,10 mWatt / cm². Durch den verwen-

ten Deckel für die Mikrotiterplatte wurde die Bestrahlungsstärke zusätzlich in geringem Maße reduziert.



Für jedes Triketon wurden zwei Mikrotiterplatten befüllt, wobei eine Platte bei 25°C 150 min lang mit 1,6 mWatt / cm² bestrahlt und im Anschluß für 30 min im Dunkeln belassen wurde. Die andere Mikrotiterplatte wurde 180 min lang in der Dunkelheit bei 25°C aufbewahrt, um mögliche Dunkelreaktionen zu berücksichtigen. Danach wurden alle Suspensionen aus den Kavitäten in Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert und die daraus resultierenden Überstände der Suspensionen photometrisch bei 524 nm vermessen. Die Überstände der Suspensionen aus den Kavitäten B2, B3 und B4, die eine Hämolyse von 0% aufwiesen, wurden als Abgleich für das Lösungsmittel verwendet. Aus den Absorptionswerten der Kavitäten B5 und B6 für 100% Hämolyse wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Dieser wurde zu den gemessenen Absorptionen der Substanzlösungen ins Verhältnis gesetzt, das Ausmaß der Hämolyse in Prozent berechnet und eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt. Die Ergebnisse für Flaveson und Papuanon sind in **Abbildung 50**, die Ergebnisse für Agglomeron und den Triketon-Komplex in **Abbildung 51** dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weder die überprüften β -Triketone noch der aus Manukaöl isolierte Triketon-Komplex Hämolyse auslösen. Innerhalb des gewählten Konzentrationsbereiches sind die Steigungen der Geraden nicht signifikant von Null verschieden (Voraussetzung: n=7, VB 95%), das heißt, es besteht

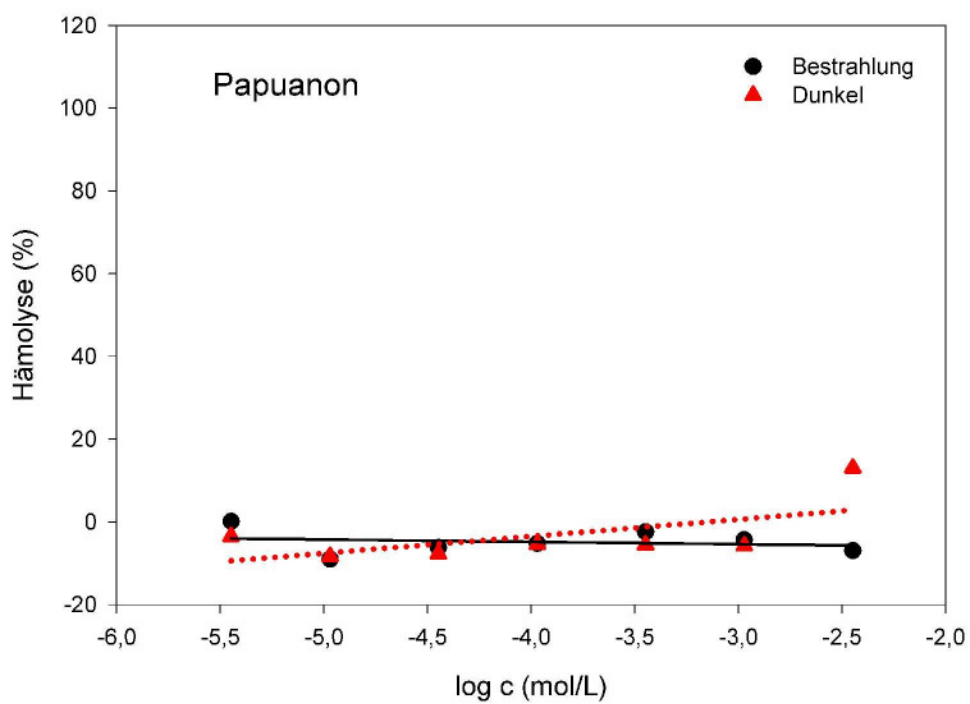
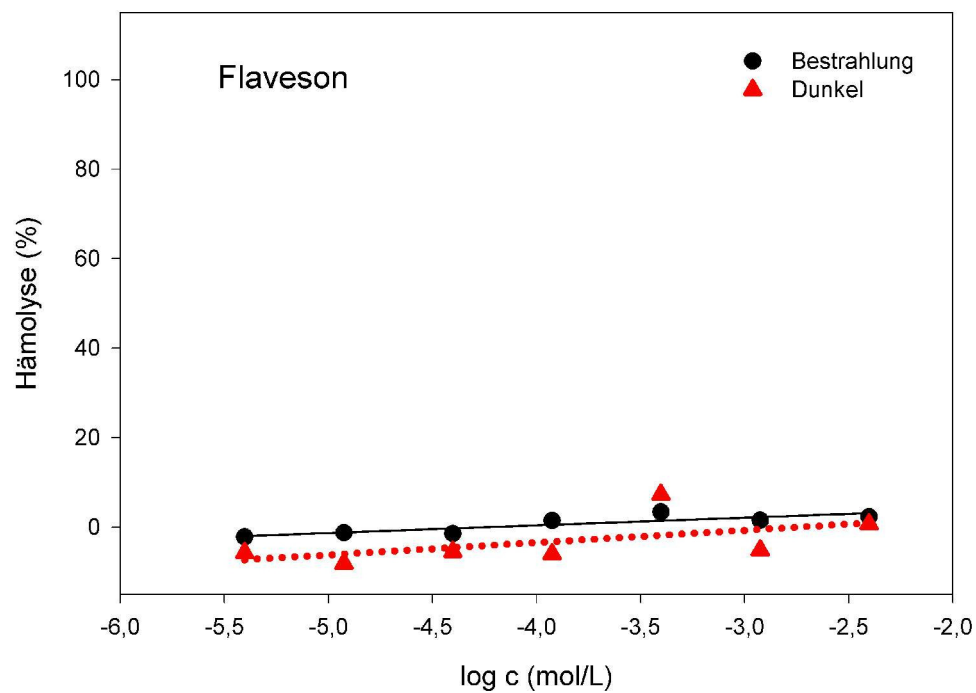


Abbildung 50: Photohämolysse, Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Flaveson und Papuanon

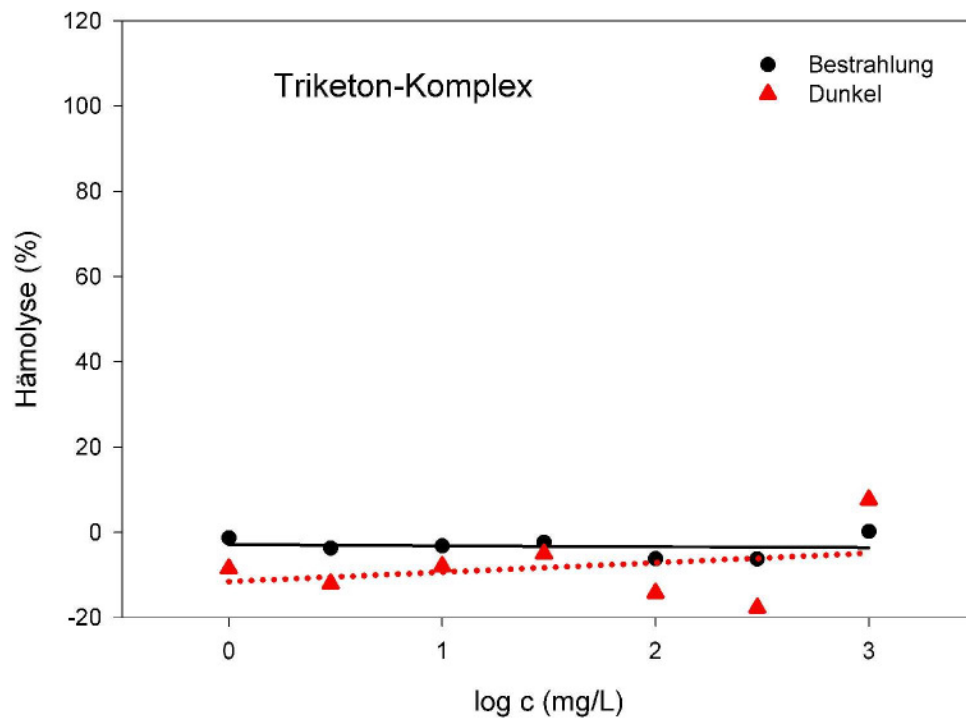
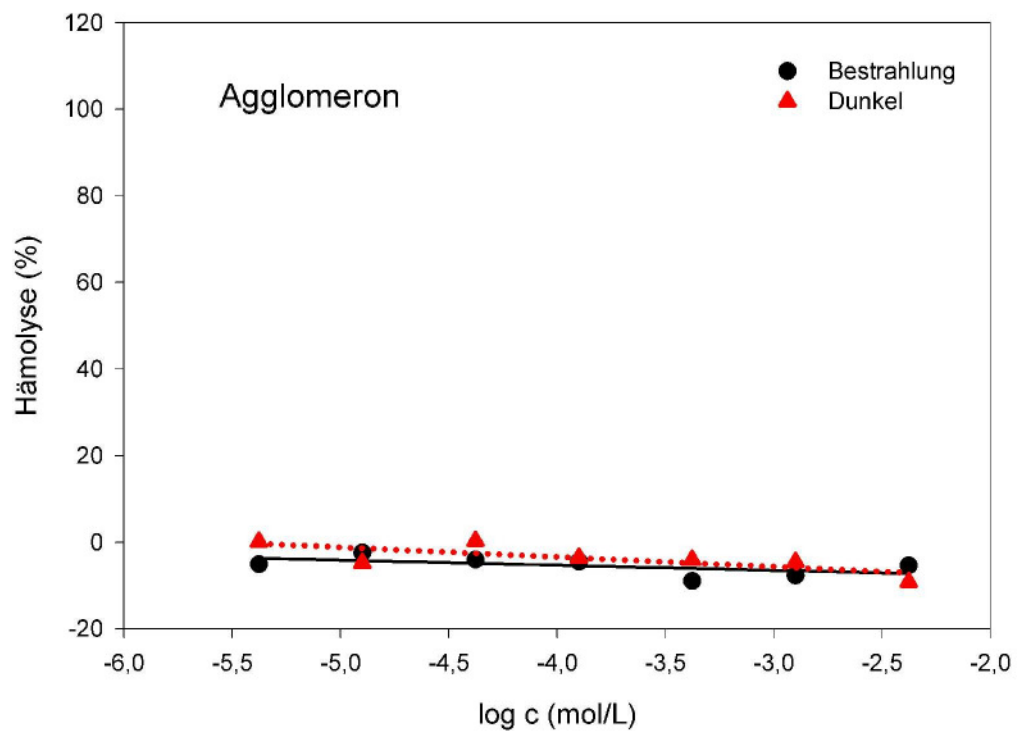
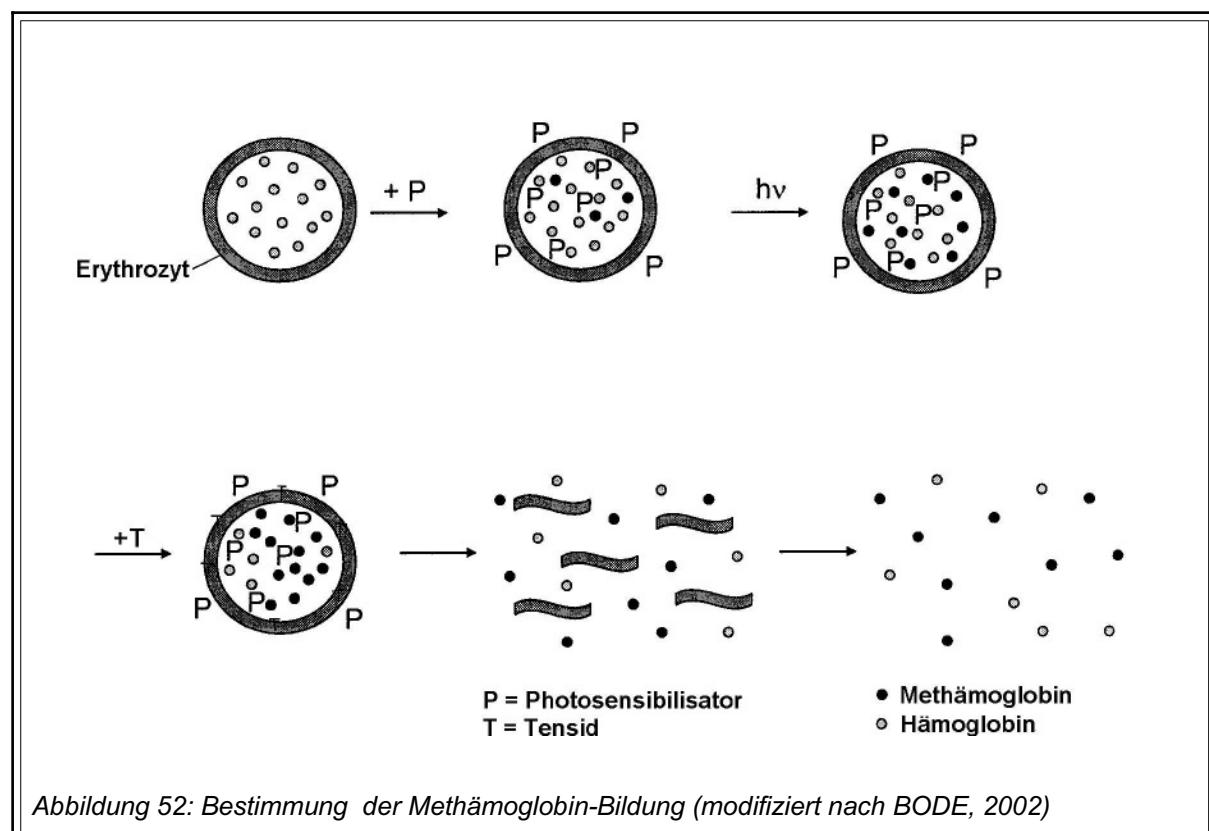


Abbildung 51: Photohämolysen, Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Agglomeron und den Triketon-Komplex

keine signifikante Abhängigkeit der Hämolyse von der Konzentration. Phototoxische Reaktionen, die auf Membranschädigungen beruhen, sind in diesem Konzentrationsbereich somit nicht zu befürchten.

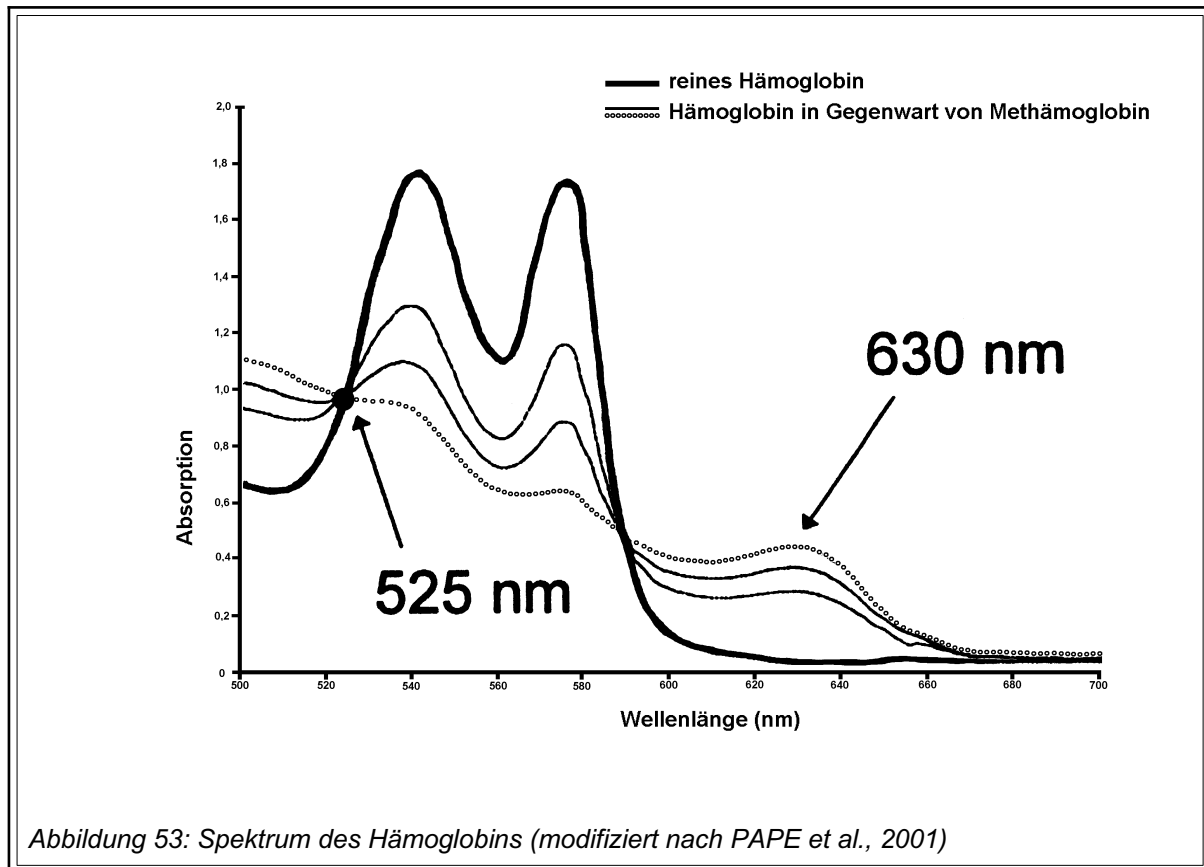
5.2.3.2 Methämoglobin-Bildung

Im zweiten Teil des kombinierten Erythrozyten-Phototoxizitäts-Testes wurde überprüft, ob die Triketone in der Lage sind, innerhalb der Zelle Hämoglobin durch Oxidation in Methämoglobin umzuwandeln. Dies erlaubt eine Aussage bezüglich phototoxischer Eigenschaften, deren Mechanismus auf einer Oxidation beruht und zu den sogenannten Typ I-Reaktionen gehört. **Abbildung 52** stellt schematisch die Bestimmung der Methämoglobin-Bildung dar.



Hierbei wird das im Hämoglobin vorliegende zweiwertige Eisen zu dreiwertigem Eisen oxidiert und lässt so das braunfarbige Methämoglobin entstehen. Nach der Bestrahlung werden durch Zugabe eines Tensids die Zellmembranen der Erythrozyten zerstört und damit intrazelluläres Hämoglobin und Methämoglobin freigesetzt. Die

Messung der Methämoglobin-Konzentration erfolgt bei 630 nm. Hierbei wird ausgenutzt, dass die charakteristische Absorption des Hämoglobins zwischen 500 nm und 600 nm ab- und die typische Absorption für Methämoglobin im Bereich von 600 nm bis 680 nm zunimmt (**Abbildung 53**).



Das Neuroleptikum Chlorpromazin, welches bereits als Beispiel für eine photohämolytisch wirksame Substanz erwähnt wurde, zeigt außerdem methämoglobinbildende Eigenschaften. Die entsprechende Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist in **Abbildung 54** dargestellt. Zur Beurteilung des phototoxischen Potentials wird analog zu den bei der Photohämolyse beschriebenen Berechnungen der Quotient aus den Werten für 50% Methämoglobin-Bildung für die Dunkelkurve und die Bestrahlungskurve berechnet.

Für die Versuche zur Methämoglobin-Bildung wurden (wie bei der Photohämolyse) ethanolische Lösungen der einzelnen Triketone und des Triketon-Komplexes in Konzentrationen von 0,01 mg / mL bis 10 mg / mL (Lösungen 1 bis 7, L1 bis L7 in

Tabelle 23) hergestellt. Diese Substanzlösungen wurden – wie in **Tabelle 23** dargestellt – in Mikrotiterplatten überführt. Die Kavitäten A1 bis A6 und B1 enthalten zunächst die Substanzlösungen L1 bis L7 sowie eine Suspension aus PBS-Puffer und eingestellter RBC-Suspension. Die Kavitäten B2, B3 und B4 enthalten die Kontrollproben für 0% Methämoglobin-Bildung; anstelle der Substanzlösungen wurde reines Ethanol verwendet. Die Proben für 100% Methämoglobin-

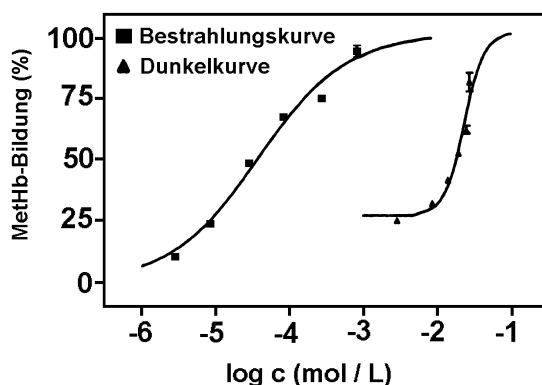


Abbildung 54: Methämoglobin-Bildung von Chlorpromazin

Bildung befinden sich in den verbleibenden Kavitäten (B5 und B6). Auch hier wurden die Substanzlösungen durch Ethanol ersetzt und es wurde eine Suspension aus eingestellter RBC-Suspension und PBS-Puffer zugegeben. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte eine halbe Minute auf einem Heidolph Titramax geschüttelt, um homogene Suspensionen zu erhalten.

Für jedes Triketon wurden zwei Mikrotiterplatten beschickt, von denen die eine Platte für 150 min mit dem Dr. Hönle Solar Simulator ($1,6 \text{ mWatt} / \text{cm}^2$) bestrahlt und dann für 30 min in der Dunkelheit belassen wurde. Die andere Mikrotiterplatte verblieb für 180 min im Dunkeln. Während der gesamten Zeit wurden beide Mikrotiterplatten auf 25°C temperiert. Im Anschluss wurden zu den Proben je $100 \mu\text{L}$ Triton-X 100 (Octylphenoldecaethylenglycolether) pipettiert. Es handelt sich dabei um ein Tensid, das zur Auflösung der Erythrozytenmembran führt und so Hämoglobin/Methämoglobin freisetzt. Für die Positivkontrolle (100% Methämoglobin-Bildung) wurde eine Lösung aus Kaliumhexacyanoferrat in bidestilliertem Wasser in den Kavitäten B5 und B6 gegeben. Bei Kaliumhexacyanoferrat handelt es sich um einen *in vitro* Methämoglobin-Bildner, der die Erythrozytenmembran nicht durchdringen kann und deshalb

erst nach Auflösung der Membran durch Oxidation das zweiwertige Eisen des Hämoglobins in das dreiwertige Eisen des Methämoglobins überführt.

Tabelle 23: Beschickung der Mikrotiterplatte für die Bestimmung der Methämoglobin-Bildung

	1	2	3	4	5	6
A	1 mg/L	3 mg/L	10 mg/L	30 mg/L	100 mg/L	300 mg/L
	MetHb-Bildung	MetHb-Bildung	MetHb-Bildung	MetHb-Bildung	MetHb-Bildung	MetHb-Bildung
	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1
	100 µL L1	100 µL L2	100 µL L3	100 µL L4	100 µL L5	100 µL L6
	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X
B	1000 mg/L	PBS	PBS	PBS	K₃[Fe(CN)₆]	K₃[Fe(CN)₆]
	MetHb-Bildung	0% MetHb	0% MetHb	0% MetHb	100% MetHb	100% MetHb
	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	900 µL RBC1	800 µL KRBC	800 µL KRBC
	100 µL L7	100 µL EtOH	100 µL EtOH	100 µL EtOH	100 µL EtOH	100 µL EtOH
	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL K	100 µL K
	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X	100 µL Trit-X
<p>L1 bis L7 = Lösungen der Triketone unterschiedlicher Konzentrationen RBC1 = Suspension aus eingestellter RBC-Suspension und PBS-Puffer (25 µL + 875 µL) Trit-X = Triton-X 100 (Octylphenoldecaethylenglycolether) KRBC = Suspension aus eingestellter RBC-Suspension und PBS-Puffer (25 µL + 775 µL) K = Lösung von K₃[Fe(CN)₆] in bidestilliertem Wasser</p>						

Um eine vollständige Zerstörung der Erythrozytenmembran sowie eine vollständige Methämoglobin-Bildung zu erreichen, wurden alle Platten 5 min geschüttelt. Die erhaltenen Suspensionen wurden vollständig in Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert und die so erhaltenen Überstände photometrisch bei 630 nm vermessen. Die ermittelten Absorptionswerte für 0% Methämoglobin-Bildung (in den Kavitäten B2, B3 und B4) wurden als Lösungsmittelabgleich verwendet. Die Werte für 100% Methämoglobin-Bildung (in den Kavitäten B5 und B6) wurden gemittelt und zu den jeweils für die Substanzlösungen gemessenen Absorptionen ins Verhältnis gesetzt. Das Ausmaß der Methämoglobin-Bildung wurde in Prozent berechnet. Die daraus

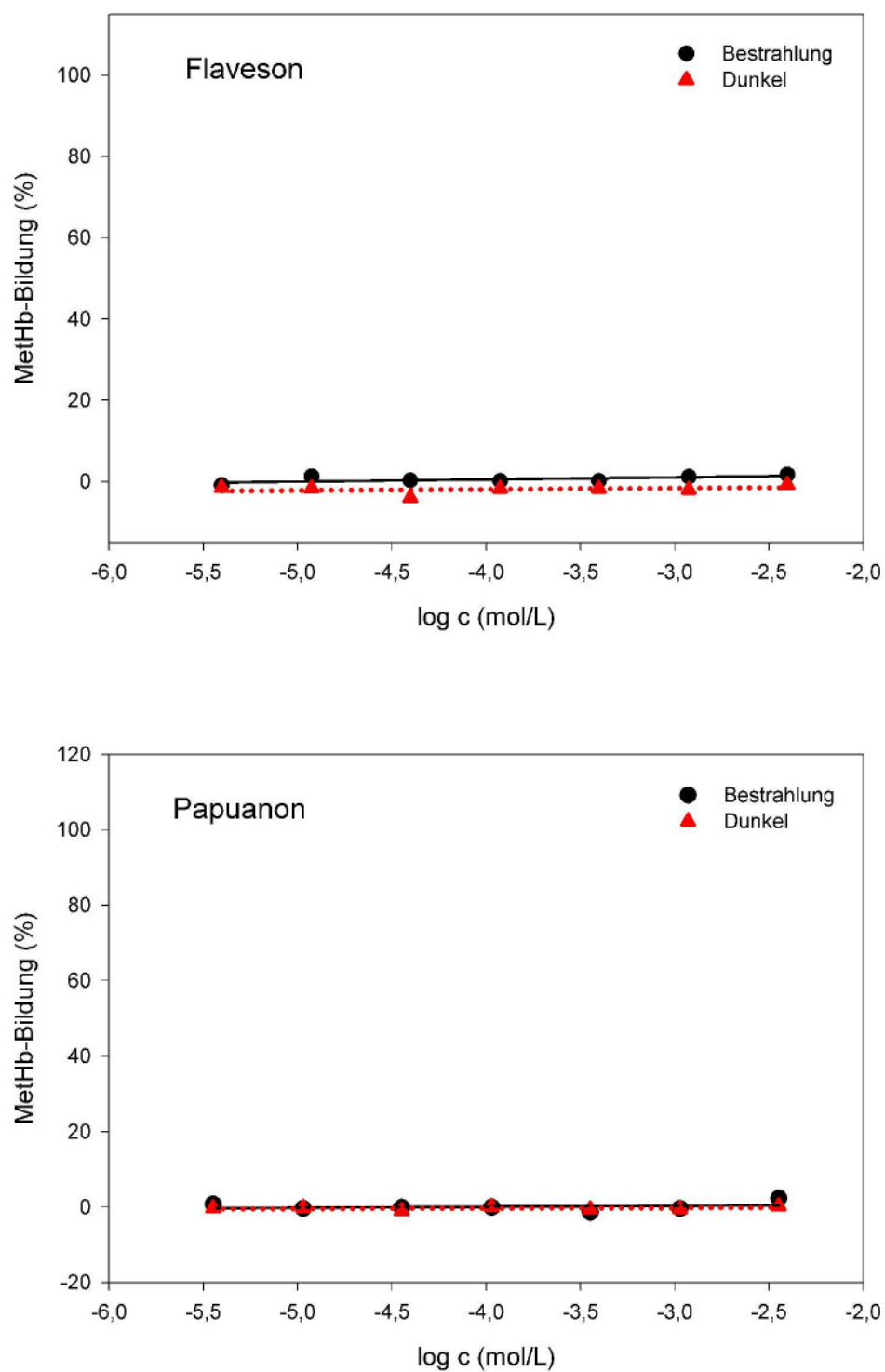


Abbildung 55: Methämoglobinbildung: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Flaveson und Papuanon

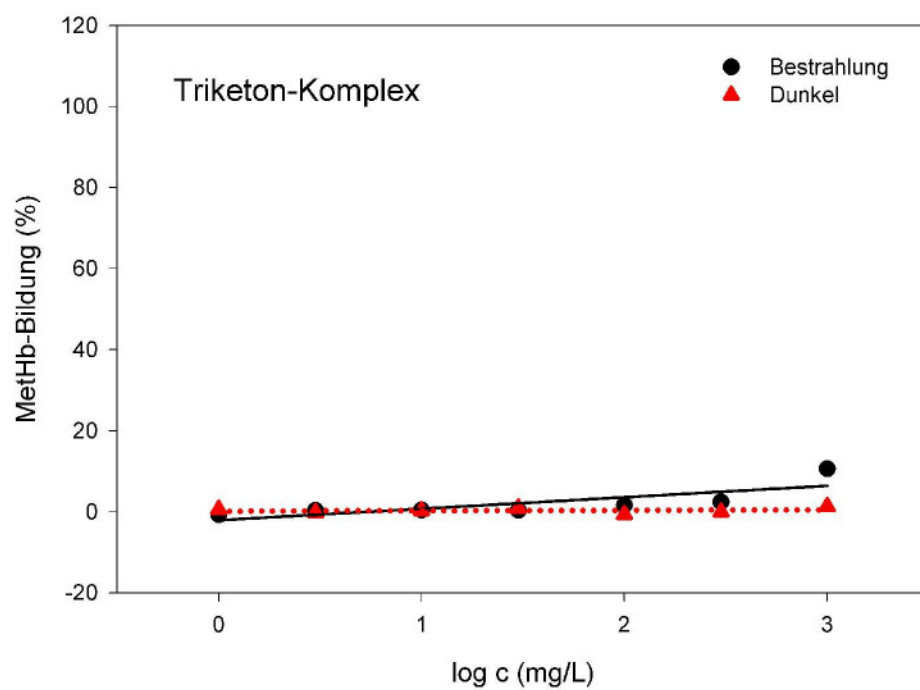
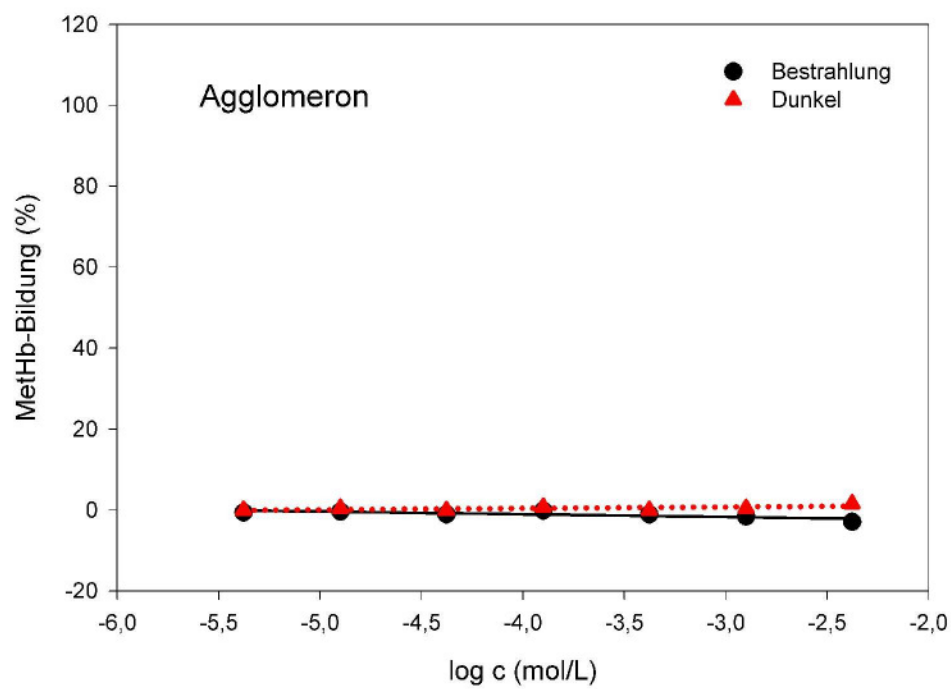


Abbildung 56: Methämoglobinbildung: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Agglomeron und den Triketon-Komplex

resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind für Flaveson und Papuanon in **Abbildung 55**, für Agglomeron und den Triketon-Komplex in **Abbildung 56** dargestellt.

Im Ergebnis lässt sich festhalten, dass für die Triketone Flaveson, Papuanon und Agglomeron keine Methämoglobin-Bildung nachweisbar war. Für die Triketon-Fraktion aus dem Manukaöl weist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve eine leicht steigende Tendenz auf. So wurde für deren höchste Konzentration bei der Bestrahlung eine Methämoglobin-Bildung von 10,6% bestimmt. Im Rahmen der statistischen Auswertung (Voraussetzung: $n = 7$, VB 95%) ergab sich sowohl für die Triketon-Fraktion als auch für die einzelnen Triketone, dass die Steigung der Geraden nicht signifikant von Null verschieden ist. Somit liegt keine signifikante Abhängigkeit der Methämoglobin-Bildung in dem gewählten Konzentrationsbereich vor.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit dem kombinierten Erythrozyten-Phototoxizitätstest ein relativ schnell durchzuführender Test vorliegt, der zur Identifizierung phototoxischer Eigenschaften herangezogen werden kann. Er bietet den Vorteil, dass neben qualitativen und quantitativen Aussagen anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurven zusätzlich Informationen über die Zielstruktur (Membran, Hämoglobin) gewonnen werden. Für die getesteten β -Triketone und den Triketon-Komplex des Manukaöls ließen sich im Konzentrationsbereich von 1 mg / L bis 1000 mg / L keine phototoxischen Eigenschaften, die auf den genannten Mechanismen beruhen, feststellen. Über eine DNA-Phototoxizität kann keine Aussage gemacht werden, sie ist aber angesichts der negativen Ergebnisse wenig wahrscheinlich.

6 Mikrobiologische Untersuchungen

6.1 Einleitung

6.1.1 *In vitro* Untersuchungen der Triketone

Für den Nachweis der Empfindlichkeit von Keimen gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen kommen in der mikrobiologischen Routineanalytik vor allem drei Methoden zur Anwendung: die Agardiffusionsmethode, die Agardilutionsmethode und die Bouillondilutionsmethode. Alle drei Methoden eignen sich zur Quantifizierung der antimikrobiellen Wirksamkeit in Form der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Sie ist definiert als diejenige Konzentration, die gerade noch ausreicht, um ein mit bloßem Auge erkennbares Keimwachstum zu verhindern. Als Ursache für die Hemmung kommen mikrobiostatische (vorhandene Keime werden in ihrer Vermehrung gehemmt) oder mikrobizide (Keime werden abgetötet) Eigenschaften der Testsubstanzen in Betracht.

Bei der Wahl einer geeigneten Untersuchungsmethode für die isolierten bzw. synthetisierten Triketone mussten drei stoffliche Besonderheiten berücksichtigt werden. Erstens handelt es sich bei den Triketonen um lipophile und somit um schlecht wasserlösliche Substanzen, die den Einsatz von Lösungsvermittlern erforderlich machen. Zweitens weisen die Triketone als ätherische Öl-Komponenten eine gewisse Flüchtigkeit auf, welche unter den Bedingungen der Inkubation (Temperatur von 37° C über einen Zeitraum von mehreren Stunden) zu Substanzverlusten führen kann. Drittens ist die ebenfalls mit der Inkubationstemperatur und -dauer zusammenhängende mögliche Instabilität der zu testenden Substanzen zu berücksichtigen. Dieser letzte Aspekt wurde bereits in Kapitel 5.1 untersucht, mit dem Ergebnis, dass die Stabilität der Triketone unter diesen Bedingungen gewährleistet ist.

Agardiffusionsmethode

Der Agardiffusionstest ist eine leicht durchzuführende Methode, bei der zunächst ein festes Nährmedium (Agar) mit einer verdünnten Suspension des gewählten Mikroorganismus beimpft wird. Anschließend wird ein Testplättchen, das mit der zu testenden Substanz imprägniert ist, auf dem Agar platziert und für 18 h bei 37°C inkubiert.

Während dieser Zeit diffundiert die Testsubstanz aus dem Plättchen in den Agar, wobei ihre Konzentration in der Nähe des Plättchens am höchsten ist. Mit zunehmender Distanz vom Testplättchen nimmt die Konzentration der Testsubstanz so weit ab, dass sie das bakterielle Wachstum nicht mehr beeinträchtigen kann. Im Fall einer Sensibilität des gewählten Mikroorganismus entsteht ein Hemmhof, dessen Durchmesser (Angabe in mm) proportional der Empfindlichkeit des Keimes ist. Der Einfachheit der Durchführung dieser Methode stehen einige Nachteile gegenüber. Die Variationsmöglichkeit in Bezug auf die Größe der Testplättchen sowie die aufgegebene Substanzmenge erschweren die Vergleichbarkeit mit anderen Ergebnissen. Außerdem spielen die Diffusionseigenschaften der getesteten Substanz eine wichtige Rolle. Während sich die Methode gut eignet für hydrophile Substanzen, die wegen ihrer guten Wasserlöslichkeit leicht in den Agar diffundieren, ist ihre Anwendbarkeit für lipophile Substanzen beschränkt. Deren geringe Wasserlöslichkeit behindert die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten im Agar und damit den Erhalt reproduzierbarer MHK-Werte. Deshalb kam für die Prüfung der Triketone auf antimikrobielle Wirksamkeit diese Methode lediglich als Vorversuch in Frage.

Agardilutionsmethode

Bei dieser Testmethode werden dem noch warmen flüssigen Nährmedium definierte Konzentrationen der zu testenden Substanz zugesetzt und daraus Platten gegossen. Nach Erkalten des Mediums erfolgt das Beimpfen mit den ausgewählten Mikroorganismen. Im Anschluss an die Inkubation wird die Auswertung vorgenommen.

Der für diese Methode erforderliche hohe Substanzbedarf von mehreren Gramm sowie die schlechte Löslichkeit der Triketone im Nährmedium und der daraus resultierende hohe Bedarf an Tensiden schlossen diese Methode als Testsystem für die Triketone von Anfang an aus.

Bouillondilutionsmethode

Bei dieser auch als „Reihenverdünnungstest“ bekannten Methode werden die zu untersuchenden Substanzen mit flüssigen Nährmedien verdünnt. Dies bedeutet für lipophile Substanzen, dass auch hier der Einsatz von Lösungsvermittlern unerlässlich ist. Die Durchführung der Methode kann entweder im Makromaßstab in sterilisierten Reagenzgläsern oder im Kleinstmaßstab in sterilen Mikrotiterplatten aus Polypropylen erfolgen. In beiden Fällen wird eine Verdünnungsreihe der Testsubstanz mit definierten Konzentrationen hergestellt. Dazu verwendet man in der Regel zweifache Verdünnungsstufen (z.B. 128 µg / mL, 64 µg / mL, 32 µg / mL ...). Jeder Verdünnungsstufe wird die gleiche Menge einer definierten Keimsuspension hinzugefügt und die erhaltene Suspension inkubiert. Die Auswertung erfolgt visuell, da das menschliche Auge auftretendes Bakterienwachstum als Trübung der Lösung wahrnehmen kann. Unterstützend können Farbindikatoren wie Triphenyltetrazoliumchlorid [CARSON et al., 1995] eingesetzt werden.

Sowohl die Agardilutionsmethode als auch die Bouillondilutionsmethode eignen sich zur Bestimmung der minimalen mikrobiziden Konzentration (MMK). Weist eine zu testende Substanz mikrobizide Eigenschaften auf, sind weitergehende Untersuchungen bezüglich der Abtötungsrate pro Zeiteinheit erforderlich. Diese Tests, zu denen die Bestimmung der \log_{10} -Reduktionsstufen und der Rideal-Walker-Test gehören, dienen der Wirksamkeitsbewertung von Substanzen. Dabei werden sogenannte Absterbekinetiken erstellt, welche die Keimzahlreduktion in Gegenwart einer zu testenden Substanz über einen definierten Zeitraum betrachten. Diese sind besonders für zur Desinfektion eingesetzte Substanzen wichtig, die gegenüber vielen Arten von Mikroorganismen ein breites Wirkungsspektrum bei möglichst vollständiger Abtötung aufweisen sollten.

6.1.2 Literaturüberblick

Die antimikrobielle Aktivität des Manukaöls gegenüber Gram-positiven Bakterien wurde in verschiedenen Veröffentlichungen [PORTER & WILKINS, 1998; HARKENTHAL et al., 1999; CHRISTOPH et al., 2000] dargelegt. Diese Aktivität ist unter anderem mit den im Öl enthaltenen β -Triketonen Flaveson, Leptospermon und

Isoleptospermon assoziiert, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen der Triketon-Konzentration im Öl und der antibakteriellen Aktivität des Öls nachgewiesen wurde [PERRY et al., 1996]. In weitergehenden Untersuchungen mit der isolierten Triketon-Fraktion wurde außerdem eine Wirkung auf verschiedene Bakterien und Pilze gezeigt. In Kombination mit Antibiotika kam es zu synergistischen Effekten und somit zu einer Wirkungsverstärkung [KIM & RHEE, 1999].

6.2 Mikroorganismen

Die Auswahl der Mikroorganismen sollte ein möglichst breites Spektrum human-pathogener Keime umfassen und so dem möglichen Einsatzgebiet der Triketone Rechnung tragen. Es wurden 8 Gram-positive und 2 Gram-negative Bakterienstämme untersucht (**Tab. 24**).

Tabelle 24: Untersuchte Bakterienstämme

<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positiv
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Gram-positiv
<i>Micrococcus luteus</i> V-9-11	Gram-positiv
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Gram-positiv
<i>Streptococcus pyogenes</i> IV-10-21	Gram-positiv
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram-positiv
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Gram-positiv
<i>Staphylococcus epidermidis</i> III-7-3	Gram-positiv
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram-negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram-negativ

Unter den Gram-positiven Mikroorganismen ist *Staphylococcus aureus* besonders interessant, da er als Erreger von Wundinfektionen häufig Antibiotika-Resistenzen aufweist. Er ist an Eiterungsprozessen beteiligt und verursacht u.a. Tonsillitis und Sinusitis. Als weitere Vertreter der Kokken wurden *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus pyogenes* überprüft. Letzterer ist ein human-pathogener Erreger und kann sowohl akute Infektionen des oberen Respirationstraktes (Scharlach, Otitis media)

als auch Haut-, Wund- und Brandwundeninfektionen hervorrufen. *Staphylococcus epidermidis* ist durch Ausbildung so genannter Biofilme eine häufige Ursache von Infektionen an implantierten Fremdkörpern (Katheter, künstliche Herzklappen und Gelenke). Biofilme stellen einen Infektionsherd dar, von dem aus Bakterien ins Blut geschwemmt werden können, woraus sepsisartige Krankheitsbilder resultieren. *Streptococcus pneumoniae*, der im Blutagar Alphahämolyse („Vergrünung“) zeigt, löst Erkrankungen wie Pneumonie, Meningitis und Otitis media aus. *Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis* vervollständigen die Auswahl Gram-positiver Keime.

Der zu den Gram-negativen Mikroorganismen zählende Keim *Escherichia coli* ist häufig an Infektionen des Urogenitalsystems, insbesondere an Harnwegsinfektionen (Pyelonephritis), beteiligt. Außerdem ist er Erreger von Diarrhoe-Erkrankungen, Appendizitis, Peritonitis sowie Wundinfektionen und Sepsis. Bei *Pseudomonas aeruginosa* handelt es sich um einen weit verbreiteten Boden- und Wasserkeim, der als opportunistischer Erreger vor allem bei immunsupprimierten Patienten in Krankenhäusern (Hospitalismuskeim) zu Infektionen des Respirationstraktes (Pneumonien) führt. Des Weiteren spielt er eine Rolle bei Wundinfektionen sowie Entzündungen des Urogenitaltrakts.

6.3 Nährmedium

Der Auswahl des Nährmediums kommt eine besondere Bedeutung zu, da es unmittelbar mit den zu testenden Substanzen in Kontakt kommt und durch Reaktion mit diesen zu einer Inaktivierung oder Aktivierung führen kann. Vor allem musste auf die Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen geachtet werden, da diese mit den Triketonen innere Komplexe bilden und sie somit inaktivieren. Des Weiteren war zu berücksichtigen, dass die Triketone wahrscheinlich Reaktionen mit Sulfhydrylgruppen (z.B. von Proteinen) eingehen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen wurde als Nährmedium Mueller-Hinton-Bouillon (MH-Bouillon) verwendet, die für die Empfindlichkeitsprüfung aerob wachsender Mikroorganismen empfohlen wird (DIN 58940).

6.4 Toleranz ausgewählter Bakterienstämme gegenüber Lösungsvermittlern

6.4.1 Einsatz von Lösungsvermittlern

Verschiedene Vorversuche bestätigten die Annahme, dass die Löslichkeit der zu testenden Triketone in MH-Bouillon wegen ihrer lipophilen Eigenschaften unzureichend sei und somit der Einsatz von lösungsvermittelnden Substanzen erforderlich würde. Zahlreiche Veröffentlichungen [u.a. COOKE & COOKE, 1994 und HAMMER et al., 2000], die sich mit der *in vitro* Testung ätherischer Öle beschäftigen und somit deren lipophilen Eigenschaften Rechnung tragen, setzen hierzu Tenside ein. Meist handelt es sich dabei um nichtionische Tenside wie Tween®80 (Polysorbat 80, Polyethylenglycolsorbitanoleat), Tween®20 (Polysorbat 20, Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat) sowie Triton®X-100 (Octylphenoxypolyethylenglycol). Insbesondere wässrige Tween®80 - Lösungen in Konzentrationen zwischen 0,5% und 0,8% werden als unproblematisch hinsichtlich einer Eigenwirkung angesehen. Außerdem finden Lösungsmittel wie Methanol, Ethanol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid (DMF) Verwendung. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von JELINEK (2001), welche ausführliche Untersuchungen zur *in vitro* Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen und ihrer Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose vorlegt. Hierin wurden an HaCaT- (human adult low calcium temperature) und U937-Zellen (humane Zelllinie) nach der Exposition mit Tween®80 deutliche morphologische Veränderungen wie Lyse und Schrumpfung nachgewiesen.

Lösungsvermittler besitzen grenzflächenaktive Eigenschaften und nehmen dadurch Einfluss auf das Testsystem. So sind sie aufgrund ihrer amphoteren Struktur unter anderem in der Lage, Mizellen zu bilden, welche die antimikrobiell wirksamen Substanzen einschließen können und damit deren Wirkung inhibieren. Eine weitere Einflussmöglichkeit besteht in der Adhäsion dieser Substanzen an der Zellwand. Die daraus resultierende Veränderung der Zellwandpermeabilität kann zu einer scheinbar erhöhten Wirksamkeit der Testsubstanz führen, was sich in einem zu niedrigen MHK-Wert äußern würde. Aus diesen Gründen stellt die Auswahl des Lösungsver-

mittlers einen Kompromiss zwischen dem Wunsch nach Einsatz möglichst geringer Mengen und der für das „In-Lösung-bringen“ erforderlichen Menge dar.

6.4.2 Testsystem

Zunächst wurde die unbedenkliche Verwendung von Zusätzen der nichtionischen Tenside Polysorbat 20 (Tween®20) und Polysorbat 80 (Tween®80), die in der Ph. Eur. 4.06 offizinell sind, überprüft. Des Weiteren wurde Dimethylsulfoxid (DMSO), welches sich in Vorversuchen durch ein besonders gutes Lösungsverhalten auszeichnete, in die Prüfung einbezogen. Als „unbedenklich“ sollten in diesem Zusammenhang tensidhaltige Lösungen gelten, die in den gewählten Konzentrationen innerhalb eines definierten Zeitraumes keinerlei sichtbaren Einfluss auf das bakterielle Wachstum ausüben.

Alle Mikroorganismen, mit denen weitergehende Versuche geplant waren, wurden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber anwesenden Tensiden untersucht. Die Durchführung der Tests erfolgte analog zur Bestimmung der MHK, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten und die Übertragbarkeit zu vereinfachen. Dazu wurden sowohl von den Polysorbaten als auch vom DMSO zweifache Verdünnungen in MH-Bouillon hergestellt und in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte überführt. Die zu prüfenden Bakterienstämme wurden auf Agarplatten aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden einige Kolonien der zu prüfenden Bakterienstämme in MH-Bouillon suspendiert und nach McFarland auf eine Dichte von 0,5 eingestellt. Dieses Inoculum wurde mehrfach verdünnt und ebenfalls in die Kavitäten der Mikrotiterplatte überführt, so dass sich eine endgültige Konzentration von 5×10^5 CFU / mL ergab. Nach dem Abdecken der Mikrotiterplatte wurde bei 37°C für 18 h inkubiert.

Da der Habitus der Bakterienplaques je nach Art des getesteten Keimes variiert, erfolgte die Auswertung nach der Inkubation visuell durch Vergleich der Bakterienplaques jeder Kavität mit denen der Wachstumskontrolle (Bakteriensuspension in MH-Bouillon ohne Testsubstanz), die ein optimales Keimwachstum aufwies. Um die Auswertung zu vereinfachen und schon geringe Veränderungen erfassen zu können,

B Ergebnisse

wurden zur Beschreibung der Bakteriensuspensionen vier Bewertungsstufen verwendet:

- Stufe 1: +++ das Wachstum der zu prüfenden Bakteriensuspension entspricht dem der Wachstumskontrolle
- Stufe 2: ++ das Wachstum der zu prüfenden Bakteriensuspension ist im Vergleich zur Wachstumskontrolle etwas reduziert
- Stufe 3: + Wachstum der zu prüfenden Bakteriensuspension ist vorhanden, aber im Vergleich zur Wachstumskontrolle deutlich reduziert
- Stufe 4: - die zu prüfende Bakteriensuspension zeigt kein Wachstum

Für jede Bakteriensuspension wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, wobei im Fall einer Abweichung der drei Einzelergebnisse um mehr als eine Stufe eine Wiederholung erfolgte. Für den weiteren Einsatz der Lösungsvermittler wurden nur der Stufe 1 zugeordnete Konzentrationen (ohne Beeinflussung des Wachstums) verwendet. Die Zuordnungen der Stufen 2 und 3 dienten lediglich einer differenzierten Betrachtung der Bakterienplaques. Konzentrationen, deren zugehörige Bakteriensuspensionen kein sichtbares Wachstum aufwiesen, entsprachen dem MHK-Wert.

6.4.3 Polysorbat 20 (Tween®20) und Polysorbat 80 (Tween®80)

Als Ausgangslösung wurden eine 50%ige Lösung von Polysorbat 20 in MH-Bouillon (Lösung A) sowie eine 33%ige Lösung von Polysorbat 80 (Lösung B) hergestellt, wobei halbstündiges Erwärmen im Wasserbad (50°C) eine deutlich verbesserte Mischbarkeit zur Folge hatte. Polysorbat-Lösungen höherer Konzentration konnten trotz variierter Bedingungen nicht hergestellt werden, da die Löslichkeit der Tenside in MH-Bouillon oberhalb der genannten Grenzen nicht mehr gewährleistet war. Die Ausgangslösungen A und B wurden mit MH-Bouillon so verdünnt, dass daraus nach Zugabe der Bakteriensuspension für Tween®20 ein Konzentrationsbereich von 0,01% bis 12,50% und für Tween®80 ein Bereich von 0,01% bis 8,33% resultierte. Das zugrunde liegende Pipettierschema ist in **Tabelle 25** dargestellt, wobei „WK“

die Wachstumskontrolle (ohne Zugabe des Tensids) des jeweiligen Mikroorganismus in MH-Bouillon bezeichnet.

Tabelle 25: Pipettierschema für Tenside Polysorbat 20 und Polysorbat 80

Verdünnungs- schritt	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
Konzentration von Polysorbat 20 [%]	0,01	0,02	0,05	0,10	0,20	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	W K
Konzentration von Polysorbat 80 [%]	0,01	0,02	0,03	0,07	0,13	0,26	0,52	1,04	2,08	4,17	8,33	W K

Die Ergebnisse für die jeweiligen Bakterienstämme (alphabetisch geordnet) sind in den **Tabellen 26** und **27** dargestellt, wobei zur Vereinfachung die Symbole der in Kapitel 6.4.2 beschriebenen Bewertungsstufen verwendet wurden.

Tabelle 26: Wachstum ausgewählter Mikroorganismen in Anwesenheit von Polysorbat 20

Polysorbat 20 [%]	0,01	0,02	0,05	0,10	0,20	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	WK
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
<i>Ec. faecalis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
<i>M. luteus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
<i>S. epidermidis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>Strept. pyogenes</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>Strept. pneumoniae</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++

Aus den vorgelegten Ergebnissen wird deutlich, dass die überprüften Bakterienstämme – auch unter Berücksichtigung möglicher Abweichungen der Ergebnisse um eine Konzentrationsstufe – einen relativ hohen Gehalt an Polysorbat 20 bzw. Polysorbat 80 tolerierten. Verallgemeinernd kann davon ausgegangen werden, dass für diese Bakterienstämme Polysorbat 20-Konzentrationen bis 3% (häufig bis 6%) und Polysorbat 80-Konzentrationen bis 2% (häufig bis 4%) eingesetzt werden können,

B Ergebnisse

ohne dass eine Beeinträchtigung des Wachstums zu befürchten ist. Einzige Ausnahme bildet der Stamm *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, für den Konzentrationen von höchstens 0,8% Polysorbat 20 bzw. 0,5% Polysorbat 80 verwendet werden dürfen.

Tabelle 27: Wachstum ausgewählter Mikroorganismen in Anwesenheit von Polysorbat 80

Polysorbat 80 [%]	0,01	0,02	0,03	0,07	0,13	0,26	0,52	1,04	2,08	4,17	8,33	WK
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Ec. faecalis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>M. luteus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	+++
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>S. epidermidis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Strept. pyogenes</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Strept. pneumoniae</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Obwohl sich beide Tenside durch gute Verträglichkeit auszeichnen, hat sich ihre Verwendung nur eingeschränkt bewährt. Insbesondere beim „Vortexen“ kam es häufig zur Schaumbildung, die vor allem beim Pipettieren der Suspensionen zu Ungenauigkeiten führte. Des Weiteren wurden Einflüsse auf den Habitus der Bakterien suspensionen deutlich, die sich häufig in einem „Zusammenklumpen“ der Kolonien und somit in einer erschwerten Auswertung äußerten. Aus diesen Gründen wurde auf eine Verwendung der beiden Polysorbate im Rahmen der MHK-Bestimmung verzichtet.

6.4.4 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Als Alternative zu den Polysorbaten wurde DMSO getestet, in dem sich die Triketone problemlos lösen ließen und das sich gleichzeitig durch ein gutes Lösungsverhalten in MH-Bouillon auszeichnete. Ausgehend von einer 80%igen DMSO-Lösung in MH-Bouillon wurden zweifache Verdünnungen hergestellt, zu denen die eingestellte Bakterien suspension gegeben wurde, so dass DMSO-Konzentrationen zwischen 0,02%

und 20% vorlagen. Das entsprechende Pipettierschema ist in **Tabelle 28** angegeben, „WK“ bezeichnet die Wachstumskontrolle (ohne Zusatz von DMSO) des getesteten Bakterienstammes.

Tabelle 28: Pipettierschema für DMSO

Verdünnungs- schritt	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
Konzentration von DMSO [%]	0,02	0,04	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00	20,00	W K

Tabelle 29 stellt die Ergebnisse für die jeweiligen Bakterienstämme dar. Analog zu der Ergebnisdarstellung bei den Polysorbaten werden hierzu die in Kapitel 6.4.2 vorgestellten Bewertungsstufen verwendet.

Tabelle 29: Wachstum ausgewählter Mikroorganismen in Anwesenheit von DMSO

DMSO [%]	0,02	0,04	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00	20,00	WK
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	+++
<i>Ec. faecalis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
<i>M. luteus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	+++
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++
<i>S. epidermidis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>Strept. pyogenes</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
<i>Strept. pneumoniae</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	+++

Im Ergebnis lässt sich festhalten, dass von den überprüften Bakterienstämmen DMSO-Konzentrationen bis zu 5% ohne sichtbare Beeinträchtigung des Wachstums toleriert wurden. Einzige Ausnahme bildete hier – ebenso wie bei den Polysorbaten – der Keim *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, für den eine DMSO-Konzentration von höchstens 1,3% verwendet werden darf.

Für die nachfolgenden mikrobiologischen Untersuchungen wurde somit DMSO verwendet, weil sich sein gutes Lösungsverhalten in Kombination mit einer relativ hohen Toleranz durch die Mikroorganismen als Vorteil erwies. Außerdem tritt weder eine – wie bei den Polysorbaten beobachtete – Schaumbildung auf, noch wurde eine Veränderung des Habitus der Bakteriensuspensionen beobachtet.

6.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmkonzentration ist als die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffs (angegeben in $\mu\text{g} / \text{mL}$ bzw. mg / mL), bei der unter gegebenen *in vitro*-Bedingungen die Vermehrung von Bakterien innerhalb einer festgelegten Zeitspanne verhindert wird. Demzufolge weisen sensible Keime niedrige MHKs auf, das heißt, bereits hohe Verdünnungen mit niedrigen Substanzkonzentrationen hemmen bakterielles Wachstum. Die Gleichsetzung der *in vitro* getesteten Sensibilität eines Keimes mit der Wirkung der Testsubstanz *in vivo* ist nicht zulässig. Hier spielen zusätzlich Faktoren wie Art und Intervall der Applikation sowie komplexere physiologische Gegebenheiten eine Rolle.

Alle MHK-Bestimmungen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, orientierten sich an der DIN-Vorschrift 58940 „Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika“. Als Kulturmedium diente eine einfach konzentrierte MH-Bouillon. Ausgehend von Stammlösungen der einzelnen Triketone in DMSO (5 mg/mL) wurde zunächst eine Verdünnungsreihe unter Verwendung zweifacher Verdünnungsstufen ($512 \mu\text{g} / \text{mL}$, $256 \mu\text{g} / \text{mL}$, $128 \mu\text{g} / \text{mL}$...usw.) hergestellt.

Aus einer Übernachtskultur (Agarplatte) wurden etwa 3 bis 5 Kolonien des zu überprüfenden Bakterienstammes in isotonische Kochsalzlösung überführt und die optische Dichte bestimmt. Es handelt sich hierbei um die Messung einer „scheinbaren Extinktion“, das heißt, es erfolgt eine Bestimmung der durch die Bakterien im Flüssigmedium verursachten Streuung des eingestrahltten Lichtes. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse für den jeweiligen Testkeim zu gewährleisten, wurde die

optische Dichte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$ auf einen Wert von $0,125 \pm 0,02$ eingestellt. Die so definierte Bakteriensuspension, die einer Trübung nach McFarland-Standard Nr. 0,5 entspricht, enthält ca. 10^8 KBE / mL . Durch weitere Verdünnungsschritte lag in den Kavitäten der Mikrotiterplatte eine endgültige Keimzahl von 5×10^4 vor.

Die Bestimmung der MHK erfolgt in 96-well-Mikrotiterplatten aus Kunststoff. Zu $50 \mu\text{L}$ jeder Verdünnungsstufe wurde die gleiche Menge definierter Bakterien-suspension (Inokulum) hinzugefügt, woraus sich Verdünnungsstufen mit Triketon-Konzentrationen von $256 \mu\text{g / mL}$ bis $0,25 \mu\text{g / mL}$ ergaben (**Tabelle 30**).

Tabelle 30: MHK-Bestimmung, Konzentration der Testsubstanzen in den Kavitäten der Mikrotiterplatte

Kavität	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konzentration der Triketone [$\mu\text{g / mL}$]	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	W K

Anschließend wurde die Mikrotiterplatte verschlossen und für 18 h bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte visuell durch Vergleich des Bakterienwachstums in den Kavitäten mit der parallel durchgeführten Wachstumskontrolle, die keinen Triketonzusatz enthielt. Die niedrigste Konzentrationsstufe, die kein sichtbares Wachstum aufwies, wurde als MHK angegeben.

6.5.1 Ergebnisse

Die MHK-Werte für die Triketone und den Triketon-Komplex sind **Tabelle 31** zu entnehmen. Die Ergebnisse sind außerdem vergleichend in **Abbildung 57** zusammengestellt, wobei MHK-Werte $> 256 \mu\text{g / mL}$ nicht berücksichtigt wurden.

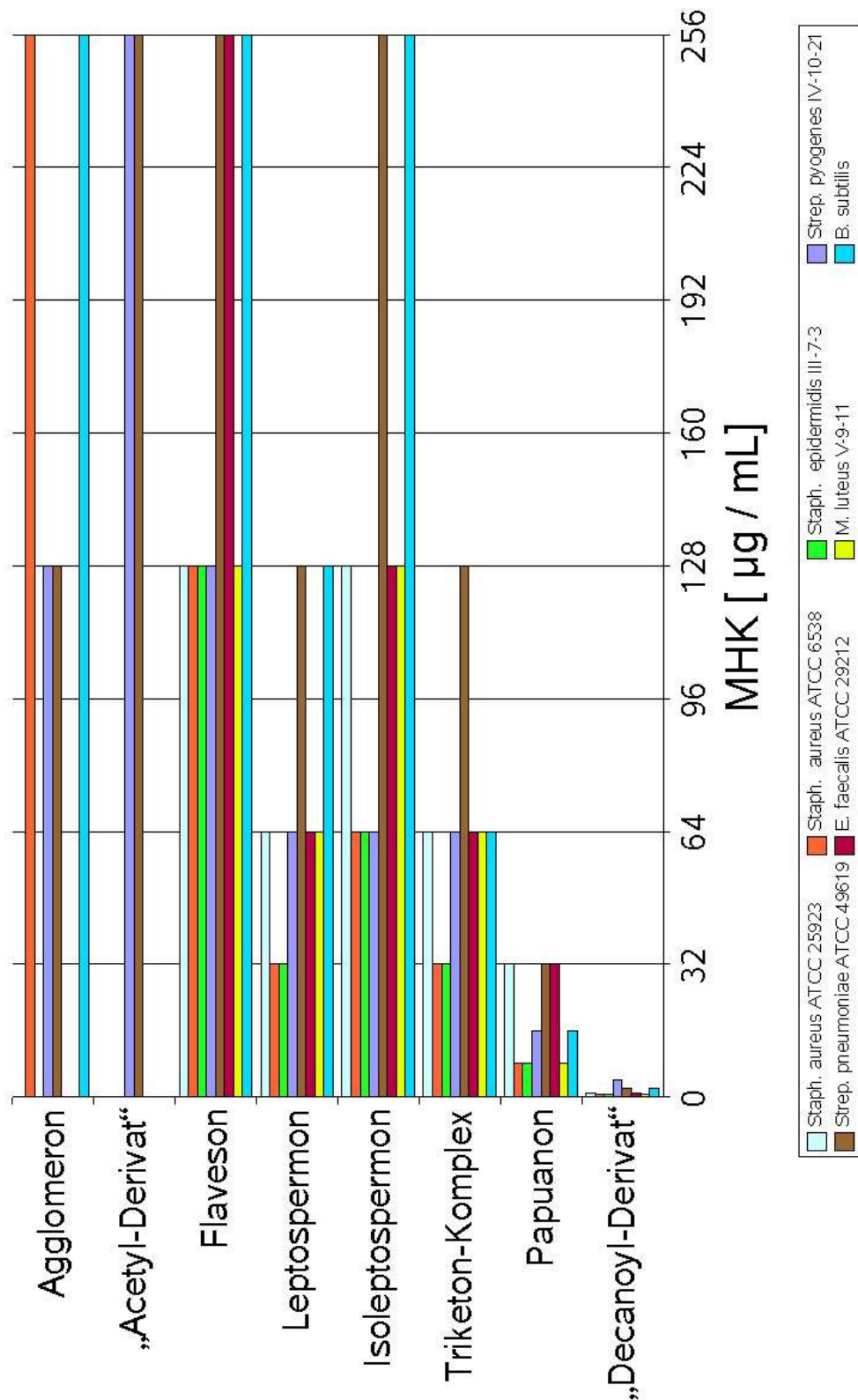
Für die meisten Triketone ließ sich innerhalb des angegebenen Konzentrationsbereiches eine gute antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien nachweisen. Insbesondere für die Triketone Flaveson, Leptospermon und Isoleptospermon werden somit Untersuchungen, die mit Manukaöl [CHRISTOPH, 2000] oder der isolierten ketonischen Fraktion aus Manukaöl [KIM und RHEE, 1999] durchge-

führt wurden, bestätigt. Eine wachstumshemmende Wirkung auf die beiden Gram-negativen Keime *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (Tab. 31) wurde für den angegebenen Konzentrationsbereich nicht nachgewiesen.

Tabelle 31: MHK-Werte einzelner β -Triketone und des Triketon-Komplexes [$\mu\text{g} / \text{mL}$]

	Agglomeron	„Acetyl-Derivat“	Flaveson	Leptospermon	Isoleptospermon	Papuanon	„Decanoyl-Derivat“	Triketon-Komplex
Gram-positive Mikroorganismen								
<i>S. aureus</i> (ATTC 25923)	> 256	> 256	128	64	128	32	1	64
<i>S. aureus</i> (ATTC 6538)	256	> 256	128	32	64	8	0,5	32
<i>S. epidermidis</i>	> 256	> 256	128	32	64	8	0,5	32
<i>Strept. pyogenes</i>	128	256	128	64	64	16	4	64
<i>Strept. pneumoniae</i>	128	256	256	128	256	32	2	128
<i>Ec. faecalis</i>	> 256	> 256	256	64	128	32	1	64
<i>M. luteus</i>	> 256	> 256	128	64	128	8	0,5	64
<i>B. subtilis</i>	256	> 256	256	128	256	16	2	64
Gram-negative Mikroorganismen								
<i>E. coli</i>	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
<i>P. aeruginosa</i>	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256

Der Triketon-Komplex, das heißt die Mischung aus Flaveson, Leptospermon und Isoleptospermon im Verhältnis 1 : 3 : 1, zeigte eine hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber allen Gram-positiven Bakterien (32 - 128 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Die vergleichende Betrachtung der hierfür gefundenen MHK-Werte mit denen der einzelnen Triketone macht deutlich, dass die antimikrobielle Wirkung des Triketon-Komplexes insgesamt immer so stark ist, wie die stärkste Einzelwirkung eines der Triketone. Mit einer Ausnahme (*Streptococcus pyogenes*: Leptospermon und Isoleptospermon weisen die gleiche MHK auf) handelt es sich dabei um das Leptospermon. Als Beispiel sei hier *Entero-*



coccus faecalis angeführt: Die MHK beträgt für Flaveson 256 µg / mL, für Leptospermon 64 µg / mL und für Isoleptospermon 128 µg / mL; der Triketon-Komplex weist eine MHK von 64 µg / mL auf.

Die Wirkung von miteinander kombinierten antimikrobiell wirksamen Substanzen kann auf verschiedenen Prinzipien beruhen:

- Addition: die Wirkung der Einzelkomponenten addiert sich
- Synergismus: miteinander kombinierte Substanzen zeigen eine signifikant höhere Wirkung als die Summe der Wirkungen der Einzelkomponenten
- Indifferenz: miteinander kombinierte Substanzen sind nicht wirksamer als die wirksamste Einzelkomponente
- Antagonismus: die Wirkung der miteinander kombinierten Einzelkomponenten ist geringer als die Wirkung der wirksamsten Einzelkomponente

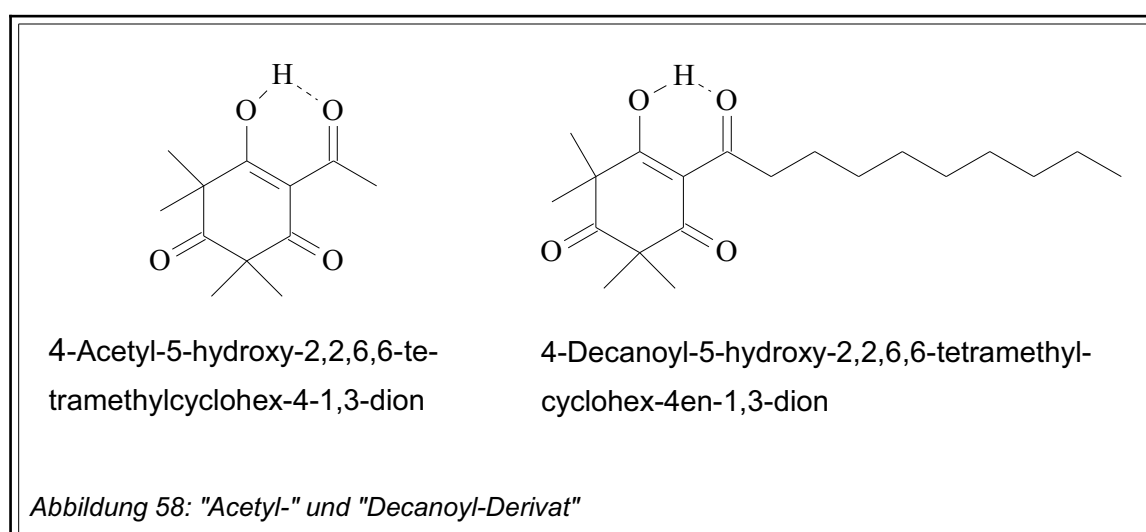
Die Tatsache, dass sowohl Leptospermon als auch der Triketon-Komplex, welcher nur etwa 60% Leptospermon enthält, die gleiche MHK aufweisen, lässt die Schlussfolgerung zu, dass der antimikrobiellen Aktivität des Triketon-Komplexes das Prinzip der Indifferenz zugrunde liegt. Nur bei *Bacillus subtilis* liegt die MHK des Triketon-Komplexes im Vergleich zum Leptospermon um eine Konzentrationsstufe tiefer, was aber nicht aussagekräftig genug ist, um auf synergistische Effekte zu schließen.

Um den beobachteten Effekt deutlicher zu machen, wurde die MHK von *Streptococcus pneumoniae* für Papuanon, für den Triketon-Komplex sowie für eine Mischung aus diesen Komponenten im Verhältnis von 1:1 bestimmt. Die ermittelten MHK-Werte betrugen für Papuanon 32 µg / mL, für den Triketon-Komplex 128 µg / mL sowie für das Gemisch 32 µg / mL (nicht in Tab. 31 aufgeführt). Durch die Zumischung von Papuanon wurde demnach der MHK-Wert des Triketon-Komplexes deutlich abgesenkt, was die zuvor gewonnenen Erkenntnisse bestätigte.

Beim Vergleich der MHK-Werte für die Isomeren Leptospermon und Isoleptospermon lässt sich jeweils ein Unterschied um eine Verdünnungsstufe nachweisen; Leptospermon weist dabei den höheren MHK-Wert auf. Dies trifft mit Ausnahme von

Streptococcus pyogenes (gleiche MHK für Leptospermon und Isoleptospermon) auf alle getesteten Gram-positiven Mikroorganismen zu.

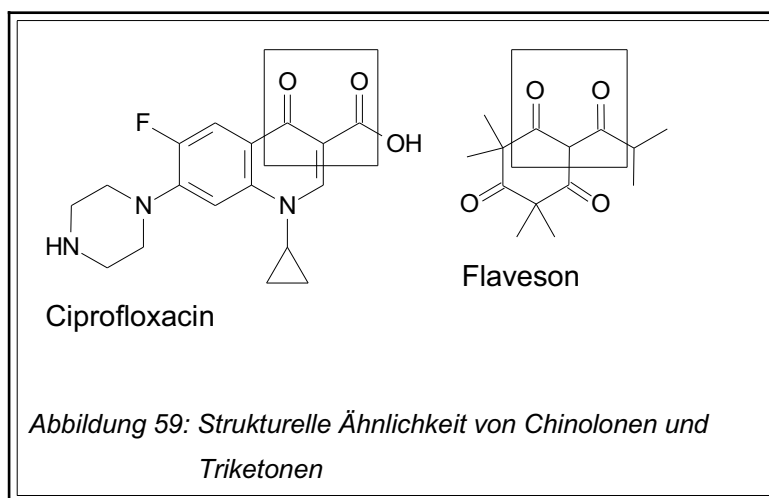
Des Weiteren zeigte sich für die natürlich vorkommenden Triketone mit zunehmender Länge der Acylseitenkette eine zunehmend höhere antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven Bakterien (**Abb. 57** bzw. **Tab. 31**). So ergaben sich für Flaveson mit einem Isobutyryl-Rest MHK-Werte von 256 µg / mL bis 128 µg / mL, während für Papuanon mit einem Hexanoyl-Rest Werte von 32 µg / mL bis 8 µg / mL gefunden wurden. Um diese Struktur-Wirkungs-Beziehung zu bestätigen, wurden ein „Acetyl“- und ein „Decanoyl-Derivat“ synthetisiert (siehe Kapitel B3), deren Strukturen in **Abbildung 58** dargestellt sind. Anschließend erfolgte die Bestimmung der MHK, wobei das „Acetyl-Derivat“ innerhalb des überprüften Konzentrationsbereiches keine oder nur eine geringe (256 µg / mL) antimikrobielle Wirksamkeit zeigte. Für das „Decanoyl-Derivat“ hingegen wurde eine im Vergleich zu den anderen Triketonen verstärkt wachstumshemmende Wirkung beobachtet; die MHK-Werte lagen hier zwischen 4 µg / mL und 0,5 µg / mL.



Agglomeron mit seiner abweichenden Struktur ähnelte in seiner Wirkstärke vor allem dem „Acetyl-Derivat“, welches innerhalb des angegebenen Konzentrationsbereiches eine geringe bzw. keine Wirkung (alle Werte ≥ 256 µg / mL) zeigte. Lediglich für die Stämme *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus pneumoniae* wurden MHK-Werte von 128 µg / mL gefunden.

6.5.2 MHK chinolonresistenter *Escherichia coli*-Stämme

Die Triketone weisen strukturelle Ähnlichkeit mit bakterizid wirkenden Chinolonen auf (**Abb. 59**), so dass ergänzend für *Escherichia coli* ein Chinolonempfindlicher Stamm sowie eine Auswahl chinolonresistenter Stämme (insgesamt 7) getestet wurden.



Mit Ausnahme des Stammes DE112, bei dem es sich um eine hochempfindliche Tetracyclin-resistente Mutante handelt, zeigte keines der Triketone eine wachstumshemmende Wirkung für den Konzentrationsbereich von 256 µg / mL bis 0,25 µg / mL.

Tabelle 32: MHK-Werte für *E. coli* DE112

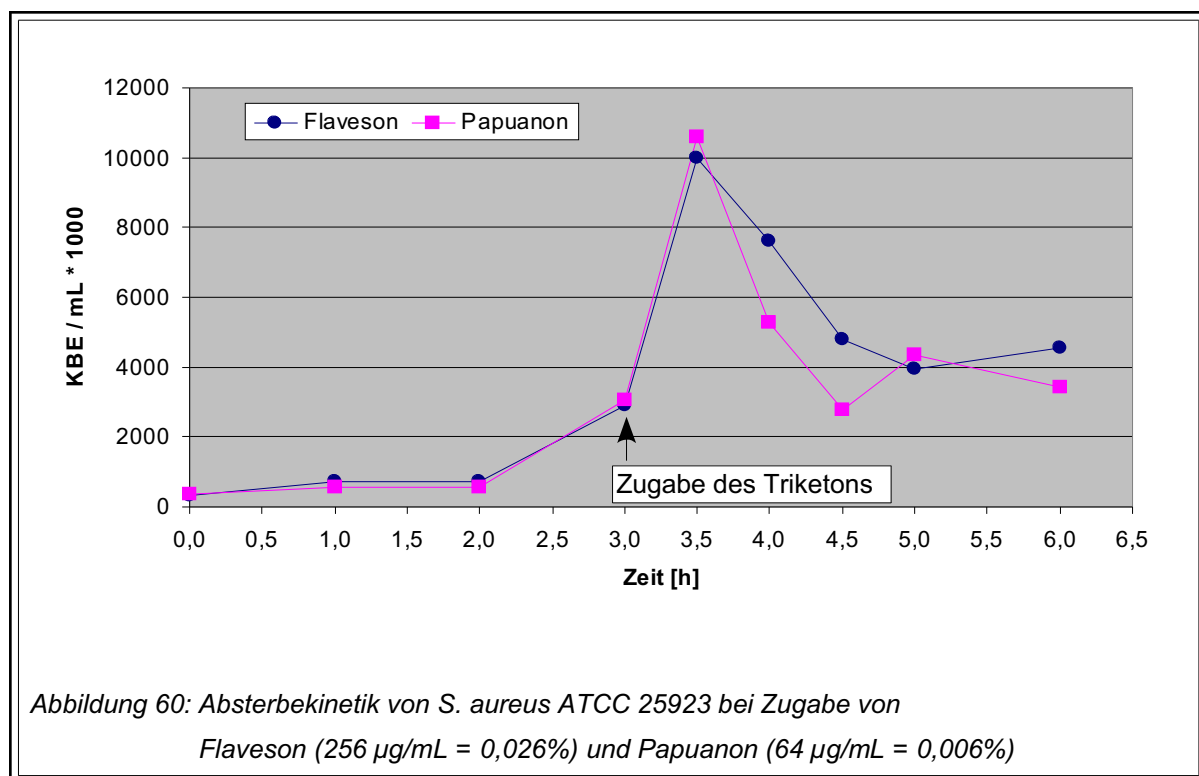
	MHK [µg / mL]
Agglomeron	256
„Acetyl“-Derivat	256
Flaveson	64
Leptospermon	32
Isoleptospermon	128
Papuanon	16
„Decanoyl“-Derivat“	2
Triketon-Komplex	128

hemmende Wirkung für den Konzentrationsbereich von 256 µg / mL bis 0,25 µg / mL. Die für den Stamm DE112 erhaltenen Ergebnisse sind in **Tabelle 32** dargestellt. Wie bei den Gram-positiven Keimen ist auch hier eine Steigerung des wachstumshemmenden Effektes mit zunehmender Länge des Acyl-Restes feststellbar.

6.6 Absterbekinetik von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Die Untersuchung der Kinetik einer *Staphylococcus aureus*-Kultur nach Zugabe von antimikrobiell wirksamen Substanzen erlaubt eine Aussage über Wirkungseintritt und Wirkdauer. Des Weiteren ermöglicht sie eine Differenzierung hinsichtlich des Wirkungstyps (mikrobiostatisch oder mikrobizid).

Untersucht wurden die beiden natürlich vorkommenden Triketone Flaveson und Papuanon, wobei Ersteres einen kurzketigen und Letzteres einen langketigen Acylrest aufweist. Die bei der Untersuchung eingesetzte Konzentration betrug das Doppelte der zuvor gegenüber *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ermittelten MHK-Werte. Daraus resultierte für Flaveson eine Konzentration von 256 µg/mL (= 0,026%) und für Papuanon eine Konzentration von 64 µg/mL (= 0,006%). Ausgehend von einem Inokulum mit 10^5 KBE / mL wurden die Bakteriensuspensionen unter Schütteln inkubiert, nach 3 Stunden (in der log-Phase) die in DMSO gelösten Triketone zugegeben und deren Einfluss auf die Keimsuspensionen wurde durch Bestimmung der KBE / mL dokumentiert.

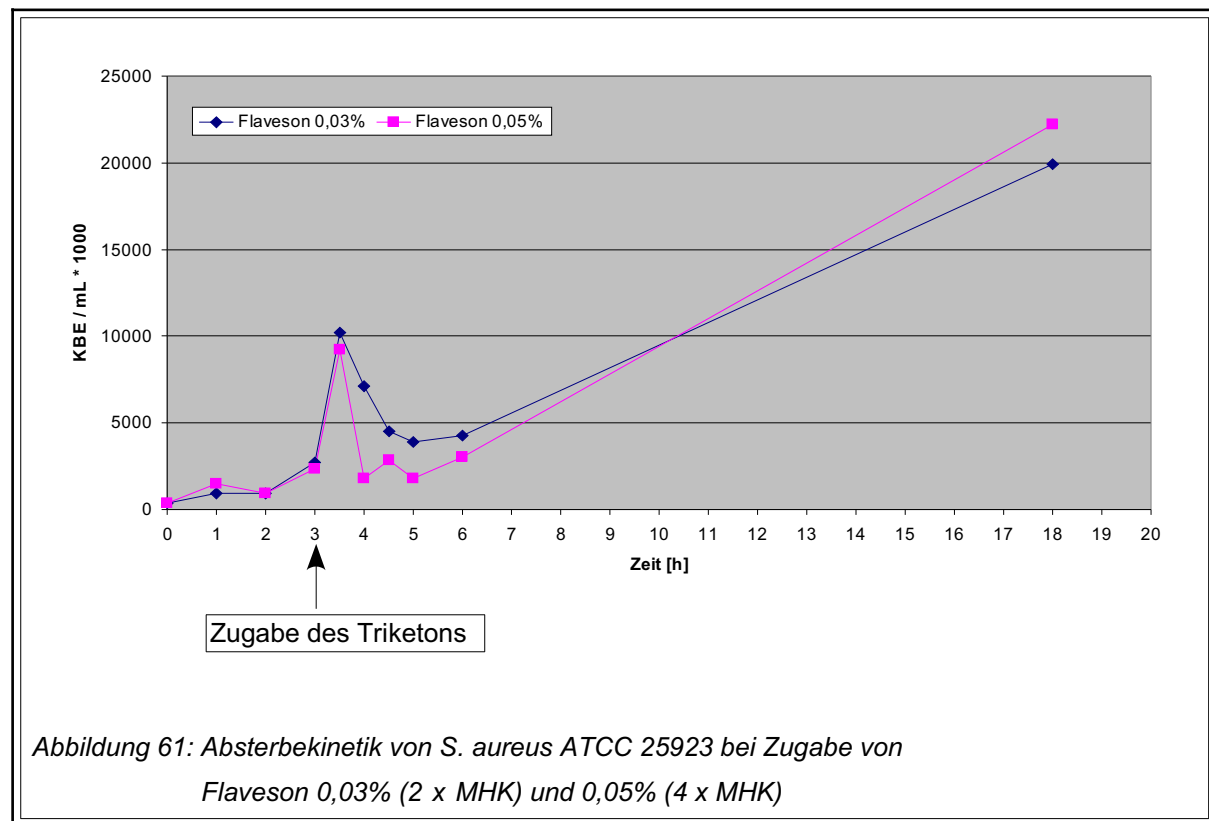


Die Kinetiken für die Triketone sind in **Abbildung 60** dargestellt. Die Kurven zeigen für beide Triketone eine etwa 30 Minuten nach Zugabe einsetzende abrupte Reduktion der lebenden Zellen (bakterizide Phase), wobei diese für Papuanon stärker ausgeprägt ist. Etwa 90 Minuten nach Zugabe der Triketone tritt ein bakteriostatischer Effekt ein, welcher sich in einer nahezu waagrecht verlaufenden Kurve äußert und bis zum Ende der beobachteten Zeitspanne anhält. In nachfolgenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass die bakteriostatische Wirkung nach etwa 6 Stunden

B Ergebnisse

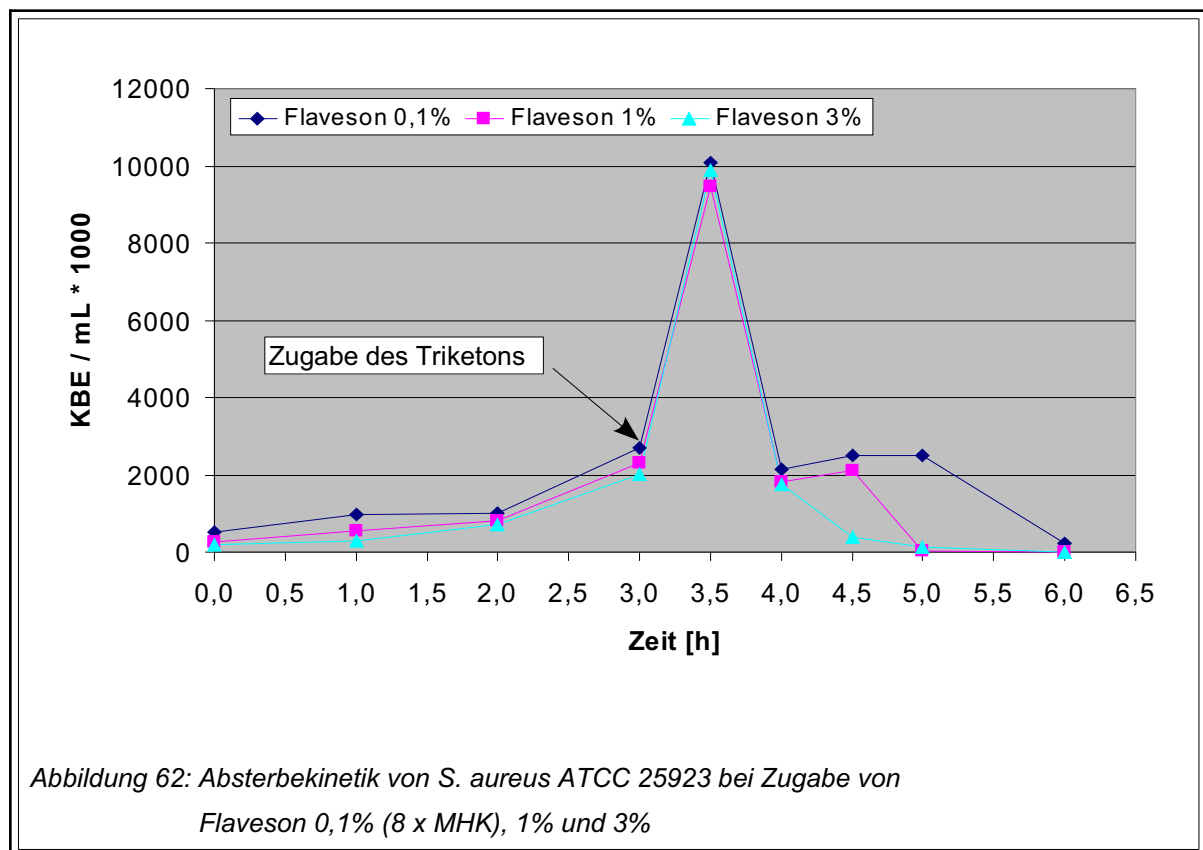
(Flaveson) bzw. nach etwa 7 Stunden (Papuanon) nachlässt und das Bakterienwachstum danach wieder exponentiell zunimmt.

Um Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen, wurden Absterbekinetiken für verschiedene Flaveson-Konzentrationen aufgenommen und miteinander verglichen. Die Zugabe des in DMSO gelösten Flavesons erfolgte nach 3 Stunden und zwar in Konzentrationen von 0,03% (2 x MHK), 0,05% (4 x MHK), 0,1% (8 x MHK), 1% sowie 3%.



Die Kurven für die Flaveson-Konzentrationen von 0,03% und 0,05% (**Abb. 61**) zeigten erwartungsgemäß zunächst eine deutliche Reduktion der Keimzahl. Nach einer darauf folgenden bakteriostatischen Phase stieg die Anzahl lebensfähiger Keime wieder deutlich an. Der Vergleich mit den Kurven für höhere Flaveson-Konzentrationen (**Abb. 62**) belegt, dass die Wirkung des Flavesons stark konzentrationsabhängig ist. Nach anfänglich gleichem Verlauf der Kurve ließ sich hier ein bakterizider Effekt nachweisen, der eine komplette Abtötung der Mikroorganismen nach 6 Stunden (für Konzentrationen von 1% und 3%) bzw. nach 18 Stunden (für 0,1%;

Kurve hier nur bis 6 h dargestellt) erreichte. Die Dauer der bakteriostatischen Phase, welche der ersten Reduktion der Keime folgt, nimmt mit zunehmender Flaveson-Konzentration ab. Bei einer Konzentration von 3% entfällt sie.



Auf gleiche Weise wurde das stark lipophile „Decanoyl-Derivat“ getestet, in der Annahme, dass dieses angesichts seiner hervorragenden MHK-Werte schneller zum vollständigen Absterben der Mikroorganismen führen würde (hier nicht dargestellt). Es zeigte sich jedoch, dass die Kinetiken des „Decanoyl-Produktes“ denjenigen des Flavesons entsprachen. Lediglich die Intensität der 30 Minuten nach Zugabe einsetzenden Keimreduktion war beim „Decanoyl-Produkt“ stärker ausgeprägt.

7 Antivirale Wirkung von Triketonen

7.1 Einleitung

In verschiedenen Studien wurde der inhibitorische Effekt verschiedener Acylphloroglucin-Derivate auf die Replikation des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) [CHIBA et al., 1992] sowie ein durch Euglobale (isoliert aus *Eucalyptus*-Arten) verursachter inhibitorischer Effekt auf das aktivierte Epstein-Barr-Virus (EBV) gezeigt [TAKASAKI et al., 1995]. Letzteres ist Auslöser des „Pfeifferschen Drüsenfiebers“ und gehört ebenso wie Herpes-simplex-Viren (HSV) zur Familie der Herpesviren.

Durch Herpes-simplex-Viren verursachte Erkrankungen gehören zu den häufigsten Infektionskrankheiten der Haut. Sie äußern sich in Form schmerzhafter bläschenförmiger Hautläsionen, welche bevorzugt im Gesichts- und Genitalbereich auftreten. Das Virus wird aufgrund seiner antigenen Eigenschaften in die Typen 1 (HSV-1, sog. oraler Stamm) und 2 (HSV-2, sog. genitaler Stamm) unterteilt. Während HSV-1 bevorzugt durch Schmier- und Tröpfcheninfektion aus Herpesläsionen übertragen wird, erfolgt die Übertragung des HSV-2 (Auslöser von Herpes genitalis) meist durch sexuelle Kontakte. Nach der Primärinfektion penetriert das HSV als Nukleokapsid in die Nervenendigungen, gelangt von dort entlang der Axone in die Ganglien und persistiert in den neuronalen Zellen. Die Reaktivierung des HSV (symptomatisch oder asymptomatisch) kann bei geschwächter Immunlage oder Irritation der infizierten Neuronen erfolgen. Zur Behandlung stehen verschiedene Nucleosid-Analoga zur Verfügung, als Beispiele seien hier Aciclovir, Idoxuridin und Penciclovir genannt.

Während für zahlreiche ätherische Öle Arbeiten zur antimikrobiellen oder antimykotischen Wirksamkeit vorliegen, sind Informationen über deren antivirale Eigenschaften eher spärlich. In dieser Hinsicht am besten untersucht ist das Australische Teebaumöl, welches seit langer Zeit volksheilkundlich bei Lippenherpes (Herpes labialis) eingesetzt wird. Der wissenschaftliche Wirksamkeitsnachweis wurde erst 2001 von SCHNITZLER et al. erbracht, die für Teebaumöl eine halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50}) von 0,0009% für HSV-1 und von 0,0008% für HSV-2 bestimmten und eine ausgeprägt viruzide Wirkung nachwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die antivirale Aktivität von Manukaöl, den darin enthaltenen Triketonen Flaveson und Leptospermon sowie von Agglomeron gegenüber HSV-1 untersucht und im Hinblick auf deren Wirkung in verschiedenen Phasen der Virusinfektion charakterisiert. Das eingesetzte Manukaöl wurde gaschromatographisch charakterisiert und enthielt 14,5% Leptospermon, 4,5% Flaveson sowie 3,9% Isoleptospermon (Triketone insgesamt: 22,9%). Die einzelnen Triketone wurden synthetisiert bzw. isoliert. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (Abt. Biologie) Heidelberg sowie dem Hygiene-Institut (Abt. Virologie) Heidelberg durchgeführt.

7.2 Ermittlung der Zytotoxizität

Die in den Virusexperimenten verwendeten RC 37-Zellen (Affennierenzellen) wurden hinsichtlich ihrer Verträglichkeit mit den zu testenden Substanzen überprüft. Hierbei fanden ethanolische Lösungen mit Substanz- bzw. Öl-Konzentrationen von 0,0001 bis 0,1% Verwendung. Nach Inkubation wurde der Anteil intakter Zellen (cell viability) mit Hilfe eines „neutral red dye uptake assay“ festgestellt. Hierbei wird ausgenutzt, dass vitale (intakte) Zellen einen Farbstoff aufnehmen, während tote Zellen (mit Löchern in ihrer Schutzhülle) dies nicht tun. Die aufgenommene Farbstoffmenge ist somit proportional zur Anzahl vitaler Zellen und wird nach deren Auflösung photometrisch bestimmt. Die Konzentrationen, bei denen keine sichtbaren Veränderungen der Zellmorphologie und -dichte feststellbar waren, sind ebenso wie die ermittelten TC_{50} -Konzentrationen (halbmaximale zytotoxische Konzentration) in **Tabelle 33** aufgeführt.

Tabelle 33: Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen

	max. nicht zytotoxische Konzentration [% V/V]	TC_{50}-Wert [% V/V]
Agglomeron	0,001	0,03
Flaveson	0,003	0,10
Leptospermon	0,001	0,05
Manukaöl	0,003	0,004

7.3 Wirkung in verschiedenen Phasen der Virusinfektion

Um Aussagen in Bezug auf den Mechanismus der antiviralen Wirkung treffen zu können, wurden das Manukaöl und die Triketone zu verschiedenen Zeiten der Virusinfektion zugegeben. Sämtliche Versuche wurden mit konfluenten RC 37-Zellen durchgeführt, die vor ihrer Inkubation mit einem Overlaymedium überschichtet wurden, um zu gewährleisten, dass sich das HSV nur von Zelle zu Zelle ausbreiten konnte. Jedes Virus führt durch Vermehrung zum Untergang der umgebenden Zellen, wodurch sogenannte Plaques (Löcher im Zellrasen) entstehen. Die Auswertung erfolgte nach viertägiger Inkubation durch Zählen dieser Plaques, aus denen die prozentuale Reduktion im Vergleich zu den Infektionseignissen bei Abwesenheit der Testsubstanzen (Kontrolle) berechnet wurde. Die Konzentration der zu testenden Substanzen orientierte sich an den Ergebnissen der Zytotoxizitätsuntersuchungen und betrug für Manukaöl und Flaveson 0,003% sowie für Agglomeron und Leptospermon 0,001%.

Prüfung der zellprotektiven Eigenschaften von β -Triketonen

Um evtl. vorhandene zellprotektive Effekte der Testsubstanzen (z.B. durch Blockade von Rezeptoren auf der Zelloberfläche und daraus folgend ein erschwertes Anheften der Viren) zu erkennen, wurden die konfluenten RC 37-Zellen in einer Lösung der jeweiligen Substanz suspendiert und für 60 Minuten darin belassen. Nach dem Entfernen der Substanzlösungen wurden die Zellen mit dem HSV-1 infiziert und inkubiert.

Prüfung der β -Triketone in Bezug auf eine direkte Virusschädigung

Die Behandlung des HSV-1 mit den Testsubstanzen vor Infektion der Zellen soll zeigen, ob das Virus selbst gehemmt oder sogar inaktiviert wird (=viruzide Wirkung). Als Ursache kommt hierbei eine Blockade oder Veränderung der Oberflächenstrukturen auf der Virushülle durch die Testsubstanz in Betracht. Für den Versuch wurde das Virus in einer Lösung der jeweiligen Substanz suspendiert, 60 Minuten lang inkubiert und erst dann für 60 Minuten auf die RC 37-Zellen gegeben. Anschließend wurde die Suspension entfernt, die Zellen inkubiert.

Einfluss der β -Triketone auf die Adsorptions-Phase des Virus

Bei diesem Versuch wurde eine Suspension von HSV-1 in der jeweiligen Testsubstanz hergestellt, diese sofort auf die Zellen aufgebracht, nach 60 Minuten wieder entfernt und anschließend die Zellen inkubiert. Bei dieser Anordnung des Versuches kann die jeweilige Testsubstanz Strukturen (wie z.B. Rezeptoren) sowohl auf der Virusoberfläche als auch auf der Zelloberfläche beeinflussen und so die Adsorption des Virus einschränken oder verhindern.

Einfluss der β -Triketone während der Replikations-Phase des Virus

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf das Virus nach dessen Adsorption, d.h. also in der Replikationsphase zu überprüfen, wurden die RC 37-Zellen zunächst 60 Minuten lang mit dem Virus infiziert. Nach Entfernen der Virussuspension wurde die im Overlaymedium gelöste Testsubstanz zugegeben und die Zellen wurden inkubiert.

Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt, wie oben angegeben die prozentuale Reduktion der Plaquebildung bestimmt und aus den erhaltenen Einzelwerten wurde der jeweilige Mittelwert gebildet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 34** aufgeführt und zusätzlich in **Abbildung 63** graphisch dargestellt.

Tabelle 34: Prozentuale Reduktion der Plaquebildung (Mittelwerte für die einzelnen Versuche);

Kontrolle = 100% PFU

	<i>Prüfung der zellprotektiven Eigenschaften [%]</i>	<i>Prüfung auf direkte Virus-schädigung [%]</i>	<i>Adsorptions-Phase [%]</i>	<i>Replikations-Phase [%]</i>
Agglomeron	96,5	21,0	97,7	97,9
Flaveson	106,9	0,9	74,5	99,3
Leptospermon	98,9	20,3	88,3	93,2
Manukaöl	93,8	0,5	65,2	63,5

Die graphische Auswertung (**Abb. 63**) macht deutlich, dass eine zellprotektive Wirkung durch Vorbehandlung der RC 37-Zellen mit Manukaöl oder einzelnen Triketonen ausgeschlossen werden kann. Die ermittelten Werte liegen in einem Bereich

von 94% - 107% und sind mit dem Wachstum des Virus ohne Zusatz von Testsubstanz vergleichbar. Im Gegensatz dazu ließ sich bei der Vorbehandlung des Virus mit nichtzytotoxischen Konzentrationen der Testsubstanzen ein starker antiviraler Effekt nachweisen. Sowohl Agglomeron als auch Leptospermon reduzierten die Plaquebildung um etwa 80% und zeigten damit eine dem parallel getesteten Aciclovir (79,8%; hier nicht dargestellt) vergleichbare Wirkung [Reichling et al., 2005]. Die stärkste antivirale Wirkung wiesen jedoch Manukaöl und Flaveson auf, für sie wurde eine Reduktion der Plaquebildung um 99,5% und 99,1% ermittelt. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Triketone ebenso wie das Manukaöl mit viralen Hüllstrukturen interagieren und damit die Adsorption des Virus sowie dessen Penetration in die Zellen unterbinden. Dieser Effekt war ebenfalls – wenn auch deutlich geringer ausgeprägt – bei Zugabe der Testsubstanzen während der Adsorptionsphase nachweisbar. Einzige Ausnahme bildete das Agglomeron, für das in dieser Versuchsreihe keine signifikante Wirkung nachgewiesen wurde. Flaveson, auch hier das wirksamste der drei getesteten Triketone, reduzierte in dieser Phase die Plaquebildung um 25,5%, Manukaöl um 34,8%.

Erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen nach dem Eindringen des HSV-1 in die Wirtszelle, also während der Replikationsphase, zeigte keines der Triketone eine signifikante Wirkung auf das virale Wachstum. Manukaöl hingegen reduzierte die Plaquebildung um 36,5%.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Triketone des Manukaöls ebenso wie das Öl selbst eine direkte antivirale Wirkung haben, die bevorzugt in einer frühen Phase der Virusvermehrung, d. h. vor der Infektion, zum Tragen kommt. Als Ursache ist eine Interaktion der Triketone mit Strukturen auf der Virushülle wahrscheinlich, wobei der genaue Wirkmechanismus noch detaillierter untersucht werden muss. Sie weisen somit einen vollständig anderen Mechanismus auf, als die Nucleosid-Analoga (z.B. Aciclovir), deren Wirkung auf einer Hemmung der viralen DNS-Synthese während der Replikationsphase des Virus beruht. Die Triketone können jedoch nicht als alleinige Träger der antiviralen Gesamtwirkung des Manukaöls gelten, da das Öl im Gegensatz zu den Triketonen auch während der Replikationsphase eine geringe antivirale Aktivität zeigt. Deshalb ist davon auszugehen, dass andere Komponenten

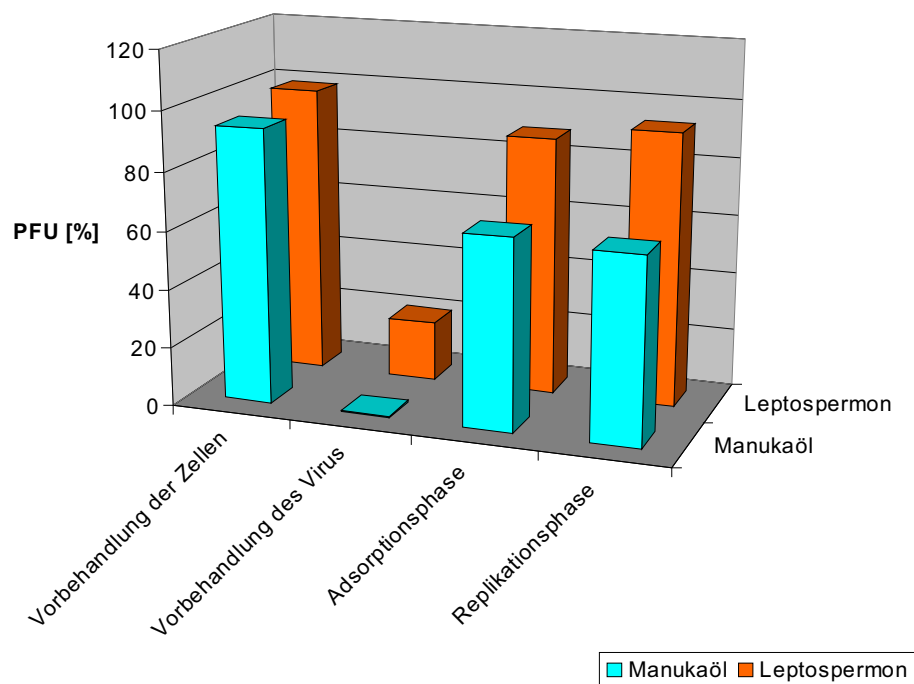
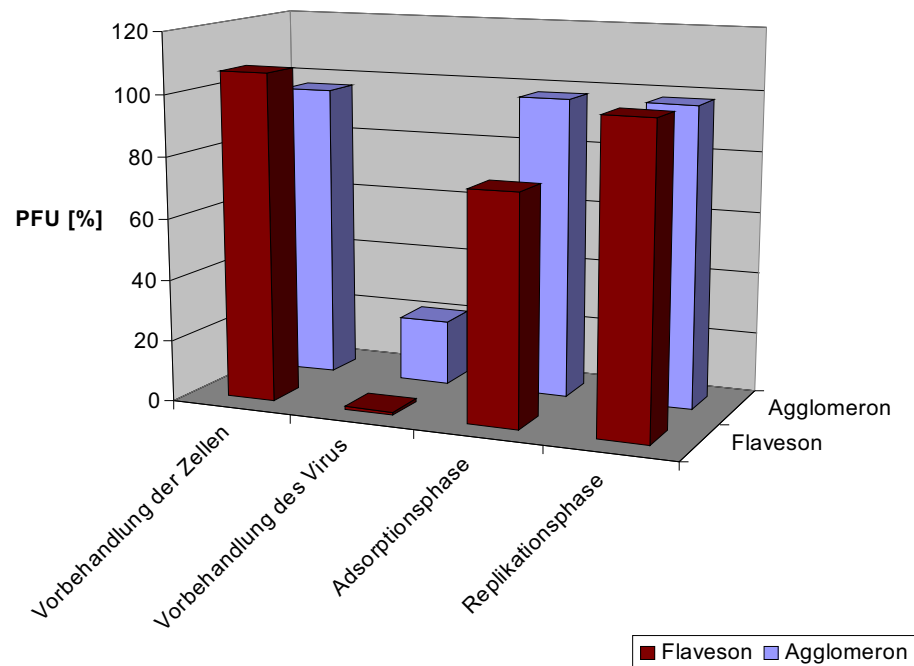


Abbildung 63: Wirkung verschiedener β -Triketone und des Manukaöls (prozentuale Reduktion) während verschiedener Phasen der Virusinfektion

des Öls (z.B. Terpen-Derivate) an dieser Wirkung beteiligt sind. In diesem Zusammenhang sei das ausschließlich aus Terpenen bestehende „Australische Teebaumöl“ genannt, für das ebenfalls eine antivirale Wirksamkeit nachgewiesen wurde [SCHNITZLER et al., 2001]. Die Ergebnisse bestätigen sowohl die volksheilkundliche Anwendung des Manukaöls bei Herpes simplex-Infektionen als auch die potentielle Anwendbarkeit der Triketone in der topischen antiviralen Therapie.

C Diskussion

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten experimentellen Arbeiten verfolgten das Ziel, Kenntnisse über natürliche β -Triketone zu gewinnen, wie sie im Neuseeländischen Teebaumöl (Manukaöl) und anderen ätherischen Ölen aus Pflanzen der Familie der Myrtaceae vorkommen. Dies geschah vor allem im Hinblick auf den Einsatz der β -Triketone resp. der entsprechenden ätherischen Öle in der Phytotherapie und Kosmetik.

Ursprünglich war beabsichtigt, verschiedene β -Triketone aus ätherischen Ölen der Myrtaceae zu isolieren, in der Annahme, dies sei der einfachste Weg, um isolierte Triketone zu erhalten. Dabei boten sich nach Literaturrecherche zahlreiche Arten an, die auszugsweise in den Tabellen 1 bis 5 (Kapitel A4) aufgeführt sind. In der Praxis bereitete jedoch die Beschaffung des geeigneten Pflanzenmaterials bzw. der daraus isolierten ätherischen Öle erhebliche Schwierigkeiten, so dass nur das Manukaöl als β -Triketon-Quelle zur Verfügung stand. Weitere Triketone waren somit nur durch chemische Synthese zugänglich. Das aus *E. agglomerata* Maiden isolierte Triketon Agglomeron wurde von einem Kollegen zur Verfügung gestellt.

Isolierung der β -Triketone und deren Synthese

Die in der Literatur [HARKENTHAL, 2000; COURTNEY et al., 1983] veröffentlichten Methoden zur Isolierung des „ β -Triketon-Komplexes“, bestehend aus Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon, erwiesen sich insofern als problematisch, als der hierzu verwendete Diethylether einen Stabilisator enthält, der sich im isolierten Präparat anreichert und nicht abtrennen lässt. Erfolg brachte die Verwendung von Ethylacetat als Extraktionsmittel, weil damit eine höhere Reinheit (98,9%) des Triketon-Komplexes bei nur geringfügig niedrigerer Ausbeute (im Mittel 3% weniger als mit Diethylether) erreicht wurde.

Als weiteres Problem erwies sich die Isolierung einzelner β -Triketone aus dem Triketon-Komplex. In Bezug auf Flaveson konnte dies mittels einer Kugelrohrdestillation im Vakuum (135°C, 17 mbar) zufriedenstellend gelöst werden; das Triketon wurde so mit einer Ausbeute von 13% und 99,8% Reinheit isoliert. Isoleptospermon und

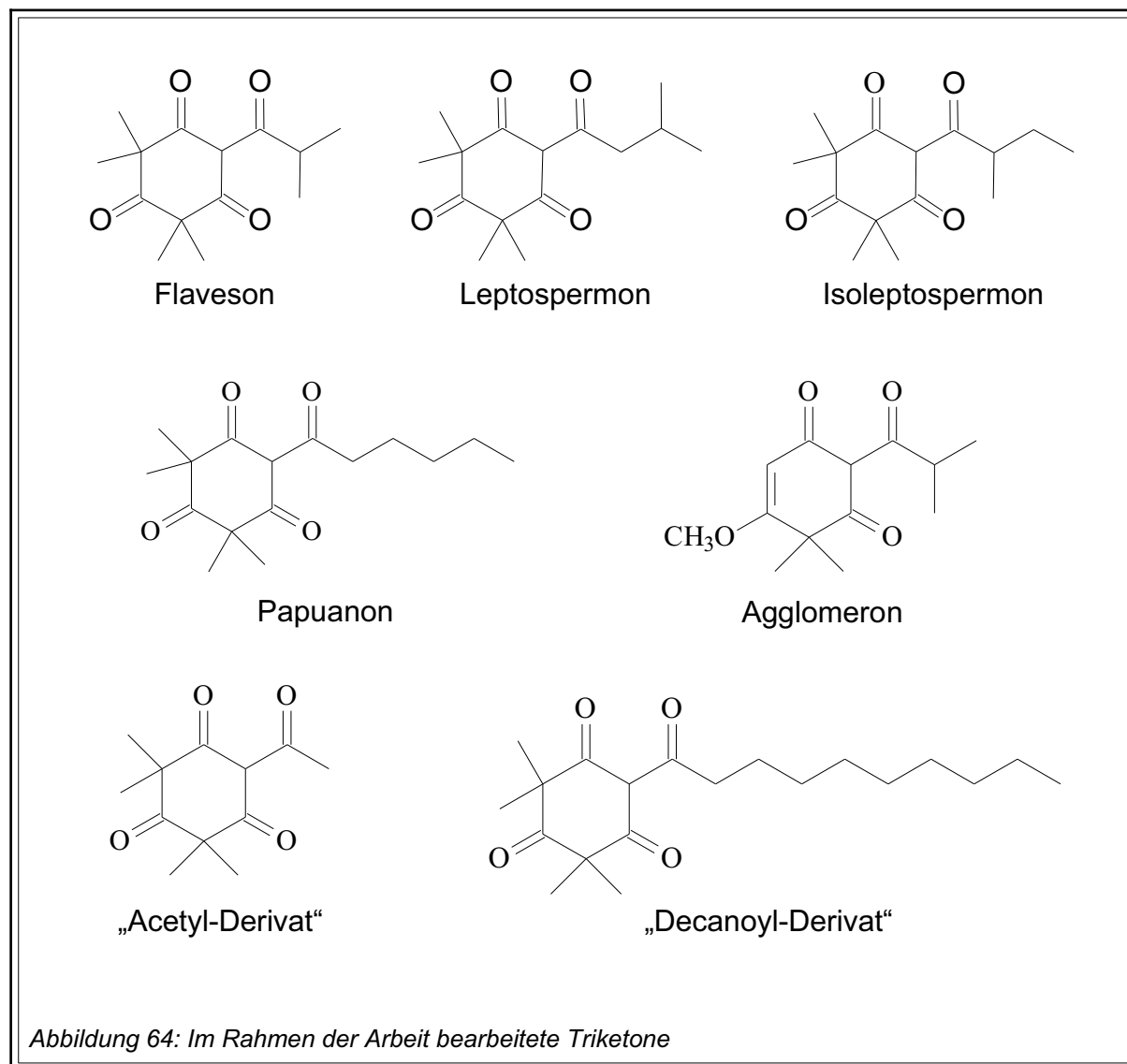
Leptospermon hingegen ließen sich auf diese Weise nicht trennen und waren nur durch chemische Synthese zugänglich.

In Anlehnung an eine für *Mammea*-Cumarine beschriebene Darstellung [CROMBIE et al., 1985 und 1987] wurde eine Synthesevorschrift entwickelt, der eine Acylierung des Phloroglucins und eine Methylierung zugrunde liegen. Sie ermöglichte sowohl die Gewinnung der natürlich vorkommenden Triketone Flaveson, Isoleptospermon, Leptospermon und Papuanon als auch der Triketone 4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Acetyl-Derivat“) und 4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Decanoyl-Derivat“). Letztere kommen in der Natur nicht vor und wurden mit dem Ziel synthetisiert, die variierende Länge der Acylseitenkette zum Gegenstand von Struktur-Wirkungs-Untersuchungen zu machen. Alle Triketone wurden mit Ausbeuten zwischen 51% und 78% in einer gaschromatographischen Reinheit von mindestens 99,8% gewonnen. Die entwickelte Synthesevorschrift führte zu reproduzierbaren Ausbeuten und Reinheitsgraden der β -Triketone und lässt sich in Zukunft für weitere Untersuchungen an dieser Stoffklasse einsetzen. Im Endeffekt standen für die nachfolgenden Untersuchungen (antimikrobielle Wirksamkeit, Stabilität, phototoxisches Potential) die in **Abbildung 64** gezeigten β -Triketone in ausreichender Menge (3 g – 10 g) zur Verfügung.

Chromatographische und spektroskopische Eigenschaften der β -Triketone

Da die spektroskopischen Daten der sieben Triketone in der Literatur nur zum Teil publiziert waren, wurden diese nach erfolgreicher Synthese ergänzt bzw. erstmals dokumentiert. Die Identifizierung der einzelnen Triketone anhand ihrer UV-Spektren erwies sich wegen der Ähnlichkeit der Spektren erwartungsgemäß als schwierig, nur Agglomeron mit seiner stärker abweichenden Struktur erlaubte eine klare Zuordnung. Ebenso ähnelten sich die IR-Spektren der einzelnen β -Triketone, sie waren durch charakteristische C-H-Valenzschwingungen und starke, für Carbonyl-Funktionen typische Absorptionen gekennzeichnet. Eine bessere Möglichkeit zur Identifizierung von β -Triketonen eröffnet die Massenspektrometrie. Sie erlaubt die Unterscheidung der einzelnen Triketone, auch wenn sie alle einen charakteristischen Zerfall des Tetramethyldion-Grundgerüsts aufweisen, der zu einem typischen Fragment mit der Massenzahl m/z 70 führt. Die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren ergän-

zen vorhandene Literaturangaben [BICK et al., 1965 und VAN KLINK et al., 1999] und sind, ebenso wie die anderen Spektren, im Anhang abgebildet. Gemeinsam liefern sie eine gute Grundlage zur Identifizierung der sieben β -Triketone.



Neben der spektroskopischen Charakterisierung spielte die Entwicklung chromatographischer Methoden zur Auftrennung einzelner β -Triketone eine Rolle. Sie sind Voraussetzung für eine Quantifizierung der Triketone im ätherischen Öl und ermöglichen deren Identifizierung anhand von Retentionszeiten. Es wurde eine HPLC-Methode (RP-18, Gradient aus Acetonitril, Wasser und Eisessig) entwickelt, die sich insbesondere durch die basisliniengetrennten Peaks der Isomeren Isoleptospermon und Leptospermon sowie durch eine kurze Analysendauer (10 min) auszeichnet und

sich somit als Routinemethode eignet. Auffällig ist, dass die Peaks der beiden Isomeren im Vergleich zu den anderen Peaks vor und nach ihnen deutlich verbreitert im Chromatogramm erscheinen. Dieses Phänomen wurde sowohl bei isokratischer Elution als auch bei der Gradientenelution beobachtet, eine plausible Erklärung hierfür wurde jedoch nicht gefunden.

Die gaschromatographische Auftrennung der Triketone ließ sich sowohl auf unpolaren als auch auf polaren stationären Phasen erreichen. Letztere erwies sich als unvorteilhaft, da die Peaks der Triketone durch ein störendes Tailing charakterisiert sind. Für die unpolare Phase (BGB-1; 100% Dimethylpolysiloxan) wurden die Retentionsindices bestimmt, die zusammen mit einer massenspektroskopischen Analyse eine eindeutige Identifizierung der einzelnen Triketone in ätherischen Ölen erlauben. Auch die Dünnschichtchromatographie auf RP-18-Phasen erwies sich als schnelle und brauchbare Trennmethode. Mit Ausnahme des Isomerenpaares Isoleptospermon und Leptospermon konnten damit alle Triketone mit einem Fließmittelgemisch aus Ameisensäure und Dichlormethan (6:4) zufriedenstellend getrennt werden. Eine postchromatographische Differenzierung der einzelnen β -Triketone wurde nicht erreicht. Mit Ausnahme des Agglomerons (begründet in seiner abweichenden Struktur) wiesen alle Triketone die gleiche Färbung auf.

Untersuchungen zur Stabilität

Die Verwendbarkeit von ätherischen Ölen in therapeutischen und kosmetischen Zubereitungen hängt wesentlich von ihrer Stabilität ab. Dabei geht es um die Haltbarkeit dieser Produkte als solche und um die Frage, ob im Laufe der Lagerung Zersetzungsprodukte gebildet werden, die ähnlich wie beim „Australischen Teebaumöl“ unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen können [HARKENTHAL et al., 2000]. Untersucht wurde der Einfluss von Licht und höheren Temperaturen, wobei sich die Triketone, exemplarisch geprüft an Flaveson, erfreulicherweise als sehr stabil erwiesen. Nach 60 Wochen Lagerungszeit unter Lichteinfluss und im Dunkeln sowie bei Raumtemperatur und bei 37°C konnten weder gas- noch dünnschichtchromatographisch Zersetzungsprodukte nachgewiesen werden.

Phototoxizität

Die topische Anwendung der β -Triketone erfordert u.a. Kenntnisse über mögliche phototoxische Eigenschaften. Das Fehlen diesbezüglicher Publikationen gab Anlass zu entsprechenden Untersuchungen. Gestützt wurde dieses Anliegen durch die in den USA veröffentlichte „Guidance for Industry – Photosafety Testing (2003) und die in der EU veröffentlichte „Note for Guidance on Photosafety Testing“ (2002), die eine Beurteilung von Substanzen auf mögliche photosensibilisierende Eigenschaften empfehlen, sofern sie für den Einsatz am Menschen bestimmt sind und im Bereich von 260 bis 700 nm absorbieren. Als Testmethode wurde hierzu der kombinierte Erythrozyten-Phototoxizitätstest verwendet, welcher sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über das phototoxische Potential von Substanzen erlaubt. Erfreulicherweise wiesen weder die getesteten Triketone Agglomeron, Flaveson und Papuanon noch der aus Manukaöl isolierte Triketon-Komplex phototoxische Eigenschaften auf, ein für die äußerliche Anwendung entscheidender Vorteil. Eine Aussage zur DNA-Phototoxizität ließ der kombinierte Erythrozyten-Phototoxizitätstest nicht zu. Diesbezügliche Untersuchungen stehen noch aus, lassen aber angesichts vorliegender Ergebnisse keine derartige Wirkung erwarten.

Antibakterielle Wirksamkeit

Im Rahmen mikrobiologischer Untersuchungen wurden die synthetisierten bzw. isolierten β -Triketone auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit getestet. Voraussetzung hierfür war die Wahl eines geeigneten Lösungsvermittlers, der bei fehlender Eigenwirkung auf die Mikroorganismen eine gute Löslichkeit der Triketone im Testmedium gewährleistet. In Untersuchungen mit Polysorbat 20, Polysorbat 80 und DMSO erwies sich Letzteres als deutlich überlegen, weil bei dessen Verwendung weder eine Schaumbildung, wie bei den Polysorbaten beobachtet, noch eine Veränderung des Habitus der Bakteriensuspension auftrat und es in relativ hohen Konzentrationen (bis zu 5%) einsetzbar war.

Es lässt sich festhalten, dass sowohl die natürlich vorkommenden Triketone als auch der aus Manukaöl isolierte „Triketon-Komplex“ eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven Keimen aufweisen. Die Ergebnisse, welche für die Triketone Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon gewonnen wurden, bestätigen

die mit Manukaöl [CHRISTOPH, 2000] und dessen ketonischer Fraktion [KIM und RHEE, 1999] durchgeführten Untersuchungen. Darüber hinaus manifestiert sich die Forderung nach Manukaölen mit hohem Triketon-Gehalt, sofern diese als antibakterielle Zusätze Verwendung finden sollen. Offen bleibt die Frage nach einer Resistenzentwicklung der Triketone; diesbezüglich liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Entscheidend für die Wirkstärke ist die Lipophilie der einzelnen Triketone. In Struktur-Wirkungs-Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich die antimikrobielle Wirksamkeit der β -Triketone mit zunehmender Länge der Acyl-Seitenkette verstärkt. Unter den natürlich vorkommenden Triketonen erwies sich Papuanon, welches einen Hexanoyl-Rest aufweist, als das am besten antibakteriell wirksame Triketon. Unter Einbeziehung des „Acetyl-Derivats“ (4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion) und des „Decanoyl-Derivats“ (4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion) ließ sich der direkte Zusammenhang zwischen der Lipophilie des Triketons und der Stärke seiner antibakteriellen Wirksamkeit untermauern. Mit dem „Decanoyl-Derivat“ lag das stärkste antibakteriell wirksame Triketon vor, das je nach Keim MHK-Werte zwischen 4 μg / mL und 0,5 μg / mL aufwies.

Da die lipophilen Eigenschaften einer Substanz u.a. ihre Affinität zu Membranstrukturen bestimmen, kommt es mit zunehmender Lipophilie der β -Triketone möglicherweise zu einer verstärkten Interaktion mit der bakteriellen Zytoplasmamembran. In der Folge wird der Transport kleiner hydrophiler Moleküle in die Bakterien verhindert [LLOYD et al., 1988], was zu einer Beeinträchtigung des bakteriellen Stoffwechsels führt. Vorstellbar ist auch, dass die β -Triketone nach Überwindung der Zellwand in die Zytoplasmamembran penetrieren, von dort in das Zytoplasma diffundieren und auf bestimmte Stoffwechselvorgänge einwirken.

Beachtenswert ist, dass die antimikrobielle Wirkung des „Triketon-Komplexes“ insgesamt immer so stark ist, wie die stärkste Einzelwirkung eines der drei darin enthaltenen Triketone. Daraus lässt sich folgern, dass der antimikrobiellen Aktivität der Triketone das Prinzip der Indifferenz zugrunde liegt, was durch einen speziellen Versuch mit dem „Triketon-Komplex“ und Papuanon gestützt wurde.

Diskutiert wird, dass die Wirkung der Triketone zum Teil auf ihrer Fähigkeit beruht, chelatähnliche Strukturen auszubilden. So könnten sie z.B., ähnlich wie die 4-Amino-5-hydroxy-chinoline [MEYER, 2000], Metallkationen wie die von den meisten pathogenen Keimen benötigten Fe^{3+} -Ionen komplexieren. Bakterien benötigen für ihr Wachstum und die Ausprägung von Pathogenitätseigenschaften etwa 10^{-5} mol / L freie Fe^{3+} -Ionen [BRAUN, 1995]. Durch Ausbildung sogenannter Siderophore (Eisen-carrier), die als starke Komplexbildner den Proteinkomplexen der Wirtsorganismen Fe^{3+} -Ionen entziehen und aktiv in die Zelle transportieren, können Bakterien ihren lebensnotwendigen Eisenbedarf decken [HIDER, 1984; SCHWYN und NEILANDS, 1987]. Es ist vorstellbar, dass die Triketone in Konkurrenz zu den Siderophor-Strukturen treten und den Keimen so die für das Wachstum notwendigen Fe^{3+} -Ionen entziehen. Des Weiteren kommen Reaktionen zwischen den Ketogruppen und enzym-spezifischen Strukturen wie Sulfhydrylgruppen in Betracht, die zu einer Modifikation und damit verbunden zu einer Inaktivierung von Enzymen führen können.

Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit war es, Aussagen bezüglich des Zeitpunktes, der Wirkung und der Wirkdauer von Triketonen zu treffen. Hierzu wurde das Verhalten von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nach Zugabe von Triketonen während der log-Phase anhand von Absterbekinetiken beurteilt. Für alle überprüften Triketone wurde eine etwa 30 Minuten nach Zugabe der Triketone einsetzende Reduktion der lebenden Zellen beobachtet, die in Abhängigkeit von der Lipophilie des eingesetzten Triketons unterschiedlich stark ausgeprägt war. Im weiteren Verlauf erwies sich die Wirkung der Triketone als stark konzentrationsabhängig. So zeigten Flaveson-Konzentrationen bis 0,05% einen bakteriostatischen, Konzentrationen ab 0,1% einen bakteriziden Wirkungsverlauf. Letzterer wies nach einer Reduktion der lebensfähigen Keime zunächst eine bakteriostatische Phase auf, die sich mit zunehmender Flaveson-Konzentration verkürzte und schließlich ganz wegfiel. Bei Einsatz bakterizider Konzentrationen wurde das vollständige Absterben der Mikroorganismen 3 Stunden nach ihrer Zugabe erreicht, dies galt auch für das „Decanoyl-Derivat“.

Eine Wirkung der Triketone und des Manukaöls auf Gram-negative Bakterienstämme, insbesondere auf chinolonresistente *Escherichia coli*-Stämme ließ sich nicht nachweisen. Dieses Ergebnis bestätigt ähnliche Arbeiten [u.a. MATHEKGA et al.,

1999; LIS-BALCHIN et al., 1996; PORTER & WILKINS, 1998], in denen für Triketon- oder Acylphloroglucin-haltige Öle bzw. Fraktionen keine oder nur eine sehr schwache Wirksamkeit gegenüber Gram-negativen Mikroorganismen nachgewiesen wurde. Wie bereits erwähnt, liegen zum Wirkmechanismus der Triketone keine gesicherten Erkenntnisse vor. Die oben angeführten Überlegungen zur Chelatierung der lebenswichtigen Fe^{3+} -Ionen durch die Triketone liefern in Bezug auf die fehlende Wirkung bei Gram-Negativen Bakterien eine unzureichende Erklärung. Somit kommen auch andere Mechanismen wie die Beeinflussung von Transportvorgängen in der Zellmembran oder von Stoffwechselvorgängen in der Bakterienzelle in Betracht. Selbst das Zusammenspiel mehrerer verschiedener Mechanismen ist vorstellbar. Voraussetzung für die Beeinflussung der genannten Vorgänge ist das Penetrieren der Triketone in die Zellmembran oder das Zytoplasma, was zunächst eine Überwindung der Zellwand erfordert. Während die Zellwand Gram-positiver Bakterien für Substanzen mit einer Molekülmasse von bis zu 3300 Dalton relativ leicht zu durchdringen ist [AUTERHOFF et al., 1991], stellt die Zellwand Gram-negativer Bakterien aufgrund ihres mehrschichtigen Aufbaus ein größeres Hindernis dar. Der Durchtritt von niedermolekularen Substanzen durch die äußere Membran erfolgt über Porine, hydrophile Poren in der lipophilen Membran [SCHLEGEL, 1992]. Es kann angenommen werden, dass die fehlende Hydrophilie der Triketone deren Penetration in die äußere Membran Gram-negativer Bakterien verhindert und so für die fehlende Wirksamkeit verantwortlich ist.

Antivirale Wirksamkeit

Während für zahlreiche ätherische Öle Untersuchungen zu deren antimikrobieller und antimykotischer Wirksamkeit veröffentlicht wurden, sind Arbeiten zur antiviralen Aktivität von Ölen seltener. Daher war es in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Anliegen, erstmals die antivirale Aktivität von Manukaöl sowie ausgewählten Triketonen zu untersuchen und Rückschlüsse auf einen möglichen Wirkmechanismus zu ziehen. Zur Untersuchung gelangten Agglomeron, Flaveson, Leptospermon und Manukaöl; sie wurden auf ihre Wirksamkeit gegenüber Herpes-simplex-Viren Typ 1 in verschiedenen Phasen der Virusinfektion überprüft. Alle Triketone zeichneten sich ebenso wie das Manukaöl durch eine ausgeprägte viruzide Wirkung aus, sofern sie in direkten Kontakt mit dem Virus gebracht werden. Für Agglomeron und Lepto-

spermon wurde eine dem Aciclovir vergleichbare Wirkung gezeigt. Als stärker wirksam erwiesen sich Manukaöl und Flaveson, sie reduzierten die Plaquebildung um 99,5% bzw. 99,1%. Als Wirkmechanismus kann angenommen werden, dass sowohl die Triketone als auch das Manukaöl mit den viralen Hüllstrukturen interagieren, so die Adsorption des Virus an die Wirtszellen erschweren oder sogar unterbinden und dadurch die Penetration des Virus in die Zellen verhindern. Für die Wirkung des Manukaöls muss außerdem von einer Beteiligung anderer Substanzen sowie synergistischen Effekten ausgegangen werden, da die enthaltenen Triketone lediglich einen Anteil von 22,9% ausmachten. Bestätigt werden diese Überlegungen durch die Ergebnisse, die bei Zugabe einer Suspension aus HSV-1 und jeweiligem Triketon bzw. Manukaöl zu den RC 37-Zellen gewonnen wurden. Dabei ist die Geschwindigkeit, mit der sich die Viren an die Oberfläche der Wirtszelle heften, offenbar größer als die Geschwindigkeit, mit der die Triketone die viralen Hüllstrukturen blockieren, so dass die Reduktion der Plaquebildung hier deutlich geringer (12% – 35%) ausgeprägt war. Ausgeschlossen werden können sowohl zellprotektive Eigenschaften der Triketone als auch eine Einflussnahme der Triketone nach Penetration der Viren in die Wirtszelle.

Weitere Aspekte

Die diskutierten Ergebnisse legen vor allem eine topische Anwendung der Triketone nahe, wobei weitergehende toxikologische Untersuchungen noch ausstehen. Von REICHLING et al. (2000) wurde ein modifizierter HET-CAM-Test (Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test) zur Abschätzung der potentiellen schleimhautreizenden Wirkung ätherischer Öle eingesetzt und mit diesem u.a. das Manukaöl getestet. Die überprüften Öle wurden abhängig von ihrer Reizschwellenkonzentration in drei Kategorien eingeteilt: Schleimhautreizende Wirkung bei geringer Reizschwellenkonzentration (1 - 10%), bei mittlerer Reizschwellenkonzentration (15 - 25%) und bei hoher Reizschwellenkonzentration (30 - 100%). Sowohl Manukaöl als auch die isolierte Triketon-Fraktion [HARKENTHAL, 2000] gehören zur letzten Kategorie und verursachen somit erst bei einer relativ hohen Konzentration eine Schleimhautreizung. Es ist anzunehmen, dass die einzelnen Triketone ebenfalls in diese Kategorie einzuordnen sind. Offen bleibt allerdings die Frage, ob die höhere Lipophilie des Papua-

nons und des „Decanoyl-Derivates“ nicht eine stärkere Schleimhautreizung zur Folge hat.

Im Hinblick auf eine innerliche Applikation sind sowohl die Triketone als auch das Manuköl kritisch zu betrachten, da diesbezüglich keine gesicherten Erkenntnisse vorliegen. Für Leptospermon konnte gezeigt werden, dass es sich durch Leberzellen (*in vitro*) nicht metabolisieren lässt und somit einen stark kompetitiven Inhibitor des oxidativen Arzneistoffmetabolismus darstellt. Als Ursache wird eine teilweise Bindung an mikrosomale Proteine angenommen [GRAHAM et al., 1970].

D Material und Methoden

1 Isolierung von β -Triketonen aus Manukaöl

1.1 Untersuchungsmaterial

Tabelle 35: Handelsmuster Manukaöl

<i>Nummer</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Nummer</i>	<i>Charge</i>
M01	Bergland	BAG Nr. 89249	P801329
M02	Canea Pharma GmbH	Los Nr. 298876	x
M03	Düllberg Konzentra	x	741-165
M04	Frey + Lau GmbH	x	00983
M05	Hübner	x	441001
M06	Kaders	Ref: 970860	x
M07	Neumond	Art. Nr. 1577	41
M08	Phoenix Natural Products	x	4111/02
M09	Primavera Life	x	04593-3
M10	Taoasis	x	24681012
M11	Worlee	Muster Nr. 5787	x
x = keine Angaben vorhanden			

1.2 Isolierung des Triketon-Komplexes – Standard-Vorschrift

5 mL Öl werden mit 25 mL Diethylether versetzt und 3mal mit je 25 mL 5%iger Natriumcarbonat-Lösung extrahiert. Die Natriumcarbonat-Phasen werden vereinigt und mit 10 mL 25%iger Salzsäure versetzt (Achtung: starke Gasentwicklung!), woraus sich ein pH-Wert von 2 ergibt. Anschließend wird 3mal mit je 25 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten Ether-Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer bis zum Verschwinden des Diethylethers eingeeengt. Der β -Triketon-Komplex wird als gelber zähflüssiger Rückstand (ca. 1g) erhalten.

1.3 Isolierung des Triketon-Komplexes – Modifizierte Vorschrift

5 mL Öl werden mit 25 mL Ethylacetat versetzt und 3mal mit je 25 mL 5%iger Natriumcarbonat-Lösung extrahiert. Die Natriumcarbonat-Phasen werden vereinigt und mit 10 mL 25%iger Salzsäure versetzt (Achtung: starke Gasentwicklung!), wo-

raus ein pH-Wert von 2 resultiert. Anschließend wird 3mal mit je 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer bis zum Verschwinden des Ethylacetats eingengt. Der gelbe, zähflüssige Rückstand (ca. 1g) enthält den β -Triketon-Komplex.

1.4 Isolierung nach HARKENTHAL (Zitat aus Dissertation)

Füllmaterial: Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie, Korngröße 0,063 - 0,2 mm
Durchführung: Manukaöl wurde auf die mit n-Hexan konditionierte Kieselgelsäule aufgebracht und mit n-Hexan eluiert, bis im Eluat keine Terpene mehr nachweisbar waren. Anschließend wurden die Triketone mit Methanol von der Säule eluiert. Die durch Dünnschicht- oder Gaschromatographie ermittelten triketonhaltigen Fraktionen wurden vereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer oder durch Einleiten von Stickstoff schonend entfernt.

2 Kugelrohrdestillation

Die fraktionierten Vakuumdestillationen wurden mit dem Kugelrohrdestillationsgerät der Firma Büchi (Büchi Glass Oven B 580) sowie mit einer Vaccubrand Membranpumpe und einem Vaccubrand Controller 24 D durchgeführt. Weitere Destillationsparameter sind in **Tabelle 36** aufgeführt.

Tabelle 36: Destillationsparameter bei der Kugelrohrdestillation

Proben- und Auffanggefäße	<ul style="list-style-type: none">• Glaskolben 60 mL (kann maximal 20 mL aufnehmen)• Glaskugel 25 mL (kann maximal 5 mL aufnehmen)
Druck	Vakuum, 10 - 60 mbar
Temperatur	<ul style="list-style-type: none">• Destillation: 150 -250°C• Auffanggefäß: Eiskühlung
Rotationsgeschwindigkeit	20 U/min
Einwaagen	2 mL beziehungsweise 4mL
Destillationsdauer	variabel bis zur Trockene des Mehrkomponenten-Gemisches, ca. 3 - 6 h

3 Chromatographische Methoden

3.1 Niederdruck-Säulenchromatographie

Die präparativen Isolierungen der Triketone aus Manukaöl erfolgten unter den in **Tabelle 37** aufgeführten Bedingungen mit einem Fließmittel aus Acetonitril : Wasser : Methanol im Verhältnis von 55 : 40 : 5, bei einem Fluss von 1 mL/min. Alle Fließmittel wurden vor der Verwendung ca. 15 min im Ultraschallbad entgast, um Bläschenbildung auf der Säule und daraus folgende Trennfehler zu vermeiden. Der unter diesen Bedingungen erreichte Druck betrug maximal 2 bar. Die Konzentrationen der eingesetzten methanolischen Triketon-Komplex-Lösungen (variabel: 1 bis 5 mL) betrugen 0,1% und 0,5%. Detektiert wurde im UV-Licht bei einer Absorption von 300 nm. Die zeitliche Fraktionierung erfolgte im Abstand von 60 Sekunden mit Hilfe eines Fraktionssammlers.

Tabelle 37: Parameter für die Niederdruck-Säulenchromatographie

Pumpe:	Büchi 681 Chromatography pump Height of stroke: 20 Stroke frequency: variabel (1/2 bis 1)
Säule:	RP18; Länge: 20,4cm; ID: 1,8cm Korngröße: 40-63 µm; Porendurchmesser: 60Å Spezifikation: Polygoprep 60-50 C18; Charge: 8014, Art. 711500.100; Macherey-Nagel
Detektor:	Varian 2550
Integrator:	Merck / Hitachi D-2000 Chromato-Integrator
Fraktionssammler:	Fraction Collector RediFrac Pharmacia

3.2 Trockensäulenchromatographie (TSC)

3.2.1 Vortrennung des ätherischen Öls in fünf Fraktionen

Die trocken Säulenchromatographische Trennung des Manukaöls in fünf unterschiedlich polare Fraktionen wurde nach dem von KUBECZKA (1973) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Zur Fraktionierung wurde ein mit einer Fritte einseitig verschlossenes Glasrohr der Spezifikation NS 29/32 (Abmessungen: Länge = 25 cm, Durchmesser = 3 cm)

verwendet, welches ca. 10 cm hoch mit Kieselgel (ICN Silicia TSC 60 A; ICN Biomedicals) gefüllt war. Auf das obere Ende der Säule wurde 1 mL einer 10%igen Lösung des Öls in n-Hexan gegeben. Sie wurde mit Kieselgel (ca. 1 cm hoch) überschichtet und zusätzlich mit Watte bedeckt. Die Elution erfolgte mit 150 mL n-Hexan (Fraktion 1). Im Anschluss an das Trockenlaufen der Säule wurde mit 60 mL eines Gemisches aus Hexan / Diethylether (4:1) eluiert, welches die Fraktion 2 bildete. Nach dem erneuten Trockenlaufen der Säule wurde diese im Verhältnis von 4 : 3 : 3 (von unten beginnend) aufgeteilt. Die entsprechenden Kieselgel-Fractionen wurden mittels eines Spatels herausgekratzt und unverzüglich wie folgt suspendiert:

Fraktion 3: in 20 mL n-Hexan

Fraktion 4: in 20 mL n-Hexan / Diethylether (1:1)

Fraktion 5: in 20 mL n-Hexan / Diethylether (1:1)

Zur Aufarbeitung der Fraktionen 3 bis 5 wurde diesen langsam und unter ständigem Rühren destilliertes Wasser zugegeben. Dies führte zum Sulzigwerden des Kieselgels, d. h. durch das Wasser wurden die absorbierten Komponenten aus dem Kieselgel verdrängt. Der daraus resultierende Überstand wurde dekantiert und der Rückstand zweimal mit dem entsprechenden Lösungsmittel (s.o.) gewaschen. Fraktionen, welche Diethylether enthielten, wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter Stickstoff-Atmosphäre auf ca. 1 mL eingeeengt.

Die Fraktionen trennen die Ölkompontenten nach ihrer Polarität wie folgt:

Fraktion 1: Kohlenwasserstoffe

Fraktion 2: Ester

Fraktion 3: Phenole, Ketone, Oxide

Fraktion 4: Aldehyde, Oxide

Fraktion 5: Alkohole, Säuren

3.3 Gaschromatographie (GC)

Die Überprüfung der isolierten / synthetisierten Triketon-Derivate erfolgte mittels verschiedener Systeme, deren Parameter in den **Tabellen 38** und **39** dargestellt sind. Der Vordruck aller Gase (H_2 , Luft, N_2) betrug ca. 3 bar. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Integrationsprogramm Hewlett Packard ChemStation.

Tabelle 38: GC-Parameter Teil 1

	HP 5890 A Series II / Port A	HP 5890 A Series II / Port B
Injektor	Split / Splitless	Split / Splitless
Injektortemperatur	250°C	280°C
Split	10:1	10:1
Detektor	FID	FID
Detektortemperatur	270°C	290°C
Säule	ZB-1 (Phenomenex) 30 m, ID: 0,25 mm, d_i : 0,25 μ m Temperatur Limit: 360 / 370°C	BGB-1 (BGB-Analytik AG) 60 m, ID: 0,25 mm, d_i : 0,25 μ m Temperatur Limit: 320 / 330°C
Temperaturprogramme	45°C bis 320°C, 3°C/min 100°C bis 320°C, 3°C/min	45°C bis 300°C, 3°C/min 100°C bis 300°C, 3°C/min
Trärgas / Carrier	Stickstoff, 60 kPa, 1 mL / min	Stickstoff, 120 kPa, 1 mL / min
Hydrogen	150 kPa	150 kPa
Air	200 kPa	200 kPa

Tabelle 39: GC-Parameter Teil 2

	HP 6890 Series
Injektor	Split / Splitless
Injektortemperatur	200°C
Split	10:1
Detektor	FID
Detektortemperatur	250°C
Säule	J&W DB-Wax Länge: 30 m, ID: 0,25 mm, d_i : 0,25 μ m Temperatur Limit: 240/260°C
Temperaturprogramme	45°C bis 220°C, 3°C/min
Trärgas / Carrier	Stickstoff, 60 kPa
Hydrogen	150 kPa
Air	200 kPa

3.4 Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS-Kopplung)

Die Identifizierung der Ölkomponenten sowie der synthetisierten Triketonderivate erfolgte durch Auswertung mittels GC-MS-Kopplung erhaltener Massenspektren. Die Trennparameter sind in **Tabelle 40** aufgeführt.

Tabelle 40: Parameter der GC-MS-Kopplung

HP 5890 A Series II	
Injektor	Split / Splitless Injector
Injektortemperatur	220°C
Split	10:1
Säule	CP-Sil 5 CB 60 m, ID: 0,25 mm, d _i : 0,25 µm
Temperaturprogramme	45°C bis 270°C, 5°C/min, isothermer Nachlauf
Trärgas / Carrier	Helium, 0,9 mL / min
Massenspektrometer	VG Analytical VG70-250 S
Detektor	Hewlett-Packard MSD 5970 B Injektionsvolumen: 1 µL
Elektronenstoßionisation	70 eV, Range: 39 – 310 Dalton

3.5 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Für die Methodenentwicklung wurde eine HPLC-Anlage der Firma Hewlett Packard verwendet (**Tab. 41**). Als Eluenten fanden Lösungsmittel der Firma Roth in der Qualität RotiSolv® Gradient grade Verwendung. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Integrationsprogramm Hewlett Packard ChemStation.

Tabelle 41: Parameter für die HPLC

Pumpe	HP 1050 Series Pumpensystem mit einem quartären Gradientenmischer
Säulen	Phenomenex® Luna 5µ C18 (2), Länge: 250 mm, Innendurchmesser: 4,60 mm
Detektor	HP Detection System 1040 M Series II (DAD)
Autosampler	Varian 8055

Isokratischer Eluent: Acetonitril / Wasser / Eisessig 50 / 49,5 / 0,5 (V/V) (Säulentemperatur 25°C, Fluss von 1 mL / min)

HPLC-Gradient: Säulentemperatur 25°C, Fluss von 2 mL / min

<i>Zeit [min]</i>	<i>Acetonitril [%]</i>	<i>Wasser [%]</i>	<i>Eisessig [%]</i>
0	70	29,7	0,3
4	60	39,6	0,4
6	97,5	2,48	0,02

3.6 Dünnschichtchromatographie (DC)

Bei der Durchführung der Dünnschichtchromatographie fanden folgende Fertigschichten Verwendung:

- Merck DC-Platten RP18 F₂₅₄ S
- Merck DC-Platten RP8 F₂₅₄ S
- Merck DC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ (silanisiert)
- Merck DC-Alufolien Polyamid F₂₅₄
- Machery & Nagel HPTLC-Fertigplatten Nano-SIL NH₂ / UV₂₅₄

Sämtliche zu analysierende Untersuchungslösungen wurden bandenförmig (vollautomatisch) mit dem CAMAG ATS3-Probenautomat (Versionsnummer 2.13.01) aufgetragen. Zur chromatographischen Entwicklung der Platten wurde die Vertikaltechnik eingesetzt. Hierbei fanden Doppeltrogkammern der Größen 10 x 10 cm sowie 20 x 10 cm Verwendung. Die Entwicklung fand sowohl in gesättigter als auch in ungesättigter Atmosphäre statt. Für die postchromatographische Derivatisierung kamen eine DESAGA Tauchkammer sowie ein elektropneumatisch arbeitendes Merck DC-Sprüngerät zum Einsatz. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des CAMAG TLC Scanner 3 (Versionsnummer 1.14.06) und der CATS-Software Version 4.06 durchgeführt.

Zur Dokumentation der Dünnschichtchromatogramme wurden der CAMAG Reprostar 3 sowie das Dokumentationssystem ProViDoc VD 40 (Programmversion:

3.01.510) der Firma DESAG verwendet, welche digitale Aufnahmen der Platten im kurzwelligen UV (254 nm), im langwelligen UV (366 nm) sowie im sichtbaren Licht (400 bis 750 nm) ermöglichten.

3.6.1 Fließmittel

Als Fließmittel wurden zunächst Lösungsmittel aus acht verschiedenen Selektivitätsgruppen nach Snyder getestet, von denen Methanol, n-Butanol, Methylfuran, Essigsäureanhydrid, Ameisensäure, Dichlormethan, Xylol und Toluol für Lösungsmittelmischungen Verwendung fanden. Eine optimale Trennung wurde mit Ameisensäure : Dichlormethan 6 : 4 erzielt.

3.6.2 Sprüh- und Tauchlösungen

Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der verwendeten Sprüh- und Tauchlösungen aufgeführt. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung frisch hergestellt.

1. Naturstoffreagenz

0,5 g Diphenylboryloxyethylamin werden in 50 ml Methanol gelöst.

2. Anisaldehyd / Schwefelsäure - Reagenz

0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure gemischt.

3. Eisen(III)chlorid - Reagenz

3,00 g Eisen(III)chlorid werden in 100 mL Ethanol gelöst.

4. Echtblausalz B - Reagenz

Sprühlösung I: 0,1 g 4,4'-Bi(2-methoxybenzoldiazoniumchlorid) werden in 20 mL destilliertem Wasser gelöst.

Sprühlösung II: Natronlauge 0,1 mol / L

5. Echtblausalz RR – Reagenz

Sprühlösung I: 0,1 g diazotiertes 4-Amino-2,5-dimethoxy-benzanilid (Zink Doppelsalz) werden in 20 mL destilliertem Wasser gelöst

Sprühlösung II: Natronlauge 0,1 mol / L

6. Echtblausalz BB – Reagenz

Sprühlösung I: 0,1 g diazotiertes 4-Amino-2,5-diethoxy-benzanilid (Zink Doppelsalz) werden in 20 mL destilliertem Wasser gelöst

Sprühlösung II: Natronlauge 0,1 mol / L

7. Joddämpfe (Jodkammer)**8. Eisen(III)chlorid – Eisencyanid – Reagenz**

Lösung A: 1 % ige wässrige Kaliumhexacyanoferrat(III) – Lösung

Lösung B: 2 % ige wässrige Eisen(III)chlorid – Lösung

Die Lösungen A und B werden kurz vor Gebrauch zu gleichen Teilen gemischt.

Zur Farbintensivierung ist das nachträgliche Besprühen mit 2-molarer Salzsäure empfehlenswert.

9. Kaliumhexacyanoferrat(III) - Eisen(III)chlorid

Lösung A: 1 % ige wässrige Kaliumhexacyanoferrat(III) – Lösung

Lösung B: 2 % ige wässrige Eisen(III)chlorid – Lösung

Die Lösungen A und B werden kurz vor Gebrauch zu gleichen Teilen gemischt und anschließend zur Intensivierung der Farbreaktion mit 2 mol/L Salzsäure besprüht.

10. Molybdätosphorsäure

7,5 g Molybdätosphorsäure werden in 100 mL Ethanol gelöst. Die besprühte Platte wird bei ca. 120°C bis zur sichtbaren Fleckenbildung erhitzt. Das nachträgliche Einstellen der Platte in NH_3 -Lösung 25 % sorgt für einen farblosen Untergrund.

4 Spektroskopische Methoden**4.1 Infrarotspektroskopie**

Die Substanzen wurden als Kaliumbromid-Pressling oder als Flüssigkeitsfilm zwischen Natriumchlorid-Platten auf einem Perkin Elmer 831 IR-Spektrometer vermessen.

4.2 ^1H -NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der Spektren erfolgte auf einem AMX 400 (400 MHz) Kernresonanzspektroskop der Firma Bruker. Als Lösungsmittel für die synthetisierten Substanzen (10 mg bis 12 mg) diente $[\text{D}_6]$ -DMSO. Die Messungen erfolgten als interner Standard gegen Tetramethylsilan (TMS). Die Protonenverhältnisse wurden durch Integration ermittelt und die chemische Verschiebung (δ) in ppm angegeben. Es wurden folgende Abkürzungen für die durch Spin-Kopplung auftretenden Signalmultiplizitäten verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, quint = Quintett, sext = Sextett, sept = Septett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstante J in Hz wurde nur für vollständig aufgelöste Signalsätze angegeben.

4.3 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der Spektren erfolgte auf einem AMX 400 (100,6 MHz) Kernresonanzspektroskop der Firma Bruker. Als Lösungsmittel für die synthetisierten Substanzen (10 mg bis 12 mg) diente $[\text{D}_6]$ -DMSO. Die Messungen erfolgten als interner Standard gegen Tetramethylsilan (TMS) und die Angabe der chemischen Verschiebung (δ) in ppm. Die Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt und zusätzlich als DEPT bzw. PENDANT-Spektrum aufgenommen.

5 *Synthese / Analytische Daten*

5.1 Synthese von Acylphloroglucin-Derivaten

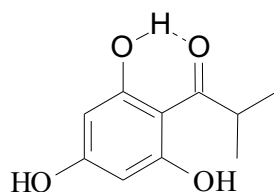
5.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV1

0,12 mol Phloroglucin = Benzen-1,3,5-triol (1 h bei 120°C getrocknet) wird in 80 mL Schwefelkohlenstoff (CS_2) unter Zugabe von 4mal 0,12 mol Aluminiumchlorid (AlCl_3) für ca. 10 min suspendiert. Nach Zugabe von 45 mL Nitrobenzol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$) wird bis zum Sieden erhitzt und im Laufe von 30 min wird der Suspension unter intensivem Rühren 0,12 mol des in 10 mL Nitrobenzol gelösten Säurechlorids zugetropft. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 40 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Vollendung der Reaktion und Abkühlen auf 40°C wird der Reaktionsansatz in 500 mL kalte (ca. 0°C) 4%ige Salzsäure (HCl) überführt. Nach Entfernung der Lö-

sungsmittel durch Einleiten von Wasserdampf fallen die Acylphloroglucin-Derivate als braungefärbte, zähflüssige bis harzartige Masse an. Sie werden mehrere Male mit kochendem Wasser gereinigt.

Die so erhaltenen Acylphloroglucin-Derivate werden ohne analytische Charakterisierung der **AAV2** (Allgemeine Arbeitsvorschrift, D 4.2) unterworfen.

5.1.1.1 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)propan-1-on



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 10,57 g (0,12 mol) Isobuttersäurechlorid (= 2-Methylpropanoylchlorid) nach Vorschrift **AAV1**

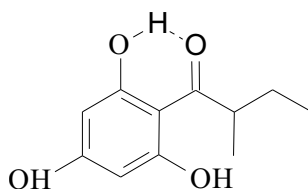
Ausbeute: 78 % (11,80 g) bezogen auf Phloroglucin, Kristalle

$C_{10}H_{12}O_4$ [196,20]

Ber. [%]: C 61,22 H 6,16

Gef. [%]: C 61,03 H 5,97

5.1.1.2 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)butan-1-on



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 14,47 g (0,12 mol) 2-Methylbuttersäurechlorid (= 2-Methylbutanoylchlorid) nach Vorschrift **AAV1**

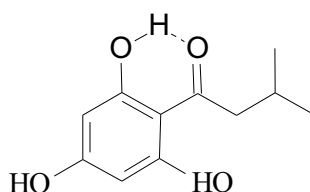
Ausbeute: 70 % (10,59 g) bezogen auf Phloroglucin, Kristalle

$C_{11}H_{14}O_4$ [210,23]

Ber. [%]: C 62,85 H 6,71

Gef. [%]: C 62,55 H 6,49

5.1.1.3 3-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)butan-1-on



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 14,47 g (0,12 mol) Isovaleriansäurechlorid
(= 1-Chloro-3-methylbutan) nach Vorschrift **AAV1**

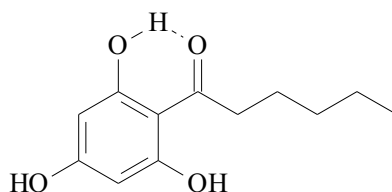
Ausbeute: 81 % (12,26 g) bezogen auf Phloroglucin, Kristalle

$C_{11}H_{14}O_4$ [210,23]

Ber. [%]: C 62,85 H 6,71

Gef. [%]: C 62,63 H 6,59

5.1.1.4 1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)hexan-1-on



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 16,15 g (0,12 mol) Capronsäurechlorid
(= Hexanoylchlorid) nach Vorschrift **AAV1**

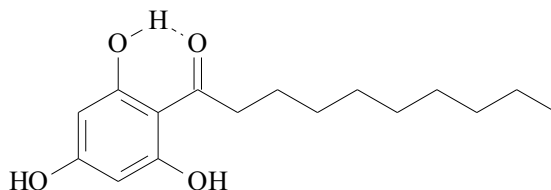
Ausbeute: 76 % (11,50 g) bezogen auf Phloroglucin, Kristalle

$C_{12}H_{16}O_4$ [224,25]

Ber. [%]: C 64,27 H 7,19

Gef. [%]: C 64,21 H 7,08

5.1.1.5 1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)decan-1-on



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 22,89 g (0,12 mol) Caprinsäurechlorid (= Decanoylchlorid) nach Vorschrift **AAV1**

Ausbeute: 76 % (11,50 g) bezogen auf Phloroglucin, Kristalle

$C_{16}H_{24}O_4$ [280,36]

Ber. [%]: C 68,55 H 8,63

Gef. [%]: C 68,46 H 8,54

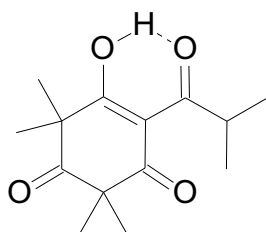
5.2 Synthese von β -Triketonen

5.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV2

Zu 2 mmol des erhaltenen Acylphloroglucin-Derivates werden eine Mischung aus 5 mL frisch hergestelltem Natriummethanolat (0,3 g Natrium in 5 mL Methanol) und 3 mL Jodmethan (CH_3I) gegeben und für 2 h am Rückfluss erhitzt. Das Entfernen der Lösungsmittel erfolgt am Rotationsverdampfer (40°C, 150 mbar), die Präzipitate werden abfiltriert. Der ölige Rückstand wird mit ca. 50 mL Salzsäure angesäuert (pH 1-2) und anschließend mit 5%iger Natriumcarbonat-Lösung extrahiert. Dann erfolgt die Extraktion der Natriumcarbonat-Phase mit Ethylacetat. Die beiden Extraktionsschritte werden dreimal wiederholt und die dann vorliegende Ethylacetat-Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Entfernung des Ethylacetats liegt ein

brauner, öliger Rückstand vor, der auf eine mit Hexan-Ethylacetat (9:1) konditionierte Kieselgelsäule (Durchmesser: 30 mm, Höhe: 18 cm, Kieselgel: ICN Silica TSC, 60Å) überführt wird. Eluiert wird mit einem Lösungsmittelgemisch aus Hexan-Ethylacetat (9:1). Nach säulenchromatographischer Abtrennung und Entfernen der Lösungsmittel wird die endgültige Reinigung über eine Kugelrohrdestillation (10-20 mbar, 130-260°C) durchgeführt.

5.2.1.1 5-Hydroxy-4-isobutyryl-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion **(Flaveson)**



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 10,57 g (0,12 mol) Isobuttersäurechlorid (= 2-Methylpropanoylchlorid) nach Vorschrift **AAV1** und anschließender Methylierung nach Vorschrift **AAV2**

Ausbeute: 63 % (9,56 g) bezogen auf Phloroglucin, hellgelbes bis farbloses Öl

IR (NaCl): 2980 cm⁻¹ (CH, aliphatisch), 1720 cm⁻¹ (C=O), 1670 cm⁻¹ (C=O), 1560 cm⁻¹ (C=O)

¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1,10 (d, J = 6,6 Hz, 6H, C(CH₃)₂ des Acylrestes), 1,33 (s, 12H, Aryl- CH₃), 3,74 (sept, J = 6,9 Hz, 1H, CH)

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 19,20; 24,23 (CH₃); 34,99 (CH); 108,54 (tert. C-Atome); 208,23; 209,68 (C=O)

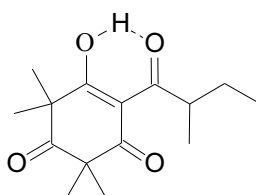
UV λ_{max} (nm): 237, 278

$C_{14}H_{20}O_4$ [252,31]

Ber. [%]: C 66,65 H 7,99

Gef. [%]: C 66,41 H 7,88

**5.2.1.2 5-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-(2-methylbutanoyl)cyclohex-4-en-1,3-dion
(Isoleptospermon)**



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 14,47 g (0,12 mol) 2-Methylbuttersäurechlorid (= 2-Methylbutanoylchlorid) nach Vorschrift **AAV1** und anschließender Methylierung nach Vorschrift **AAV2**

Ausbeute: 51 % (7,73 g) bezogen auf Phloroglucin, hellgelbes bis farbloses Öl

IR (NaCl): 2975 cm^{-1} (CH, aliphatisch), 1722 cm^{-1} (C=O), 1670 cm^{-1} (C=O), 1559 cm^{-1} (C=O)

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 0,86 (t, J = 7,6 Hz, 3H, CH_3 Acylrest-endständig), 1,10 (d, J = 6,9 Hz, 3H, CO-C- CH_3), 1,33 (m, 13H, Aryl- CH_3 und CH_2 des Acylrestes, überlappend), 1,68 (m, 1H, CH_2 des Acylrestes), 3,57 (sext, J = 6,6 Hz, 1H, CH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 11,53; 16,47; 23,36; 23,57; 23,99 (CH_3); 26,25 (CH_2); 40,72 (CH); 108,78 (tert. C-Atome); 206,77; 209,10 (C=O)

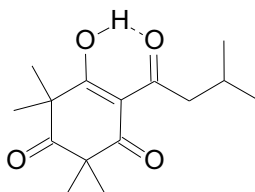
UV λ_{max} (nm): 237, 277

C₁₅H₂₂O₄ [266,34]

Ber. [%]: C 67,65 H 8,33

Gef. [%]: C 67,31 H 8,32

5.2.1.3 5-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-(3-methylbutanoyl)cyclohex-4-en-1,3-dion
(Leptospermon)



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 14,47 g (0,12 mol) Isovaleriansäurechlorid (= 1-Chloro-3-methylbutan) nach Vorschrift **AAV1** und anschließender Methylierung nach Vorschrift **AAV2**

Ausbeute: 67 % (10,14 g) bezogen auf Phloroglucin, hellgelbes bis farbloses Öl

IR (NaCl): 2960 cm⁻¹ (CH, aliphatisch), 1720 cm⁻¹ (C=O), 1670 cm⁻¹ (C=O), 1550 cm⁻¹ (C=O)

¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 0,93 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂ des Acylrestes), 1,32 (s, 12H, Aryl- CH₃), 2,08 (m, 1H, CH des Acylrestes), 2,83 (d, J = 7,1 Hz, 2H, CH₂)

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 22,77; 24,18 (CH₃); 25,92 (CH); 46,85 (CH₂); 109,73 (tert. C-Atome); 203,17; 209,71 (C=O)

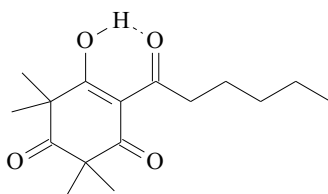
UV λ_{max} (nm): 237, 279

C₁₅H₂₂O₄ [266,34]

Ber. [%]: C 67,65 H 8,33

Gef. [%]: C 67,37 H 8,21

5.2.1.4 4-Hexanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion (Papuanon)



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 16,15 g (0,12 mol) Capronsäurechlorid (= Hexanoylchlorid) nach Vorschrift **AAV1** und anschließender Methylierung nach Vorschrift **AAV2**

Ausbeute: 61 % (9,23 g) bezogen auf Phloroglucin, hellgelbes bis farbloses Öl

IR (NaCl): 2960 cm^{-1} (CH, aliphatisch), 1720 cm^{-1} (C=O), 1670 cm^{-1} (C=O), 1560 cm^{-1} (C=O)

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 0,87 (t, J = 7,1 Hz, 3H, CH_3 des Acylrestes), 1,32 (m, 16H, Aryl- CH_3 und $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ des Acylrestes, überlappend), 1,58 (quint, J = 7,4 Hz, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$), 2,93 (t, J = 7,4 Hz, 2H, CO-CH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 14,12; 24,23 (CH_3); 22,21 24,62; 31,21; 38,72 (CH_2); 109,38 (tert. C-Atome); 204,37; 209,81 (C=O)

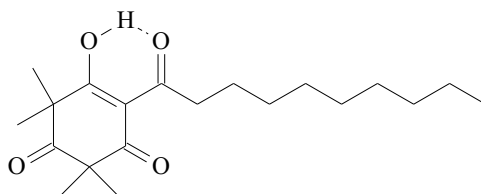
UV λ_{max} (nm): 279, 236

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ [280,36]

Ber. [%]: C 68,55 H 8,63

Gef. [%]: C 68,37 H 8,45

5.2.1.5 4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion
(„Decanoyl-Derivat“)



Aus 15,13 g (0,12 mol) Phloroglucin und 22,89 g (0,12 mol) Caprinsäurechlorid (= Decanoylchlorid) nach Vorschrift **AAV1** und anschließender Methylierung nach Vorschrift **AAV2**

Ausbeute: 59 % (8,93 g) bezogen auf Phloroglucin, hellgelbes bis farbloses Öl

IR (NaCl): 2928 cm⁻¹ (CH, aliphatisch), 1717 cm⁻¹ (C=O), 1670 cm⁻¹ (C=O), 1550 cm⁻¹ (C=O)

¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 0,86 (t, J = 6,9 Hz, 3H, CH₃ des Acylrestes), 1,25 (s, 12H, Aryl- CH₃), 1,29 (m, 12H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 1,57 (quint, J = 6,9 Hz, 2H, CO-CH₂-CH₂), 2,93 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CO-CH₂)

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 13,85; 23,71; 23,87 (CH₃); 21,99; 24,48; 28,56; 28,66; 28,71; 31,18; 38,30 (CH₂); 108,92 (tert. C-Atome); 203,91; 209,34 (C=O)

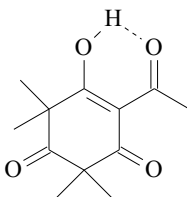
UV λ_{max} (nm): 238, 279

C₂₀H₃₂O₄ [336,47]

Ber. [%]: C 71,39 H 9,59

Gef. [%]: C 71,30 H 9,58

5.2.1.6 4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion
 („Acetyl-Derivat“)



2 mmol (0,34 g) 1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)ethanon (Merck 8.41389) werden nach Vorschrift **AAV2** einer Methylierung unterzogen

Ausbeute: 78 % (0,27 g) bezogen auf 1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)ethanon, Kristalle

IR (NaCl): 2984 cm^{-1} (CH, aliphatisch), 1722 cm^{-1} (C=O), 1675 cm^{-1} (C=O), 1561 cm^{-1} (C=O)

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1,33 (s, 12H, Aryl- CH_3), 2,54 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 24,24; 27,39 (CH_3); 109,69 (tert. C-Atome); 201,51; 209,93 (C=O)

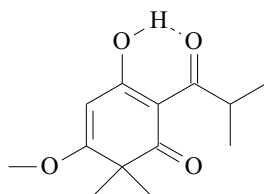
UV λ_{max} (nm): 238, 277

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$ [224,26]

Ber. [%]: C 64,27 H 7,19

Gef. [%]: C 64,21 H 7,17

5.2.1.7 3-Hydroxy-2-isobutyryl-5-methoxy-6,6-dimethylcyclohexa-2,4-dien-1-on **(Agglomeron)**



3-Hydroxy-2-isobutyryl-5-methoxy-6,6-dimethylcyclohexa-2,4-dien-1-on liegt in Form weißer Kristalle vor und wurde von Herrn E. Lassak aus *E. agglomerata* Maiden isoliert.

IR (NaCl): 2989 cm⁻¹ (CH, aliphatisch), 1726 cm⁻¹ (C=O), 1672 cm⁻¹ (C=O), 1564 cm⁻¹ (C=O)

¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1,05 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂ des Acylrestes), 1,27 (s, 6H, Aryl- CH₃), 3,86 (m, 4H, CH des Acylrestes und O-CH₃), 5,65 (s, 1H, C=CH)

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 19,08; 24,81 (CH₃); 35,42; 57,71 (CH); 49,19 (OCH₃); 93,99 (tert. C-Atome); 208,43 (C=O)

UV λ_{max} (nm): 233, 264, 320

C₁₃H₁₈O₄ [238,28]

Ber. [%]: C 65,53 H 7,61

Gef. [%]: C 65,43 H 7,58

5.3 Darstellung von Säurechloriden

5.3.1 2-Methylbutanoylchlorid

0,25 mol (25,53 g) 2-Methylbuttersäure (Merck 8.20782) werden mit 0,38 mol (45,21 g) Thionylchlorid unter Feuchtigkeitsausschluss ca. 2 h am Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das überschüssige Thionylchlorid durch Einengen am Rotationsverdampfer (ca. 76 mbar, 40°C) entfernt.

Ausbeute: 86% (22,02 g), hellgelbe Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch

Brechungsindex: $n_D = 1,4229$ (24°)

C₅H₉ClO [120,58]

Ber. [%]: C 49,80 H 7,52 Cl 29,40

Gef. [%]: C 50,03 H 7,70 Cl 29,43

5.4 Geräte

- Rotationsverdampfer: BÜCHI Vacuum Controller V-800, Rotavapor R-200, Heating Bath B-490, Pump Vac V-500

6 Elementaranalyse

C, H: Heraeus CHN-O-Rapid

Die Angabe der berechneten (Ber.) und gefundenen (Gef.) Werte erfolgt in Prozent.

7 Kombinerter Erythrozyten-Phototoxizitätstest

7.1 Gewinnung porciner Erythrozyten

Das arterielle Blut eines gerade gekeulten Hausschweines (Schwein W) wird in zwei 250 mL Zentrifugiergefäße überführt, in denen sich zur Gerinnungshemmung eine Lösung aus 20 mL Leitungswasser und ca. 380 mg Na-EDTA befindet. Nach dem Verschließen der Gefäße wird die Suspension vorsichtig geschwenkt und für 10 min in einer auf 4°C gekühlten Beckman J2-21M/E Zentrifuge bei 2800 UpM zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wird verworfen und der verbleibende Rückstand in beiden Gefäßen auf ca. 200 mL mit PBS-Puffer aufgefüllt und vermischt. Es wird erneut zentrifugiert und der beschriebene Waschvorgang zwei- bis dreimal wiederholt. Anschließend werden die verbleibenden Zellsuspensionen in den beiden Zentrifugiergefäßen auf ein Volumen von ca. 150 mL mit PBS-Puffer aufgefüllt und auf

sechs Gefäße (je 50 mL) verteilt. Die Aufbewahrung der Suspensionen erfolgt zwischen 2 und 8°C im Kühlschrank. Die maximale Verwendungszeit für diese Suspensionen liegt bei vier Tagen, wobei sie regelmäßig geschwenkt werden müssen, um eine zu starke Sedimentation der Blutkörperchen zu verhindern.

7.2 Aufbereitung der Erythrozyten-Suspension

Vor der Verwendung werden je 6 mL Erythrozytensuspension in vier 10 mL Zentrifugengefäße gegeben und für zehn Minuten in einer Heraeus Sepatech Medifuge bei 3000 UpM zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wird verworfen und es werden 4 mL PBS-Puffer hinzugefügt. Es folgt eine zwei- bis dreimalige Wiederholung des Waschvorganges. Anschließend werden alle Suspensionen vereinigt.

7.3 Einstellung der Zelldichte

Zur Einstellung der Zelldichte werden zwei Suspensionen aus je 900 µL bidestilliertem Wasser, 75 µL PBS-Puffer und 25 µL aufbereiteter Erythrozyten-Suspension hergestellt und geschüttelt, um eine vollständige Hämolyse zu erreichen. Anschließend wird in einer Heraeus Sepatech 17S Biofuge bei 3000 UpM für fünf Minuten zentrifugiert. 500 µL des jeweiligen Überstandes wird mit 500 µL einer Lösung aus bidestilliertem Wasser und PBS-Puffer (9+1 Volumenteile) gemischt und bei 576 nm photometrisch vermessen. Die gewünschte Zelldichte liegt dann vor, wenn die zwei Lösungen im Mittelwert eine Absorption zwischen 0,95 und 1,05 aufweisen (= eingestellte RBC-Suspension). Die Zelldichte im Experiment beträgt 1×10^8 Zellen / mL.

7.4 Verwendete Lösungen und Suspensionen

Substanzlösungen L1 bis L7

Von allen zu testenden Substanzen werden jeweils Lösungen in Ethanol Uvasol® mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 10 mg / mL, 3 mg / mL, 1 mg / mL, 0,3 mg / mL, 0,1 mg / mL, 0,03 mg / mL, 0,01 mg / mL. Das Probenvolumen beträgt 1000 µL.

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)

3,1515 g Na_2HPO_4 (Natriumhydrogenphosphat), 0,7621 g KH_2PO_4 (Kaliumhydrogenphosphat), 7,2060 g NaCl (Natriumchlorid) sowie 1,9817 g $\text{Glucose} \times \text{H}_2\text{O}$ werden eingewogen und in Aqua bidest. ad 1000 mL gelöst (ggf. Ultraschallbad). Diese Lösung, deren pH-Wert ca. 7,32 beträgt, wird mit NaOH (Titrisol®) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

RBC1-Suspension (Red Blood Cell 1-Suspension)

52,5 mL (875 μL) PBS-Puffer wird mit 1,5 mL (25 μL) eingestellter RBC-Suspension vermischt.

Bidest-RBC-Suspension (Bidest-Red Blood Cell-Suspension)

8,75 mL (875 μL) bidestilliertes Wasser wird mit 0,25 mL (25 μL) eingestellter RBC-Suspension vermischt.

K-RBC-Suspension (K-Red Blood Cell-Suspension)

7,75 mL (775 μL) PBS-Puffer wird mit 0,25 mL (25 μL) eingestellter RBC-Suspension vermischt.

Tensid-Lösung

100 mg Triton-X 100 (Octylphenoldecaethylenglycolether) werden in 10 mL bidestilliertem Wasser gelöst.

K-Lösung

100 mg $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Kaliumhexacyanoferrat) werden in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst.

7.5 Geräte

Zentrifugation:

- Beckman j2-21M/E Zentrifuge mit Rotor JA-14
- Heraeus Sepatech Medifuge für 10 mL Zentrifugenröhrchen
- Heraeus Sepatech 17S Biofuge mit Heraeus Sepatech 24 x 1,5 mL Rotor

Strahlungsquelle:

- Dr. Hönle Sonnensimulator SOL-500
Bestrahlungsstärke: UVA 1,67 mW / cm², UVB 0,10 mW / cm²
- H2-Filter mit Cut-off bei 305 nm

UV-Vis-Spektroskopie:

- Hewlett-Packard 8452A Dioden-Array-Spektrophotometer in Kombination mit Hewlett-Packard 9153C/900-300-Computersystem (Küvetenschlitten mit Julabo F20 Temperaturregler)

Sonstige:

- Heidolph Titrimax
- Janke & Kunkel Vortexer
- Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten à 3,6 mL
- Satorius Feinwaage

8 Untersuchungen zur Stabilität

Für die Bestrahlungen wurden ein Dr. Hönle Sonnensimulator SOL-500 und eine CAMAG Universal UV-Lampe (254 nm) eingesetzt.

9 Mikrobiologische Untersuchungen

9.1 Mikroorganismen

Der Einfluss der Triketone bzw. des Triketon-Komplexes sowie der Lösungsvermittler Polysorbat 20 (Caelo), Polysorbat 80 (Caelo) und Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) auf das Wachstum verschiedener Keime wurde durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ermittelt. Dabei kamen die in **Tabelle 42** aufgeführten Bakterien zum Einsatz, bei denen es sich bevorzugt um definierte Stämme der American Type Culture Collection (ATCC) handelte.

Tabelle 42: Mikroorganismen

Gram-positive Bakterien	Nährmedium
<i>Bacillus subtilis</i>	CA
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	BA
<i>Micrococcus luteus</i> V-9-11	CB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	CB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	CB
<i>Staphylococcus epidermidis</i> III-7-3	BA
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	BA
<i>Streptococcus pyogenes</i> IV-10-21	BA
Gram-negative Bakterien	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	CB

Prüfung chinolonresistenter *E. coli*

In **Tabelle 43** sind alle *Escherichia coli* Stämme aufgeführt, die im Rahmen dieser Prüfung verwendet wurden. Die genetischen Marker sowie die Herkunft bzw. Referenz der Stämme sind ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 43: *E. coli* - Stämme

Stamm	genetischer Marker	Referenz/Herkunft
RFM443	K-12, <i>rpsL200</i> (Str ^R), <i>galK2</i> , <i>lac</i> D74 (lac ⁻)	MENZEL, 1989
DE112	RFM443, <i>tolC</i> : miniTn10 (Tet ^R , McConkey ⁻)	VAN DYK et al., 1994
I-6-19 (WT)	Wildtyp	HEISIG & TSCHORNY, 1994
MI	WT, <i>gyrA</i> ^{S83L}	HEISIG & TSCHORNY, 1994
MII	WT, <i>gyrA</i> ^{S83L} , <i>parC</i> ^{S80I} , <i>marR</i> Δ175	HEISIG & TSCHORNY, 1994
MIII	WT, <i>gyrA</i> ^{S83L,D87G} , <i>parC</i> ^{S80I} , <i>marR</i> Δ74	HEISIG & TSCHORNY, 1994
WT-3-1	WT, <i>gyrA</i> ^{S83L,D87G}	BAGEL, 1998
WT-4	WT, <i>parC</i> ^{S80I}	BAGEL et al., 1999

9.2 Nährmedien

Alle verwendeten Nährböden und Nährlösungen wurden unmittelbar nach der Einwage gelöst und bei 121°C und 2,1 bar für 20 min autoklaviert. Die Angabe in Klammern bezeichnet die Bezugsquelle oder die Zusammensetzung bezogen auf ein Volumen von einem Liter.

- BA – Blutagar Col BAP
- CA – Caso-Agar (15,0 Pepton aus Casein; 5,0 Pepton aus Sojamehl; 5,0 NaCl; 15,0 Agar Agar)
- CB – Chinablau-Laktose-Agar (OXOID®, Wesel)
- MHB – Mueller-Hinton-Bouillon (OXOID®, Basingstoke, England)

Für einige Bakterienstämme war der Zusatz von Blut zum Nährmedium erforderlich. In diesen Fällen wurde ein 5%iger Zusatz von „Laked Horse Blood“ (OXOID®) verwendet.

9.3 Toleranz von Mikroorganismen gegenüber Lösungsvermittlern

Verwendete Lösungen

- **Lösung A:** Eine Mischung aus 2 mL Tween®20 (Caelo) und 2 mL MH-Bouillon wurde für 30 min im Wasserbad bei 50°C erwärmt.
- **Lösung B:** Eine Mischung aus 2 mL Tween®80 (Caelo) und 2 mL MH-Bouillon wurde für 30 min im Wasserbad bei 50°C erwärmt.
- **Lösung C:** Es wurde eine Mischung aus 4 mL DMSO und 1 mL MH-Bouillon hergestellt.

Es wurde durch serielle 1:2 Verdünnung aus den oben angeführten Lösungen eine lineare Verdünnungsreihe hergestellt, jeweils 50 µL der erhaltenen Lösungen wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte überführt. So ergaben sich in jeder Reihe elf Verdünnungen absteigender Konzentration. Ausgehend von Übernachtskulturen (18-24h) der Bakterienstämme auf Agarplatten wurden 3-5 einzelne Kolonien in isotonischer Kochsalzlösung bzw. MH-Bouillon suspendiert und die optische Dichte

wurde auf den McFarland-Standard 0,5 ($OD_{550} = 0,125 \pm 0,02$) eingestellt. Je 50 μ L dieser Bakteriensuspension wurden in die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte überführt; die parallel durchgeführte Wachstumskontrolle bestand aus 50 μ L MH-Bouillon und 50 μ L Bakteriensuspension. Nach der 18stündigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Auswertung durch visuellen Vergleich der für die Verdünnungen erhaltenen Bakterienplaques mit denen der Wachstumskontrolle.

9.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Als minimale Hemmkonzentration (MHK) einer Substanz gilt diejenige Konzentration, die das sichtbare Wachstum von Bakterien deutlich hemmt. Die Bestimmung der MHK wurde mittels Mikrodilutionsverfahren gemäß DIN 58940-8 durchgeführt. Dabei fanden 96-well-Mikrotiterplatten aus Kunststoff Verwendung. Die Konzentration der eingesetzten Substanzen bzw. Gemische betrug 5 mg / mL DMSO.

Es wurde durch serielle 1:2 Verdünnung eine lineare Verdünnungsreihe der Testsubstanz in MH-Bouillon hergestellt. Je 50 μ L einer Verdünnungsstufe wurden in die Kavität einer Mikrotiterplatte überführt. So ergaben sich in jeder Reihe elf Verdünnungen absteigender Konzentration. In die zwölfte Kavität wurde MH-Bouillon ohne Zusatz von Testsubstanz (Wachstumskontrolle) gegeben. Ausgehend von einer Übernachtskultur (18-24h) des zu prüfenden Bakterienstammes auf Agarplatten wurden 3-5 einzelne Kolonien in isotonischer Kochsalzlösung bzw. MH-Bouillon suspendiert und die optische Dichte wurde auf den McFarland-Standard 0,5 ($OD_{550} = 0,125 \pm 0,02$) eingestellt. Dies ergab eine Keimzahl von ca. 10^8 KBE / mL, die durch weitere Verdünnung auf 1×10^6 KBE / mL reduziert wurde. Von dieser Bakteriensuspension wurden jeweils 50 μ L in die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben, die Mikrotiterplatte wurde gegen Verdunstung geschützt und nach 18 h Inkubation bei 37°C (30°C bei *B. subtilis*) ausgewertet.

9.5 Absterbekinetiken

Bakterienstamm: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Für die Absterbekinetiken wurden jeweils Vielfache der MHK der Testsubstanzen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 mL MH-Bouillon bei 37°C im Luftschüttler (130 UpM), aus denen zu definierten Zeitpunkten (alle 30 min bzw. alle 60 min) vor und nach Zugabe der Testsubstanz Proben (50 µL) zur Keimzahlbestimmung entnommen wurden. Dabei erfolgte die Bestimmung der Anzahl jener Zellen, welche durch wiederholte Zellteilung eine Kolonie bilden können. Die entnommenen Bakteriensuspensionen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung schrittweise 1:10 verdünnt, wobei sich die Anzahl der Verdünnungsschritte nach der ungefähr zu erwartenden Keimzahl bzw. der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen richtete. Von den letzten vier Verdünnungen wurden jeweils 50 µL auf ein Viertel einer Agarplatte (Chinablau-Laktose-Agar) ausplattiert. Nach einer 18-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt und auf 1 mL Bakteriensuspension (KBE / mL) bezogen. Die graphische Darstellung erfolgte als Veränderung der KBE / mL in Bezug auf die Zeit. Als Gegenkontrolle wurde bei allen Versuchen das Antibiotikum Ampicillin eingesetzt, dessen MHK für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 0,13 µg / mL beträgt.

9.6 Geräte

- Brutschrank (Heraeus Osterode)
- Milli-Q synthesis Reinstwasseranlage (Millipore, Schwalbach)
- Schüttelinkubator Certomat R+H (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen)
- Spectralphotometer CARY 50 (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc. Bohemia, USA)

10 Untersuchungen zur antiviralen Aktivität

Die Untersuchungen zur antiviralen Aktivität wurden in Kooperation mit dem Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (Abt. Biologie) Heidelberg sowie dem

Hygiene-Institut (Abt. Virologie) Heidelberg durchgeführt. Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf einen Überblick, für detaillierte Angaben siehe KOCH (2005).

10.1 Zellkulturen

Für alle Untersuchungen wurden RC 37-Zellen (immortalisierte Nierenepithelzellen von der afrikanischen grünen Meerkatze *Ceropithecus aethiops*) in Monolayerkultur verwendet. Als Kulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 5% fötalem Kälberserum (fetal calf serum = FCS), 100 µg/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin.

10.2 Virus

Für die Versuche wurden der Herpes simplex-Virus Typ 1 Stamm KOS [PARRIS et al., 1980] verwendet und routinemäßig auf RC 37-Zellen nach RÖSEN-WOLFF et al. (1988) gezüchtet. Die HSV-1-Stammkultur wurde aus dem Überstand infizierter Zellen vorbereitet und bei -80°C eingefroren. Die Bestimmung des Infektionstiters erfolgte mit einem Standard Plaque Assay an konfluenten RC 37-Zellen.

10.3 Testsubstanzen

Für die Untersuchungen wurden die folgenden Substanzen verwendet: Agglomeron (isoliert aus *E. agglomerata* Maiden), Flaveson und Leptospermon (synthetisiert, s.o.) sowie Aciclovir (GlaxoSmithKline, gelöst in sterilem Wasser, gefroren bei -20°C). Das Manukaöl wurde von ALVA (Wallenhorst) bezogen und als 1%ige Lösung in n-Hexan gaschromatographisch sowie massenspektroskopisch charakterisiert (Carlo Erba GC 6000 mit Spectra Physics Integrator SP 4290 und Carlo Erba HRGC 4160 gekoppelt mit Finnigan MAT 4500 Massenspektrometer).

10.4 Zytotoxizitätsprüfung

Zur Bestimmung der maximalen nichtzytotoxischen Konzentration wurde ein „standard neutral red dye uptake assay“ [SÖDERBERG et al., 1996] verwendet. Aus Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die zytotoxischen Konzentrationen (Reduktion der

lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 50% = TC_{50}) der einzelnen Substanzen bestimmt.

10.5 Untersuchungen in verschiedenen Phasen der Virusinfektion

Manukaöl und Flaveson wurden in nichttoxischen Konzentrationen von 0,003%, Agglomeron und Leptospermon in Konzentrationen von 0,001% eingesetzt. Um die Art der antiviralen Wirkung zu bestimmen, wurden sowohl die Zellen als auch das Virus mit den Testsubstanzen vorbehandelt und die Testsubstanzen sowohl während als auch nach der Adsorptionsphase des Virus zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde mindestens dreimal wiederholt, die erhaltenen Ergebnisse mit den Kontrollen verglichen und die IC_{50} -Werte der Testsubstanzen (Konzentration der Testsubstanz, bei der Plaqueanzahl im Vergleich zur Kontrolle um 50% reduziert ist) aus den Dosis-Wirkungskurven bestimmt. Zum Nachweis der Eignung des Assays wurde parallel zu allen Versuchen Acyclovir getestet.

Für die Vorbehandlung der Zellen wurden diese in einer Lösung aus Medium und Testsubstanz suspendiert, 1 h bei 37°C und CO₂-Begasung (5%) inkubiert und nach Entfernen des Mediums mit dem HSV-1 infiziert. Nach erneuter Inkubation für 1 h bei 37°C und CO₂-Begasung (5%) wurde das Inokulum abgesaugt, die Zellen wurden mit Overlaymedium überschichtet und für 4 Tage (37°C, 5% CO₂-Begasung) inkubiert.

Für die Vorbehandlung des Virus wurden ca. 2×10^3 PFU HSV-1 für 1 h bei Raumtemperatur mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend auf die Zellen aufgebracht. Nach Inkubation (1 h, 37°C, 5% CO₂-Begasung) wurde das Gemisch abgesaugt, die Zellen wurden mit Overlaymedium überschichtet und für 4 Tage (37°C, 5% CO₂-Begasung) inkubiert.

Für den Versuch während der Adsorptionsphase wurde eine Suspension aus 2×10^3 PFU HSV-1 und Testsubstanz hergestellt, sofort auf die Zellen gegeben und nach 1 h Inkubationszeit (37°C, 5% CO₂) wieder entfernt. Es folgte die Überschichtung mit Overlaymedium und eine erneute Inkubation (4 Tage, 37°C, 5% CO₂).

Für den Versuch während der Replikationsphase wurden die Zellen zunächst für 1 h (37°C) mit dem Virus infiziert. Nach Entfernen des Inokulums wurden die im Overlay-medium gelösten Testsubstanzen zugegeben und inkubiert (4 Tage, 37°C, 5% CO₂).

11 Gefahrstoffe

Über die toxikologischen Eigenschaften der meisten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien bzw. synthetisierten Verbindungen liegen keine Daten im Sinne des Chemikaliengesetzes vor. Gefährliche Eigenschaften können nicht ausgeschlossen werden. Sie sind mit der für gefährliche Chemikalien üblichen Vorsicht zu handhaben.

Auch ätherische Öle können die Haut reizen bzw. sensibilisieren. Der Kontakt mit den Augen und der Haut ist deshalb zu vermeiden.

Nachfolgend sind die wichtigsten verwendeten Gefahrstoffe aufgeführt, die nach Anhang 6 der Gefahrstoffverordnung mit Gefahrensymbolen und Sicherheitsratschlägen versehen sind.

Gefahrstoff	Gefahrenmerkmal	R- und S-Sätze
2-Methyl-Buttersäure CAS-Nr.: 116-53-0	C Ätzend	R 34 S 26 – 36/37/39 – 45
2-Methylfuran CAS-Nr.: 534-22-5	F Leichtentzündlich T Giftig	R 11 – 23/25 S 16 – 24/25 – 33 – 37 – 45
2',4',6'-Trihydroxyacetophenon-Monohydrat CAS-Nr.: 480-66-0	X _i Reizend	R 36/37/38
Aceton CAS-Nr.: 67-64-1	F Leichtentzündlich X _i Reizend	R 11 – 36 – 66 – 67 S 9 – 16 - 26
Acetonitril CAS-Nr.: 75-05-8	F Leichtentzündlich X _n Gesundheitsschädlich	R 11 – 20/21/22 – 36 S 16 – 36/37
Aluminiumchlorid CAS-Nr.: 7446-70-0	C Ätzend	R 34 S 7/8 – 28 – 45
Ameisensäure CAS-Nr.: 64-18-6	C Ätzend	R 35 S 23 – 26 – 45
Anisaldehyd CAS-Nr.: 123-11-5		S23 – 24/25
Caprinsäurechlorid CAS-Nr.: 112-13-0	C Ätzend	R 34 S 26 – 36/37/39 – 45

Gefahrstoff	Gefahrenmerkmal	R- und S-Sätze
Capronsäurechlorid CAS-Nr.: 142-61-0	C Ätzend	R 14 – 34 – 37 S 26 – 36/37/39 – 45
Cyclohexan CAS-Nr.: 110-82-7	F Leichtentzündlich X _n Gesundheitsschädlich N Umweltgefährlich	R 11 – 38 – 50/53 – 65 – 67 S 9 – 16 – 33 – 60 – 61 – 62
Dichlormethan CAS-Nr.: 75-09-2	X _n Gesundheitsschädlich	R 40 S 23 – 24/25 – 36/37
Diethylether CAS-Nr.: 60-29-7	F+ Hochentzündlich X _n Gesundheitsschädlich	R 12 – 19 – 22 – 66 – 67 S 9 – 16 – 29 – 33
DMSO-D6 CAS-Nr.: 2206-27-1	X _i Reizend	R 36/38 S 26
Echtblausalz B / BB / RR CAS-Nr.: 91-91-8	X _n Gesundheitsschädlich	R 22 – 41 S 22 – 26 – 39
Eisen-III-chlorid CAS-Nr.: 7705-08-0	X _n Gesundheitsschädlich	R 22 – 38 – 41 S 26 – 39
Eisessig CAS-Nr.: 64-19-7	C Ätzend	R 10 – 35 S 23 – 26 – 45
Essigsäureanhydrid CAS-Nr.: 108-24-7	C Ätzend	R 10 – 20/22 – 34 S 26 – 36/37/39 – 45
Ethanol UVASOL® CAS-Nr.: 64-17-5	F Leichtentzündlich	R 11 S 7 – 16
Ethylacetat CAS-Nr.: 141-78-6	F Leichtentzündlich X _i Reizend	R 11 – 36 – 66 – 67 S 16 – 26 – 33
Isobuttersäurechlorid CAS-Nr.: 79-30-1	F Leichtentzündlich C Ätzend	R 11 – 35 S 16 – 23 – 26 – 36 – 45
Isovaleriansäurechlorid CAS-Nr.: 108-12-3	C Ätzend	R 10 – 34 – 37 S 26 – 36/37/39 – 45
Jodmethan CAS-Nr.: 74-88-4	T Giftig	R 21 – 23/25 – 37/38 – 40 S 36/37 – 38 – 45
Kieselgel CAS-Nr.: 7631-86-9		S22
Methanol CAS-Nr.: 67-56-1	F Leichtentzündlich T Giftig	R 11 – 23/24/25 – 39/23/24/25 S 7 – 16 – 36/37 – 45
Molybdatophosphorsäure CAS-Nr.: 51429-74-4	C Ätzend	R 34 S 26 – 36/37/39 – 45

D Material und Methoden

Gefahrstoff	Gefahrenmerkmal	R- und S-Sätze
n-Butanol CAS-Nr.: 71-36-3	X _n Gesundheitsschädlich	R 10 – 22 – 37/38 – 41 – 67 S 7/9 – 13 – 26 – 37/39 – 46
n-Hexan CAS-Nr.: 110-54-3	F Leichtentzündlich X _n Gesundheitsschädlich N Umweltgefährlich	R 11 – 38 – 48/20 – 51/53 – 62 – 65 – 67 S 9 – 16 – 29 – 33 – 36/37 – 61 – 62
Natriumcarbonat CAS-Nr.: 497-19-8	X _i Reizend	R 36 S22 – 26
Natrium CAS-Nr.: 7440-23-5	F Leichtentzündlich C Ätzend	R 14/15 – 34 S 5 – 8 – 43 – 45
Nitrobenzol CAS-Nr.: 98-95-3	T Giftig N Umweltgefährlich	R 23/24/25 – 40 – 48/23/24 – 51/53 – 62 S28 – 36/37 – 45 – 61
Phloroglucin CAS-Nr.: 108-73-6	X _i Reizend	R 36/37/38
Phosphorylchlorid CAS-Nr.: 10025-87-3	T+ Sehr Giftig C Ätzend	R 14 – 22 – 26 – 35 – 48/23 S 7/8 – 26 – 36/37/39 – 45
Salzsäure 37% CAS-Nr.: 7647-01-0	C Ätzend	R 34 – 37 S 26 – 36/37/39 – 45
Schwefelkohlenstoff CAS-Nr.: 75-15-0	F Leichtentzündlich T Giftig	R 11 – 36/38 – 48/23 – 62 – 63 S 16 – 33 – 36/37 – 45
Schwefelsäure CAS-Nr.: 7664-93-9	C Ätzend	R 35 S 26 – 30 – 45
Thionylchlorid CAS-Nr.: 7719-09-7	C Ätzend	R 14 – 20/22 – 29 – 35 S 26 – 36/37/39 – 45
Toluol CAS-Nr.: 108-88-3	F Leichtentzündlich X _n Gesundheitsschädlich	R 11 – 38 – 48/20 – 63 – 65 – 67 S 6/37 – 46 – 62
Triton®X-100 CAS-Nr.: 9002-93-1	X _n Gesundheitsschädlich	R 22 – 41 S 24 – 26 – 39
Xylol CAS-Nr.: 1330-20-7	X _n Gesundheitsschädlich	R 10 – 20/21 – 38 S 25

E Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Erforschung der analytischen, physikalisch-chemischen und toxikologischen Eigenschaften von β -Triketonen sowie ihrer antimikrobiellen und antiviralen Wirksamkeit.

β -Triketone kommen als Komponenten ätherischer Öle in verschiedenen Gattungen der Familie der Myrtaceae vor, insbesondere in *Eucalyptus*- und *Leptospermum*-Arten. Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Tatsache, dass das Neuseeländische Teebaumöl (Manukaöl, aus Blättern und Zweigen von *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst.) einen im Vergleich zu anderen Teebaumölen starke Wirkung gegen Gram-positive Bakterien aufweist. Es enthält den sogenannten „Triketon-Komplex“, der aus den Triketonen Flaveson, Isoleptospermon und Leptospermon besteht und für die antimikrobielle Wirkung des ätherischen Öls verantwortlich gemacht wird. Da das Neuseeländische Teebaumöl zunehmend in pflanzlichen Externa und Kosmetika eingesetzt wird, war es wichtig, die Eigenschaften dieser und im Vergleich dazu auch anderer β -Triketone zu untersuchen und zu dokumentieren.

Aus dem Triketon-Komplex, welcher mit einer Reinheit von 98,9% aus Manukaöl isoliert wurde, ließ sich zwar das Flaveson abtrennen, die Trennung der verbleibenden Isomere Isoleptospermon und Leptospermon erwies sich jedoch als unmöglich. Deshalb wurde, in Anlehnung an die von CROMBIE et al. (1985; 1987) beschriebene Darstellung von *Mammea*-Cumarinen, ein Syntheseverfahren entwickelt, mit dem die Herstellung der natürlich vorkommenden β -Triketone Flaveson, Isoleptospermon, Leptospermon und Papuanon gelang. Dabei erwiesen sich die Reinheit der synthetisierten Triketone (99,8%; GC) und vor allem die damit zur Verfügung stehenden Mengen an Triketonen (je nach Triketon 3 – 10g) als solide Ausgangsbasis für die toxikologischen und antimikrobiellen Untersuchungen. Die gewünschte Reinheit der Triketone von 99,8% (GC) wurde durch deren Destillation im Vakuum (Kugelrohrdestillation) erreicht. Die Ausbeuten lagen je nach Triketon zwischen 51% und 67%.

Für die Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden zwei weitere nicht in der Natur vorkommende Triketone synthetisiert: 4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Acetyl-Derivat“) und 4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Decanoyl-Derivat“). Außerdem wurde das Triketon Agglomeron (aus *E. agglomerata* Maiden) von einem Kollegen zur Verfügung gestellt.

Die Identität der synthetisierten Triketone wurden mittels Elementaranalyse sowie vor allem mit Hilfe verschiedener spektroskopischer Methoden (UV, IR, MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR) sichergestellt. Eine besondere Bedeutung kam der Massenspektrometrie zu, weil sie über die GC-MS-Kopplung den direkten Vergleich zwischen den im Manukaöl vorhandenen und den synthetisierten Triketonen ermöglichte. Mit den Ergebnissen, die aus ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Untersuchungen resultierten, konnten vorhandene Literaturangaben ergänzt und bestätigt werden.

Bei der Entwicklung verschiedener chromatographischer Methoden als Voraussetzung für eine mögliche Quantifizierung von Triketonen in ätherischen Ölen kamen die DC, die HPLC und die GC zur Anwendung. Für die HPLC wurde eine zur Routineanalytik gut geeignete Methode erarbeitet, bei der RP-18 als stationäre Phase und ein Acetonitril / Wasser / Eisessig-Gradient zum Einsatz kam. Sie zeichnete sich durch eine kurze Analysenzeit (10 min) aus. Für die gaschromatographische Trennung erwies sich eine unpolare Phase (100% Dimethylpolysiloxan) als besonders gut geeignet.

Sowohl in Untersuchungen zur Lagerbeständigkeit über einen Zeitraum von 60 Wochen als auch in Untersuchungen zur UV-Stabilität der Triketone wurden keine Artefakte bzw. Spaltungsprodukte nachgewiesen, eine unabdingbare Voraussetzung für die Verwendung von Triketonen in therapeutischen und kosmetischen Zubereitungen.

Zur Abschätzung der photosensibilisierenden Eigenschaften von β -Triketonen wurde der kombinierte Erythrozyten-Phototoxizitätstest eingesetzt, der sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen bezüglich phototoxischer Eigenschaften von Sub-

stanzen erlaubt. Dabei stellte sich heraus, dass weder die getesteten Triketone Agglomeron, Flaveson und Papuanon noch der aus Manukaöl isolierte Triketon-Komplex phototoxische Eigenschaften aufwiesen.

Die antimikrobielle Wirkung einzelner Triketone im Vergleich zum „Triketon-Komplex“ wurde mit der Bouillondilutionsmethode und DMSO als Lösungsvermittler untersucht. Alle getesteten Substanzen zeigten eine starke antimikrobielle Wirksamkeit (bakteriostatisch) gegenüber Gram-positiven Mikroorganismen mit MHK-Werten zwischen 256 µg / mL und 0,5 µg / mL, gegenüber Gram-negativen Bakterien wurde keine Wirkung beobachtet. Entscheidend für die Intensität der antimikrobiellen Wirkung ist offenbar die Lipophilie der einzelnen Triketone, denn es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Länge der Acyl-Seitenkette und der Intensität der antimikrobiellen Wirksamkeit festgestellt. Dabei wies das Triketon mit der längsten Seitenkette, das nicht in der Natur vorkommende „Decanoyl-Derivat“, die beste antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram-positiven Keimen mit Werten zwischen 0,5 µg / mL und 4 µg / mL auf. Vergleichende MHK-Untersuchungen zwischen dem „Triketon-Komplex“ und den darin enthaltenen Triketonen Flaveson, Leptospermon und Isoleptospermon machten deutlich, dass die antibakterielle Wirkung des „Triketon-Komplexes“ insgesamt immer so stark ist wie die stärkste Einzelwirkung eines der drei darin enthaltenen Triketone. Daraus muss gefolgert werden, dass der antimikrobiellen Aktivität der Triketone das Prinzip der Indifferenz zugrunde liegt. Dies wurde bestätigt durch eine künstlich hergestellte Mischung aus „Triketon-Komplex“ und Papuanon.

In ergänzend durchgeführten Absterbekinetiken an *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 wurde für alle Triketone eine etwa 30 Minuten nach deren Zugabe einsetzende deutliche Reduktion der lebenden Zellen beobachtet, die in Abhängigkeit von der Lipophilie des eingesetzten Triketons unterschiedlich stark ausgeprägt war. Der weitere Verlauf der Kinetiken war stark konzentrationsabhängig. Bei Einsatz bakterizid wirkender Triketon-Konzentrationen wurden die Keime innerhalb von 3 h nach Zugabe der Triketone vollständig abgetötet.

Einzelne Triketone und das Manukaöl wurden auf ihre Wirksamkeit gegenüber Herpes-simplex-Viren Typ 1 in verschiedenen Phasen der Virusinfektion überprüft. Sie zeichneten sich durch eine starke antivirale Wirksamkeit aus, sofern sie in direkten Kontakt mit dem Virus gebracht wurden. Am stärksten wirksam waren Manukaöl und Flaveson, sie reduzierten die Plaquebildung um 99,5% bzw. 99,1%. Als Wirkmechanismus kommen Interaktionen der Triketone mit den viralen Hüllstrukturen in Betracht, welche die Adsorption des Virus an die Wirtszellen erschweren.

Die vorliegende Arbeit liefert eine Ausgangsbasis für weiterreichende im Zusammenhang mit der Anwendung als Externa notwendigen *in vivo* Untersuchungen.

Summary

The thesis contributes to the knowledge of the analytical, physicochemical and toxicological properties of β -triketones as well as to their antimicrobial and antiviral activity.

β -triketones occur as components of essential oils within various genera of the Myrtaceae family, especially in *Eucalyptus* and *Leptospermum* species. The fact, that the New Zealand tea tree oil (manuka oil, won from leaves and twigs of *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst.) stands out due to its high activity against Gram-positive bacteria in comparison to other tea tree oils was the motive for investigation of β -triketones. the triketone complex of manuka oil, consisting of flavesone, isoleptospermone and leptospermone, is assumed to be responsible for this special effect. Since nowadays the New Zealand tea tree oil is now used as a substitute for Australian tea tree oil in herbal embrocations and cosmetics, it is important to investigate and document the properties of the manuka triketones and further available triketones.

Flavesone could be isolated from the manuka triketone complex with 99,8% purity, but the separation of the other triketones of the complex, isoleptospermone and

leptospermone, failed. Therefore a chemical synthesis for β -triketones was developed following the method of CROMBIE et al. (1985; 1987) originally applied for the synthesis of *Mammea*-coumarins. Using this method flavesone, isoleptospermone, leptospermone and papuanone could be synthesized successfully. Finally the high purity of the synthetic triketones (99,8%; GLC), achieved by vacuum distillation in a bulb to bulb distillation as well as the available amount (3 to 10g each; yield 51% to 67%) was a solid basis for the following toxicological and antimicrobial tests.

For the investigation of structure-activity relationship two further triketones were synthesized, which do not occur in nature: the 4-acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dione ("acetyl derivative") und 4-decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dione ("decanoyl derivative"). The triketone agglomerone (from *E. agglomerata* Maiden) was obtained from a colleague.

The identity of the synthesized triketones was confirmed by elementary analysis as well as by means of various spectrophotometric methods (UV, IR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$). Among these mass spectrometry was the most important because a direct comparison between the synthesized triketones and those in manuka oil was possible using GLC-MS. The $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ results confirmed and completed the data in literature.

TLC, HPLC and GLC methods were developed in order to quantify triketones in essential oils. A HPLC method with RP-18 as stationary phase and acetonitrile / water / acetic acid (gradient) as mobile phase turned out to be suitable for routine analysis due to its short analysis time (10 min). For GLC separation a low polar stationary phase (100% polysiloxane) was the most effective one.

Neither the investigation of the storage stability over 60 weeks nor the investigation of the UV stability of the triketones made visible any artefacts or degradation products. This is an indispensable result if triketones are used in therapeutical or cosmetic formulations.

In order to estimate the photosensitizing properties of the triketones a red blood cell phototoxicity test was applied, which provides qualitative and quantitative results. In this test system neither the tested β -triketones – agglomerone, flavesone and papuanone – nor the triketone complex isolated from manuka oil showed any photo-toxicological properties.

The antimicrobial activity of the seven individual triketones were tested applying the bouillon dilution method and DMSO as solubilizer. They all exhibited strong antimicrobial efficacy (bacteristatic) against Gram-positive microorganisms showing MIC values between 256 $\mu\text{g/mL}$ and 0,5 $\mu\text{g/mL}$; no effects against Gram-negative bacteria could be observed. The lipophilic character of the triketones seems to be decisive for the intensity of the antimicrobial activity, because a direct correlation between the length of the side chain and the intensity of the antimicrobial activity could be found. The triketone with the longest side chain, the synthetic “decanoyl derivative”, showed the strongest antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (MIC values between 0,5 $\mu\text{g/mL}$ and 4 $\mu\text{g/mL}$). Comparative studies with the manuka triketone complex and the β -triketones flavesone, isoleptospermone and leptospermone made it obvious that the antimicrobial activity of the triketone complex is always as high as the highest effectivity of one of the individual triketones of the complex. From this fact it can be concluded that the antimicrobial activity of the β -triketones in mixtures follows the principle of indifference, which was confirmed by testing a mixture of the triketone complex with papuanone.

In death kinetic studies with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 all triketones showed a clear reduction of the living cells 30 minutes after application, its intensity again depending on the lipophilic character of the tested triketones. The further course of the kinetics was concentration dependent. Bactericidal concentrations of triketones resulted in a complete kill of the bacteria within 6 h.

Finally three triketones and manuka oil were investigated concerning their effect on the Herpes simplex virus type 1 in the course of different phases of the viral infection. In case of direct contact with the virus, they all showed strong antiviral activity, with manuka oil and flavesone being the most active substances. They reduced the for-

mation of plaques by 99,5% and 99,1%, respectively. The mechanism seems to be an interaction of the triketones with the virion envelope hindering the adsorption of the virus by the host cell.

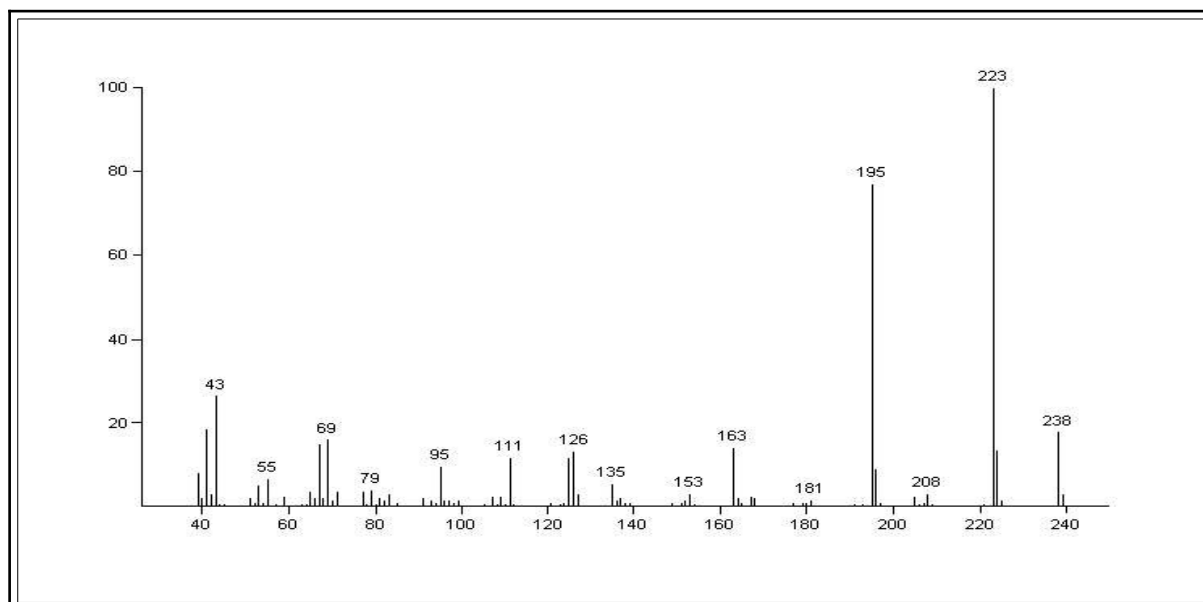
The thesis provides the basis for further reaching *in vivo* investigations which are necessary for an application of the β -triketones or of manuka oil in external phyto-preparations.

F Anhang

1 Massenspektren

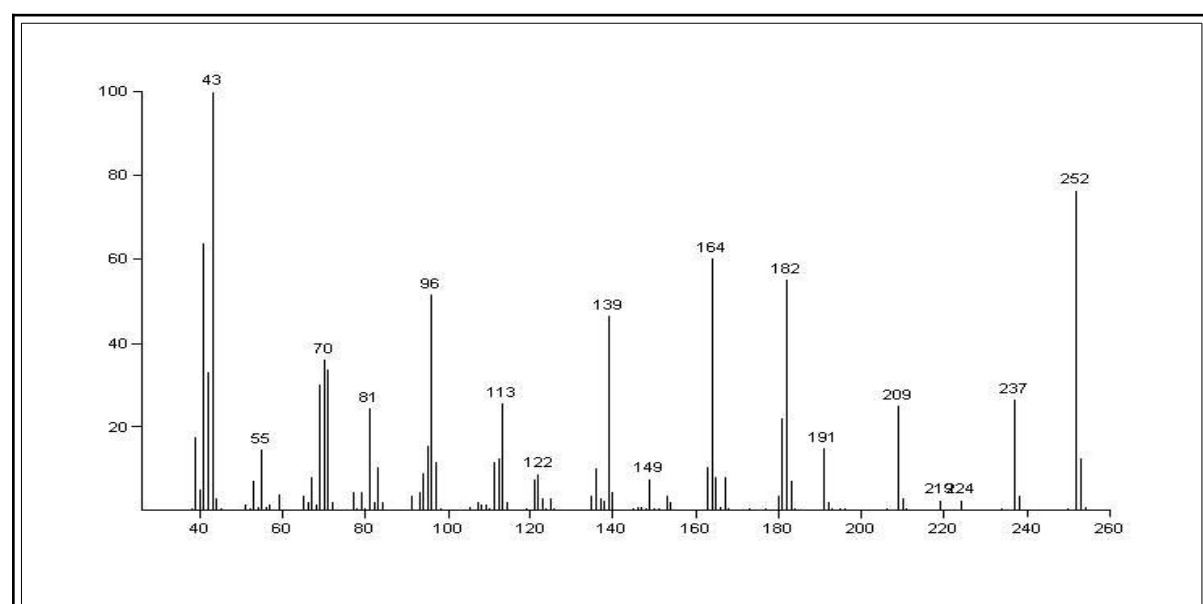
Agglomeron

El, 70 eV, (m/z): 223(100), 195(78), 43(27), 238(18), 69(16), 163(14), 126(13), 111(11)



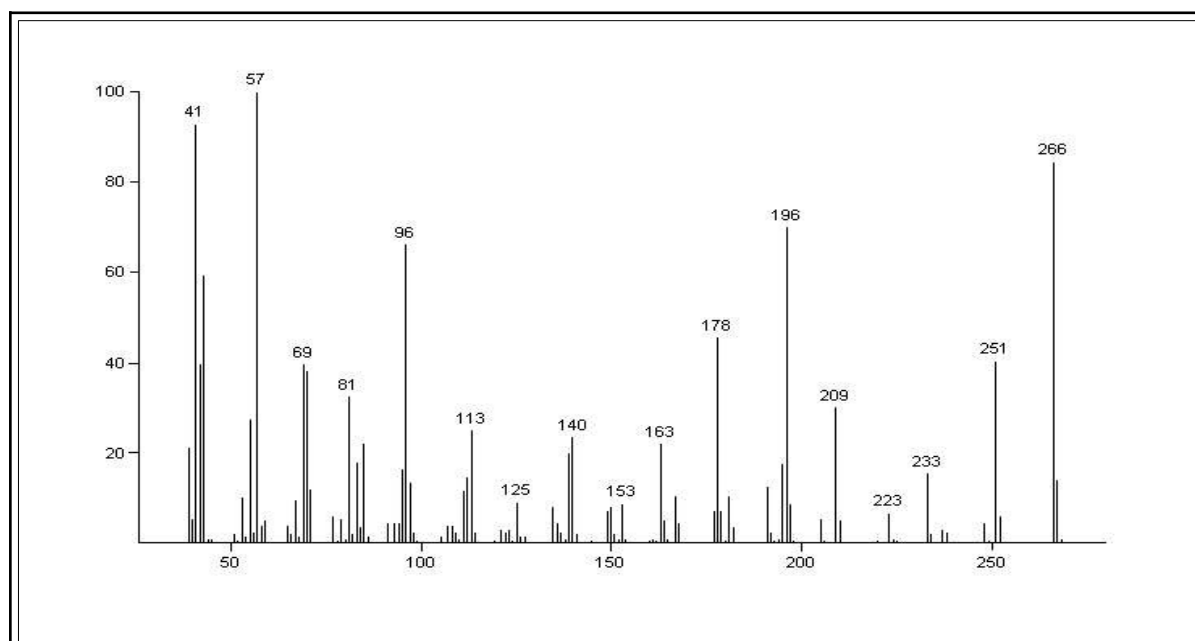
Flaveson

El, 70 eV, (m/z): 43(100), 252(76), 164(60), 182(55), 96(51), 139(46), 70(36), 237(27)

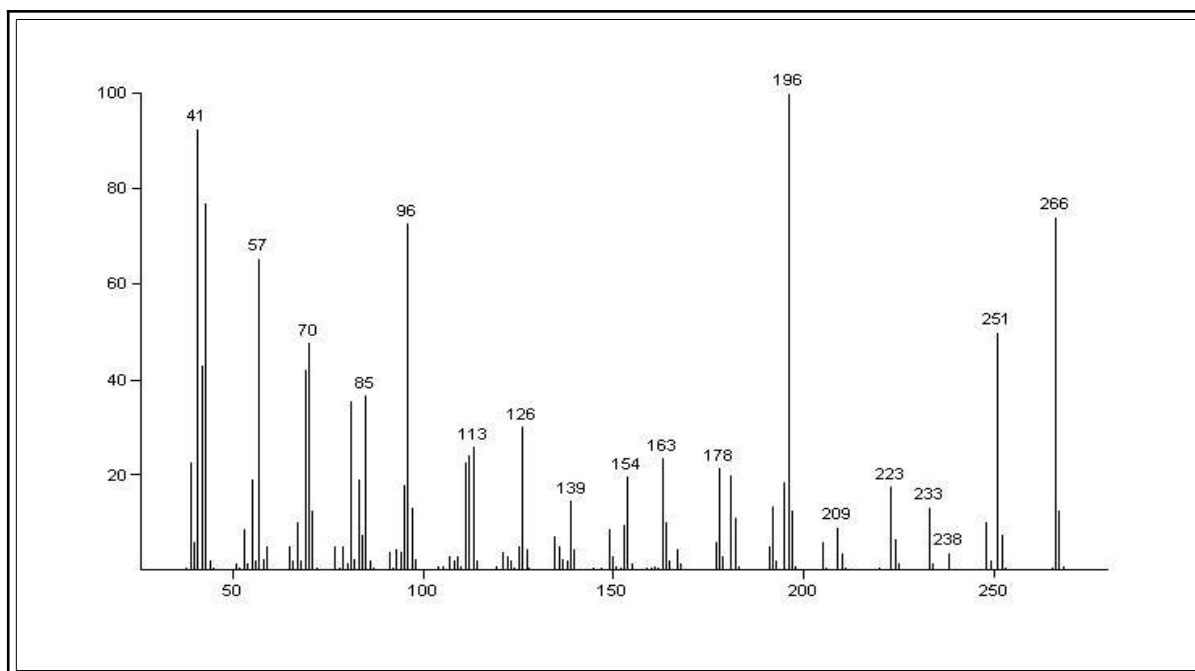


Isoleptospermon

El, 70 eV, (m/z): 57(100), 41(93), 266(85), 196(70), 96(66), 178(46), 251(41), 69(39)

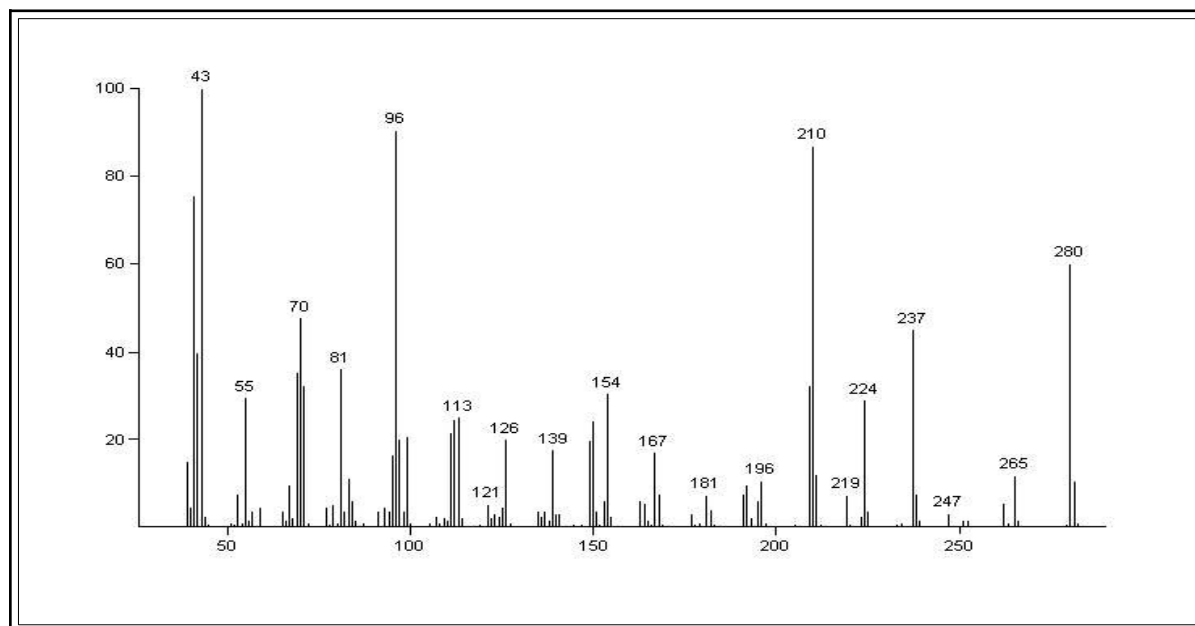
**Leptospermon**

El, 70 eV, (m/z): 196(100), 41(93), 266(74), 93(73), 57(65), 251(50), 70(48), 85(37)



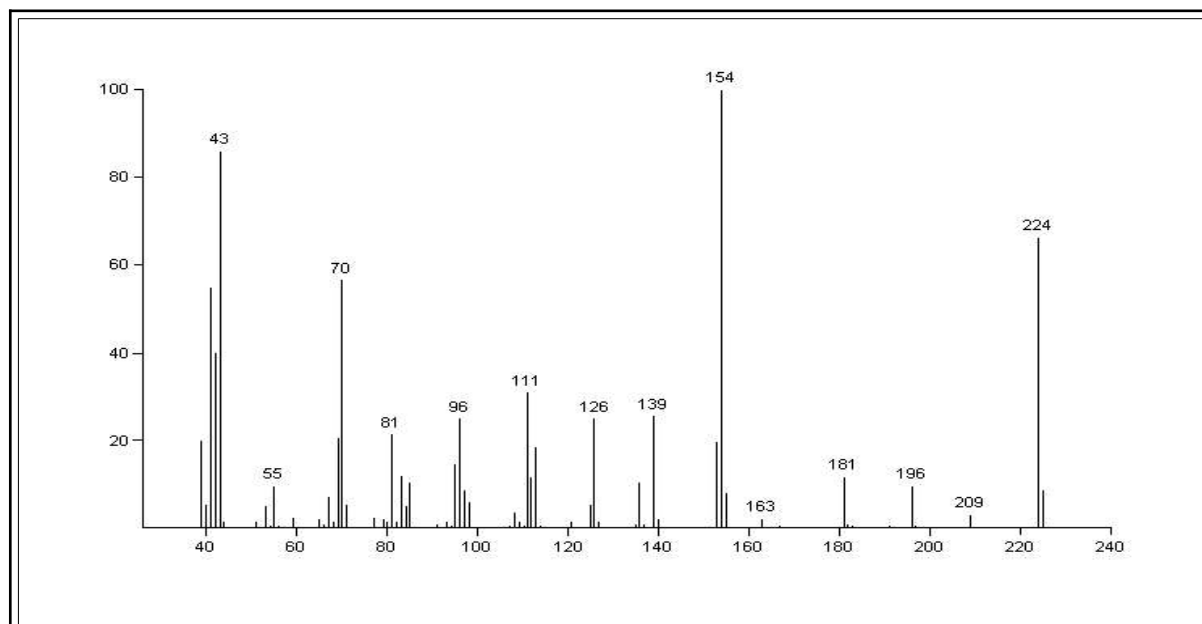
Papuanon

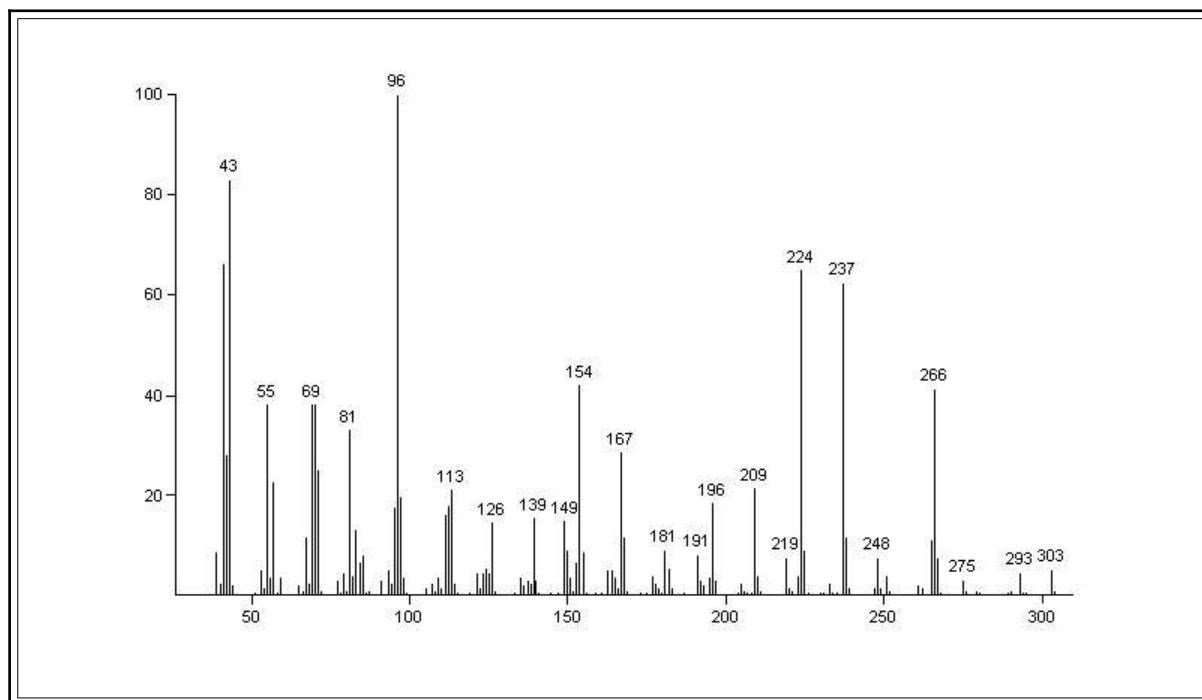
El, 70 eV, (m/z): 43(100), 96(90), 210(87), 280(60), 70(48), 237(45), 154(31), 55(29)



4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-1,3-dione

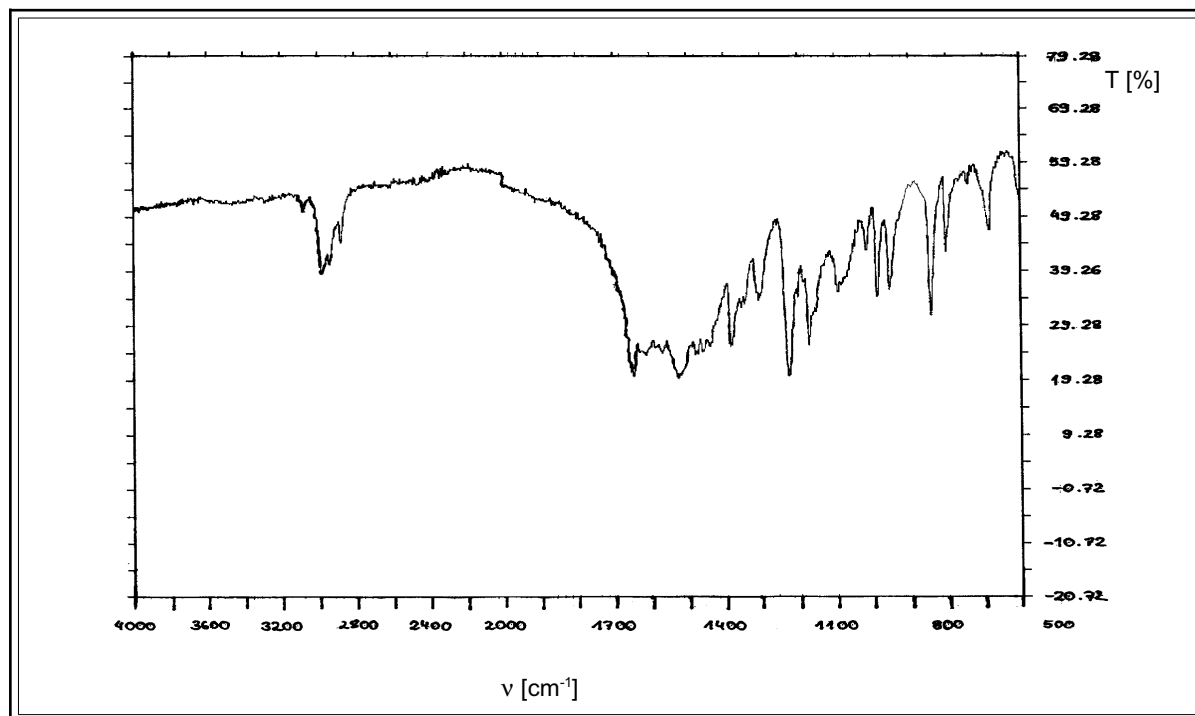
El, 70 eV, (m/z): 154(100), 43(86), 224(66), 70(56), 111(30), 139(26), 96(25), 126(25)



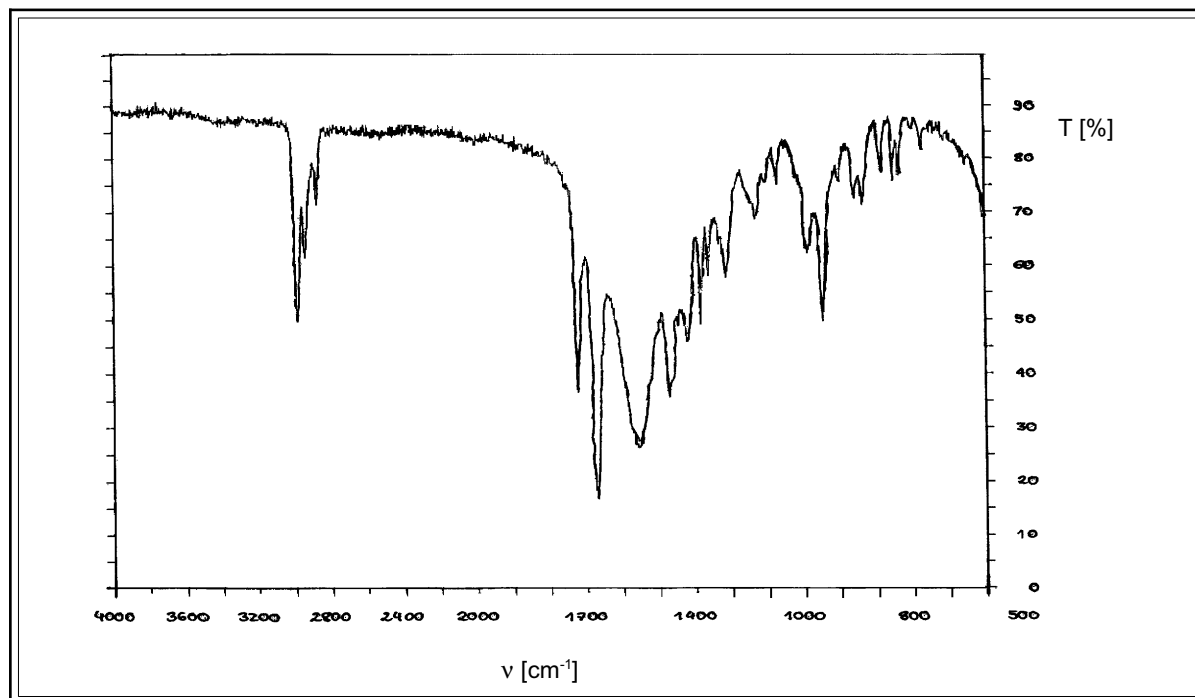
4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dioneEI, 70 eV, (m/z): 96(100), 43(83), 224(65), 237(63), 154(42), 266(41), 55(38), 69(38)

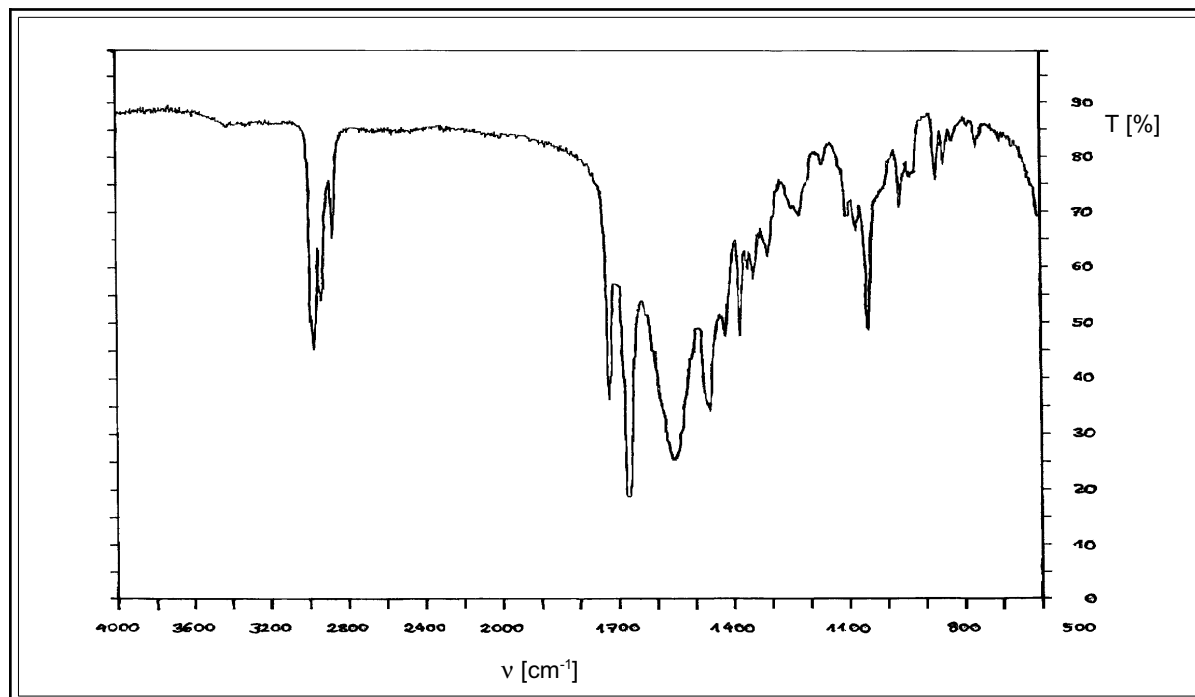
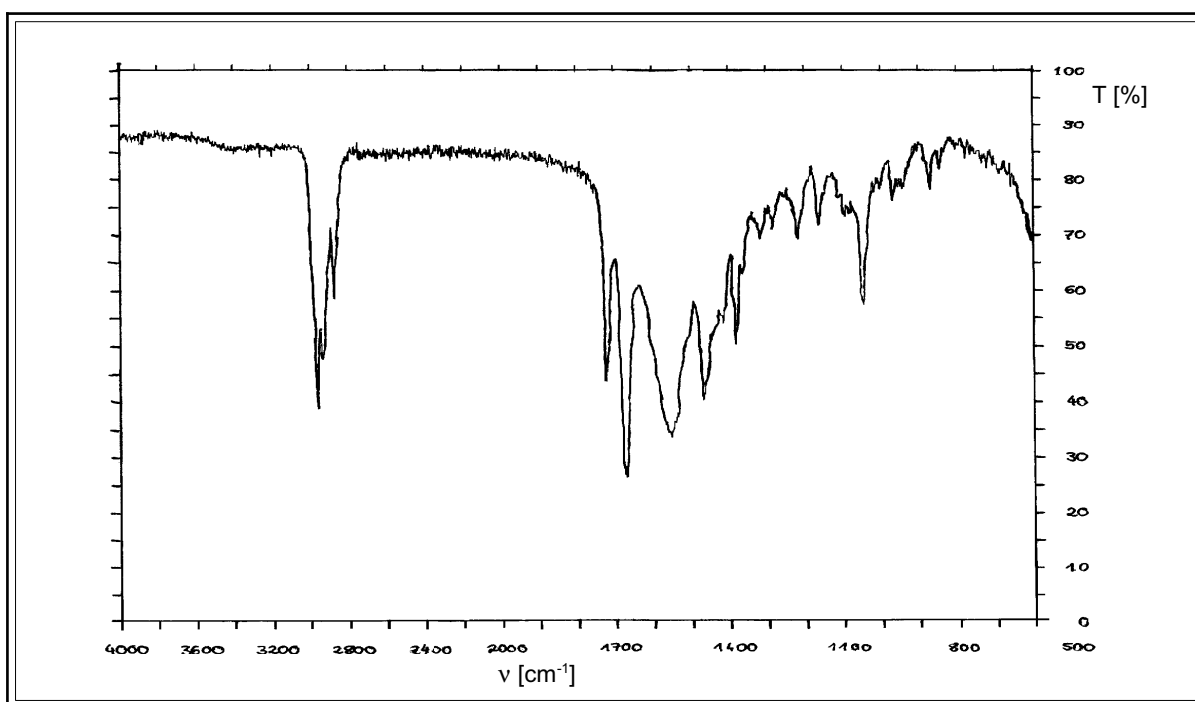
2 IR-Spektren

Agglomeron

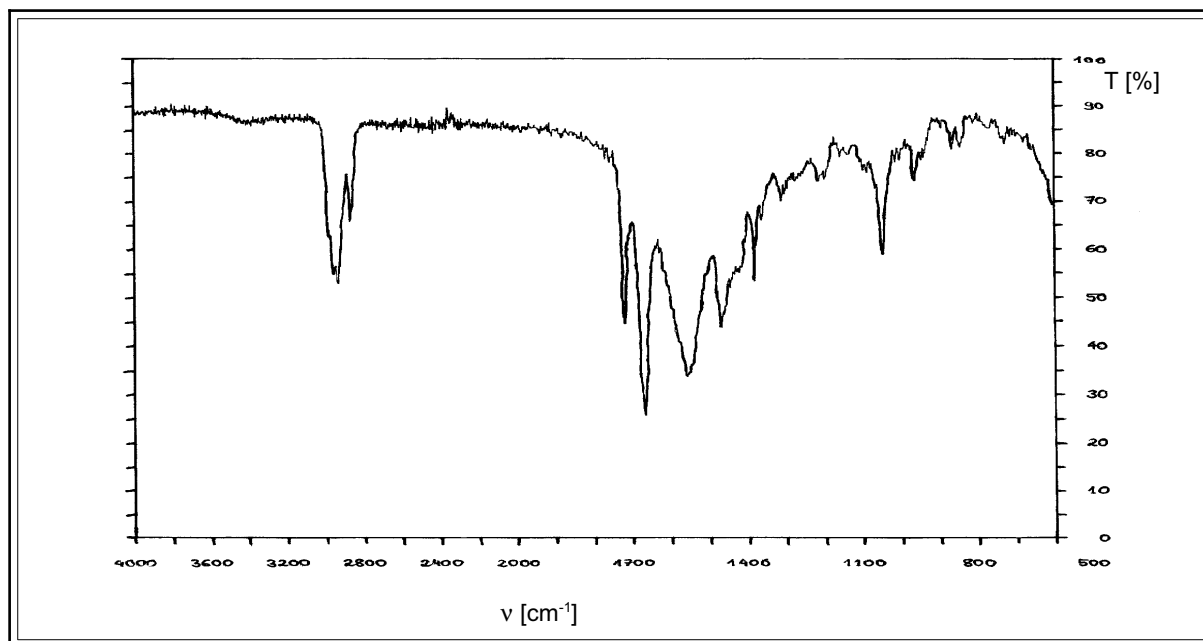


Flaveson

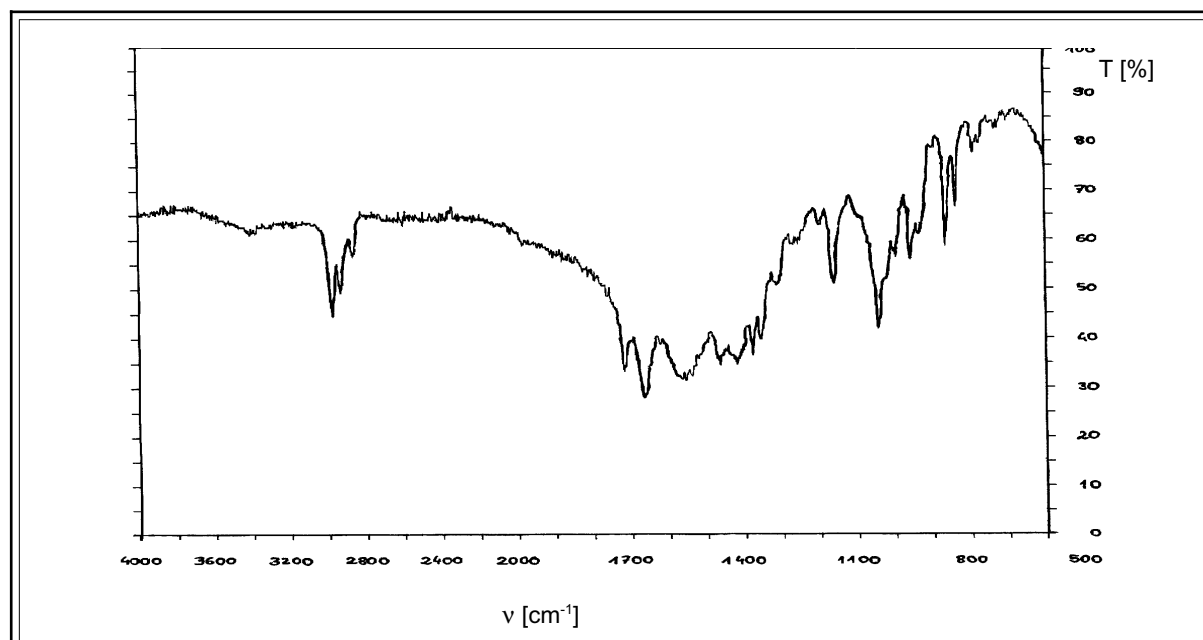


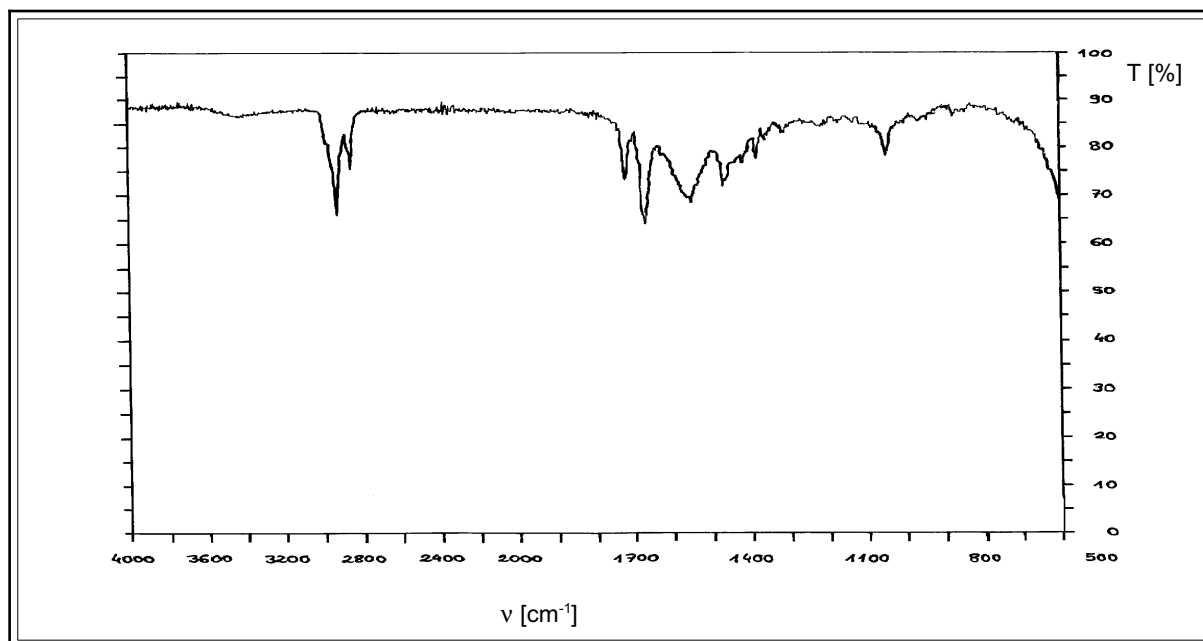
Isoleptospermon**Leptospermon**

Papuanon



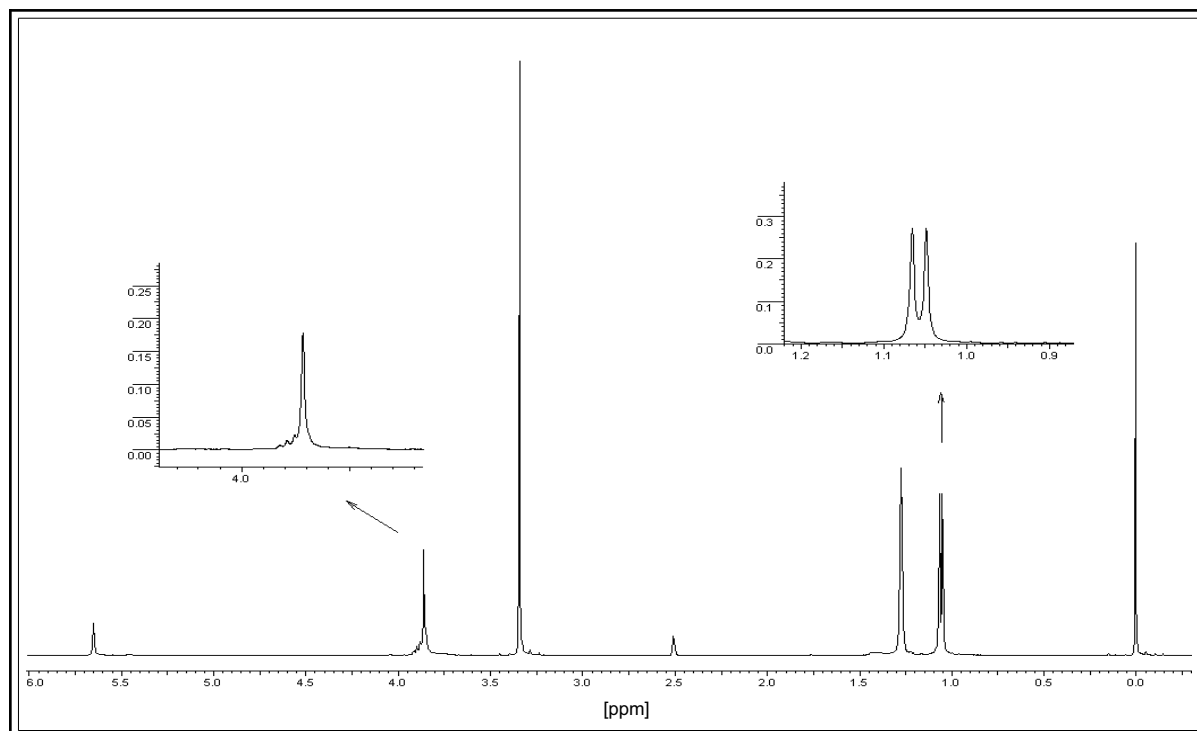
4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-1,3-dion



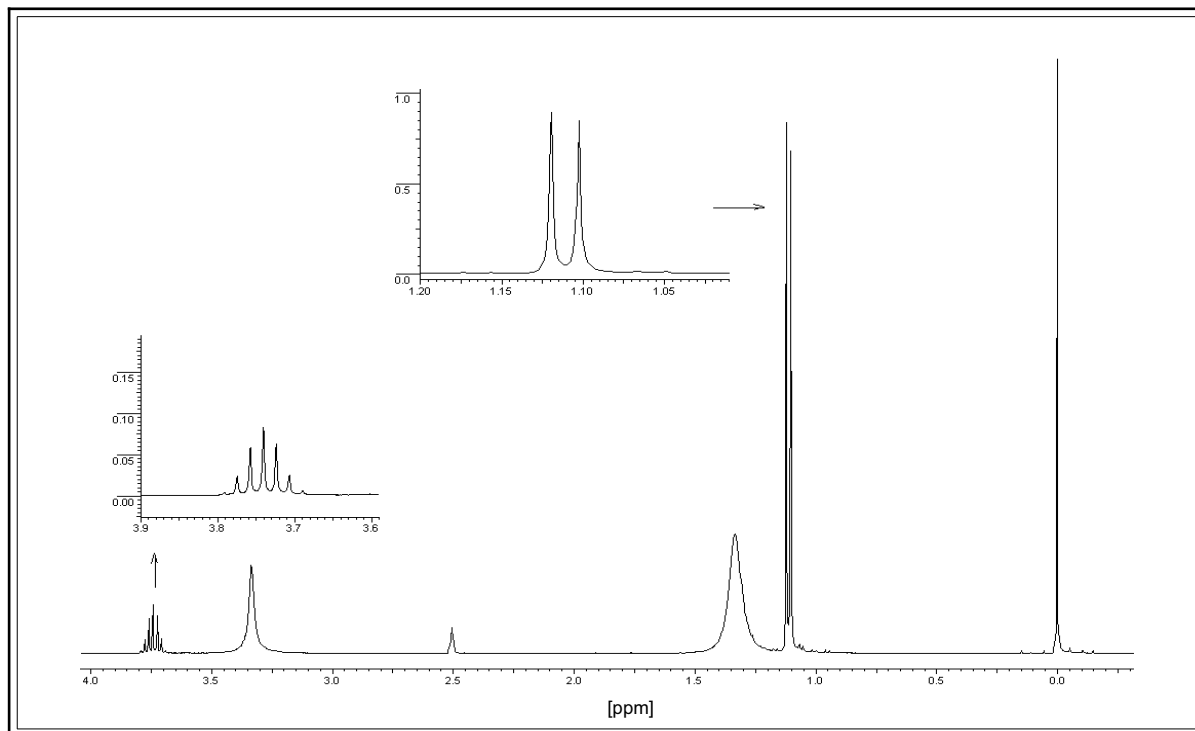
4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4en-1,3-dion

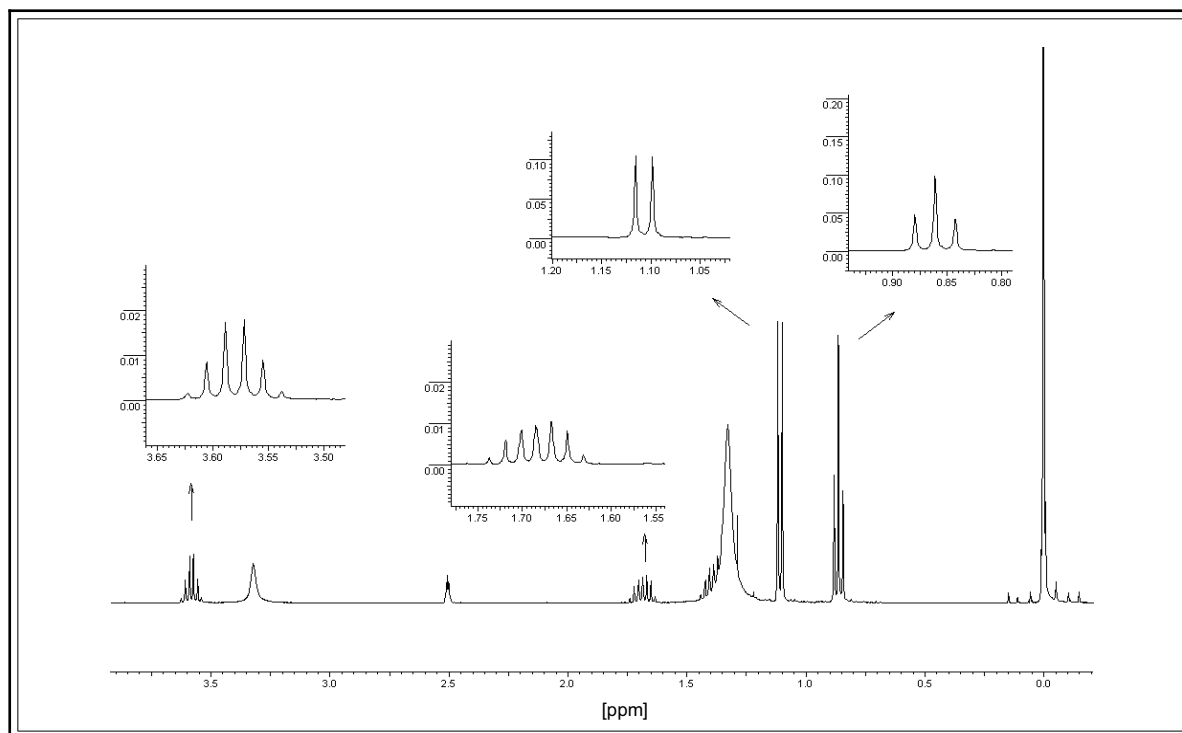
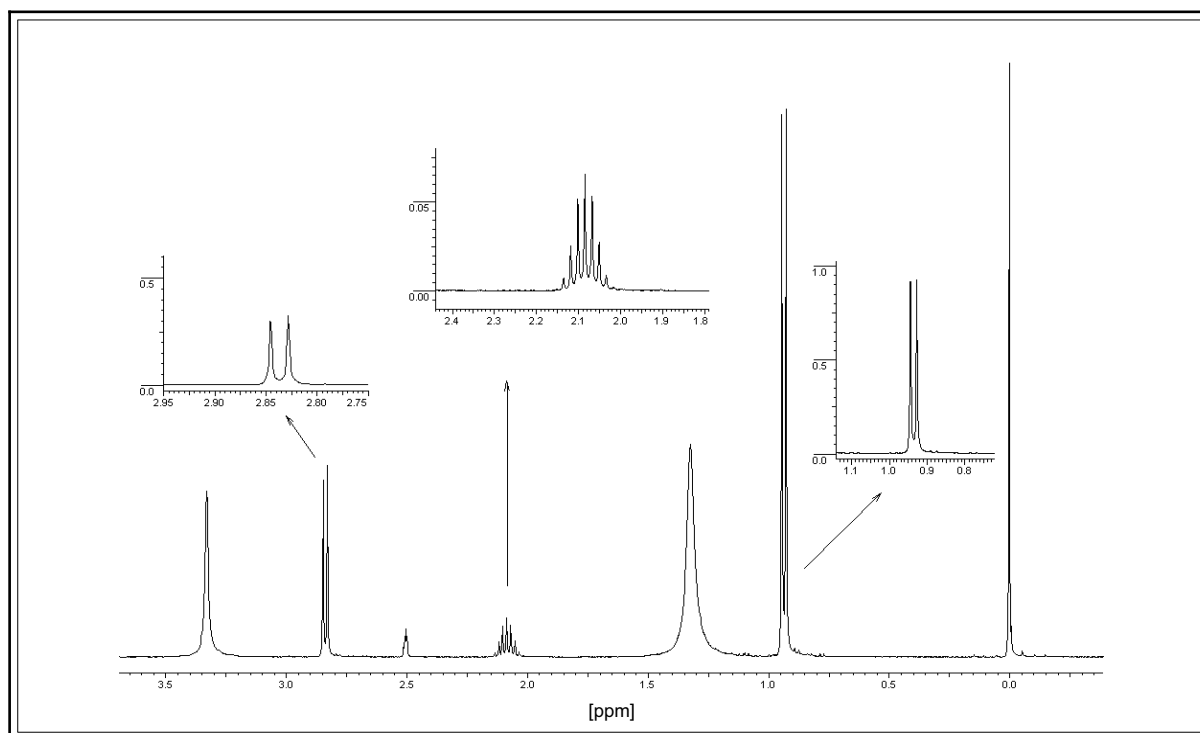
3 ^1H -NMR-Spektren

Agglomeron

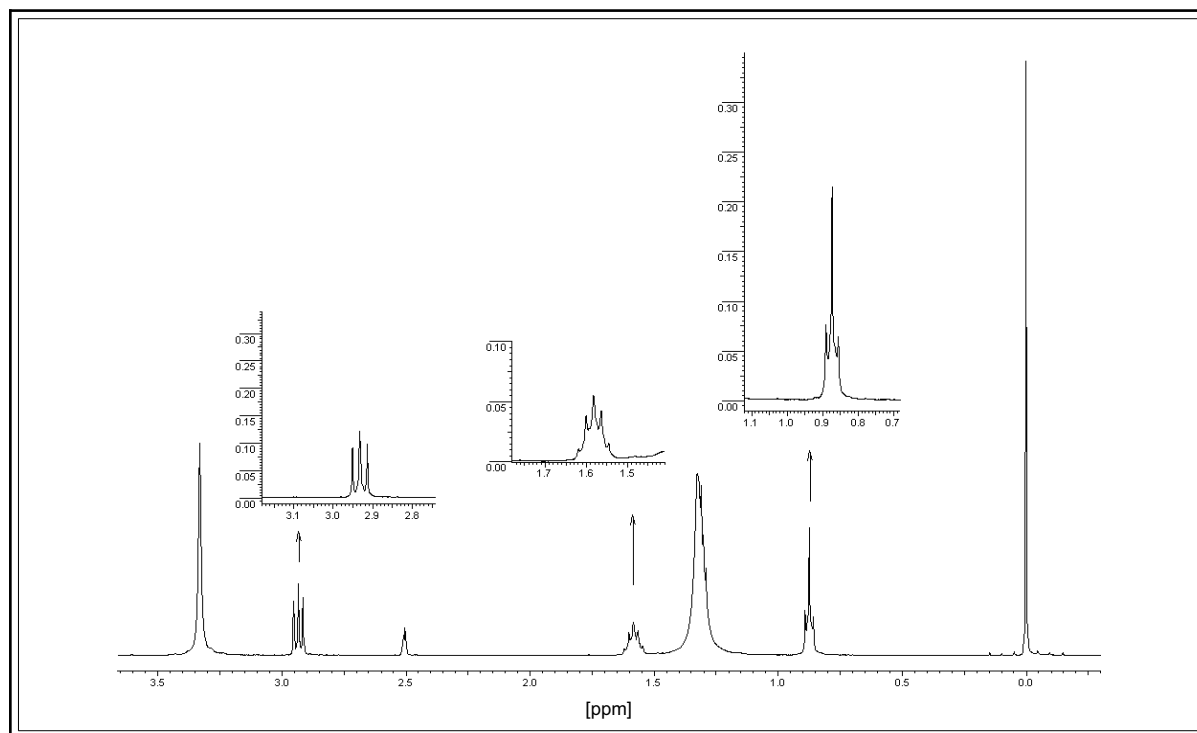


Flaveson

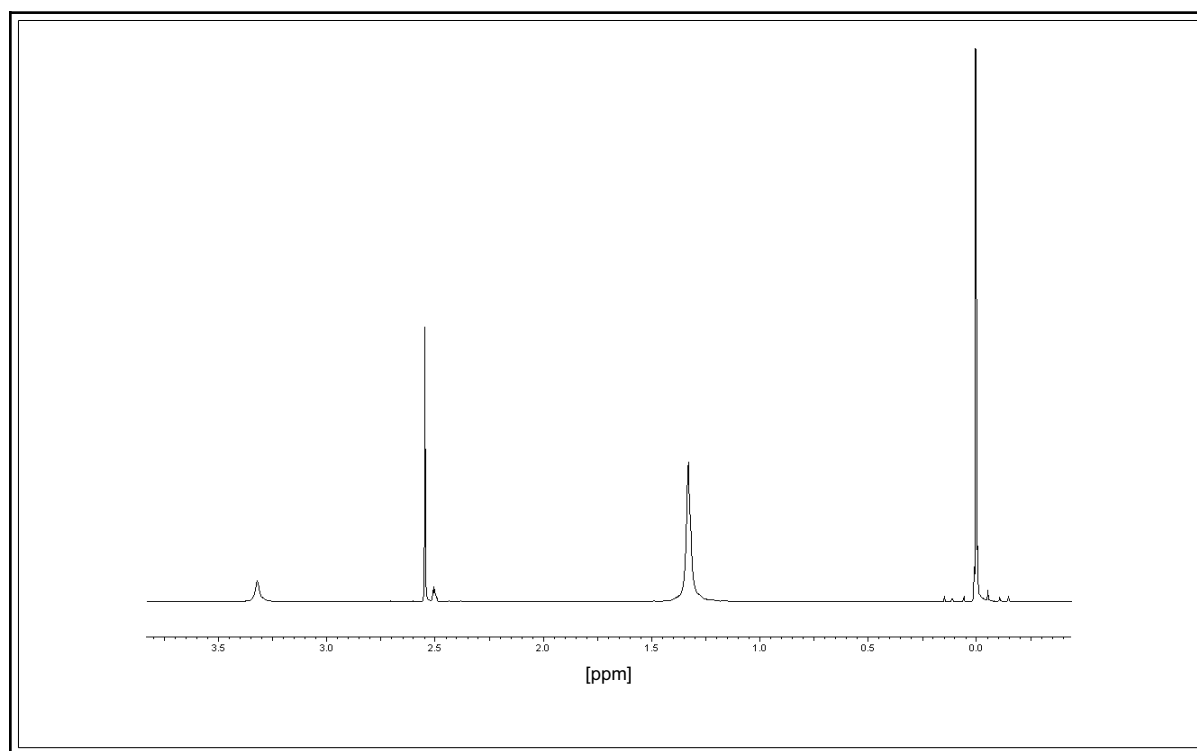


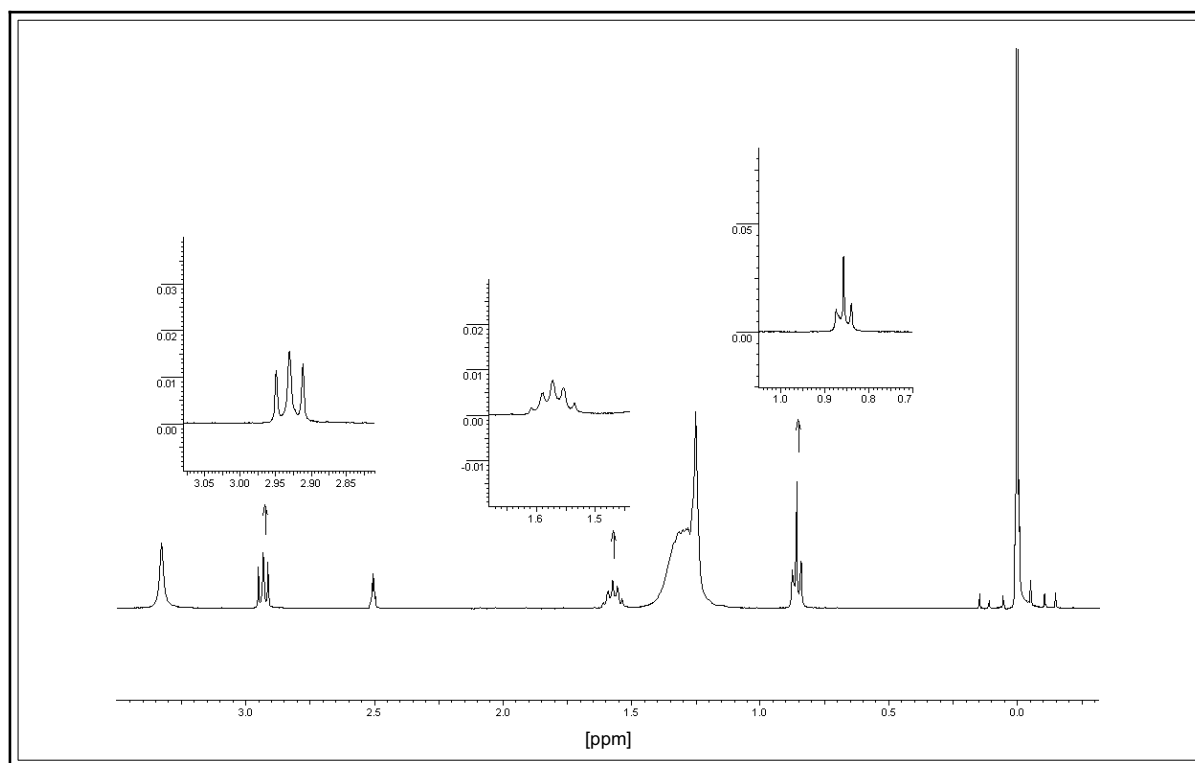
Isoleptospermon**Leptospermon**

Papuanon



4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-1,3-dion



4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dione

4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Systematische Stellung der Myrtaceae.....	4
Abbildung 2: Grundgerüst der Filixsäuren.....	15
Abbildung 3: Grundgerüst der Flavaspidsäuren.....	16
Abbildung 4: Hopfenbitterstoffe.....	16
Abbildung 5: Acylphloroglucin-Derivate der Myrtaceae.....	17
Abbildung 6: "formylated phloroglucinol compounds".....	18
Abbildung 7: Grundgerüst der Macrocarpale und Euglobale.....	18
Abbildung 8: Acylphloroglucin-Derivate aus <i>Myrtus communis</i> L.....	19
Abbildung 9: Tautomeren-Gleichgewicht von Tasmanon.....	20
Abbildung 10: Cyclische Polyketone vom Phloroglucin-Typ (β -Triketone).....	21
Abbildung 11: Keto-Enol-Tautomerie von Isoleptospermon.....	22
Abbildung 12: Cyclische Polyketone vom Resorcin-Typ.....	22
Abbildung 13: Cyclische Polyketone vom Cyclopentandion-Typ.....	23
Abbildung 14: G-Regulatoren G1, G2, G3 in <i>Eucalyptus grandis</i>	24
Abbildung 15: Hypothese zur Biogenese der β -Triketone.....	25
Abbildung 16: Acylphloroglucin-Derivate aus <i>Hypericum</i> -Arten.....	28
Abbildung 17: Strukturähnlichkeiten zwischen Leptospermon und HPPD- Herbiziden.....	37
Abbildung 18: Strukturähnlichkeit zwischen Leptospermon und Valone.....	38
Abbildung 19: Gaschromatogramm von Manukaöl, J&W DB-WaxEtr.....	39
Abbildung 20: Isolierter Triketon-Komplex, Methode nach HARKENTHAL (2000)....	41
Abbildung 21: Gaschromatogramm des isolierten Triketon-Komplexes.....	43
Abbildung 22: Massenspektrum von BHT.....	44
Abbildung 23: Gaschromatographischer Vergleich der Extraktion mit Diethylether und Ethylacetat.....	45
Abbildung 24: Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm des Triketon- Komplexes, BDB 1.....	49
Abbildung 25: Kugelrohrdestillationsgerät.....	50
Abbildung 26: Bauprinzip der Kugelrohrdestillation (Schnitt).....	51
Abbildung 27: Trennung von Isoleptospermon und Leptospermon mittels Niederdruck-Säulenchromatographie.....	54

Abbildung 28: Gaschromatographische Auswertung der Niederdruck-Säulenchromatographie.....	55
Abbildung 29: Synthese nach Van Klink et al. (1999).....	57
Abbildung 30: Darstellung der Triketone.....	62
Abbildung 31: MS-Fragmentierungsschema.....	63
Abbildung 32: IR-Spektrum (NaCl) von Flaveson	64
Abbildung 33: ¹ H-NMR-Spektrum von Flaveson (DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	65
Abbildung 34: ¹ H-NMR-Spektrum von 4-Acetyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-en-1,3-dion („Acetyl-Derivat“, DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	66
Abbildung 35: ¹ H-NMR-Spektrum von 4-Decanoyl-5-hydroxy-2,2,6,6-tetra-methylcyclohex-4-en-1,3-dion („Decanoyl-Derivat“, DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	67
Abbildung 36: Schema zur Optimierung der mobilen Phase (CAMAG, 1996).....	70
Abbildung 37: DC der Triketone; RP-18, Ameisensäure / Dichlormethan (6:4).....	71
Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm (Ausschnitt), isokratische Elution.....	74
Abbildung 39: HPLC-Chromatogramm der Triketone / Triketon-Derivate (Detektion UV 275 nm).....	75
Abbildung 40: UV-Spektren der β-Triketone Agglomeron und Flaveson.....	76
Abbildung 41: Gaschromatogramm (Ausschnitt) der Triketone (BGB-1, 60 m).....	78
Abbildung 42: Graphische Auftragung der n-Alkane C ₉ bis C ₂₆ , Retentionszeit (R _t); Retentionsindex (R _i).....	79
Abbildung 43: Flaveson-Reinheit bei Einfluss von Raumtemperatur und Tageslicht.....	83
Abbildung 44: Flaveson-Reinheit bei 37°C.....	84
Abbildung 45: Flaveson-Reinheit im Verlauf der Bestrahlung.....	86
Abbildung 46: Schematische Darstellung der Anregung eines Photosensibilisators.....	89
Abbildung 47: Darstellung der Photohämolyse eines Erythrozyten, nach BODE (2004).....	92
Abbildung 48: Photohämolyse durch Chlorpromazin.....	93
Abbildung 49: Spektrale Strahlungsverteilung des Sonnensimulators SOL-500 im Vergleich zum Tageslicht D65.....	95
Abbildung 50: Photohämolyse, Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Flaveson und Papuanon.....	96

Abbildung 51: Photohämolysen, Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Agglomeron und den Triketon-Komplex.....	97
Abbildung 52: Schematische Darstellung der Methämoglobin-Bildung (nach BODE, 2002).....	98
Abbildung 53: Spektrum des Hämoglobins (modifiziert nach PAPE et al., 2001).....	99
Abbildung 54: Methämoglobin-Bildung durch Chlorpromazin.....	100
Abbildung 55: Methämoglobinbildung: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Flaveson und Papuanon.....	102
Abbildung 56: Methämoglobinbildung: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Agglomeron und den Triketon-Komplex.....	103
Abbildung 57: Antibakterielle Aktivität der Triketone (nur MHK bis 256 µg/mL).....	119
Abbildung 58: "Acetyl-" und "Decanoyl-Derivat".....	121
Abbildung 59: Strukturelle Ähnlichkeit von Chinolonen und Triketonen.....	122
Abbildung 60: Absterbekinetik von <i>S. aureus</i> ATCC 25923 bei Zugabe von Flaveson (0,026%) und Papuanon (0,006%).....	123
Abbildung 61: Absterbekinetik von <i>S. aureus</i> ATCC 25923 bei Zugabe von Flaveson 0,03% und 0,05%.....	124
Abbildung 62: Absterbekinetik von <i>S. aureus</i> ATCC 25923 bei Zugabe von Flaveson 0,1%, 1% und 3%.....	125
Abbildung 63: Wirkung verschiedener β-Triketone und des Manukaöls während verschiedener Phasen der Virusinfektion.....	131
Abbildung 64: Im Rahmen der Arbeit bearbeitete Triketone.....	135

5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Natürliches Vorkommen von Agglomeron.....	29
Tabelle 2: Natürliches Vorkommen von Flaveson.....	32
Tabelle 3: Natürliches Vorkommen von Isoleptospermon.....	33
Tabelle 4: Natürliches Vorkommen von Leptospermon.....	34
Tabelle 5: Natürliches Vorkommen von Papuanon.....	36
Tabelle 6: Komponenten des Manukaöls.....	40
Tabelle 7: Konzentration der Triketone in ausgewählten Handelsölen (%).....	41
Tabelle 8: Isolierung des Triketon-Komplexes mit Diethylether (n = 10).....	46
Tabelle 9: Isolierung des Triketon-Komplexes mit Ethylacetat (n = 10).....	47
Tabelle 10: Säurechloride und Zwischenprodukte der Triketon-Synthese.....	60
Tabelle 11: ¹³ C-NMR-Daten (CDCl ₃ , 75 MHz) für β-Triketone (VAN KLINK et al., 1999).....	68
Tabelle 12: Postchromatische Detektion der Triketone.....	72
Tabelle 13: Gradientenzusammensetzung.....	75
Tabelle 14: Retentionszeiten (tR) und Retentionsindices (Ri) der Triketone (BGB-1).....	78
Tabelle 15: Lagerbedingungen für Flaveson.....	81
Tabelle 16: Reinheit von Flaveson (Peakflächenprozente), Braunglas, RT, Tageslicht.....	82
Tabelle 17: Reinheit von Flaveson (Peakflächenprozente), Weißglas, RT, Tageslicht.....	82
Tabelle 18: Reinheit von Flaveson (Peakflächenprozente), 37°C, Dunkelheit.....	83
Tabelle 19: Reinheit von Flaveson (Peakflächenprozente), 37°C, Tageslicht.....	84
Tabelle 20: Reinheit von Flaveson während der Bestrahlung mit UV-Licht (Peakflächenprozente).....	85
Tabelle 21: Pflanzen mit photosensibilisierenden Eigenschaften (Auswahl).....	90
Tabelle 22: Beschickung der Mikrotiterplatte für die Bestimmung der Photohämolyse.....	94

Tabelle 23: Beschickung der Mikrotiterplatte für die Bestimmung der Methämoglobin-Bildung.....	101
Tabelle 24: Untersuchte Bakterienstämme.....	108
Tabelle 25: Pipettierschema für Tenside Polysorbat 20 und Polysorbat 80.....	113
Tabelle 26: Wachstum ausgewählter Mikroorganismen in Anwesenheit von Polysorbat 20.....	113
Tabelle 27: Wachstum ausgewählter Mikroorganismen in Anwesenheit von Polysorbat 80.....	114
Tabelle 28: Pipettierschema für DMSO.....	115
Tabelle 29: Wachstum ausgewählter Mikroorganismen in Anwesenheit von DMSO.....	115
Tabelle 30: MHK-Bestimmung, Konzentration der Testsubstanzen in den Kavitäten der Mikrotiterplatte.....	117
Tabelle 31: MHK-Werte einzelner β -Triketone und des Triketon-Komplexes [μg / mL].....	118
Tabelle 32: MHK-Werte für <i>E. coli</i> DE112.....	122
Tabelle 33: Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	127
Tabelle 34: Prozentuale Reduktion der Plaquebildung.....	129
Tabelle 35: Handelsmuster Manukaöl.....	143
Tabelle 36: Destillationsparameter bei der Kugelrohrdestillation.....	144
Tabelle 37: Parameter für die Niederdruck-Säulenchromatographie.....	145
Tabelle 38: GC-Parameter Teil 1.....	147
Tabelle 39: GC-Parameter Teil 2.....	147
Tabelle 40: Parameter der GC-MS-Kopplung.....	148
Tabelle 41: Parameter für die HPLC.....	148
Tabelle 42: Mikroorganismen.....	167
Tabelle 43: <i>E. coli</i> - Stämme.....	167

G Literaturverzeichnis

Allen, K. L.; Molan, P. C.; Reid, G. M.

A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys
Journal of Pharmacy and Pharmacology **43**, 817 – 822 (1991)

Ashurst, P. R.

Methylation products of phloracylphenones
Chemistry & Industry **9**, 381 (1966)

Auterhoff, H.; Knabe, J.; Höltje, H.

Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 12. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1991

Bagel, S.

Adhärenzeigenschaften chinolonresistenter E. coli-Isolate
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1998)

Bagel, S.; Hullen, V.; Wiedemann, B.; Heisig, P.

Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*
Antimicrobial Agents and Chemotherapy **43**, 868 – 875 (1999)

Bick, I. R. C.; Horn, D. H. S.

Nuclear magnetic resonance studies. V. The tautomerism of tasmanone and related β -triketones
Australian Journal of Chemistry **18**, 1405 – 1410 (1965)

Bick, I.; Blackman, A. J.; Hellyer, R. O.; Horn, D. H. S.

The isolation and structure of flavesone
Journal of the Chemical Society, 3690 – 3692 (1965)

Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Fookes, C. J. R.

Volatile leaf oils of some south-western and southern Australian species of the genus *Eucalyptus* (Series I) Part XIV. Subgenus *Monocalyptus*
Flavour and Fragrance Journal **12**, 177 – 183 (1997)

Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.

Volatile leaf oils of some south-western and southern Australian species of the genus *Eucalyptus* (series 1). Part XIX
Flavour and Fragrance Journal **13**, 131-139 (1998)

Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.

Volatile leaf oils of some southwestern and southern Australian species of the genus *Eucalyptus* (series I). Part XVII: subgenus *Symphyomyrtus* (I) section Bisectaria, series Calycogonae and (II) section Dumaria, series Dumosae, series Rigentes and series Ovulares
Flavour and Fragrance Journal **12**, 269-275 (1997)

Birch, A. J.

β -triketones. Part I. The structures of angustione, dehydroangustione, calythrone and flavaspidic acid
Journal of the Chemical Society Abstracts **670**, 3026 – 3030 (1951)

Birch, A. J.; Elliott, P.

Studies in relation to biosynthesis. VIII. Tasmanone, dehydroangustione, and calythrone
Australian Journal of Chemistry **9**, 95 – 104 (1956)

Blum, A.

Am anderen Ende der Erde
Deutsche Apotheker Zeitung **14**, 1227 – 1234 (1995)

Bode, C.

Der kombinierte Erythrozyten-Phototoxizitätstest als eine Anwendung der UV/Vis-Spektroskopie
Weiterbildungsseminar Kiel, 2002

Bode, C.

Phototoxikologie der Kaliumkanal-Blocker Psora-3 und Psora-4: *In vitro*-Untersuchungen zur Photoirritation, Photokarzinogenität und Photoallergenität
Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel (2004)

Boland, D. J.; Brophy, J. J.; House, A. P. N.

Eucalyptus leaf oils: Use, chemistry, distillation and marketing
ACIAR/CSIRO, Australian Central for International Agricultural Research, Inkata Press, Melbourne (1991)

Bracher, F.; Heisig, P.; Languth, P.; Mutschler, E.; Rücker, G.; Scriba, G.; Stahl-Biskup, E.; Troschütz, R.

Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 2005
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Braun, V.

Proteinfunktionen der äußeren Membran von *E. coli*
BIOspektrum 1, 31 – 35 (1995)

Briggs, L. H.; Hassall, C. H.; Short, W. F.

Leptospermone Part II
Journal of the Chemical Society, 706 – 709 (1945)

Briggs, L. H.; Penfold, A. R.; Short, W. F.

Leptospermone Part I
Journal of the Chemical Society, 1193 – 1195 (1938)

Brooker, S. C.; Cambie, R. C.; Cooper, R. C.

New Zealand Medicinal Plants

Heinemann Publishers, Auckland, NZ, Third Edition, 1987

Brooker, M. I. D.

A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae)

Australian Systematic Botany **13**, 79 - 148 (2000)

Brophy, J. J.; Goldsack, R. J.

Leaf oils of the genus *Backhousia* (Myrtaceae)

Journal of Essential Oil Research **7**, 237 – 254 (1995)

Brophy, J. J.; Goldsack, R. J.; Bean, A. R.; Forster, P. I.; Lepschi, B. J.

Leaf essential oils of the genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in Eastern Australia. Part 3. *Leptospermum arachnoides* and allies

Flavour and Fragrance Journal **14**, 85 – 91 (1999)

Brophy, J. J., Goldsack, R. J.; Forster, P. I.; Hibbert, D.B.; Punruckvong, A.

Variation in *Callistemon viminalis* (Myrtaceae): New evidence from leaf essential oils

Australian Systematic Botany **10**, 1 – 13 (1997)

Burry, J. N.; Lawrence, J. R.

Phototoxic blisters from high furosemide dosage

The British Journal of Dermatology **94**, 495 – 499 (1976)

Carr, A.

Tea trees and their therapeutic properties

online-Resource (2003)

Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V.

Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)

Microbios **82**, 181 – 185 (1995)

Chiba, K.; Takakuwa, T.; Tada, M.; Yoshii, T.

Inhibitory effect of acylphloroglucinol derivatives on the replication of Vesicular Stomatitis Virus

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **56**, 1769 – 1772 (1992)

Christoph, F.

Chemische Zusammensetzung und antimikrobielle Eigenschaften der ätherischen Öle von *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst. und anderer Teebaumöle der Gattungen *Kunzea*, *Leptospermum* und *Melaleuca* unter besonderer Berücksichtigung von Handelsölen

Dissertation, Universität Hamburg (2001)

Christoph, F.; Kaulfers, P.-M.; Stahl-Biskup, E.

A comparative study of the *in vitro* antimicrobial activity of tea tree oils *s.l.* with special reference to the activity of β -triketones

Planta Medica **66**, 556 – 560 (2000)

Connor, H. E.; Edgar, E.

Name changes in the indigenous New Zealand flora, 1960-1986 and Nomina Nova IV, 1983-1986

New Zealand Journal of Botany **25**, 115 - 170 (1987)

Cooke, A.; Cooke, M. D.

An investigation into the antimicrobial properties of manuka and kanuka oil

Cawthron Report No. **263**, 24 – 26 (1994)

Costello, L. R.

Kino: A brief overview

Mauget Technical Bulletin 01-10-15, <http://www.mauget.com>

Courtney, J. L.; Lassak, E. V.; Speirs, G. B.

Leaf wax constituents of some myrtaceous species

Phytochemistry **22**, 947 – 949 (1983)

Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J.

Synthesis of mammeins and surangin A

Tetrahedron Letters **26**, 29 – 2932 (1985)

Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J.

Synthesis of the *Mammea* coumarins. Part 1. The coumarins of the *Mammea* A, B, and C series

Journal of the Chemical Society / Perkin Transactions **1**, 317 – 331 (1987)

Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J.

Synthesis of the *Mammea* coumarins. Part 2. Experiments in the *Mammea* E series and synthesis of *Mammea* E/AC

Journal of the Chemical Society / Perkin Transactions **1**, 333 – 343 (1987)

Crow, W. D.; Nicholls, W.; Sterns, M.

Root inhibitors in *Eucalyptus grandis*: Naturally occurring derivatives of the 2,3-dioxabicyclo(4.4.0.)decane system

Tetrahedron Letters **18**, 1353 – 1356 (1971)

Dayan, F.; Romagni, J.; Tellez, M.; Rimando, A.; Duke, S.

Managing weeds with natural products

Pesticide Outlook – October, 185 – 188 (1999)

De Groot, A. C.; Weyland, J. W.

Systemic contact dermatitis from tee tree oil
Contact Dermatitis **27**, 279 – 280 (1992)

Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin 1990

Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern
(außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika – Mikrodilution (DIN 58940
Teil 8)

Diffey, B. L.; Daymond, T. J.; Fairgreaves, H.

Phototoxic reactions to piroxicam, naproxen and tiaprofenic acid
The British Journal of Rheumatology **22**, 239 – 242 (1983)

Eucalink

online Ressource

<http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/PlantNet/Euc/index.html>

Europäisches Arzneibuch

Ausgabe 5, 2. Nachtrag

Eyles, A.; Davies, N. W.; Mohammed, C.

Novel detection of formylated phloroglucinol compounds (FPCs) in the wood of
Eucalyptus globulus and *E. nitens*
Journal of Chemical Ecology **29**, 881 – 898 (2003)

Feng, X.

Untersuchung der nukleophilen Substitution von Porphyrinen mit lithium-
organischen Reagenzien
Dissertation, Freie Universität Berlin (2001)

Ferguson, J.; Addo, A. A.; Jones, S.

A study of cutaneous photosensitivity induced by amiodarone
The British Journal of Dermatology **113**, 537 – 549 (1985)

Foley, W.; Lassak, E.

The potential of bioactive constituents of *Eucalyptus* foliage as non-wood products from plantations
RIRDC-Publication (2004)

Frohne, D.; Pfänder, H. J.

Giftpflanzen, 4. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2004

Fulkerson, D.

Diversity and distribution of Eucalyptus
online Ressource, <http://www.biology.iastate.edu/intop/1Australia/Australia%20papers/Div%20and%20Dist%20Eucalyptus> (1996)

Gardner, R.

The essential oil of manuka (*Leptospermum scoparium*)
Journal of the Society of Chemical Industry **43**, 34T – 35T (1924)

Ghisalberti, E. L.

Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species
Phytochemistry **41**, 7 – 22 (1995)

Graham, P. S.; Hellyer, R. O.; Ryan, A. J.

The kinetics of inhibition of drug metabolism *in vitro* by some naturally occurring compounds
Biochemical Pharmacology **19**, 769 – 775 (1970)

Grieve, M.

A modern herbal (1995)

online-Ressource: <http://www.botanical.com>

Guidance for Industry – Photosafety Testing“ (Mai 2003)

online-Ressource, www.fda.gov

Hall, N.; Johnston, R. D.

Forest Trees of Australia, 3rd ed.

Australian Government Publishing Service (1970)

Hamilton, P.

Oykangand and Olkola Dictionary

Australian Institute of Aboriginal and Torres Strait Islander Studies (AIATSIS),
1998

Hammer, K. A., Carson, C. F. Riley, T. V.

In vitro activities of ketoconazole, econazole, miconazole and *Melaleuca alter-*
nifolia (tea tree) oil against *Malassezia* species

Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44**, 467 – 469 (2000)

Harkenthal, M.

Melaleucaae Aetheroleum - Untersuchung zur pharmazeutischen Qualität, anti-
bakteriellen Wirkung im Vergleich zu ausgewählten, traditionell verwendeten
ätherischen Ölen sowie zu irritativen und allergischen Nebenwirkungen

Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2000

Harkenthal, M.; Hausen, B. M.; Reichling, J.

1,2,4-Trihydroxy menthane, a contact allergen from oxidized Australian tea tree
oil

Die Pharmazie **55**, 153 – 154 (2000)

Harkenthal, M.; Reichling, J.; Geiss, H. K.; Saller, R.

Oxidationsprodukte als mögliche Ursache von Kontaktdermatiden
Pharmazeutische Zeitung **47**, 26 – 30 (1998)

Harkenthal, M.; Reichling, J.; Geiss, H.-K.; Saller, R.

Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil and eucalyptus oil
Die Pharmazie **54**, 460 – 463 (1999)

Heisig, P.; Tschorny, R.

Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro
Antimicrobial Agents and Chemotherapy **38**, 1284-1291 (1994)

Hellyer, R. O.

The occurrence of β -triketones in the steam-volatile oils of some myrtaceous Australian plants
Australian Journal of Chemistry **21**, 2825 – 2828 (1968)

Hellyer, R.O.

The structure of agglomerone, a new β -triketone
Australian Journal of Chemistry **17**, 1418 – 1422 (1964)

Hellyer, R. O.; Bick, I. R. C.; Nicholls, R. G.; Rottendorf, H.

Structure of tasmanone
Australian Journal of Chemistry **16**, 703 – 708 (1963)

Hellyer, R. O., McKern, H. H. G.

Essential oils of the genus *Eucalyptus*. II. Leaf oils of *E. oblonga* and *E. mitchelliana*
Australian Journal of Chemistry **16**, 515 – 519 (1963)

Hellyer, R. O.; Pinhey, J. T.

The structure of grandiflorone, a new β -triketone

Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic **17**, 1496 – 1498 (1966)

Hider, R. C.

Siderophores from microorganisms and plants

Structure and Bonding **58**, 25 – 87 (1984)

Hill, K.D., Johnson, L. A. S.

Systematic studies in the eucalypts – 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae)

Telopea **6**, 173 – 505 (1995)

Hu, L. H.; Khoo, C. W.; Vittal, J. J.; Sim, K. Y.

Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*

Phytochemistry **53**, 705 – 709 (2000)

Jelinek, A.

In vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose

Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001

Jori, A.; Bianchetti, A.; Prestini, P. E.

Effect of essential oils on drug metabolism

Biochemical Pharmacology **18**, 2081 – 2085 (1969)

Jori, A.; Bianchetti, A.; Prestini, P. E.; Garattini, S.

Effect of eucalyptol (1,8-cineole) on the metabolism of other drugs in rats and in man

European Journal of Pharmacology **9**, 362 – 366 (1970)

Kedzia, A.; Ostrowski-Meissner, H.

The effect of selected essential oils on anaerobic bacteria isolated from respiratory tract

Herba Polonica **49**, 29 – 36 (2003)

Kim, E. H.; Hwang, S.-J.; Park, S. Y.; Rhee, G. J.

Topical formulation and antimicrobial activity of a ketonic fraction from *Leptospermum scoparium*

Yakche Hakhoechi **30**, 151 – 158 (2000)

Kim, E. H.; Rhee, G. J.

Activities of ketonic fraction from *Leptospermum scoparium* alone and synergism in combination with some antibiotics against various bacterial strains and fungi

Yakhak Hoeji **43**, 716 – 728 (1999)

Knight, T. E.; Hausen, B. M.

Melaleuca oil (tea tree oil) dermatitis

Journal of the American Academy of Dermatology **30**, 423 – 427 (1994)

Koch, C.

Antivirale Effekte ausgewählter ätherischer Öle auf behüllte Viren unter besonderer Berücksichtigung des Herpes simplex Virus Typ 1 und 2

Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2005)

Kubeczka, K.-H.

Vortrennung ätherischer Öle und ähnlich komplexer Stoffgemische für die GC-Analyse durch modifizierte Trockensäulenchromatographie

Chromatographia **6**, 106 - 108 (1973)

Kupp, L. I.; Rosen, S.; Beck, F. M.

Effect of antioxidants on growth and lactic acid production by *Streptococcus mutans*

Journal of Dental Research **64**, 1016 - 1018 (1985)

Ladriges, P. Y., Udovicic, F.

Comment on a new classification of the Eucalypts

Australian Systematic Botany **13**, 149 – 152 (2000)

Lakhvich, F. A.; Khlebnikova, T. S.

Cyclic β -triketones in nature

Vestsi Akademii Navuk Belarusi, Seryya Khimichnykh Navuk **4**, 101 – 116 (1996)

Lawler, I. R.; Eschler, B. M.; Schliebs, D. M.; Foley, W. J.

Relationship between chemical functional groups on *Eucalyptus* secondary metabolites and their effectiveness as marsupial antifeedants

Journal of Chemical Ecology **25**, 2561 – 2573 (1999)

Lawler, I. R.; Foley, W. J.; Eschler, B. M.

Foliar concentration of a single toxin creates habitat patchiness for a marsupial folivore

Ecology **81**, 1327 – 1338 (2000)

Lee, D. L.; Knudsen, C. G.; Michaely, W. J.; Chin, H. L.; Nguyen, N. H.; Carter, C. G.; Cromartie, T. H.; Lake, B. H.; Shribbs, J. M.; Fraser, T.

The structure-activity relationships of the triketone class of the triketone class of HPPD herbicides

Pesticide Science **54**, 377 – 384 (1998)

Lee, D. L.; Prisbylla, M. P.; Cromartie T. H.; Dagarin, D. P.; Howard, S. W.; Provan, W. M.; Ellis, M. K.; Fraser, T.; Mutter, L. C.

The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase

Weed Science **45**, 601 – 609 (1996)

Lehmann, P.

Heliotrope Erkrankungen – Diagnostik und Therapie

Deutsche Medizinische Wochenschrift **129**, 259 – 266 (2004)

Lis-Balchin, M.; Hart, S. L.; Deans, S. G.

Bioactivity of New Zealand medicinal plant essential oils

Acta Horticulturae **426**, 13 – 30 (1996)

Lis-Balchin, M.; Hart, S. L.; Deans, S. G.

Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or Manuka and *Kunzea ericoides* or Kanuka), Originating in Australia and New Zealand

Phytotherapy Research **14**, 623 – 629 (2000)

Lloyd, W. J.; Broadhurst, A. V.; Hall, M. J.; Andrews, K. J. M.; Barber, W. E.; Wong-Kai-In, P.

Cyclohexane triones, novel membrane-active antibacterial agents

Antimicrobial Agents and Chemotherapy **32**, 814 – 818 (1988)

Mathekga, A. D. M.; Meyer, J. J. M.; Horn, M. M.; Drewes, S. E.

An acylated phloroglucinol with antimicrobial properties from *Helichrysum caespititium*

Phytochemistry **53**, 93 – 96 (2000)

Menzel, R.

A microtiter plate-based system for the semiautomated growth and assay of bacterial cells for beta-galactosidase activity
Analytical Biochemistry **181**, 40 – 50 (1989)

Meyer, T.

Synthese, Cyclisierung und biologische Wirksamkeit von 4-Amino-5-hydroxy-chinolin
Dissertation, Universität Hamburg 2000

Mierendorff, H.

persönliche Mitteilung, 2002

Molan, P. C.

(Professor of Biological Sciences & Director of the Honey Research Unit, University of Waikato)
persönliche Mitteilung über eigene Untersuchungen, 2004

Moore, B. D.; Wallis, I. R.; Palá-Paúl, J.; Brophy, J. J.; Willis, R. H.; Foley, W. J.

Antiherbivore chemistry of *Eucalyptus* - cues and deterrents for marsupial folivores
Journal of Chemical Ecology **30**, 1743 – 1769 (2004)

Mustafa, K.; Perry, N. B.; Weavers, R. T.

2-Hydroxyflavanones from *Leptospermum polygalifolium* subsp. *polygalifolium*
Phytochemistry **64**, 1285 - 1293 (2003)

Nishizawan, M.; Emura, M.; Kan, Y.; Yamada, H.; Ogawa, K.; Hamanaka, N

Macrocyclic HIV-reverse transcriptase inhibitors of *Eucalyptus globulus*
Tetrahedron Letters **33**, 2983 – 2986 (1992)

Note for Guidance on Photosafety Testing“ (2002)

online-Ressource, www.emea.eu.int

Pape, W. J. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Steiling, W.

The Red Blood Cell Phototoxicity Test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA Validation Programme on Phototoxicity (Phase II)
Alternatives to Laboratory Animals **29**, 145 – 162 (2001)

Parris, D. S.; Dixon, R. A.; Schaffer, P. A.

Physical mapping of herpes simplex virus type 1 mutants by marker rescue: correlation of the physical and genetic maps
Virology **100**, 275 – 287 (1980)

Penfold, A.R.

The occurrence of a new phenol in the essential oils of the „*Leptospermums*“
Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales **55**, 49 – 51 (1921)

Perry, N. B.; Brennan, N. J.; Van Klink, J. W.; Harris, W.; Douglas, M. H.; McGimpsey, J. A.; Smallfield, B. M.; Anderson, R. E.

Essential oils from New Zealand manuka and kanuka: chemotaxonomy of *Leptospermum*
Phytochemistry **44**, 1485 – 1494 (1997)

Perry, N. B.; Van Klink, J. W.; Nerida, J.; Brennan, W. H.; Anderson, R. E.; Douglas, M. H.; Smallfield, B. M.

Essential oils from New Zealand manuka and kanuka: chemotaxonomy of *Kunzea*
Phytochemistry **45**, 1605 – 1612 (1997)

Porter, N. G.; Smale, P. E.; Nelson, M. A.; Hay, A. J.; Van Klink, J. W.; Dean, C. M.

Variability in essential oil chemistry and plant morphology within a *Leptospermum scoparium* population.

New Zealand Journal of Botany **36**, 125 – 133 (1998)

Porter, N. G.; Wilkins, A. L.

Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*

Phytochemistry **50**, 407 – 415 (1998)

Prisbylla, M. P.; Onisko, B. C.; Shribbs, J. M.; Adams, D. O.; Liu, Y.; Ellis, M. K.; Hawkes, T. R.; Mutter, L. C.

The novel mechanism of action of the herbicidal triketones

Proceedings of the British Crop Protection Conference – Weeds **2**, 731 – 738 (1993)

Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 260. Auflage

de Gruyter Verlag, 2004

Putman, E.; van der Laan, J. W.; van Loveren, H.

Assessing immunotoxicity: Guidelines

Fundamental and Clinical Pharmacology **17**, 615 – 626 (2003)

Reichling, J.; Harkenthal, M.; Geiss, H. K.; Saller, R.

Australisches Teebaumöl

Österreichische Apotheker-Zeitung **14**, 652 – 660 (1997)

Reichling, J.; Harkenthal, M.; Landvatter, U.; Saller, R.; Erdinger, L.

Ätherische Öle im HET-CAM-Test

Deutsche Apotheker Zeitung **140**, 4688 – 4694 (2000)

Reichling, J.; Koch, C.; Stahl-Biskup, E.; Sojka, C.; Schnitzler, P.

Virucidal activity of a β -triketone rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture
Planta Medica **12**, 1113 – 1127 (2005)

Reichling, J.; Patz, B.; Schnitzler, P.

Virusinfektion mit rezidivierenden Attacken
Pharmazeutische Zeitung **24**, 16 – 22 (2003)

Robbins, A.

Botanical medicine monographs and sundry, Fluid extracts of the new Pharmacopoeia. Part IV
American Journal of Pharmacy **55** (1883)

Rösen-Wolff, A.; Ben-Hur, T.; Becker, Y.; Darai, G.

Comparative analysis of the transcripts mapped in the *Bam*HI DNA fragment B of avirulent HSV-1 HFEM, virulent HSV-1 F and their intratypic recombinant viruses
Virus Research **10**, 315 – 324 (1988)

Rotstein, A.; Lifshitz, A.; Kashman, Y.

Isolation and antibacterial activity of acylphloroglucinols from *Myrtus communis*
Antimicrobial Agents and Chemotherapy **6**, 539 – 542 (1974)

Rubel, D. M.; Freeman, S.; Southwell, I. A.

Tea tree oil allergy: What is the offending agent? Report of three cases of tea tree oil allergy and review of the literature
Australasian Journal of Dermatology **39**, 244 – 247 (1998)

Russell, K. M.; Molan, P. C.; Wilkins, A. L.; Holland, P. T.

Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey
Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**, 10 – 13 (1990)

Schlegel, H. G.

Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage
Thieme Verlag Stuttgart 1992

Schnitzler, P.; Schön, K.; Reichling, J.

Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture.
Die Pharmazie **56**, 343 – 347 (2001)

Schulz, K. H.; Wiskemann, A.; Wolf, K.

Klinische und experimentelle Untersuchungen über die photodynamische Wirksamkeit von Phenothiazinderivaten, insbesondere von Megaphen
Archiv für klinische und experimentelle Dermatologie **202**, 285 – 298 (1956)

Schwyn, B.; Neilands, J. B.

Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores
Analytical Biochemistry **160**, 47 – 56 (1987)

Seitz, T.; Hoffmann, M. G.; Krähmer, H.

Herbizide für die Landwirtschaft
Chemie in unserer Zeit **37**, 112 – 126 (2003)

Short, W. F.

The essential oil of manuka (*Leptospermum scoparium*)
Journal of the Society of Chemical Industry (London) **45**, 96 – 98 (1926)

Söderberg, T.; Johansson, A.; Gref, R.

Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells
Toxicology **107**, 99 – 109 (1996)

Somal, N. A. I.; Coley, K. E.; Molan, P. C.; Hancock, B. M.

Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey
Journal of the Royal Society of Medicine **87**, 9 – 11 (1994)

Sowmithran, D.; Prasad, K. J. R.

Aluminium chloride/phosphoryl chloride as an efficient acylating agent
Synthesis **05**, 545 – 546 (1985)

Spielmann, H.; Müller, L.; Aeverbeck, D.; Balls, M.; Brendler-Schwaab, S.; Castell, J. V.; Curren, R.; de Silva, O.; Gibbs, N. K.; Liebsch, M.; Lovell, W. W.; Merk, H. F.; Nash, J. F.; Neumann, N. J.; Pape, W. J. W.; Ulrich, P.; Vohr, H.-W.

The Second ECVAM Workshop on Phototoxicity Testing
Alternatives to Laboratory Animals **28**, 777 – 814 (2000)

Stern, R. S.

Photocarcinogenicity of drugs
Toxicology Letters **102**, 389 – 392 (1998)

Stirnadel, A.; Stirnadel, U. H.

Arzneimittel enthaltende Extraktivstoffe aus Pflanzen oder Pflanzenzellen der Art *Leptospermum scoparium*
Europäisches Patentamt 1989

Stirnadel, A.; Stirnadel, U. H.

Verwendung der aus *Leptospermum scoparium* extrahierbaren Wirkstoffe zur
Bekämpfung von cancerogenen Erkrankungen
Deutsches Patentamt 1987

Strasburger, E.; Sitte, P.

Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 35. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag 2002

Swanston-Flatt, S. K.; Day, C.; Baily, C. J.; Flatt, P. R.

Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin
diabetic mice
Diabetologia **33**, 462 – 464 (1990)

Takarada, K.; Kimizuka, R.; Takahashi, N.; Honma, K.; Kato, T.

A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral patho-
gens
Oral Microbiology and Immunology **19**, 61 – 64 (2004)

Takasaki, M.; Konoshima, T.; Kozuka, M.; Tokuda, H.

Anti-tumor-promoting activities of euglobals from *Eucalyptus* plants
Biological & Pharmaceutical Bulletin **18**, 435 – 438 (1995)

**Tam, N'G. T.; Thuam, D. T.; Bighelli, A.; Castola, V.; Muselli, A.; Richomme, P.;
Casanova, J.**

Baeckea frutescens leaf oil from Vietnam: composition and chemical variability
Flavour and Fragrance Journal **19**, 217 – 220 (2004)

Terada, Y.; Saito, J.; Kawai, T.; Singh, I. P.; Etoh, H.

Structure-activity relationship of phloroglucinol compounds from *Eucalyptus*, as
marine antifoulants
Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **63**, 276 – 280 (1999)

Teuscher, E.; Melzig, M. F.; Lindequist, U.

Biogene Arzneimittel, 6. Auflage

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2004

Van Doorslaer, S.; Dedoner, A.; De Block, M.; Callens, F.

Oxidative stress in plants. EPR monitoring in DMPO-DMSO based extracts

Journal of Plant Physiology **154**, 132 – 136 (1999)

Van Dyk, T. K.; Majarian, W. R.; Konstantinov, K. B.; Young, R. M.; Dhurjati, P. S.; LaRossa, R. A.

Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock genebioluminescence gene fusions

Applied and Environmental Microbiology **60**, 1414 – 1420 (1994)

Van Klink, J. W.; Brophy, J. J.; Perry, N. B.; Weavers, R. T.

β-Triketones from Myrtaceae: Isoleptospermone from *Leptospermum scoparium* and Papuanone from *Corymbia dallachiana*

Journal of Natural Products **62**, 487 – 489 (1999)

Velikonja, J.; Pupovac-Velikonja, A.; Durrigl, A.

Culture of *Aspergillus parasiticus* in apple juice. II. The effect of butylhydroxyanisole (BHA) and butylhydroxytoluol (BHT) on fungal growth and aflatoxin biosynthesis

Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung **185**, 223 – 226 (1985)

Wagner, H.; Bauer, R.

Pharmazeutische Biologie, 6. Auflage

Bd. 2, Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1999)

Walter, H.; Breckle, S.-W.

Ökologie der Erde

Band 4: Gemäßigte und Arktische Zonen außerhalb Euro-Nordasiens

Gustav Fischer Verlag (1991)

Wichtl M. (Hrsg.)

Teedrogen und Phytopharmaka, 4. Auflage

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2002)

Wilson, P.

Evolution of the myrtle family in Australia

Australian Plants Online **13** (1999)

Yamakoshi, Y.; Murata, M; Homma, S.

Isolation and characterization of macrocarpals B-G

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **56**, 1570 – 1576 (1992)

Zarebska, Z.

Cell membrane, a target for PUVA-Therapy

Journal of Photochemistry and Photobiology B **23**, 101 – 109 (1994)

Curriculum Vitae

Name	Cornelia Sojka
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	20.02.1973
Geburtsort	Rostock

1979 – 1989	Zehnklassige allgemeinbildende polytechnische Oberschule „Johannes R. Becher“, Bad Doberan
1989 – 1993	Gymnasium „Klosterschule“, Hamburg Abitur im Juni 1993
10/93 – 05/98	Universität Hamburg, Studium der Pharmazie; Abschluss mit Bestehen des Zweiten Prüfungsabschnitts (Staatsexamen)
06/98 – 11/98	Praktikum im Rahmen des dritten Ausbildungsabschnitts, Bahnhof-Apotheke, Hamburg-Bergedorf
12/98 – 05/99	Praktikum im Rahmen des dritten Ausbildungsabschnitts, Desitin, Hamburg
06/99	Approbation zum Apotheker nach Bestehen des Dritten Prüfungsabschnitts (Staatsexamen)
07/99 – 01/01	Mitarbeit an dem BMBF-Projekt „Pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe einheimischer Pflanzen“
01/99 – 09/01	Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der Stadt Hamburg (nach HmbNFVO vom 15.01.1985)
seit 01/01	Freie Doktorandin am Institut für Pharmazie (Universität Hamburg), Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie
seit 08/99	Berufstätigkeit (Teilzeit) als Apothekerin in der Bahnhof-Apotheke, Hamburg-Bergedorf
seit 04/00	Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik