



# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Antifungale Inhaltsstoffe der Gattungen *Zingiber* und *Curcuma*  
(Zingiberaceae) und ihre chemosystematische Bedeutung

angestrebter akademischer Grad

Magister/Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Adriane Raninger  
Matrikel-Nummer: 0025829  
Studienrichtung /Studienzweig A438  
(lt. Studienblatt):  
Betreuerin / Betreuer: Prof. Dr. Harald Greger

Wien, im Oktober 2009



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Systematik und Morphologie</b>	2
2.1. Systematik der Ordnung Zingiberales	2
2.2. Systematik und Verbreitung der Familie Zingiberaceae	3
2.2.1. Die Gattung <i>Alpinia</i> Roxb.	4
2.2.2. Die Gattung <i>Curcuma</i> Linn.	5
2.2.3. Die Gattung <i>Zingiber</i> Miller	6
<b>3. Material und Methode</b>	8
3.1. Pflanzenmaterial	8
3.2. Testorganismen	9
3.2.1. <i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	9
3.3. Phytochemische Methoden	10
3.3.1. Extraktion	10
3.3.2. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	10
3.3.3. Präparative Methoden	11
3.3.3.1. Dünnschichtchromatographie DC	11
3.3.3.2. Trockensäule	11
3.3.3.3. Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)	12
3.3.3.4. Präparative Dünnschichtchromatographie	12
3.3.4. Spektroskopische Methoden	12
3.3.4.1. UV-VIS-Spektroskopie	12
3.3.4.2. IR-Spektroskopie	12
3.3.4.3. NMR-Spektroskopie	13
3.3.4.4. Massenspektroskopie	13
3.4. Bioassay <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	13
3.4.1. Kultivierung und Sporengewinnung	13
3.4.2. Keimzahlbestimmung	14
3.4.3. Bioautographie auf Dünnschichtplatten	15
3.4.3.1. Bioautographie auf DC mit Gesamtextrakten	15
3.4.3.2. Bioautographie auf DC konzentrationsabhängig	15
3.4.4. Stoffwechselaktivität mittels MTT	15

<b>4. Stoffklassen</b>	18
4.1. Stoffklasse der Gingerole	18
4.2. Stoffklasse der Curcuminoide	22
4.3. Stoffklasse der Phenylbutenoide	26
4.4. Biosynthese der Curcuminoide und Gingerole	28
4.5. Stoffklasse der Terpenoide	30
4.6. Biosynthese der Terpenoide	31
<b>5. Ergebnisse</b>	34
5.1. Phytochemische Ergebnisse	36
5.1.1. <i>Z. montanum</i> (J. König) Link ex A. Dietr.	36
5.1.2. <i>Z. officinale</i> Roscoe	41
5.1.3. <i>Z. ottensii</i> Valetton und <i>Z. spectabile</i> Griff.	44
5.1.4. <i>C. longa</i> L.	45
5.1.5. <i>Curcuma</i> sp.	47
5.2. Biologische Aktivität	49
5.2.1. Bioautographische Tests auf DC-Platten mit <i>C. sphaerospermum</i>	49
5.2.1.1. <i>Z. montanum</i> (J. König) Link ex A. Dietr.	50
5.2.1.2. <i>Z. officinale</i> Roscoe	53
5.2.1.3. <i>C. longa</i> L.	55
5.2.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Mikrotiterplatten	56
<b>6. Diskussion</b>	61
<b>7. Anhang</b>	64
7.1. Spektraldatenkatalog	64
7.2. Abbildungen der Herbarbelege	85
7.3. Literaturverzeichnis	93

# 1. Einleitung

Die Ingwergewächse gehören zu einer der wichtigsten Komponenten der nicht verholzten Pflanzen in den Tropen von Süd-Ost Asien. Sie sind sowohl in den Höhenlagen der Gebirge als auch in Bambuswäldern und Plantagen im Tiefland anzutreffen. Es gibt nur wenige Pflanzengemeinschaften in diesen Gebieten in denen keine Ingwergewächse vorkommen. Einer der Hotspots dieser wundervollen Pflanzen ist die kontinentale Monsunregion von Asien, hier spielt Thailand eine bedeutende Rolle als Heimat für die größte Diversität der Flora an Zingiberaceae. Darüber hinaus präsentieren die Ingwergewächse einen großen Anteil der Pflanzen in Süd-Ost Asien mit wirtschaftlicher Bedeutung für Nahrungsmittel, Medizin, Kosmetik und Zierpflanzen (LARSEN, 2006).

Phytochemisch werden die Zingiberaceae durch das Vorkommen von Curcuminoiden, Gingerolen, Phenylbutenoiden, Phenylpropenen, Sesquiterpenen, Diterpenen und Flavonoiden charakterisiert. Die Gattung *Zingiber* Miller zeichnet sich vor allem durch die Synthese von Gingerolen aus, die außerhalb dieser Gattung bis jetzt nur in den Samen von *Aframomum melegueta* K. Schum. entdeckt wurden. Durch diese scharfschmeckenden Inhaltsstoffe ist *Zingiber officinale* Roscoe weltweit bekannt und als Gewürz und Heilmittel hoch geschätzt. Eine weitere wichtige weltweite Bedeutung in der Küche und Medizin erreichte die Gattung *Curcuma* Linn. durch die Stoffklasse der Curcuminoide. Die in der Natur nur selten vorkommenden Phenylbutenoide sind ein typisches Merkmal der Gattung *Zingiber*, vor allem *Zingiber montanum* (J. König) Link ex A. Dietr.. Die drei bis jetzt besprochenen Stoffklassen inklusive der Terpene haben ein breites biologisches Wirkungsspektrum wie zum Beispiel antifungale, antibakterielle, entzündungshemmende, antioxidative und anticancerogene Eigenschaften.

Die vorliegende Arbeit soll einen chemosystematischen Einblick in die große Familie der Zingiberaceae geben. Mit Hilfe von verschiedenen Bioassays werden die biologisch aktiven Inhaltsstoffe, durch welche die behandelten Gattungen eine so große wirtschaftliche Bedeutung erlangten, detektiert, isoliert und auf Ihre antifungale Wirksamkeit getestet.

## 2. Systematik und Morphologie

### 2.1. Systematik der Ordnung Zingiberales

Die Ordnung Zingiberales werden aufgrund der Anzahl der fertilen Staubblätter in acht Familien und zwei morphologische Gruppen eingeteilt. Die vier Familien der Musaceae, Strelitziaceae, Lowiaceae und Heliconiaceae sind durch fünf fertile Staubblätter und bananenähnliche Laubblätter gekennzeichnet und sind auch als „banana-families“ bekannt. Die Cannaceae und Marantaceae mit je einem fertilen Staubblatt und einem Antherensack und die Zingiberaceae und Costaceae mit je einem fertilen Staubblatt und zwei Antherensäcken werden in die zweite Gruppe der „ginger-families“ gestellt (KRESS et al., 2001). Die Zingiberaceae wurden von DAHLGREN et al. (1985) zur Ordnung der Zingiberales gestellt, die eine charakteristische monophyletische Gruppe in den Monokotyledonen darstellt. Die Anwesenheit von ultraviolett fluoreszierenden Inhaltsstoffen, das Epikutikularwachs des Strelitzia-Typs und das stärkereiche Endosperm unterstreichen die Verwandtschaft der Zingiberales mit den Commeliniden, Bromeliniden, Gräser und Seggen (APG, 1998). Die Beziehungen zwischen den Familien der Zingiberales wurde von morphologischen, anatomischen, phytochemischen, cytologischen, palynologischen und molekularen Analysen bestätigt (LARSEN & LARSEN, 2006).

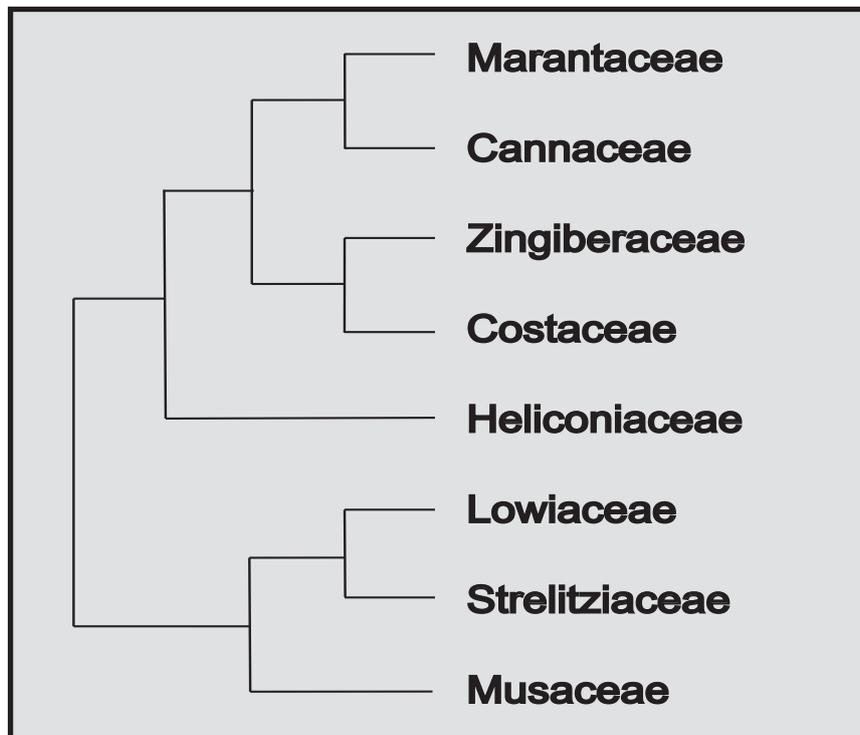


Abb. 2.1.: Stammbaum der acht Familien der Zingiberales aus KRESS et al., 2001

## 2.2. Systematik und Verbreitung der Familie Zingiberaceae

Die Zingiberaceen bilden die größte Familie der Ordnung Zingiberales. Sie sind pantropisch verbreitet, wobei die Gattung *Renealmia* auch in den Neotropen, vier Gattungen (*Aframomum* K. Schum. , *Aulotandra* Gagnep. , *Siphonochilus* J. M. Woods & Franks und *Renealmia* L.) in Afrika und die restlichen in Ost-Asien und den Pazifischen Inseln verbreitet sind (KRESS et al., 2002). Keine der 45 in Asien vorkommenden Gattungen sind in Afrika und Amerika heimisch, auch die im nördlichen tropischen Australien vorkommenden Gattungen stammen ursprünglich aus Asien (LARSEN & LARSEN, 2006). In früheren Studien war die Familie Costaceae in den Zingiberaceae inkludiert, durch das Fehlen der aromatischen Öle, die verzweigten Achsen und der spiralen monostichen Blattstellung gilt sie heute als Schwesternstamm der Ingwergewächse (SPECHT et al., 2001). Die zur Zeit anerkannte Klassifikation der Zingiberaceae enthält vier Unterfamilien (Siphonochiloideae, Tamijioideae, Alpinioideae, Zingiberoideae) und sechs Triben (Abb. 2.2.) (KRESS et al., 2002).

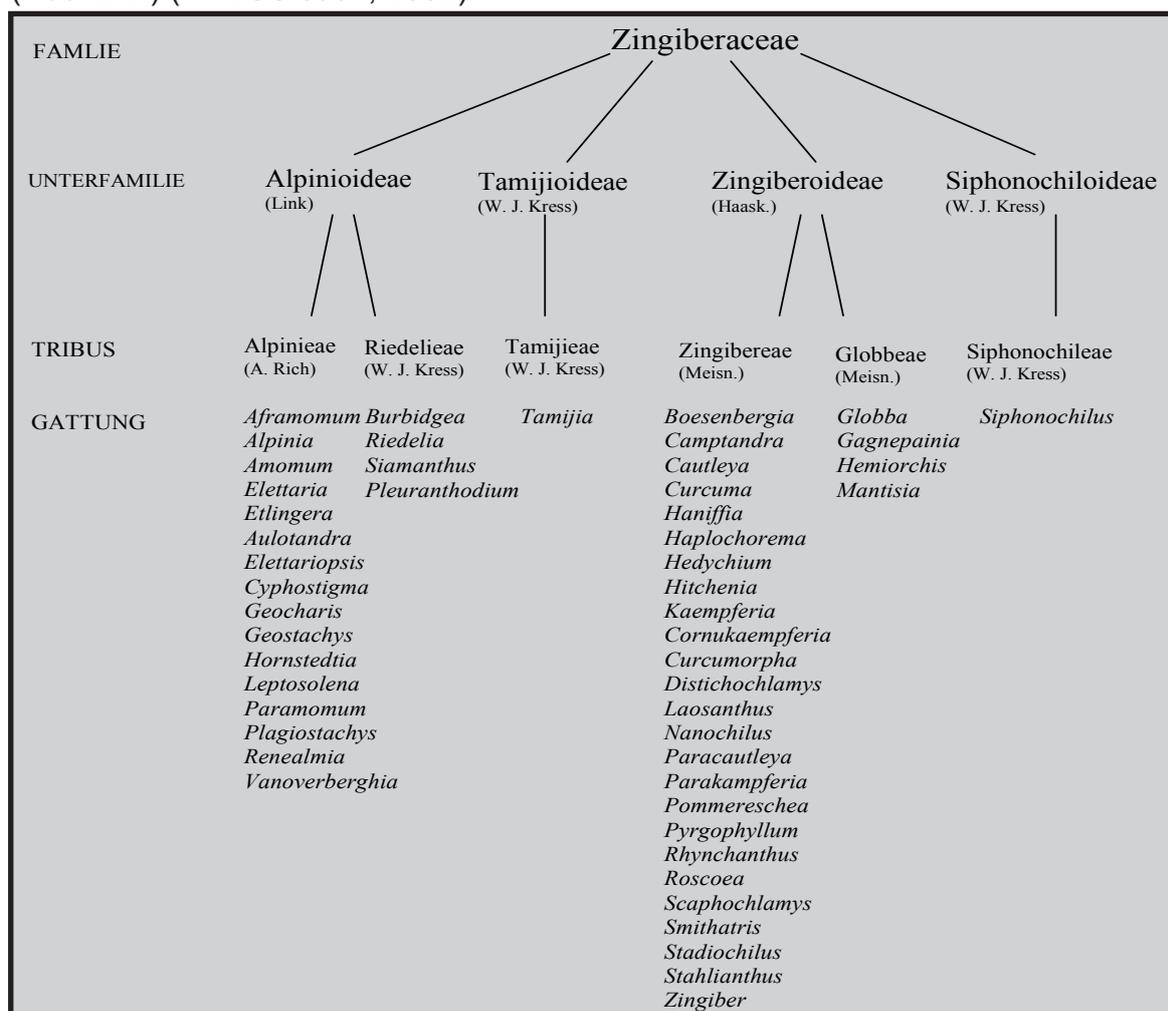


Abb. 2.2.: Anordnung der Unterfamilien, Triben und Gattungen der Familie Zingiberaceae nach KRESS et al. 2002.

### 2.2.1. Die Gattung *Alpinia* Roxb.

Der Gattungsname *Alpinia* Roxb. wurde als erstes von Linne´ für die neotropische *Alpinia racemosa* L. verwendet und in die Tribus Alpinieae eingegliedert (KRESS et al., 2005). *Alpinia* ist mit ca. 230 Arten die größte und am weitesten verbreitete Gattung der Zingiberaceae, ihr heutiges Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Sri Lanka und den westlichen Ghats in Indien bis China, Japan, dem gesamten süd-östlichen Asien, dem Pazifik bis Fiji, Samoa, Caroline Islands und in Australien bis New South Wales. Die meisten Arten wachsen in niederen und mittleren Waldlagen und erreichen eine Höhe von einem bis drei Meter, jedoch können sie wie z.B. *A. regia* R.M. Smith und *A. boia* Seem. auf den Fiji-Inseln auch Wuchshöhen von bis zu acht Meter erreichen. Einige Arten wurden in Neu Guinea und Sulawesi auch in montanen Wäldern bis 2000m Seehöhe gefunden. Die am nördlichsten vorkommende Art ist *A. japonica* (Thunb.) Miq., welche auch die strengen Winter im Norden Tokyos übersteht. Die Mehrheit der Arten der Gattung *Alpinia* sind in der Region von Malaysia zu finden. Charakteristisch für *Alpinia* sind große immergrüne Blätter, ein starkes Rhizom und eine terminale Infloreszenz. Die Ausbildung der Infloreszenz ist vielfältig und reicht von einer wenigblütigen Ähre (*A. oxymitra* K. Schum.) zu vielverzweigten Thyrsen (*A. galanga* (L.) Willd. und *A. javanica* Blume), ebenso variiert die Blütengröße von sehr klein (*A. conchigera* Griff.) zu sehr groß (*A. zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm. und *A. malaccensis* (Burm.f.) Roscoe (LARSEN & LARSEN, 2006).

Phytochemisch wird die Gattung *Alpinia* durch Terpenoide, Diarylheptanoide, Phenylpropanoide und Flavonoide gekennzeichnet. Davon sind die Mono- und Sesquiterpene in der Familie weiter verbreitet, die Gattungen *Alpinia*, *Aframomum* und *Hedychium* bilden weiters Labdan-Diterpene. Phenylpropanoide werden außerhalb der Gattung *Alpinia* in der Gattung *Kaempferia* synthetisiert (PANCHAROEN et al., 2000).



Abb. 2.3.: *A. galanga* Infloreszenz Foto: Christian Gilli

### 2.2.2. Die Gattung *Curcuma* Linn.

Das Diversitätszentrum der Gattung *Curcuma* Linn. liegt im kontinentalen Asien, vor allem in Thailand ist sie häufig vertreten. Die Blätter sind eiförmig bis elliptisch, an der Basis verschmälert und an der Spitze zugespitzt. Das stark verzweigte Rhizom besitzt die für die Gattung typische gelb-orange Färbung und bildet an den Enden Knollen. Die Infloreszenz steht meist terminal an der Blattachse oder bildet einen lateralen Blütenpross. Bei den meisten Arten besteht der distale Teil der Infloreszenz aus sterilen Hochblättern (Coma) welche häufig auffallend gefärbt sind, jedoch nicht in derselben Farbe wie die fertilen Blüten (Abb. 2.4.). Die in den nördlichen Gebieten vorkommenden Arten wie *C. ecomata* Craib und *C. glans* K. Larsen & Mood bilden die Infloreszenz bereits in der Trockenzeit vor der Blattentwicklung, jedoch die Vielzahl der Arten bilden die Infloreszenz gleichzeitig mit dem Blattsproß aus. Einige Arten wie *C. alismatifolia* Gagnep. mit dunkelvioletten Blüten und pinkfärbigen Coma und *C. racemosa* mit rot-orangen Tragblättern, weißen Blüten und fehlendem Coma haben weltweit einen großen Stellenwert als Zierpflanzen. Durch die Verwendung als Gewürz und Heilpflanze in der traditionellen chinesischen Medizin ist *C. longa* L. die am häufigsten kultivierte Art der Gattung (LARSEN & LARSEN, 2006).

Phytochemisch wird die Gattung *Curcuma* charakterisiert durch die Stoffklassen der Curcuminoide und Sesquiterpene. Die Curcuminoide aus der Gruppe der Diarylheptanoide sind gelb gefärbte Substanzen die für ihre antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften bekannt sind. Diarylheptanoide sind in den Gattungen *Alpinia*, *Curcuma* und *Zingiber* vertreten. Die Curcuminoide sind für die Verwendung von *Curcuma*-Arten als Arzneidroge und Gewürz verantwortlich (PANCHAROEN et al., 2000).

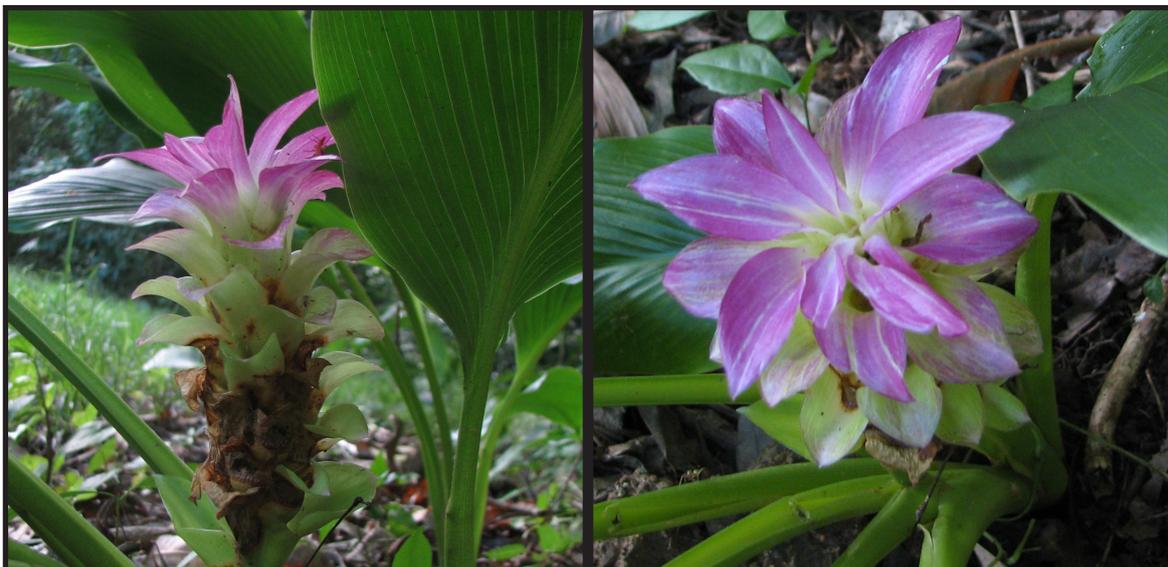


Abb. 2.4.: *C. australasica* Hook. F. Infloreszenz Foto: Christian Gilli

### 2.2.3. Die Gattung *Zingiber* Miller

Die Gattung *Zingiber* wurde 1754 von Miller erstmals als Zinziber erwähnt, die geänderte Schreibweise wurde sechs Jahre später durch den deutschen Botaniker Georg Böhmer veröffentlicht. Verbreitet ist die Gattung von Süd bis Süd-Ost Asien über China und Japan bis zum nördlichen tropischen Australien und besitzt ca. 150 Arten (THEILANDE, 1999). *Zingiber*-Arten sind mittelgroße (30 bis 180 cm) Pflanzen und tragen ihre Infloreszenz auf einem kurzen separaten Blütenspross der direkt aus dem Rhizom entspringt (Abb. 2.5.), mit Ausnahme von *Z. pellitum* Gagnep., *Z. junceum* Gagnep. und *Z. gramineum* Noronha, die eine terminale Infloreszenz besitzen (BRANNEY, 2005). Die zahlreichen Blätter besitzen an der Basis der Lamina eine charakteristische Verdickung (Pulvinus), diese Struktur wurde bis jetzt nur bei der Gattung *Zingiber* und einigen Arten der Marantaceae gefunden. Das deutlichste Bestimmungsmerkmal der Gattung *Zingiber* ist die Anthere, welche eine längliche, den Griffel umfassende Struktur besitzt und über die Anthere ragt (Abb. 2.5.). *Z. officinale* Roscoe ist die bekannteste und am häufigsten verwendete Art der Familie. Durch die häufige Anwendung von Ingwer in Speisen, Getränken und auch medizinischen Produkten ist er eine der wichtigsten wirtschaftlichen Pflanzen im asiatischen Raum. Große Bedeutung in der traditionellen asiatischen Medizin haben auch die Arten *Z. zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm., *Z. ottensii* Valetton und *Z. montanum* (J.König) Link ex A. Dietr. (LARSEN & LARSEN, 2006).

Phytochemisch ist die Gattung *Zingiber* gekennzeichnet durch die Stoffklassen der Phenylbutenoide, Gingerole (Arylalkanoide), Curcuminoide, Sesquiterpenoide und Flavonoide. Dabei treten Phenylbutenoide in der Natur sehr selten auf, bisher wurden diese ausschließlich in der Gattungen *Zingiber* und in wenigen *Alpinia*-Arten nachgewiesen (KIKUZAKI et al., 2001). Bei *Z. montanum* (J. König) Link ex A. Dietr. (Synonym *Z. cassumunar* Roxb.) stellen diese den Hauptbestandteil der Stoffausstattung dar. Gingerole und deren Derivate treten als Hauptbestandteil in *Z. officinale* auf. Außerhalb der Gattung *Zingiber* wurden Gingerole auch in den Samen von *Aframomum melegueta* K. Schum. (Synonym *Amomum melegueta* Roscoe) gefunden. Flavonoide und deren verwandte Derivate sind in der Familie außerhalb der Gattung *Zingiber* auch in den Gattungen *Alpinia*, *Aframomum*, *Boesenbergia* und *Kaempferia* vertreten (PANCHAROEN et al., 2000).



Abb. 2.5.: links oben: *Z. ottensii* ZIN 060013, rechts oben: *Z. montanum* ZIN 060024, links unten: *Z. ottensii* ZIN 060013, rechts unten: cf. *Z. newmanii* Fotos: Christian Gilli, Johann Schinnerl

### 3. Material und Methode

#### 3.1. Pflanzenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die unterirdischen Organe (Rhizome) verschiedener Arten der Familie Zingiberaceae aus den Gattungen *Zingiber*, *Alpinia* und *Curcuma* untersucht. Das Pflanzenmaterial wurde im Rahmen einer phytochemischen Exkursion nach Thailand im Februar 2006 auf Märkten gekauft.

Die Pflanzen wurden im Botanischen Garten der Universität Wien (HBV) kultiviert und anhand der morphologischen Merkmale die Art bestimmt. Zur Dokumentation wurden von allen Aufsammlungen Herbarbelege angefertigt. Abbildungen des Herbars sind im Anhang (Kap. 7.2.) zu finden.

Art	Herkunft	Garten-, Herbarnr.
<i>Zingiber officinale</i>	Thailand, Ubon Ratchathani Warin Market	ZIN 090042
– II –	Thailand, Province Trang, Trang Market	ZIN 070005
– II –	China, gekauft in Wien, Gemüsemarkt Donauzentrum	ZIN 060054
<i>Z. montanum</i>	Thailand, Province Nakhon Ratchisma Pak Thong Chai Market	ZIN 060024
– II –	– II –	ZIN 060032
– II –	Thailand, Bangkok, Chatuchak Market	ZIN 090004
– II –	Thailand, Province Nakhon Ratchisma Pak Thong Chai Market	ZIN 060036
– II –	Thailand, Bangkok, Chatuchak Market	ZIN 060035
<i>Z. ottensii</i>	– II –	ZIN 060013
<i>Z. spectabile</i>	Thailand, Kaset Fair Market	ZIN 090008
<i>Curcuma longa</i>	Thailand, Bangkok, Chatuchak Market	ZIN 060037
– II –	– II –	ZIN 060038
– II –	– II –	ZIN 060039
– II –	– II –	ZIN 060040
– II –	– II –	ZIN 060041
<i>Curcuma sp.</i>	– II –	ZIN 060001
– II –	– II –	ZIN 060004
– II –	– II –	ZIN 060028
– II –	– II –	ZIN 060014
– II –	– II –	ZIN 060006
<i>Alpinia galanga</i>	– II –	ZIN 060021
– II –	Thailand, Province Nakhon Ratchisma Pak Thong Chai Market	ZIN 070006
<i>A. roxburghii</i>	Thailand, Province Chiang Mai, Doi Ang Khang	ZIN 070010
<i>A. nigra</i>	Thailand, Province Chiang Mai, Ban Louang Lia	ZIN 070009
<i>A. malaccensis</i>	Thailand, Province Chiang Mai, near Chiang Dao	ZIN 070008
<i>Kaempferia parviflora</i>	Thailand, Bangkok, Chatuchak Market	ZIN 060017

Tab.3.1.: Herkünfte der untersuchten Arten

## 3.2. Testorganismen

### 3.2.1. *Cladosporium sphaerospermum* Penz.

Fungi imperfecti oder Deuteromycetes sind Vertreter höherer Pilze (Ascomyceten und wenige Basidiomyceten) in deren Entwicklungszyklus die Phase der sexuellen Befruchtung fehlt. Die Vermehrung erfolgt durch asexuell gebildete Sporen (Konidien) oder rein vegetativ. Sie gehören zu den bis jetzt am häufigsten isolierten Pilzen und übernehmen große Bedeutung in der Pilzflora von Böden und Luft. Die Gattung *Cladosporium* wurde erstmals durch Link (1816) mit nur vier Arten beschrieben. Durch die heute üblichen DNA-Analysen wurden die wesentlich komplexeren Verwandtschaftsverhältnisse bekannt. Phylogenetisch ist *C. sphaerospermum* in der monophyletischen Gruppe der Davidiellaceae eingegliedert. Isoliert und beschrieben wurde dieser erstmals von Zitrusblättern in Italien durch Penzig (1882) (ZALAR et al., 2007). *C. sphaerospermum* (Abb. 3.1.) ergibt durch die Ausbildung dunkler Sporen und der hohen Empfindlichkeit gegenüber bestimmter Pflanzeninhaltsstoffen einen idealen Testpilz.

Der Testpilz *C. sphaerospermum* wurde von Günter Kraus in Wien aus der Luft isoliert und am Institut für Botanik, Abteilung Systematik und Phylogenie von Alexander Urban und Carolin Rebernick mittels ITS-Primer sequenziert.

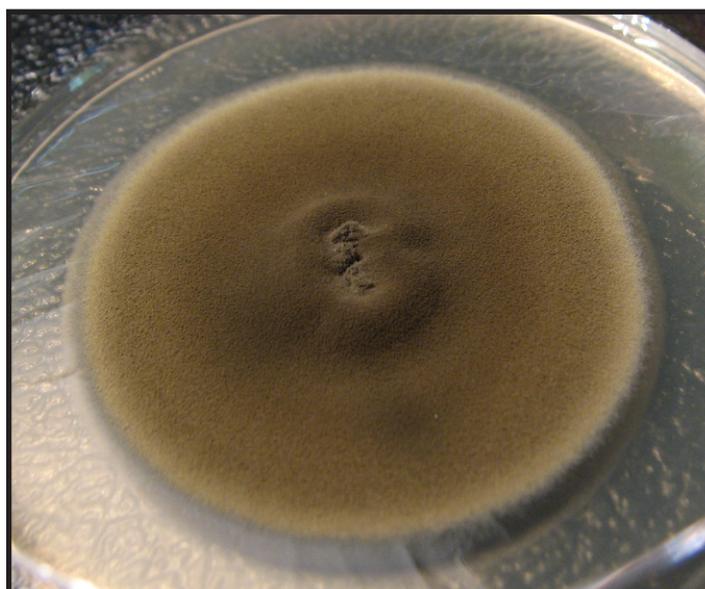


Abb. 3.1.: Reinkultur von *Cladosporium sphaerospermum* auf Malzextraktagar 2% Foto: Christian Gilli

### 3.3. Phytochemische Methoden

#### 3.3.1. Extraktion

Die zerkleinerten Rhizome wurden mit flüssigem Stickstoff übergossen, mit Methanol (MeOH) überschichtet und im dunklen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach fünf Tagen wurde der Erstextrakt abfiltriert, ein Zweitextrakt angesetzt und ebenfalls im dunkeln bei Raumtemperatur extrahiert. Nach weiteren fünf Tagen wurde der Zweitextrakt abgefiltert und mit dem Erstextrakt vereint. Der MeOH-Extrakt wurde am Rotovapor bei 30°C eingengt und mit Chloroform:Aqua dest. (2:1, vv) ausgeschüttelt, wobei in der Chloroformphase der überwiegende Anteil der zu analysierenden Stoffe enthalten ist. Zur weiteren Verwendung wurde eine Konzentration von 10mg/ml MeOH eingestellt, die Zwischenlagerung erfolgte bei -20°C im Kühlschrank.

#### 3.3.2. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Durch die hohe Trennleistung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie kann durch die Auftrennung der Gesamtextrakte ein erster Überblick der vorhandenen Substanzen gewonnen werden. Mit dem UV-Diodenarraydetektor werden die UV-Spektren gemessen, zusammen mit den Retentionszeiten geben diese Auskunft über die enthaltenen Stoffe.

Gerät:	Agilent 1100 Series mit UV-Diodenarraydetektor
Säule:	Agilent Hypersil® BDS-C 4,6x250mm, 18,5µm
Laufmittel:	Gemisch aus wässrigem Puffer (o-Phosphorsäure 0,015mol und Tetrabutylammoniumhydroxid 0,0015mol, pH=3; nach REISCH et al., verändert) und MeOH (Gradient-grade) entsprechend Tab. 3.2; Flow: 1ml/min
Probe:	Gesamtextrakt in Konzentration von 10mg/ml MeOH, über Merck Kieselgel RP-8 (Korngröße 25-40µm) filtriert; Einspritzvolumen 10µl

Zeit [min]	MeOH [Vol.%]	Puffer [Vol.%]
0,01	50	50
20	80	20
23	100	-
30	100	-

Tab. 3. 2. Laufmittelgradient HPLC

### 3.3.3. Präparative Methoden

#### 3.3.3.1. Dünnschichtchromatographie DC

Begleitend zu den phytochemischen Methoden wurden DC-Analysen auf ALUGRAM SIL G/UV254 (0,20mm Kieselgel 60 Machery-Nagel GmbH & CO. KG) durchgeführt. Für die Detektion der vorhandenen Inhaltsstoffe mit chromophoren Gruppen wurde die DC-Platte unter UV-Licht bei 254nm (fluoreszenzlöschende Eigenschaft der Stoffe) und bei 366nm (Eigenfluoreszenz der Substanzen) analysiert. Mit dem Besprühen des Reagenzes Anisaldehyd (85ml Methanol, 10ml Eisessig, 8ml Schwefelsäure, 0,5ml Anisaldehyd) und anschließender Erwärmung konnten auch Substanzen ohne chromophore Gruppen sichtbar gemacht werden.

#### 3.3.3.2. Trockensäule

Eine erste Auftrennung der Gesamtextrakte erfolgte durch Eluation mit steigenden Polaritäten der Lösungsmittel (Tab. 3.3.) mittels Säulenchromatographie (Länge: 70cm, Durchmesser: 20mm, 60g Kieselgel 60, Korngröße 0,2-0,5mm, Fa. Merck). Das Eluat wurde in 50ml Fraktionen geschnitten und am Rotovapor bei 30°C eingengt. Die Menge wurde bestimmt und eine Konzentration von 5mg/ml Methanol eingestellt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels HPLC und DC-Platten analysiert und verglichen.

Petrolether (PE) [ml]	Aceton [ml]	MeOH [ml]	Fraktionen [je 50ml]
100	-	-	I1+I2
85	15	-	II1+II2
70	30	-	III1+III2
50	50	-	IV1+IV2
20	80	-	V1+V2
-	100	-	VI1+VI2
-	85	15	VII1+VII2
-	70	30	VIII1+VIII2
-	50	50	IX1+IX2
-	-	100	X1+X2

Tab. 3.3.: Laufmittel Trockensäule

### 3.3.3.3. Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)

Eine weitere Auftrennung der einzelnen Trockensäulenfraktionen erfolgte durch die präparative MPLC. Die Fraktionen wurden am Rotavapor bei 30°C eingeeengt, die Menge bestimmt und eine Konzentration von 1mg/ml MeOH oder Diethylether (Et<sub>2</sub>O) eingestellt. Weiters wurden die einzelnen MPLC-Fraktionen durch HPLC und DC-Platten auf ihre Reinheit analysiert.

Detektor:	ISCO UA-6 UV/VIS Detektor
Säule:	Lobar® Glassäule 440x37mm, befüllt mit Merck Kieselgel LiChroprep™ SI 60 (Korngröße 40-63µm)
Pumpe:	Taumelkolbenpumpe QD-1 SSY (1-10bar) Fluid Metering, Inc.
Fluss:	30ml/min bei 2,0-3,0bar
Laufmittel:	Petrolether (PE)/Ethylacetat (EtOAc)-Mischungen mit steigender Polarität in 5%-Schritten bis 100% EtOAc

### 3.3.3.4. Präparative Dünnschichtchromatographie

Substanzen, die als Gemisch vorlagen, wurden mit Hilfe der präparativen DC (TLC Silica gel 60 F254 Glassplates 20x20cm, Fa. Merck KgaA) nachgereinigt. Die verwendeten Laufmittelgemische wurden experimentell ermittelt. Bei den erhaltenen Reinstoffen wurde die Menge bestimmt und eine Konzentration von 1mg/ml MeOH oder Et<sub>2</sub>O eingestellt. Die Kontrolle auf Reinheit erfolgte durch HPLC-Analysen und DC.

## 3.3.4. Spektroskopische Methoden

### 3.3.4.1. UV-VIS-Spektroskopie

Die UV-VIS-Spektren wurden durch den UV-Diodenarraydetektor der HPLC aufgenommen.

### 3.3.4.2. IR-Spektroskopie

Die Messung der Reinstoffe erfolgte in CCl<sub>4</sub> durch ein NaCl-Fenster (Weite: 0,5mm) an einem 16PC FT IR-Spektrometer von Perkin Elmer. Die Einteilung der Intensität der Absorptionssignale wurde mit s (strong), m (medium) und w (weak) im Spektralkatalog (Kap. 7.1.) vorgenommen.

### **3.3.4.3. NMR-Spektroskopie**

Die NMR-Spektren wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Wien an einem AM-400 WB und WM 250 FT-Spektrometer von Bruker in deuteriertem Chloroform gemessen und ausgewertet.

### **3.3.4.4. Massenspektroskopie**

Die Massenspektren wurden ebenfalls am Institut für Organische Chemie der Universität Wien an einem Varian MAT 311 A Spektrometer durchgeführt und ausgewertet.

## **3.4. Bioassay *Cladosporium sphaerospermum***

### **3.4.1. Kultivierung und Sporengewinnung**

Für die langfristige Lagerung werden Mycelstückchen in einem Konservierungsmedium in Cryoröhrchen (Nunc, InterMed) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Kultivierung werden je drei Mycelblöcke auf Malzextraktager (MEA)-Platten aufgebracht und über drei Tage unter Lichtausschluß gelagert. Das sporulierende Mycel wird vor der Ernte mit dem Mikroskop auf ausreichende Anzahl an Sporen untersucht. Die Platten werden mit 5ml 0,9%iger NaCl-Lösung überschichtet, die Sporenlösung filtriert, zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, der Rückstand in Malz-Bouillon aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Konservierungsmedium:	500ml	Aqua dest.
(14% Saccharose, 1% Pepton)	70g	Saccharose
	5g	Pepton aus Sojamehl Fa. Merck KGaA
	Sterilisation: 15min bei 121°C (1atm)	
Malzextraktagar (MEA):	500ml	Aqua dest.
	10g	Malzextrakt für Mikrob. Fa. AppliChem GmbH
	10g	D-Glucose Monohydrat p.a. Fa. Loba Feinchemie
	0,5g	Pepton aus Sojamehl Fa. Merck KGaA
	10g	Agar Fa. Merck KGaA
	Sterilisation: 15min bei 121°C (1atm)	
Malz-Bouillon (2%):	500ml	Aqua dest.
	10g	Malzextrakt für Mikrob. Fa. AppliChem GmbH
	Sterilisation : 15min bei 121°C (1atm)	
NaCl-Lösung (0,9%):	500ml	Aqua dest.
	4,5g	NaCl p.a. Fa. Merck KGaA
	Sterilisation: 15min bei 121°C (1atm)	

Tab. 3.4.: Zusammensetzung der Medien für Bioassay

### 3.4.2. Keimzahlbestimmung

Die Sporensuspension wird in einer Verdünnungsreihe mit Malz-Bouillon um den Faktor 1:10 verdünnt und 20µl auf einer MEA-Platte strichförmig aufgetragen. Nach drei Tagen werden die Kolonien der kleinsten sichtbaren Verdünnung ausgezählt und auf die Vollkonzentration aufgerechnet. Für die Bioautographie und Elisa-Essays werden Sporenkonzentration von  $10^8$  bzw.  $10^4$  pro 10ml Malz-Bouillon eingestellt.

### 3.4.3. Bioautographie auf Dünnschichtplatten

#### 3.4.3.1. Bioautographie auf DC mit Gesamtextrakten

Um einen ersten Überblick der antifungalen Inhaltsstoffe zu bekommen wurden parallel zu den DC-Platten der phytochemischen Untersuchungen (vgl. Kapitel 3.3.3.1.) DC-Platten mit Sporensuspension besprüht. Nach dreitägiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß erfolgt eine Bestrahlung der Platten mit UV-Licht und Fixierung mittels transparenter Klebefolie.

#### 3.4.3.2. Bioautographie auf DC konzentrationsabhängig

Gesamtextrakte und Reinstoffe werden in verschiedenen Konzentrationen punktförmig aufgetragen und die DC-Platten wie in Kapitel 3.4.3.1. beschrieben behandelt. Für die Einstellung der Konzentrationen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (Tab. 3.5.).

Konz. Gesamtextrakt [µg/20µl Aceton p.a.]:	2000	1000	500	250	125
Konz. Reinstoff [µg/20µl Aceton p.a.]:	200	100	50	25	12,5

Tab. 3.5.: Konzentrationsangaben Gesamtextrakte und Reinstoffe

### 3.4.4. Stoffwechselaktivität mittels MTT

MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid) ist ein gelbes Tetrazoliumsalz das durch ein mitochondriales Enzym (Succinat-Dehydrogenase) in lebenden stoffwechselaktiven Zellen wasserunlösliche blaue Formazankristalle bildet (ALTMANN, 1976) (Abb. 3.4.). Durch diesen Assay wird die Stoffwechselaktivität des Pilzes unter Beeinflussung der Gesamtextrakte und Rohstoffe gemessen. Die Absorption des gebildeten Formazans wird bei 560nm an einem Spektrophotometer (Elisa Sunrise-Basic Tecan) bestimmt und mittels Statistikprogramm SPSS 10 ausgewertet.

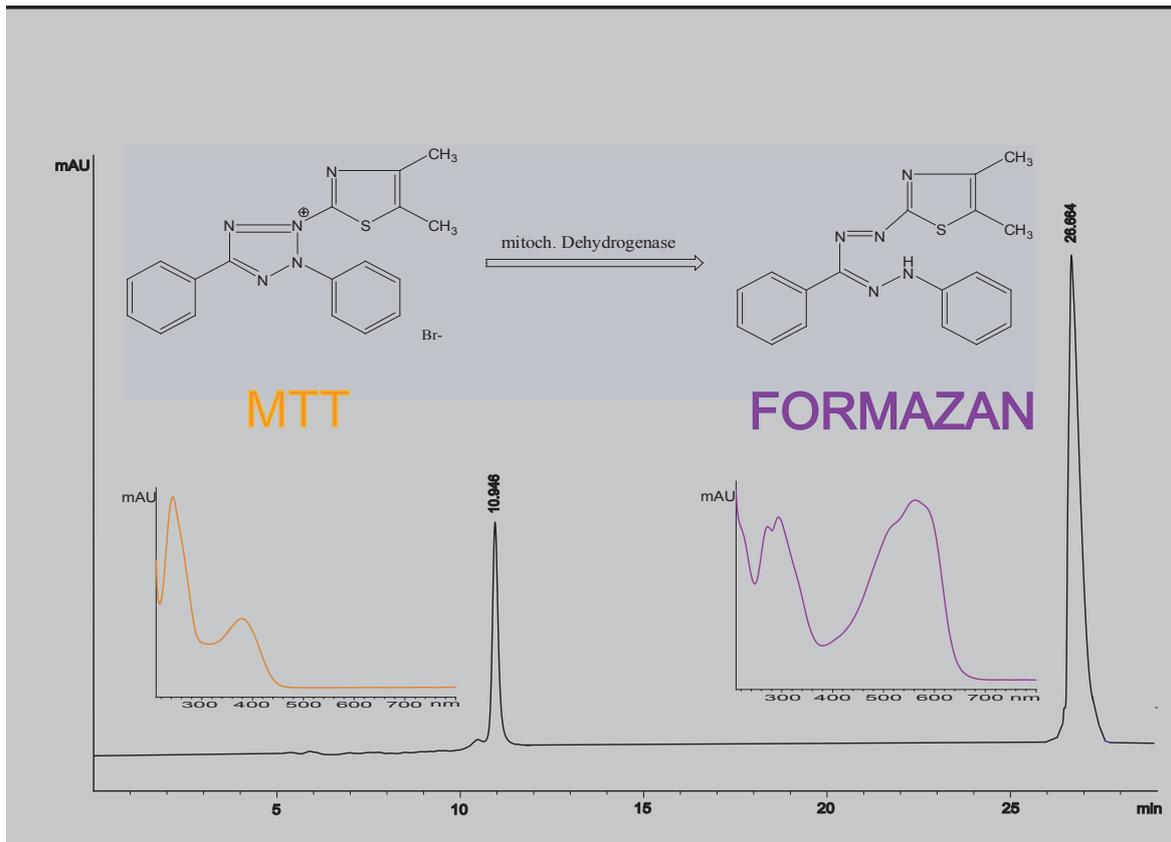


Abb. 3.3.: Synthese des gelben MTT durch die mitochondrielle Dehydrogenase zu blauen Formazankristallen, HPLC-Chromatogramm und Spektren von MTT und Formazan.

Für die Präparation der Stammlösung werden je 2mg Testsubstanz der Reinstoffe und 20mg Testsubstanz der Gesamtextrakte in 250µl Aceton p.a. aufgenommen. Eine 2%-Malzbouillon-Lösung und eine Reaktionslösung mit 5mg MTT/ml Aqua dest. werden vorbereitet. Für die Erstellung der Verdünnungsreihen werden jeweils 50µl der Malzbouillon-Lösung in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert, wobei die erste Reihe der Wells frei bleibt. Die Stammlösung wird in 4750µl 2%-Malzbouillon aufgenommen und mit einem Tropfen Tween 80 (Serva, Feinbiochemica) versetzt, 100µl dieser Lösung werden in die erste Reihe der Wells pipettiert. Um die Verdünnungen 1:2 zu erhalten entnimmt man 50µl aus dem ersten Well und pipettiert sie in das zweite, von diesem entnimmt man ebenfalls 50µl und pipettiert sie in das dritte Well, das wird bis zum letzten Well durchgeführt. 50µl Sporensuspension (vgl. Kapitel 3.4.2.) werden jedem Well zugefügt. Die Endkonzentration sollte 0,5g/ml MTT (FREIMOSER et al., 1999) und 5% organisches Lösungsmittel (ENGELMEIER, 1997) nicht überschreiten, ansonsten könnte eine Hemmung des Pilzwachstums auftreten. Nach achtstündiger Inkubationszeit unter Lichtausschluß und Raumtemperatur werden jedem Well 15µl MTT-Lösung zugesetzt.

Nach weiteren acht Stunden Inkubation unter Lichtausschluß und Raumtemperatur erfolgt eine Zentrifugation (15.000xg für 5min), der Überstand wird vorsichtig abpipettiert. Durch Zugabe von jeweils 200µl Isopropanol werden die Formazankristalle extrahiert, die Mikrotiterplatten 15min geschüttelt und abermals zentrifugiert. 150µl des Überstandes überführt man in neue Mikrotiterplatten. Die Messung der Extinktion erfolgt an einem Elisa bei 560nm (Referenzmessung bei 690nm), ein Blank mit Isopropanol wird abgezogen. Die Berechnung erfolgt durch das Programm SPSS 10.

## 4. Stoffklassen

### 4.1. Stoffklasse der Gingerole

Gingerole sind die typischen scharfschmeckenden Inhaltsstoffe von *Zingiber officinale*. Diese biologisch aktiven Stoffe sind im wesentlichen für die medizinische Anwendung des Ingwers verantwortlich. Die Gingerole und Gingerolderivate kommen als Strukturen mit aliphatischen Seitenketten ( $n= 4,6,8,10$ ) in den Rhizomen vor, wobei [6]-Gingerol den mengenmäßig größten Anteil aufweist (Abb.4.1.) (ZARATE et al., 1996).

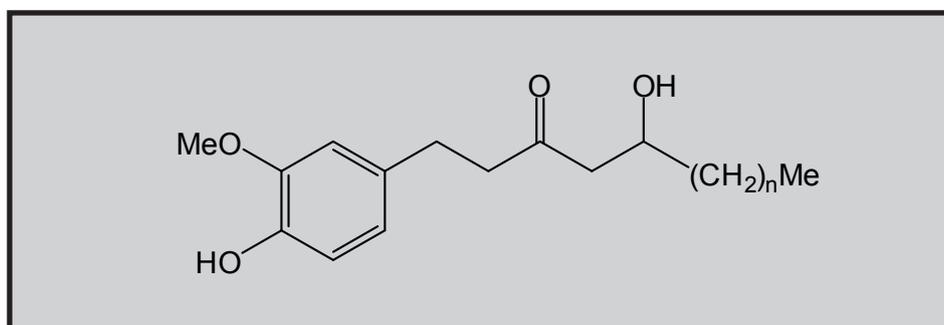


Abb. 4.1.: Gingerol-Grundstruktur

Gingerole sind durch die Anwesenheit der benachbarten Hydroxy- und Ketogruppe thermisch und in saurer Umgebung sehr labil und bilden durch Dehydratisierung Shogaole. In frischen Rhizomen ist der überwiegende Anteil der aktiven Komponenten Gingerol, hingegen bei getrockneten Rhizomen Shogaol, also das dehydrierte Produkt von Gingerol (BRANOWSKY, 1985; GOVINDARAJAN, 1982). Durch Hydrierung des Shogaols entsteht ein weiterer mengenmäßig beachtlicher Bestandteil der Scharfstoffe, das Paradol. Das Auftreten von Gingerolen, Shogaolen und Paradolen im Rhizom von *Z. officinale* ist von mehreren Faktoren abhängig wie geographischer Lage, Erntezeitpunkt, dem Alter des Rhizoms und der Methode der Extraktion (GRZANNA et al., 2005).

In letzter Zeit gab es einen deutlichen Anstieg an kommerziellen Ingwerprodukten für die Behandlung von chronischer Arthritis, Magenbeschwerden, Übelkeit, Reisekrankheit, Asthma, Atembeschwerden, Zahnschmerzen und Gingivitis mit Gingerolen und Shogaolen als Wirkstoffe. Die Stabilität dieser Inhaltsstoffe im Darm und Magen ist für die Wirkung und das pharmakologische Verständnis für die Anwendung maßgeblich entscheidend. Durch den Unterschied in der chemischen

Struktur zwischen Gingerol und Shogaol ist anzunehmen, dass diese Stoffe in ihrer Wirkung unterschiedlich auftreten. Shogaol besitzt durch den Verlust der Hydroxylgruppe eine deutlich höhere lipophile Eigenschaft als Gingerol, resultierend aus der unterschiedlichen Polarität tritt auch in der Wirkung eine Differenz auf (BHATTATAI et al., 2006). Studien von KIMURA et al., 1989 und PANCHO et al., 1989 ergaben, dass Gingerole die PGF $2\alpha$ -induzierte Muskelkontraktion in isolierten Mesenterienvenen von Mäusen erhöht, wohingegen Shogaol bei gleichen Versuchsbedingungen hemmend wirkt. Eine Kombination von Gingerol und Shogaol wirkt ebenfalls hemmend, dadurch kann die Aussage getroffen werden, dass die Wirkung von Shogaol potenter ist als jene von Gingerol.

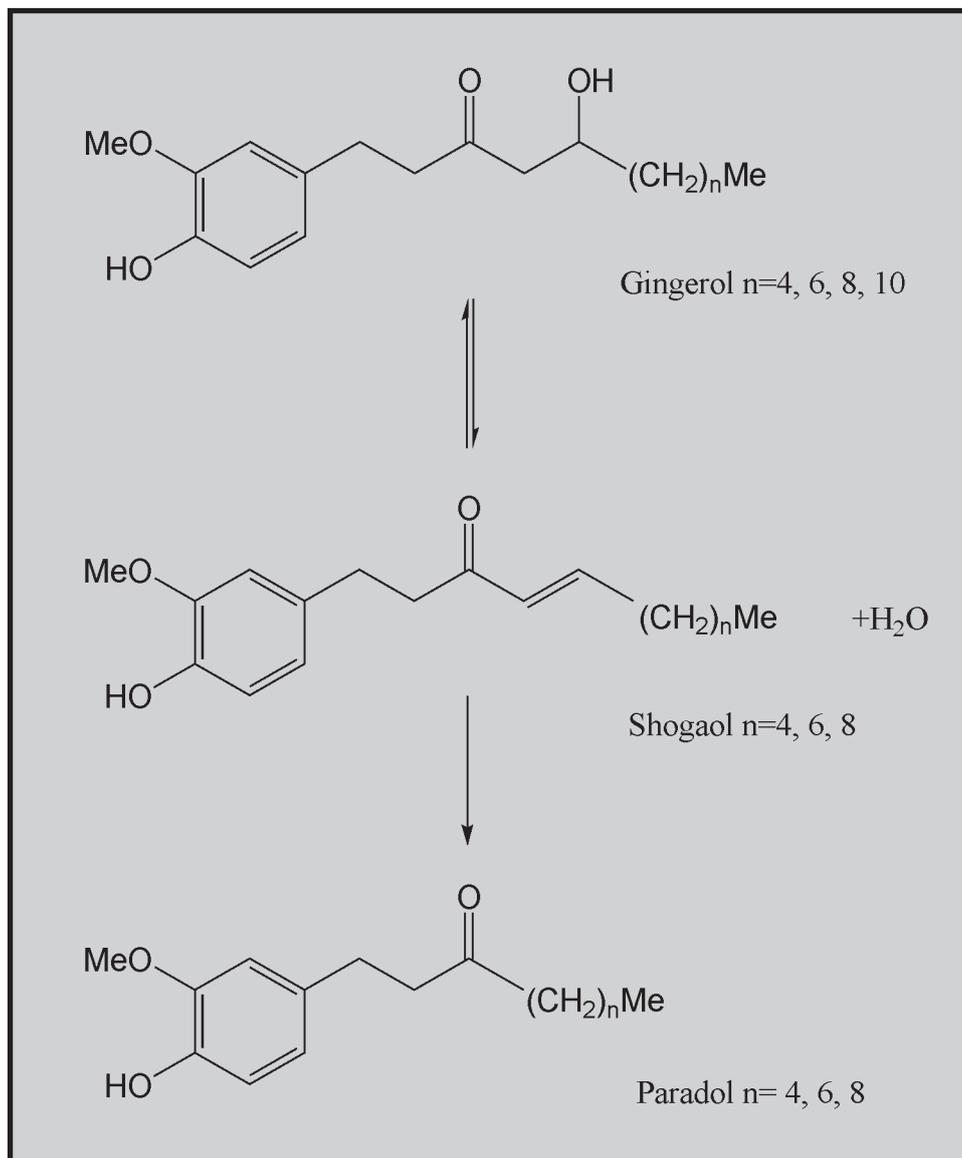


Abb. 4.2.: Schematische Darstellung des Prozesses der Dehydratisierung und Hydrierung von Gingerol verändert, aus GRZANNA et al., 2005

Gingerole und Gingerolderivate sind nicht nur wegen ihrer medizinischen Wirkung interessant, sie besitzen auch antifungale, antibakterielle, antihepatotoxische und insektizide Wirkung. Die Wirkung ist abhängig von der Länge der Alkylketten, wobei [8]-Gingerol die höchsten Aktivitäten aufweist, je kürzer und länger die Seitenketten sind, umso geringer fallen die Wirkungen aus. Ein Vergleich der antifungalen Eigenschaften mit *Microsporium gypseum* zwischen [6]-Gingerol und [6]-Gingerdiol ergab keine signifikanten Unterschiede (FICKER et al., 2003). Gingerole treten auch als Agonist der Vanilloidrezeptoren auf. Diese Rezeptoren werden durch Capsaicin aktiviert und verdächtigt, für das Auftreten von Gelenkschmerzen verantwortlich zu sein. Gingerole und Zingerone als Agonisten der Vanilloidrezeptoren eingesetzt können so wirksam als Analgetikum bei Gelenkschmerzen verwendet werden (DEDOV et al., 2002).

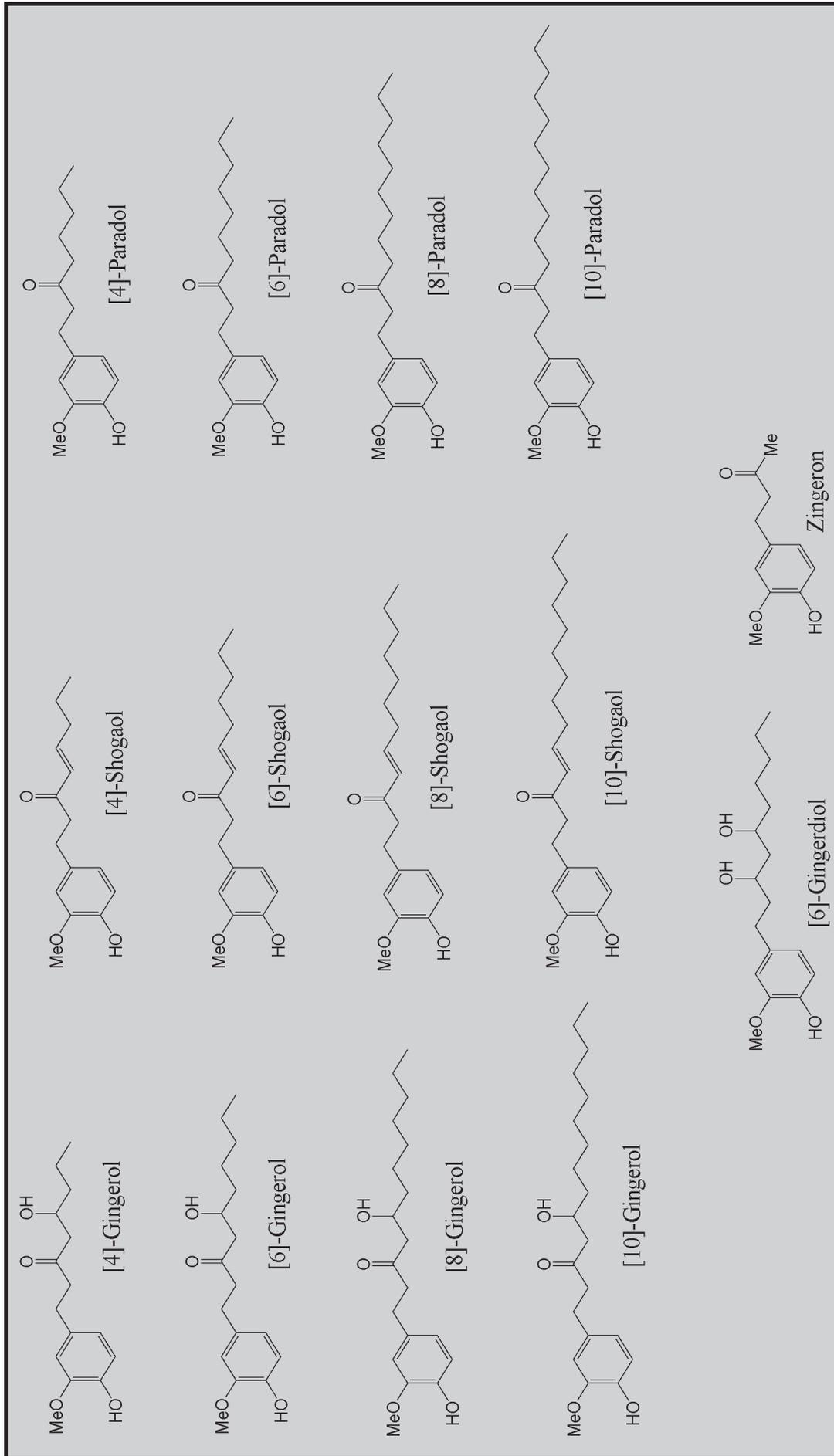


Abb. 4.3.: Überblick über die in *Z. officinale* gefundenen Gingerole und Gingerolderivate, verändert aus FUHRMANN et al., 2000; MINGHETTI et al., 2007; BHATTARAI et al., 2006; GRZANNA et al., 2005

## 4.2. STOFFKLASSE DER CURCUMINOIDE

Curcuminoide sind hauptsächlich in den Rhizomen verschiedener *Curcuma* Arten anzutreffen. Sie bestehen aus drei Hauptkomponenten wobei Curcumin (Abb. 4.4.) als mengenmäßig größte Substanz auftritt. Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin sind meist in geringeren Konzentrationen vorhanden. Curcuminoide sind aufgrund ihres konjugierten Doppelbindungssystems auffallend gelb-orange gefärbt und finden häufigen Einsatz als Gewürz und Lebensmittelfarbstoff. Curcumin ist bekannt für ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten wie entzündungshemmende, antioxidative und antikarzinogene Eigenschaften. In der traditionellen orientalischen Medizin wird *C. longa* bereits seit tausenden Jahren als Medizinalpflanze verwendet (HOEHLE et al., 2006). Die therapeutische Wirkung von Curcumin bei Alzheimer, alkoholinduzierten oxidativen Schäden von Leber, Nieren, Gehirn und Herz und myocardialen ischaemischen Schäden wurde an Tierversuchen erfolgreich nachgewiesen (SOMPARN et al., 2007).

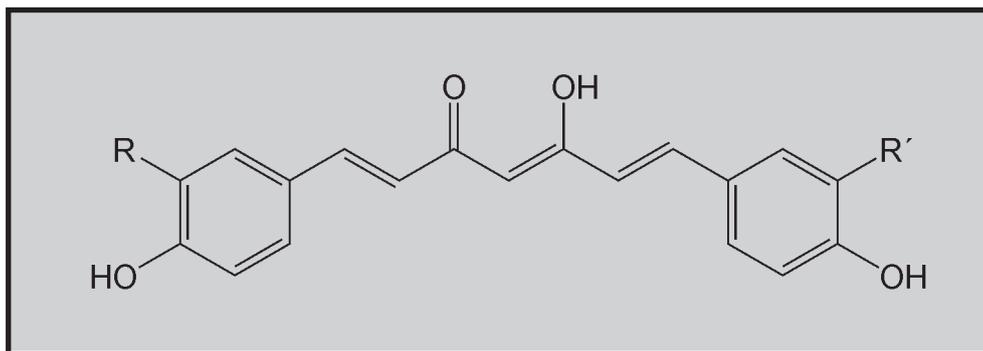


Abb. 4.4.: Grundstruktur Curcuminoide

Wie in Abb. 4.5. dargestellt bestehen Curcuminoide aus einer konjugierten Grundstruktur mit einer Diketofunktion welche zu einer Keto-Enol Tautomerie führt. In Lösung tritt ausschließlich die Enolform auf. Die antioxidativen Eigenschaften von Curcumin sind u.a. auf diese Reaktionen und der Formation von relativ stabilen freien Radikalen zurückzuführen. Möglicherweise werden die antioxidativen Eigenschaften nicht hauptsächlich vom Curcumin, sondern von dessen Metaboliten (vgl. Abb. 4.6.) herbeigeführt. Der Metabolismus von Curcumin und dessen Derivate wurde an Ratten in vivo und in vitro, an menschlichen Leber- und Inestinalzellen in vitro und Krebspatienten untersucht (HOEHLE et al., 2006). Durch fortlaufende Reduktion der vier Doppelbindungen des Heptadien-3,5-dion-Systems bilden sich die Metaboliten (Abb. 4.6.) mit Tetrahydrocurcumin und Hexahydrocurcumin als Hauptbestandteile. Dihydrocurcumin (auch bekannt unter Hexahydrocurcuminol) und Octahydrocurcumin treten nur in geringen Mengen auf. Die für die Bioreduktion

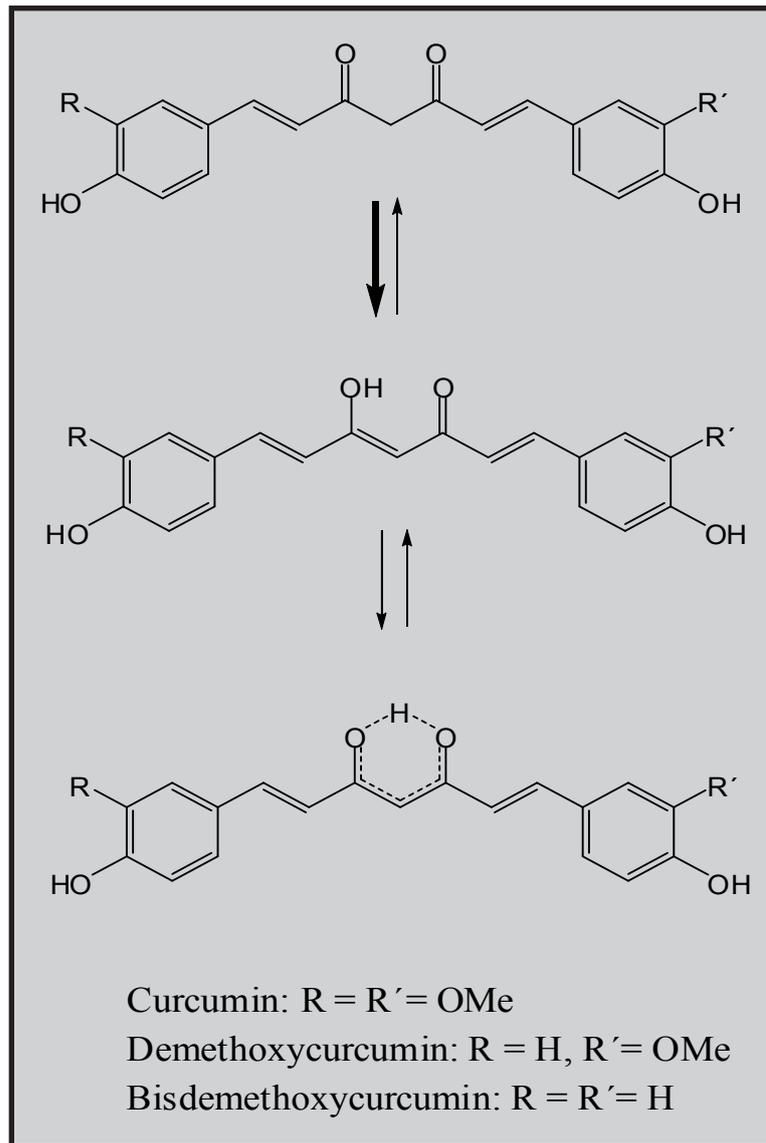


Abb. 4.5: Keto-Enol Tautomerie der Curcuminoid-Strukturen aus *C. longa*, verändert aus HOEHLE et al., 2006

von Tetrahydrocumarin und Hexahydrocumarin verantwortlichen Enzyme befinden sich im Cytosol der Leber und des Darms (Alkoholdehydrogenase), bei der weiteren Reduktion von Hexahydrocurcumin zu Octahydrocurcumin sind Microsome beteiligt. Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin folgen dem selben Biosyntheseweg bei der Bildung von reductiven Metaboliten wie Curcumin (HOEHLE et al., 2006).

Die Minderungen von chronischen Krankheiten wie DNA-Schäden, Mutagenesen, Karziogenesen und Hemmung von pathogenen Bakterienwachstum stehen oft in Verbindung mit der Einschränkung der Ausbreitung von freien Radikalen in biologischen Systemen. Die antioxidative Kapazität wird häufig als Parameter für medizinische bioaktive Komponenten verwendet. Curcuminoiden treten als

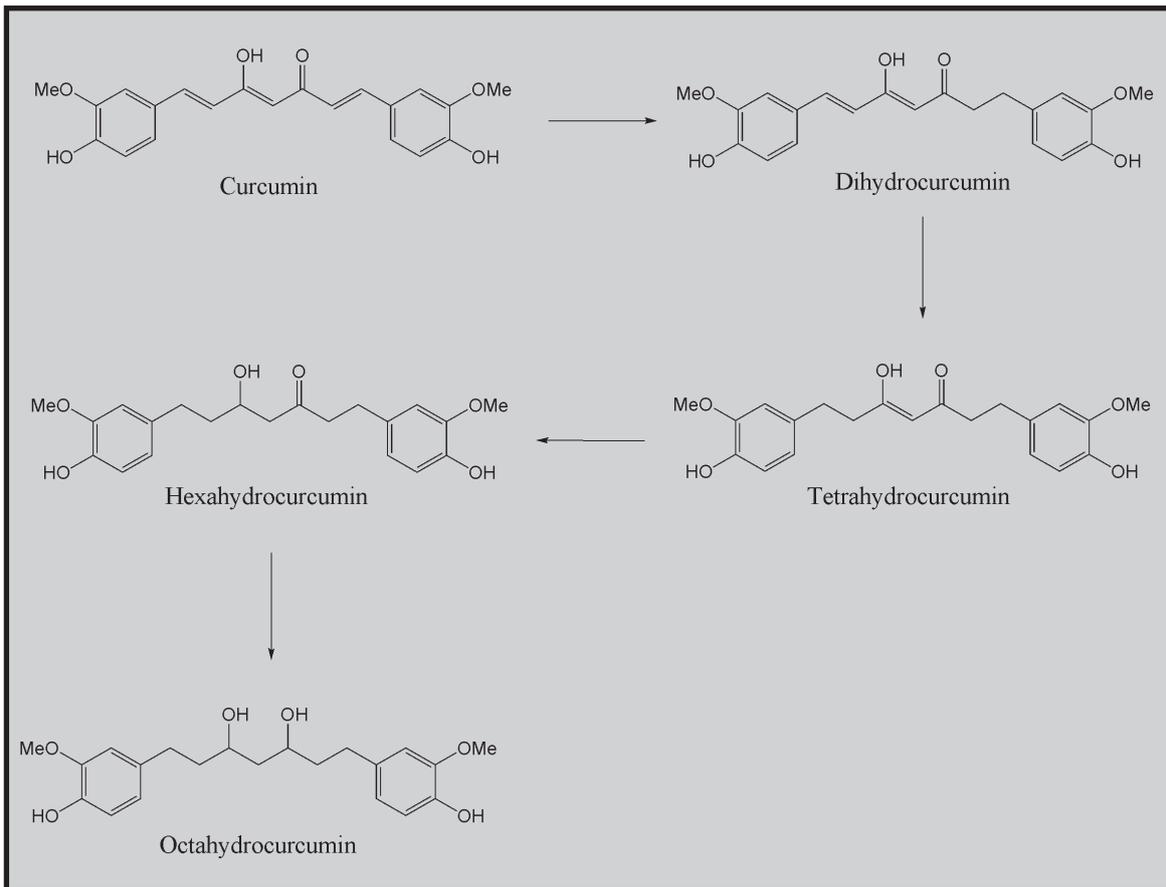


Abb. 4.6.: Reduktion von Curcumin aus HOEHLE et al., 2006

Radikalfänger von Hydroxyl- und Stickstoffdioxid-Radikalen auf und hemmen die Lipidperoxidation. Die Lipidperoxidase steht in direktem Zusammenhang mit verschiedenen Arten von biologischen Schäden. Durch die Positionierung der Curcuminoide in der Zellmembran hemmen sie die freien Radikale und reagieren zu Phenoxyradikalen. Diese sind polarer als die Curcuminoide und wandern zu der Oberfläche der Membran wo diese durch wasserlösliche Antioxidantien wie Ascorbinsäure unschädlich gemacht werden. Curcuminoide besitzen auch hohe antioxidative Eigenschaften gegen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), dieses wirkt toxisch und induziert bei in vitro Versuchen Zelltod. Zweiseitige Eisenionen ( $Fe^{2+}$ ) reagieren mit  $H_2O_2$  zu  $Fe^{3+}$ ,  $OH^-$  und  $OH$ . (siehe Abb. 4.7.). Durch die hohe Kapazität der Curcuminoide  $Fe^{2+}$  zu binden kann die Wirkung als Peroxidationsinhibitor erklärt werden.  $Fe^{3+}$  ist häufig in Nahrungsmittel vorhanden, die Wirkung als Radikalproduzent ist jedoch um mehr als das 10-fache geringer wie bei  $Fe^{2+}$  (AK et al., 2008).

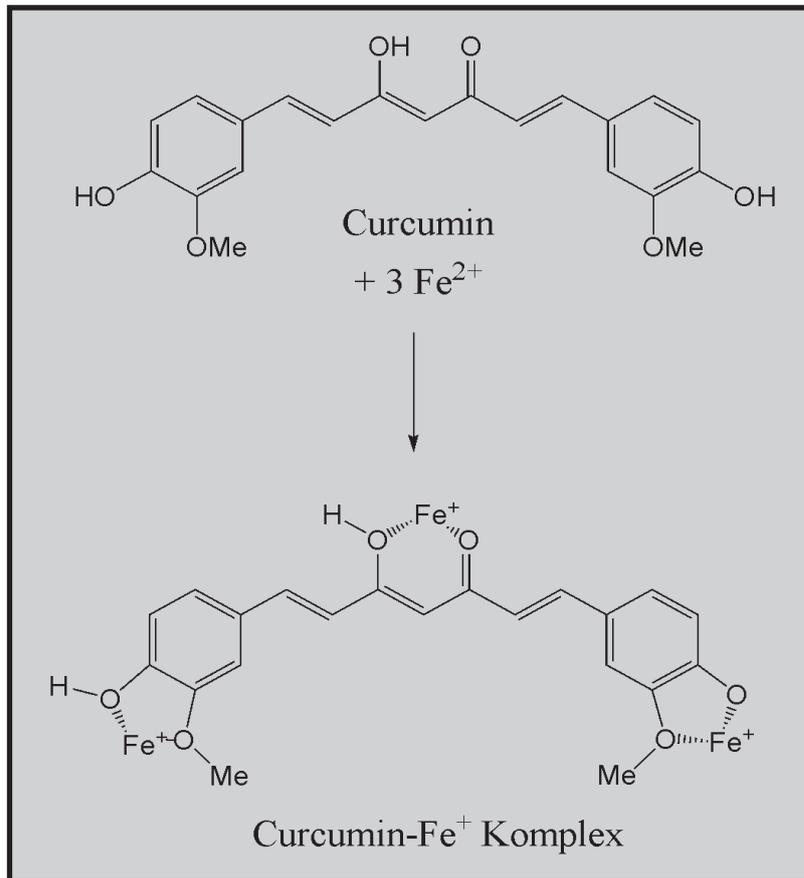


Abb. 4.7.: Wahrscheinlicher Curcumin-Fe<sup>+</sup> Komplex, verhindert die Entstehung freier Radikale von Fe<sup>2+</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, abgeändert aus AK et al., 2008

### 4.3. STOFFKLASSE DER PHENYLBUTENOIDE

Phenylbutenoide (Abb. 4.8.) kommen in der Natur sehr selten vor. In der Gattung *Zingiber*, vor allem in *Z. montanum*, bilden sie den Hauptbestandteil der sekundären Inhaltsstoffe (PANCHAROEN, 2000). Sie treten als Monomere und Dimere (Abb. 4.9.) in den Rhizomen auf und besitzen antifungale, entzündungshemmende, antitumor und insektizide Wirkung.

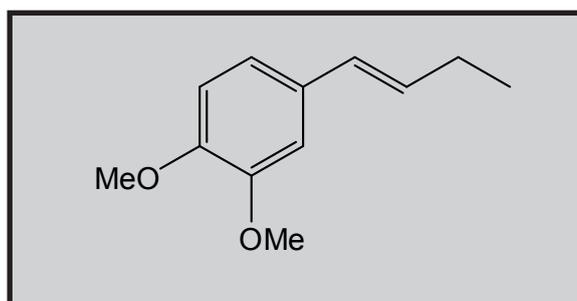


Abb. 4.8.: Grundstruktur Phenylbutenoide

Rezente Studien ergaben, daß Phenylbutenoide die Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2) hemmen. COX-2 steht in Verbindung mit entzündungshemmenden Prozessen und wirkt auf das Zellwachstum. Durch die Minderung der COX-2 Aktivität können diese Prozesse und Tumorstadium gehemmt werden. Phenylbutenoid-Dimere zeigten eine stärkere Wirkung als COX-2 Hemmer als die Monomere mit Butadien-Substitution. Keine Hemmung zeigten dagegen die Monomere mit Buten-Seitenkette. Die Konjugation der Seitenketten scheint für die Wirkung maßgeblich zu sein (HAN et al., 2005).

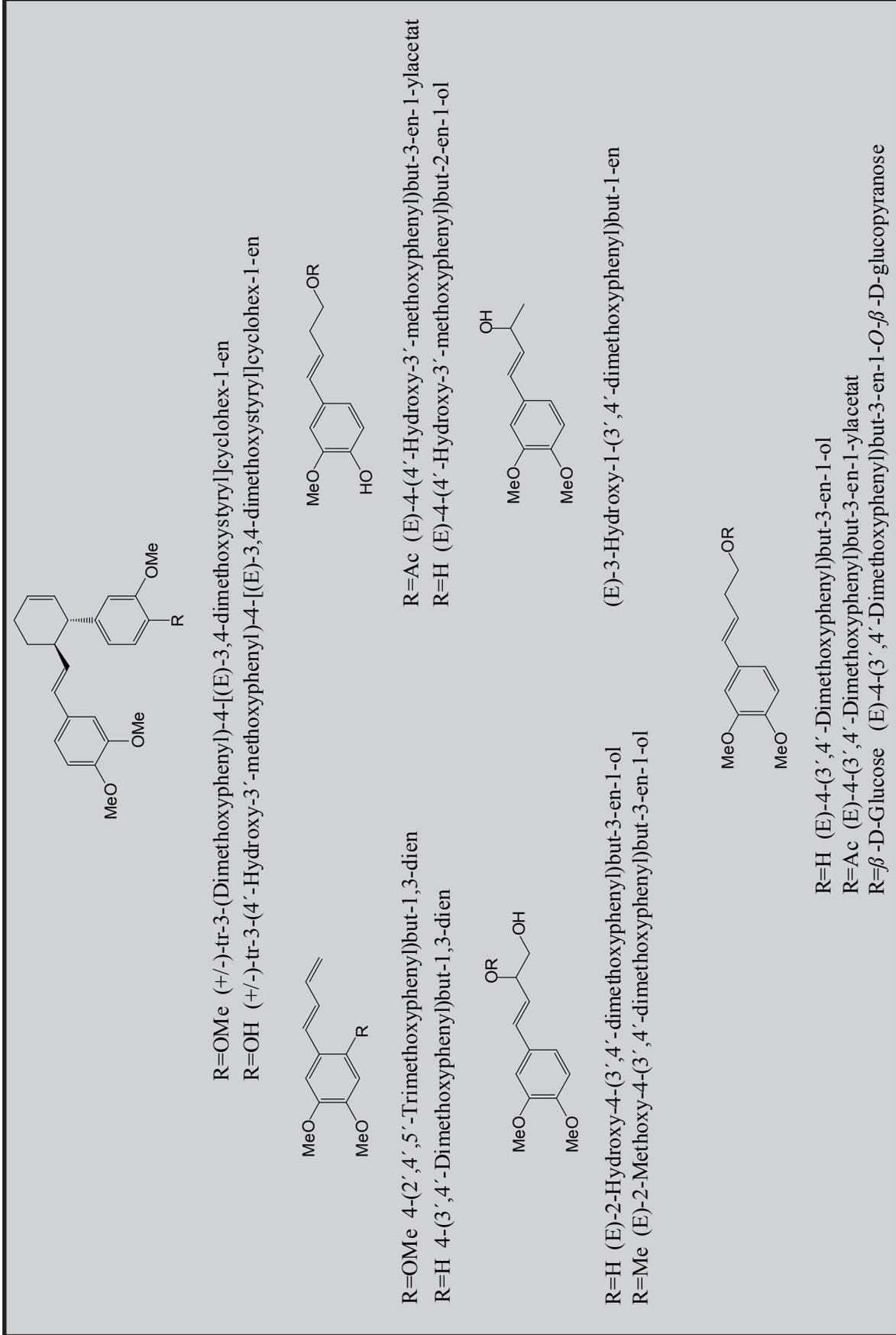


Abb. 4.9.: Bekannte Phenylbutenoide aus *Z. montanum*

#### 4.4. BIOSYNTHESE DER CURCUMINOIDE UND GINGEROLE

*Curcuma longa*, *Zingiber officinale* und *Z. montanum* akkumulieren in den Rhizomen große Mengen wichtiger pharmakologischer aktiver Inhaltsstoffe. Bei *Z. officinale* sind es vorwiegend Gingerole und Curcuminoide, bei *C. longa* Curcuminoide und bei *Z. montanum* Phenylbutenoide. Durch die häufige Anwendung in der Medizin und als Nahrungsmittel wurden schon frühe Studien der Biosynthese durchgeführt. Diese weisen darauf hin, dass die Gingerole und Curcuminoide durch die Interaktion von Zwischenprodukten der Phenylpropanoid-Synthese und Derivaten der Acetat- und Fettsäuresynthese entstehen (DENNIF et al., 1976; 1980). Ebenso sind Enzyme ähnlich der Poliketid-Synthase, welche mit Derivaten von Coenzym A aus Zwischenprodukten agieren, vermehrt an der Biosynthese beteiligt (SCHRÖDER, 1997).

Basierend auf diesen Angaben können zwei Biosynthesewege für die Entstehung der Gingerole und Curcuminoide angegeben werden. Die Curcuminoide können durch die Polyketid-Synthase (oder ähnlichem Enzym) aus zwei Molekülen p-Cumaroyl-CoA und einem Molekül Malonyl-CoA entstehen. Durch Hydroxylierung und O-Methyltransferase wird das entstandene Bisdemethoxycurcumin zu Demethoxycurcumin und zum Curcumin. Alternativ ist es möglich, dass die Curcuminoid-Synthase CoA-Ester von der p-Cumarsäure und Ferulasäure als Substrat verwendet. Die Hydroxylierung und O-Methylierung, die die funktionalen Gruppen des Curcumin bilden, wären dann die gleichen Reaktionen wie bei der ursprünglichen Phenylpropanoid-Biosynthese. Für die Synthese des Gingerols ist eine Reduktion der Doppelbindungen der p-Cumar-Säurederivate notwendig. Diese Reduktion kann vor oder nach der Verbindung der CoA-Ester des korrespondierenden aliphatischen Alkohols und der derivatisierten Phenylpropanoid-Reste stattfinden (RAMIREZ-AHUMADA et al., 2006).



## 4.5. STOFFKLASSE DER TERPENOIDE

Terpene sind sehr heterogen und stellen eine der größten Gruppe der Naturprodukte dar. Sie bauen sich durch Aneinanderlagerung von C5-Isopreneinheiten auf (Abb. 4.11.) und besitzen eine große Vielfalt an Kohlenstoffgerüsten. Zur Zeit sind ca. 30.000 Terpene bekannt. Eine Unterteilung der Stoffklasse erfolgt durch die Anzahl der Isopreneinheiten. Zwei Isopreneinheiten werden als Monoterpene bezeichnet, drei als Sesquiterpene, vier als Diterpene, sechs als Triterpene, acht als Tetraterpene und darüber als Polyterpene (GERSHENZON & CROTEAU, 1991). HARBORNE (1993) illustrierte die Verbreitung der Terpene im Pflanzenreich wie in Tab. 4.1. aufgelistet.

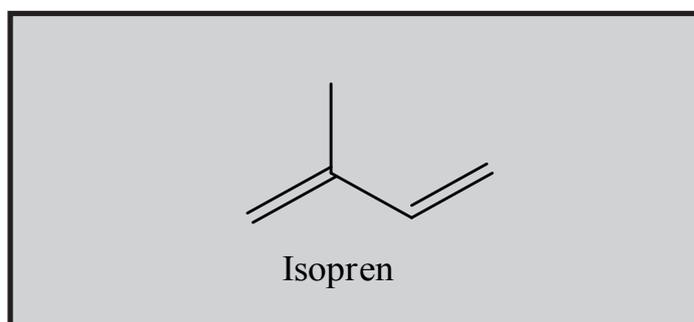


Abb. 4.11.: C5-Grundbaustein der Terpene

Stoffklasse	Anzahl Derivate	Verbreitung
Monoterpene	1000	weit verbreitet, vor allem in ätherischen Ölen
Sesquiterpene	3000	größte Klasse der Terpene, vor allem in Gefäßpflanzen
Diterpene	2000	weit verbreitet, vor allem in Harzen und Balsamen
Triterpene		
Saponine	600	in ca. 70 Pflanzenfamilien vorkommen
Limonioide	100	vor allem in Rutaceae, Meliaceae und Simaroubaceae
Cucurbitacin	50	Cucurbitaceae
Cardenolide	150	Apocynaceae, Asclepiadaceae, Scrophulariaceae
Tetraterpene		
Carotenoide	600	universell in Blättern, oft auch in Blüten und Früchten

Tab. 4.1.: Verbreitung Terpene nach HARBORNE (1993)

Terpene sind für die Biologie, Medizin, Landwirtschaft etc. von großer Bedeutung. Ihr Wirkungsspektrum reicht von der Anwendung als Insektizide, Fungizide und Bakterizide bis hin zur Verwendung als Geruchsstoffe in der Kosmetikindustrie. Mono- und Sesquiterpene treten als Hauptbestandteil von ätherischen Ölen auf, somit haben sie große industrielle und ökologische Bedeutung als Riech- und Aromastoffe (BREITMAIER, 1999). Dazu kommt die biologische Funktion von Vitamin A als Photorezeptor bei Tieren, von Carotinoiden als lichtschützende Pigmente in Pflanzen, von Pheromonen und Steroiden etc. Ein weiterer wichtiger Vertreter ist Ubichinon (Coenzym Q) das am Elektronentransport der Photosynthese in Bakterien und Chloroplasten beteiligt ist (LATZEL, 2000).

## 4.6. Biosynthese Terpene

Von SCHWARZ, 1994 konnte durch Applikationsexperimente mit  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose an *Gingko biloba* gezeigt werden, daß in höheren Pflanzen der Mevalonat- und Desoxyxyluloseweg gemeinsam auftreten. Die Sterole der Sämlinge werden hauptsächlich über den Mevalonatweg, Ginkolide hingegen über den Desoxyxyluloseweg gebildet. Die daraus resultierende Schlußfolgerung war, daß die beiden Terpen-Biosynthesewege in unterschiedlichen Zellkompartimenten ablaufen. Der Mevalonatweg im Cytosol und der Desoxyxyluloseweg in den Plastiden (Abb. 4.12.).

Isopentenyl-diphosphat (IPP) und das Isomer Dimethylallyl-diphosphat (DMAPP) stellen die „aktivierten“ Terpenoidmonomere dar. Durch Kopf-Schwanz-Addition von einem IPP und einem DMAPP wird Geranyl-diphosphat (GPP) gebildet. Mit einem weiteren IPP entsteht Farnesyl-diphosphat (FPP), welches das Ausgangsprodukt für fast alle Sesquiterpene ist. Bei Addition eines dritten IPP entsteht Geranyl-geranyl-diphosphat (GGPP), welches die Vorstufe für Diterpene, Tetraterpene und Polyterpene darstellt (Abb. 4.13.) (GERSHENZON & CROTEAU, 1991; CHAPPELL, 1995). Die Polymerisationsreaktionen werden durch die Prenyltransferase katalysiert, wobei durch Abspaltung eines Diphosphat-Restes von einem Substrat ein Kohlenstoffkation entsteht. An dieses kondensiert IPP, wobei erneut ein Carbokation gebildet wird, aus dem durch Abspaltung eines Protons GPP entsteht (Abb. 4.12.). Die Prenyltransferasen katalysieren eine C-C-Bindung zwischen zwei Molekülen, wohingegen die Cyclasen intramolekulare Zyklisierung bewirken (CHAPPELL, 1995).

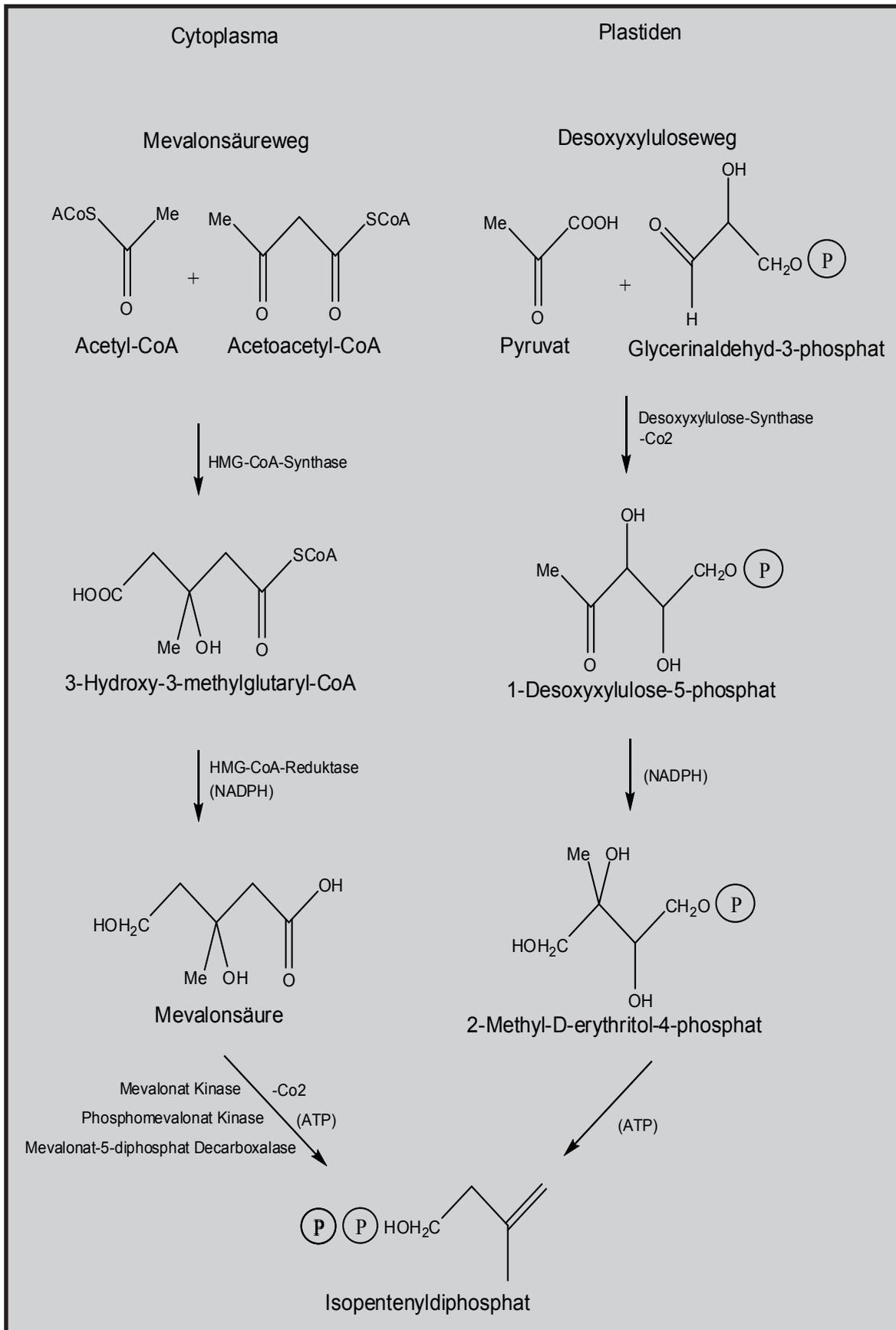


Abb. 4.12.: Biosynthese und Kompartimentierung von Isoprenyldiphosphat in der Pflanze (SCHWARZ, 1994)

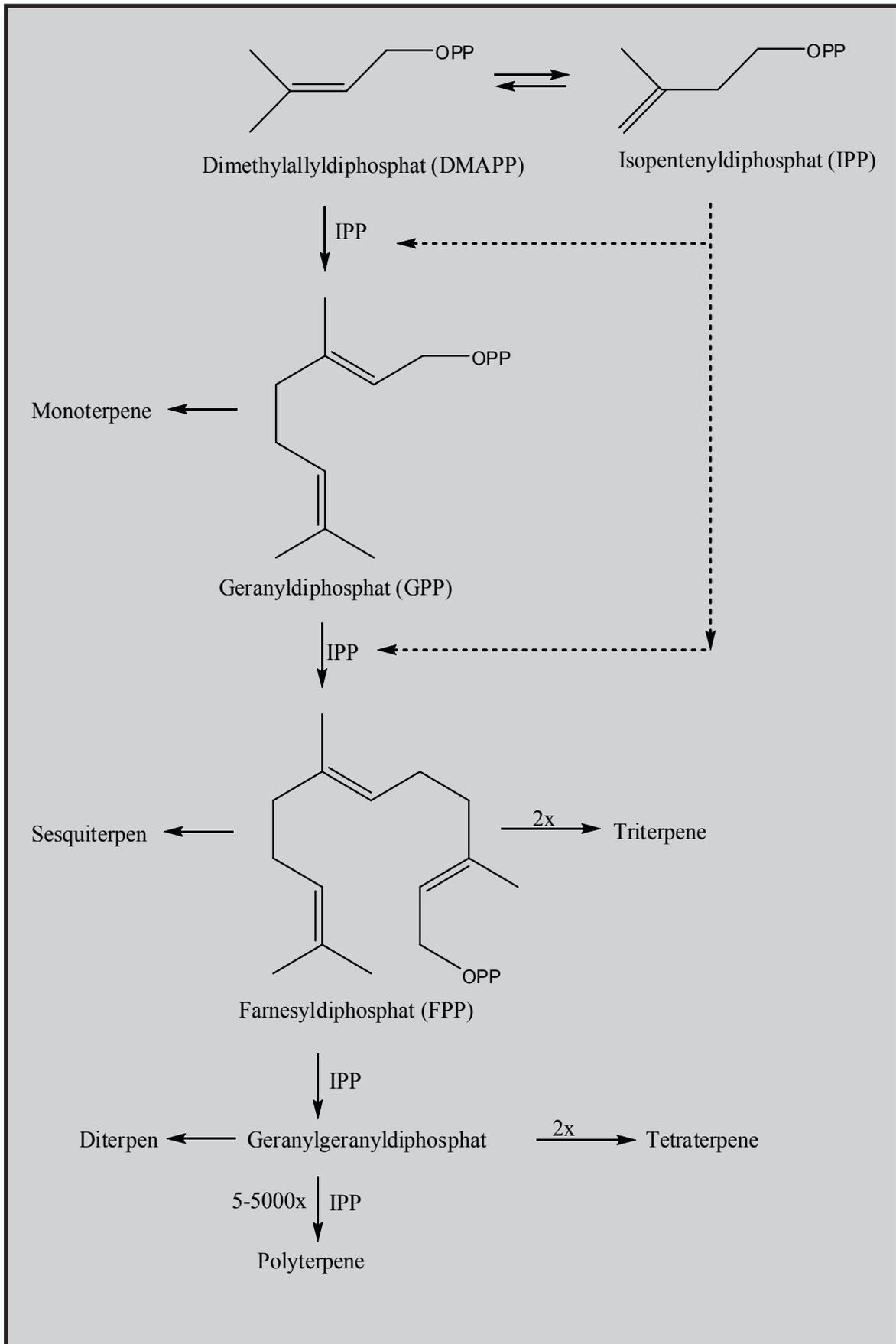
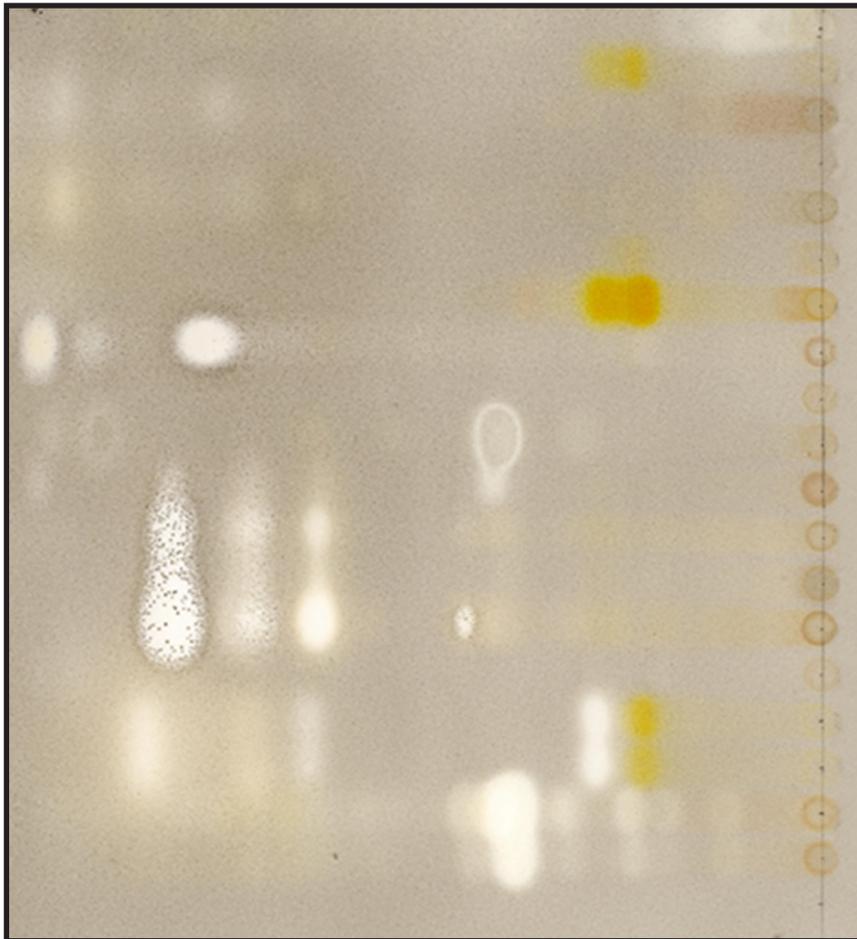


Abb. 4.13.: Überblick über die Biosynthese der Terpene (GERSHENZON & CROTEAU, 1991)

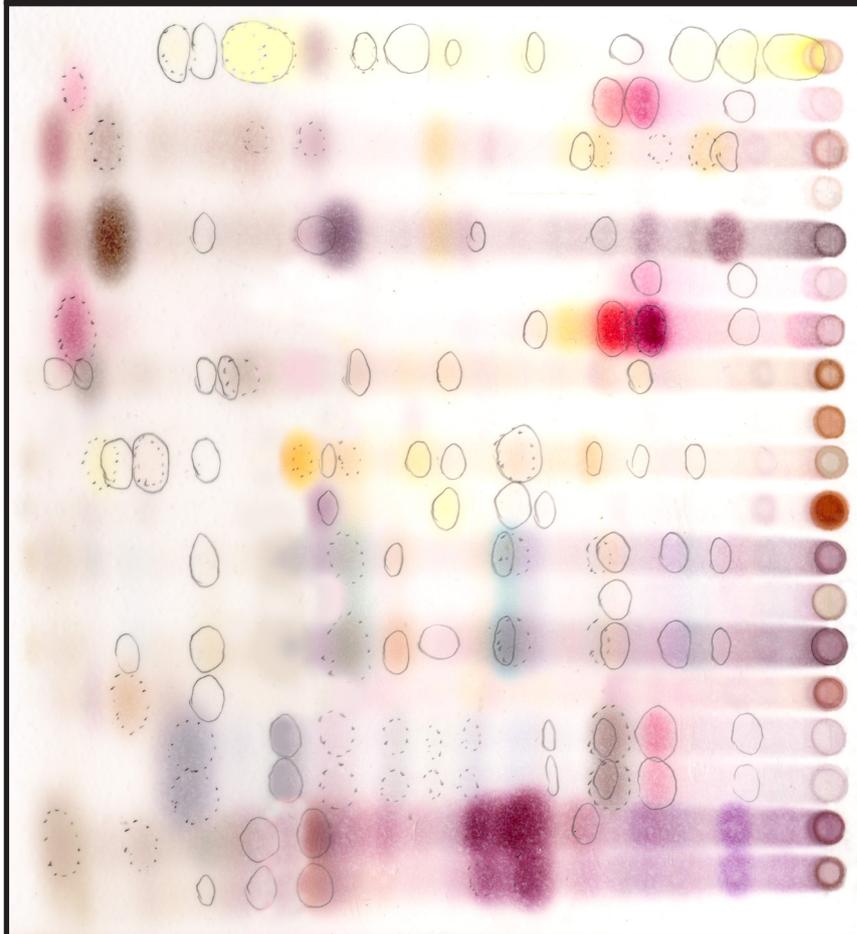
## 5. ERGEBNISSE

Zur Erfassung charakteristischer Stoffausstattungen der Zingiberaceen-Gattungen *Zingiber*, *Curcuma* und *Alpinia* und ihrer antifungalen Aktivitäten wurden  $\text{CHCl}_3$ -Fraktionen von methanolischen Rhizom-Extrakten von 26 verschiedenen Herkünften mit DC und HPLC-UV Detektion vergleichend analysiert. Genauere Angaben zu den einzelnen Herkünften sind dem Herkunftsverzeichnis (Tab. 3.1.) zu entnehmen. Parallele Biotests auf Dünnschichtplatten besprüht mit Konidiosporen von *Cladosporium sphaerospermum* (Bioautographie) informieren dabei gleichzeitig über das Auftreten antifungaler Stoffe. In der Bioautographie ergaben sich demnach deutliche Hemmhöfe für die Herkünfte der beiden *Zingiber*-Arten *Z. officinale* (ZIN 070005, 060054) und *Z. montanum* (ZIN 060032, 060024) und den beiden *Alpinia*-Arten *A. galanga* (ZIN060021, 070006) und *A. roxburghii* (ZIN 070010) (Abb. 5.1.). Die aus der Literatur bekannte antifungale Wirkung von *Curcuma*-Arten konnte zwar in der Übersichts-Bioautographie (Abb. 5.1.) nicht eindeutig festgestellt werden, ergibt aber bei entsprechenden Trockensäulen-Fraktionen deutliche (gelbe) Hemmhöfe. (Abb. 5.16.). Nachdem in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit von Christian Gilli die artenreiche Gattung *Alpinia* genauer untersucht wird, sollen in der vorliegenden Arbeit nur die antifungalen Stoffe von *Zingiber* und *Curcuma* eingehender analysiert werden. Die beiden Individuen *A. galanga* (ZIN 070006) und *Curcuma* sp. (ZIN 060001) wurden wegen Pilzinfektion der Rhizome in zwei getrennte Extrakte aufgeteilt, Teil a beinhaltet die infizierten Rhizomteile, Teil b die nicht betroffenen. Bei der chromatographischen Analyse konnte dabei kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Insgesamt konnten vier Phenylbutenoide, drei Curcuminoide und drei Gingerole aus drei Arten (*Z. montanum*, *Z. officinale* und *C. longa*) mittels MPLC und präparativer DC isoliert werden. Die Aufklärung der Molekülstruktur der isolierten Substanzen erfolgte mit spektroskopischen Methoden ( $^1\text{H}$ -NMR-,  $^{13}\text{C}$ -NMR und Massenspektroskopie) in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Organische Chemie an der Universität Wien. Die sehr lipophilen Sesquiterpene wurden durch Co-Chromatographie mit entsprechenden Vergleichssubstanzen und Literaturvergleich identifiziert.



ZIN 060017  
 ZIN 060001a  
 ZIN 060028  
 ZIN 060014  
 ZIN 060006  
 ZIN 060004  
 ZIN 060001b  
 ZIN 070010  
 ZIN 070009  
 ZIN 070008  
 ZIN 060038  
 ZIN 070006b  
 ZIN 070006a  
 ZIN 060021  
 ZIN 060013  
 ZIN 060032  
 ZIN 060024  
 ZIN 060054  
 ZIN 070005



ZIN 060017  
 ZIN 060001a  
 ZIN 060028  
 ZIN 060014  
 ZIN 060006  
 ZIN 060004  
 ZIN 060001b  
 ZIN 070010  
 ZIN 070009  
 ZIN 070008  
 ZIN 060038  
 ZIN 070006b  
 ZIN 070006a  
 ZIN 060021  
 ZIN 060013  
 ZIN 060032  
 ZIN 060024  
 ZIN 060054  
 ZIN 070005

Abb. 5.1.: Übersichts-DC der  $\text{CHCl}_3$ -Phasen der Gesamtextakte behandelt mit Anisaldehyd (links) und Sporensuspension von *Cladosporium sphaerospermum* (rechts). Die Abkürzungen verweisen auf die Herkunftsliste in Tab. 3.1. Laufmittel:  $\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}/\text{MeOH}$  60/40/5 ZIN 06001a: Rhizom mit Pilzinfektion, ZIN 06001b: ohne Pilzinfektion, ZIN 070006a: Rhizom mit Pilzinfektion, ZIN 070006b: ohne Pilzinfektion

Die HPLC-UV-Analyse der Extrakte erfolgte mit einem MeOH-H<sub>2</sub>O-Gradienten (Tab. 3.2.). Zur besseren Erfassung der Retentionszeit wurde die Detektion der Individuen der Gattung *Curcuma* bei 254nm durchgeführt, die Profile der Gattungen Zingiber bei 230nm. Die Peaks der isolierten bzw. identifizierten Substanzen wurden zur besseren Übersicht mit Kurzbezeichnungen und Farbcode für die jeweilige Stoffklasse versehen:

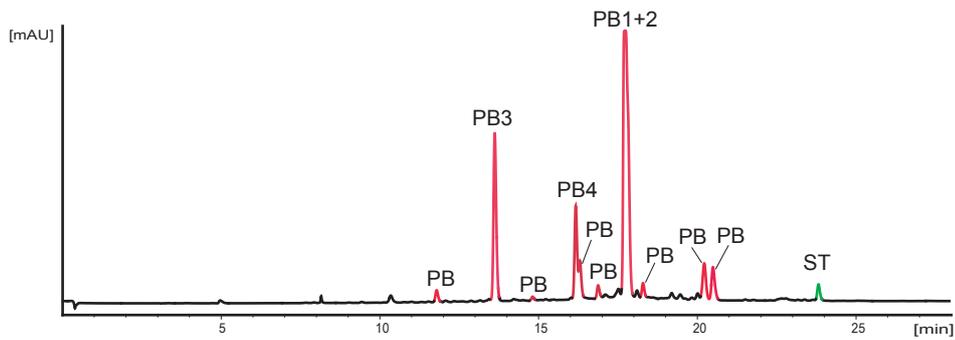
**PB** = Phenylbutenoide      **C** = Curcuminoiden  
**ST** = Sesquiterpene      **G** = Gingerole

Zusätzlich folgt nach den farbigen Abkürzungen eine fortlaufende Nummer, die eine eindeutige Zuordnung der Peaks zu den im Anhang aufgelisteten Stoffen im Spektraldatenkatalog (Kap. 7.1.) ermöglicht. Substanzen, die nur wegen ihres charakteristischen UV-Spektrums einer Stoffklasse zugeordnet werden konnten, aber nicht eindeutig identifiziert wurden, sind mit Stoffklassenkürzel ohne Nummernangabe versehen.

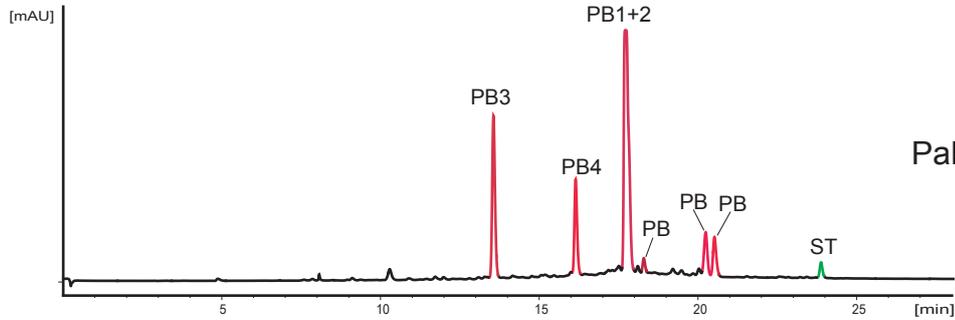
## 5.1. Phytochemische Ergebnisse

### 5.1.1. *Z. montanum* (J. König) Link ex A. Dietr.

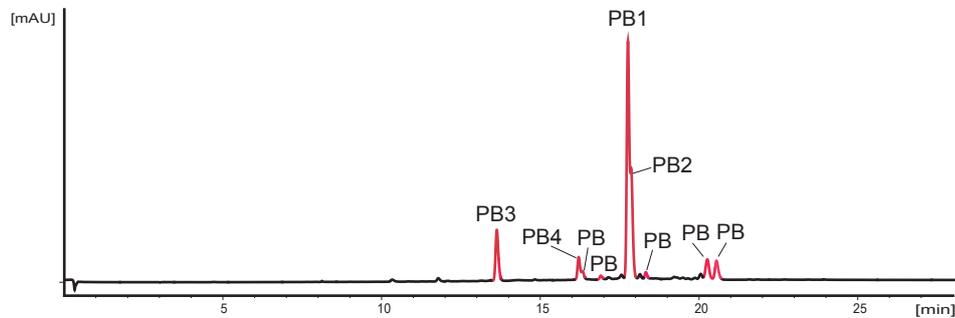
Die hier analysierten fünf Individuen von *Z. montanum* stammen von verschiedenen Märkten in Thailand (siehe Herkunftsverzeichnis Tab. 3.1.). Alle Individuen zeigten ein nahezu identisches Derivatmuster (Abb. 5.2.), wobei quantitativ die Stoffklasse der Phenylbutenoide vorherrschte. Vier Phenylbutenoide (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB1**), (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB2**), (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (**PB3**) und (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat (**PB4**) konnten aus ZIN 060024 isoliert werden (Abb. 5.2.). Bei acht weiteren Verbindungen handelt es sich wahrscheinlich aufgrund des UV-Spektrums ebenfalls um Phenylbutenoide (**PB**). Wegen zu geringer Menge konnten sie aber nicht isoliert und identifiziert werden. (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB1**) und (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB2**) erwiesen sich bei allen Individuen als Hauptsubstanz. In den Individuen ZIN 060035 und ZIN 060036 konnten zusätzlich Spuren von einem Sesquiterpen (**ST**) nachgewiesen werden (Abb. 5.2.). Dieses Sesquiterpen ist in den Individuen ZIN09004, ZIN060024 und ZIN060032 nicht detektierbar. ZIN060024 und ZIN060032 enthalten zusätzlich in Spuren noch einen Stoff, dessen UV-Spektrum auf ein Curcuminoid schließen läßt.



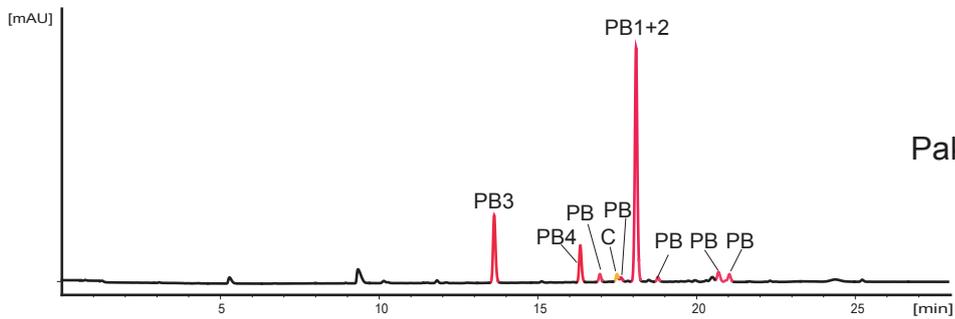
ZIN 060035  
Chatuchak-Markt



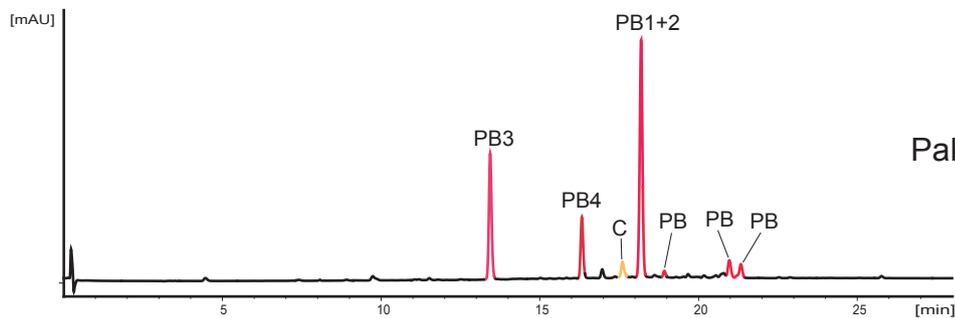
ZIN 060036  
Pak Thong Chai-Markt



ZIN 090004  
Chatuchak-Markt



ZIN 060024  
Pak Thong Chai-Markt



ZIN 060032  
Pak Thong Chai-Markt

**PB1** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien

**PB2** (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien

**PB3** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol

**PB4** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat

**PB** vermutlich ein Phenylbutenoid

**C** vermutlich ein Curcuminoid

Abb. 5.2.: HPLC-Vergleich der  $\text{CHCl}_3$ -Phase der Rhizome von fünf Individuen von *Z. montanum*. Die Formelbilder sind aus Abb. 4.9. zu entnehmen.

Der Gesamtextrakt des Individuums ZIN 060024 wurde in größeren Zeitabständen wiederholt mit der gleichen HPLC-Methode gemessen (Abb. 5.4.). Daraus ergab sich eine geringe quantitative Änderung der Stoffmengen (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (**PB3**) und (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat (**PB4**). Es ist anzunehmen daß mit fortlaufender Zeit (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat (**PB4**) durch Hydrolyse in (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (**PB3**) übergeht (Abb. 5.3.). Ebenso konnte ein Zuwachs von einem vermutlichen Curcuminoid (**C**) festgestellt werden.

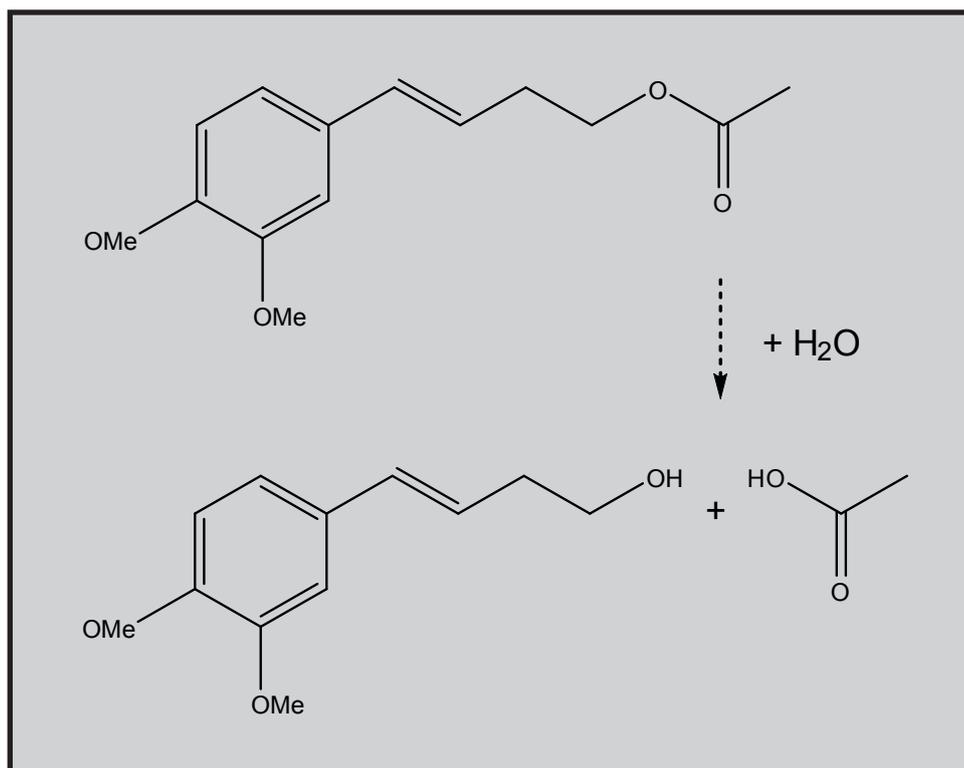
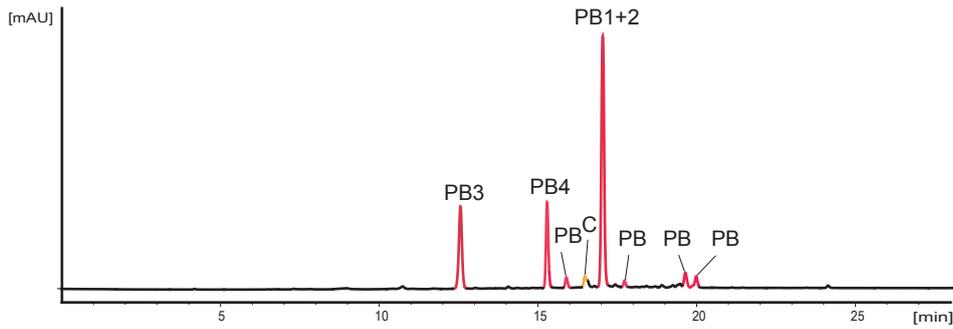
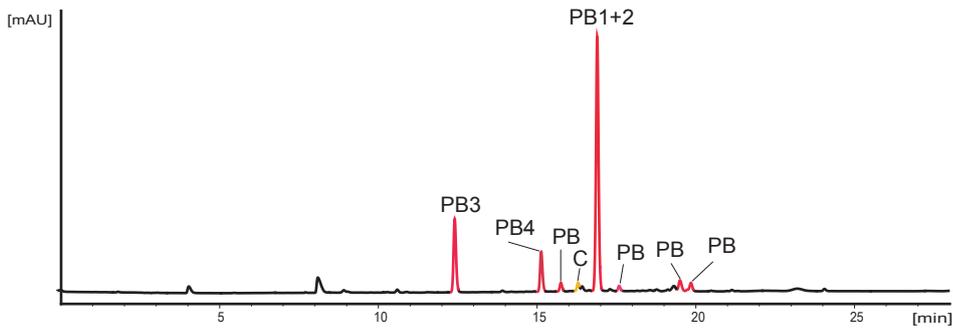


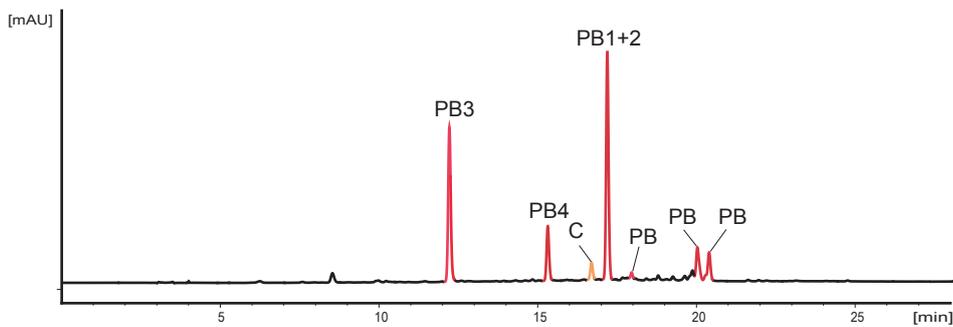
Abb. 5.3: Vermutliche Hydrolyse von (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat (**PB4**) zu (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (**PB3**).



18.06.2006



22.02.2007

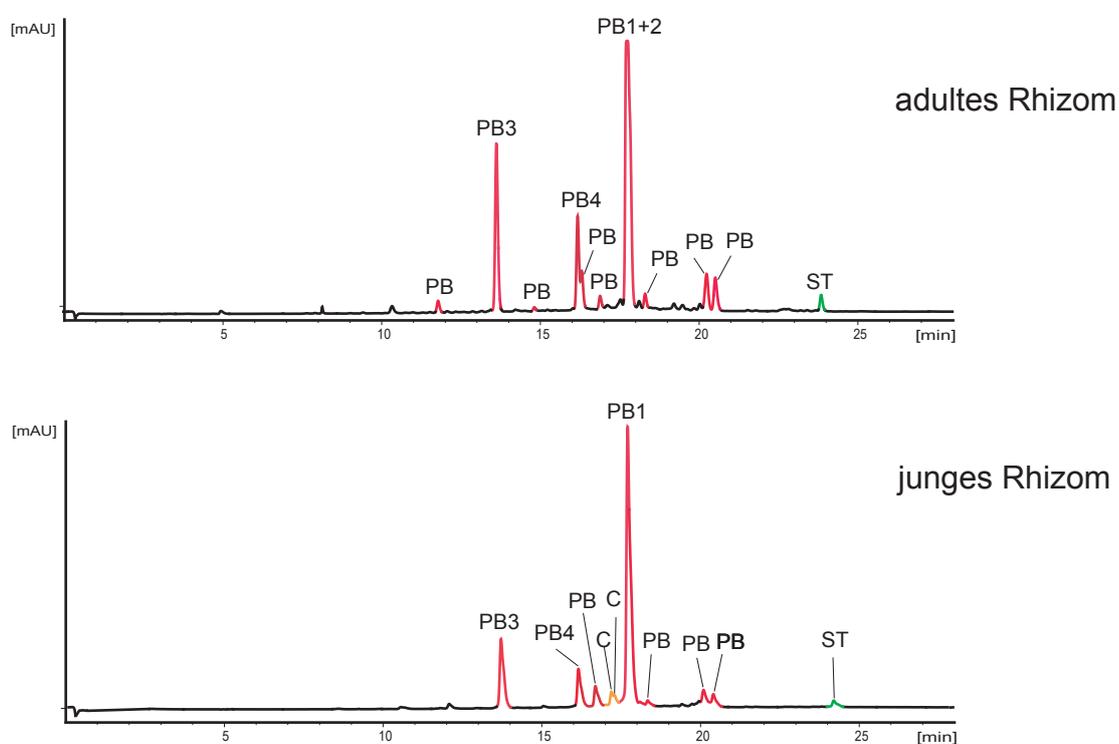


18.02.2008

- PB1** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien
- PB2** (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien
- PB3** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-but-3-en-1-ol
- PB4** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat
- PB** vermutlich ein Phenylbutenoid
- C** vermutlich ein Curcuminoid

Abb. 5.4.: HPLC-Vergleich des Gesamttextektes von *Z. montanum* ZIN 060024 (Thailand, Pak Thong Chai Markt) gemessen am 18.06.2006, 22.02.2007 und 18.02.2008. Die Fomelbilder sind Abb. 4.9. zu entnehmen.

Der Vergleich von HPLC-Profilen eines Individuums einer adulten Pflanze (ZIN 060035) und einer Jungpflanze (Abb. 5.5.) zeigen nur leichte Differenzen im HPLC-Chromatogramm. Als Hauptsubstanz tritt dabei (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB1**) auf, während (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB2**) in der Jungpflanze nicht detektiert werden konnte. Außerdem scheinen im jungen Rhizom neben (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (**PB3**) und (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat (**PB4**) auch die anderen vermutlichen Phenylbutenoid-Derivate mengenmäßig zurückzutreten. In der Jungpflanze wurden weiters zwei Curcuminoide (**C**) detektiert, welche in der Adulten nicht nachweisbar waren. Spuren von vermutlichen Curcuminoiden (**C**) sind auch in den Rhizomen von ZIN 060032 und ZIN 060024 feststellbar, bei denen es sich aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeit um anderen Derivate als in der Jungpflanze handeln dürfte (Abb. 5.2.).

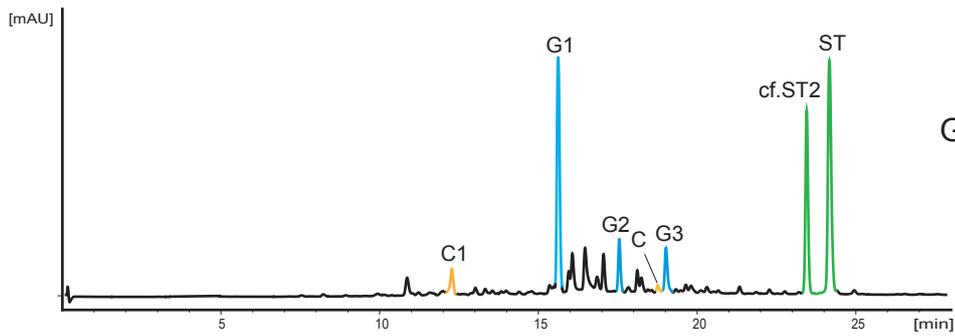


- PB1** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien
- PB2** (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien
- PB3** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol
- PB4** (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat
- PB** vermutlich ein Phenylbutenoid
- C** vermutlich ein Curcuminoid
- ST** vermutlich ein Sesquiterpen

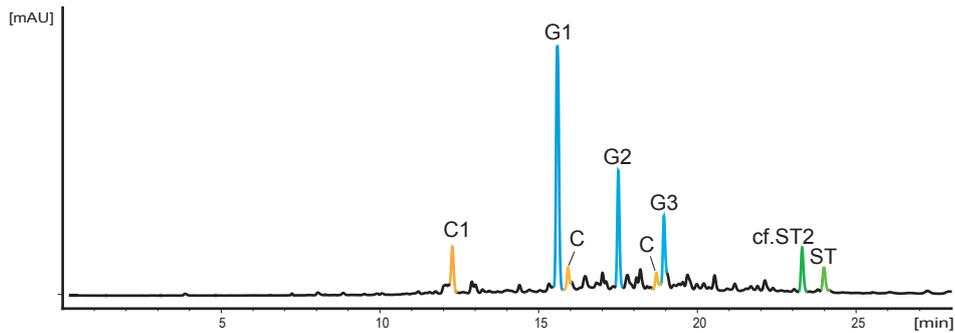
Abb. 5.5.: HPLC-Vergleich der Rhizome von einem Individuum von *Z. montanum* ZIN 060035 adult und Jungpflanze. Die Formelbilder sind Abb. 4.9. zu entnehmen.

### 5.1.2. *Z. officinale* Roscoe

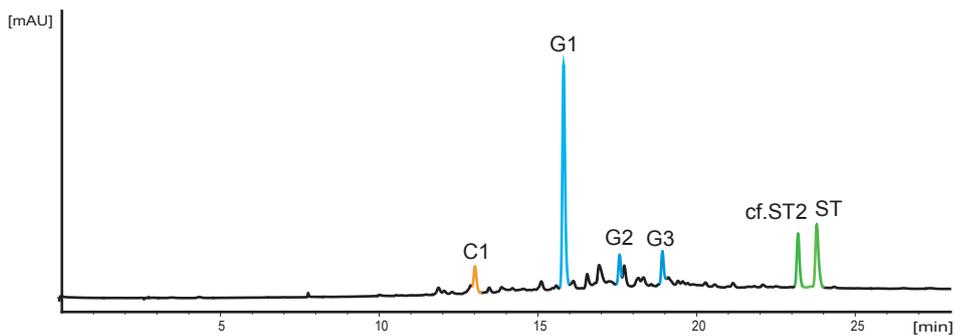
Die hier analysierten Individuen von *Z. officinale* stammen von zwei verschiedenen Märkten in Thailand (ZIN 070005 Trang, ZIN 090042 Ubon Ratchathani) und einer unbekanntenen Herkunft in China (gekauft in einem Gemüsemarkt Wien). Wie Abb. 5.6. zeigt, haben alle drei Individuen ähnliche HPLC-Profile. Auffallend ist, daß ZIN 070054 aus China einen deutlich höheren Anteil an Sesquiterpenen (**ST**) aufzeigt. Ganz allgemein ist für *Z. officinale* die Ausbildung von Gingerolderivaten charakteristisch. (6)-Gingerol (**G1**) tritt bei allen drei Chromatogrammen als Hauptsubstanz auf, wesentlich schwächer sind die Derivate (6)-Shogaol (**G2**) und (8)-Gingerol (**G3**) ausgebildet. Gingerole sind durch die Anwesenheit der benachbarten Hydroxy- und Ketogruppe thermisch und in saurer Umgebung sehr labil und bilden durch Dehydratation Shogaole. Die Synthese der Gingerolderivate ist von der Extraktionsmethode und weiteren Faktoren (siehe Kap. 4.1.) abhängig, deshalb kann das Strukturprofil der Gingerole bei ein und demselben Individuum variieren. In kleinen Mengen konnte das Curcuminoid Hexahydrocurcumin (**C1**) isoliert werden, weitere vermutliche Curcuminoiden konnten wegen geringer Substanzmenge nicht isoliert, aber durch ihr UV-Spektrum identifiziert werden.



ZIN 060054  
Gemüsemarkt Wien/  
China



ZIN 070005  
Trang-Markt



ZIN 090042  
Ubun Ratchathani,  
Warin-Markt

- |           |                   |            |                             |
|-----------|-------------------|------------|-----------------------------|
| <b>G1</b> | (6)-Gingerol      | <b>C</b>   | vermutlich ein Curcuminoid  |
| <b>G2</b> | (6)-Shogaol       | <b>ST2</b> | Zingiberen                  |
| <b>G3</b> | (8)-Gingerol      | <b>ST</b>  | vermutlich ein Sesquiterpen |
| <b>C1</b> | Hexahydrocurcumin |            |                             |

Abb. 5.6.: HPLC-Vergleich der  $\text{CHCl}_3$ -Phase der Rhizome von drei Individuen von *Z. officinale* ZIN 060054, 070005 und 090042. Die Formelbilder sind Abb. 4.9. zu entnehmen. cf. ST2 wurde aufgrund von UV-Spektrum und Literaturvergleich identifiziert.

In Abb. 5.7. ist ein Vergleich aus HPLC-Profilen der  $\text{CHCl}_3$ -Fraktion des MeOH-Extraktes, der  $\text{H}_2\text{O}$ -Phase und des Ätherisches Öl aus Wasserdampfdestillation abgebildet. Das Ätherisches Öl besteht zum Großteil aus Sesqui- und Monoterpenen. Als Hauptsubstanz tritt mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der UV-Spektren Zingiberen (**ST2**) auf. Durch die hohe Flüchtigkeit dieser Stoffe konnte trotz großer Ausgangsmengen keine Substanz isoliert werden. Die weiteren im Ätherischen Öl enthaltenen Sesqui- und Monoterpene (Camphen, 1,8-Cineol, Borneol, Neral, Geranial,  $\alpha$ -Curcumen,  $\alpha$ -Farnesen,  $\beta$ -Bisabolen,  $\beta$ -Sesquiphellandren) (MARTINS et al., 2001) sind durch fehlenden Chromophor in der UV-Detektion nicht ersichtlich. Die Hauptsubstanzen der  $\text{CHCl}_3$ -Phase (Gingerole) sind im Ätherischen Öl und in der  $\text{H}_2\text{O}$ -Phase nicht detektierbar, ebenso wie Hexahydrocurcumin (**C1**).

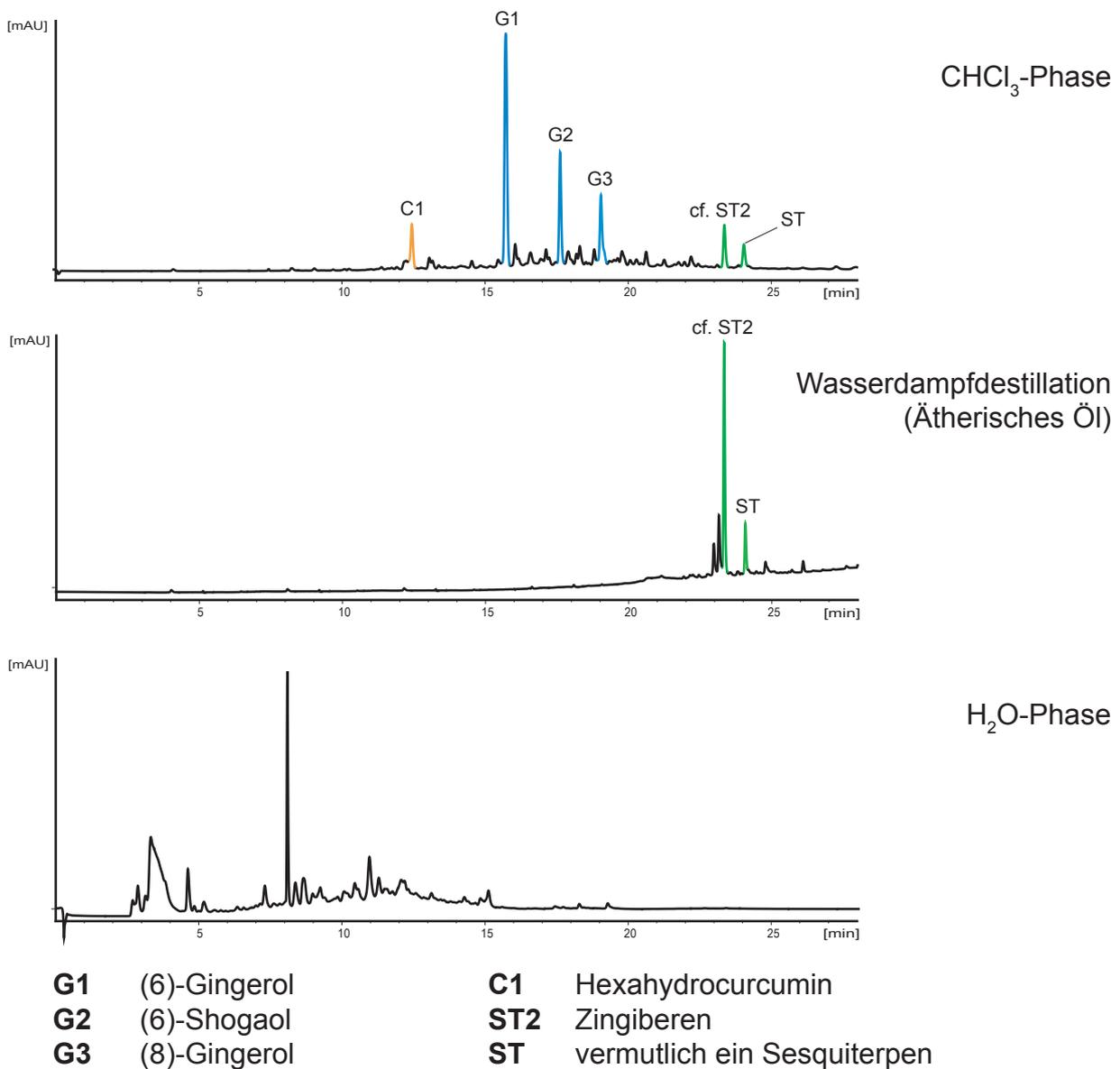
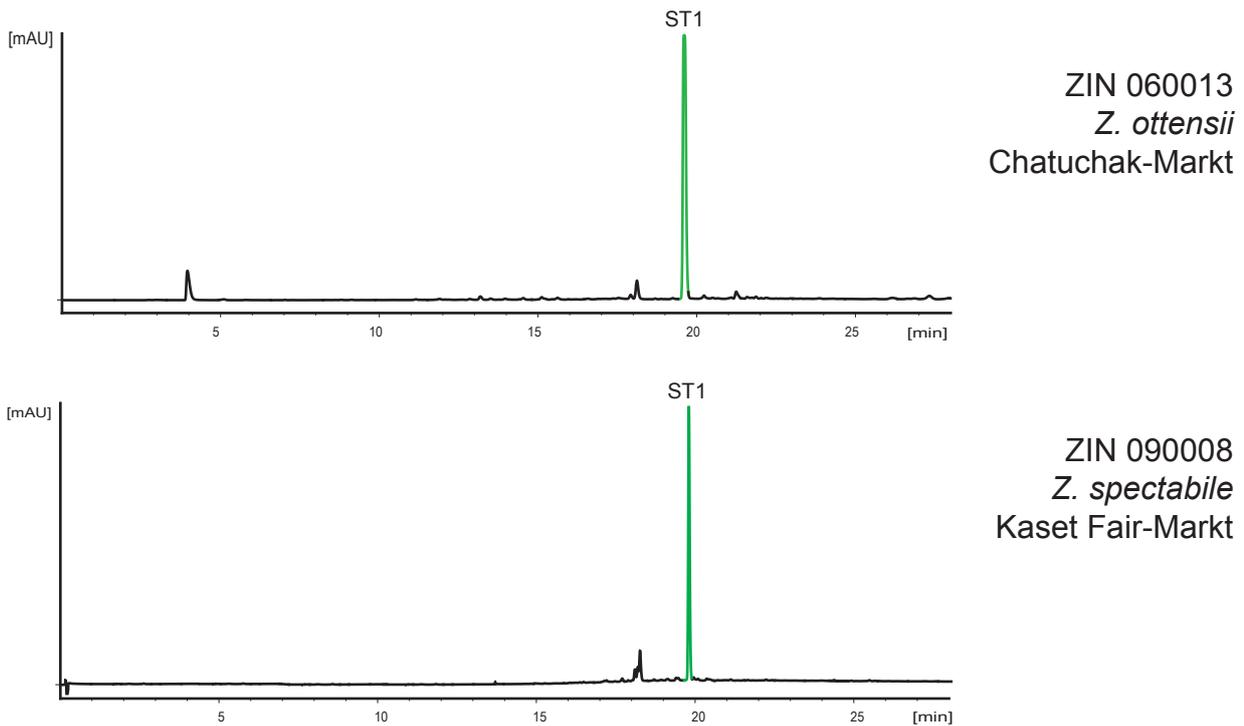


Abb. 5.7.: HPLC-Vergleich Rhizom  $\text{CHCl}_3$ -Phase, Wasserdampfdestillation (Ätherisches Öl) und  $\text{H}_2\text{O}$ -Phase aus *Z. officinale* ZIN 070005, die Formelbilder sind Abb. 4.9. zu entnehmen. cf. ST2 wurde aufgrund von UV-Spektrum und Literaturvergleich identifiziert.

### 5.1.3. *Z. ottensii* Valetton und *Z. spectabile* Griff.

Sehr charakteristisch für *Z. ottensii* (ZIN 060013) und *Z. spectabile* (ZIN 090008) ist die Ausbildung von dem Sesquiterpen Zerumbon (**ST1**) als Hauptsubstanz. Die weiteren Inhaltsstoffe wie Flavonoide (z.B. Kaempferol und Derivate), Diterpene (z. B. Zerumin A, Coronarin B, Coronarin D) und Diarylheptanoide (AKIYAMA et al., 2006) sind wegen zu geringer Quantität nicht detektierbar oder wegen des fehlenden Chromophors im HPLC-Chromatogramm nicht ersichtlich.



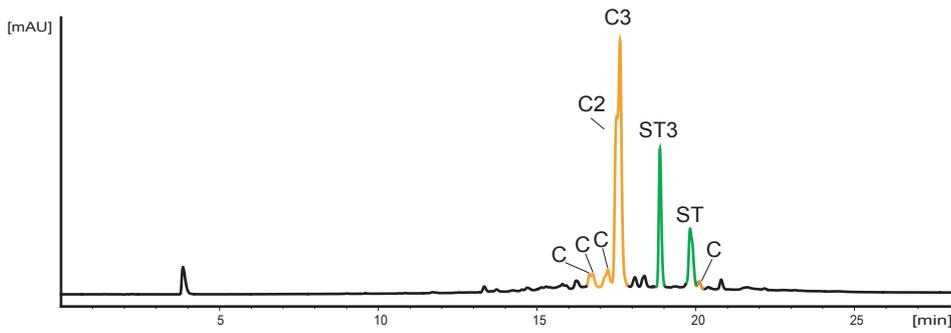
#### **ST1** Zerumbon

Abb. 5.8.: HPLC-Profil im Vergleich  $\text{CHCl}_3$ -Phase Rhizom *Z. ottensii* und *Z. spectabile*. Bei ST1 handelt es sich durch Literaturvergleich und UV-Detektion vermutlich um Zerumbon.

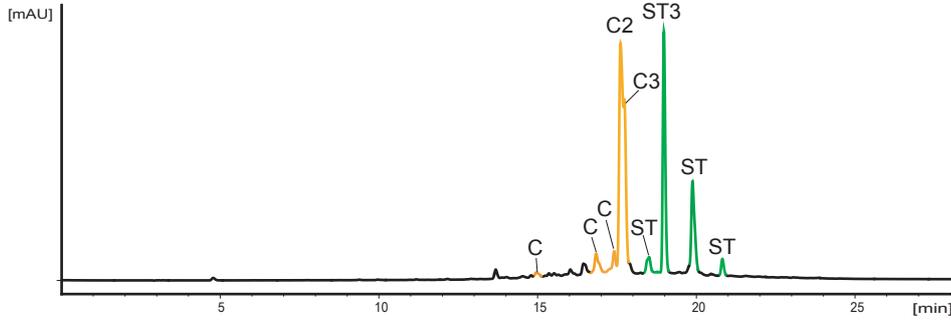
#### 5.1.4. *Curcuma longa* L.

Die Rhizomextrakte von *C. longa* werden von Curcuminoiden und Sesquiterpenen dominiert. Charakterisiert wurden die HPLC-Profile durch das Vorherrschen von Curcumin (**C2**), Demethoxycurcumin (**C3**) und ar-Turmeron (**ST3**). Anhand des charakteristischen UV-Spektrums können auch noch kleine Mengen an Curcuminoiden (**C**) und Sesquiterpenen (**ST**) vermutet werden (Abb. 5.9.).

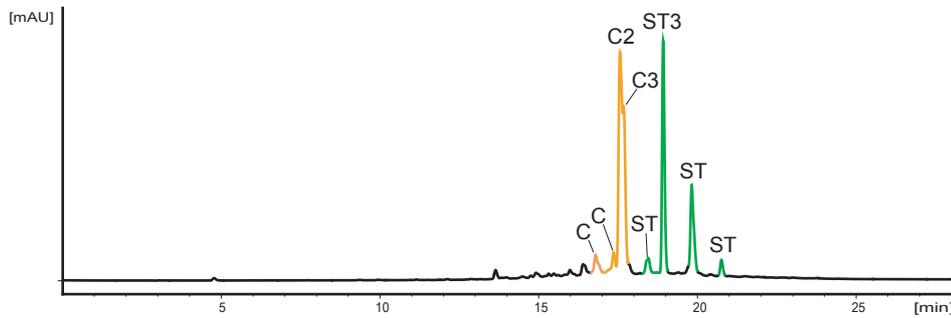
Die HPLC-Chromatogramme der einzelnen Individuen unterscheiden sich nur geringfügig. Bei ZIN 060037, ZIN 060038 und ZIN 060039 bestehen die Hauptpeaks der Curcuminoiden aus Curcumin (**C2**) und Demethoxycurcumin (**C3**), während bei ZIN 060040 und ZIN 060041 nur Curcumin (**C2**) detektiert werden konnte. Ebenso stellt ar-Turmeron (**ST3**) bei ZIN 060037, ZIN 060028 und ZIN 060039 die Haupts substanz unter den Sesquiterpenen dar, bei ZIN 060040 und ZIN 060041 dominiert ein nicht identifiziertes Sesquiterpen. Ar-Turmeron (**ST3**) tritt hier in kleineren Mengen auf. Weiters tritt in ZIN 060040 und ZIN 060041 ein weiteres in ZIN 060037, ZIN 060038 und ZIN 060039 nicht detektierbares Sesquiterpen (**ST**) auf.



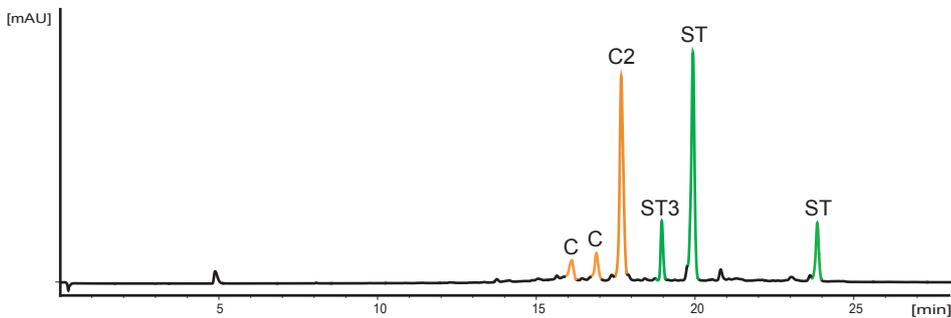
ZIN 060037



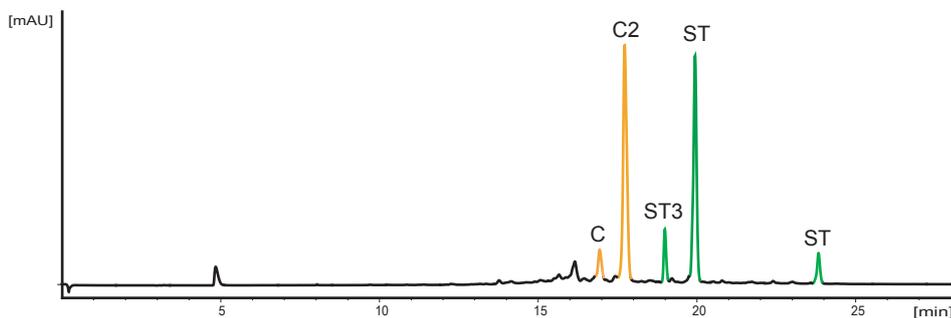
ZIN 060038  
vgl. Abb. 5.1.



ZIN 060039



ZIN 060040



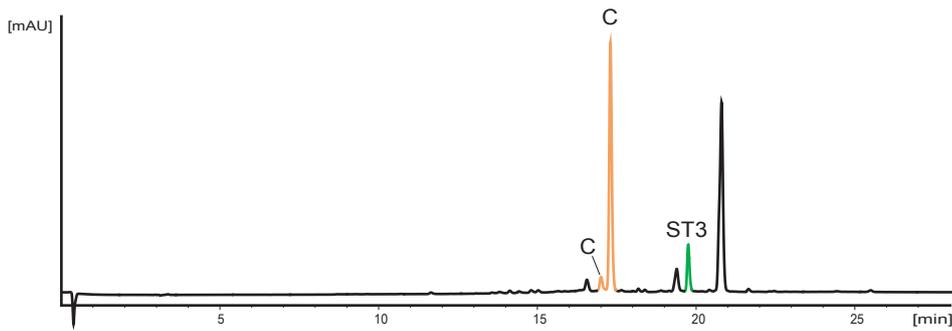
ZIN 060041

<b>C2</b>	Curcumin	<b>ST3</b>	ar-Turmeron
<b>C3</b>	Demethoxycurcumin	<b>ST</b>	vermutlich ein Sesquiterpen
<b>C</b>	vermutlich ein Curcuminoid		

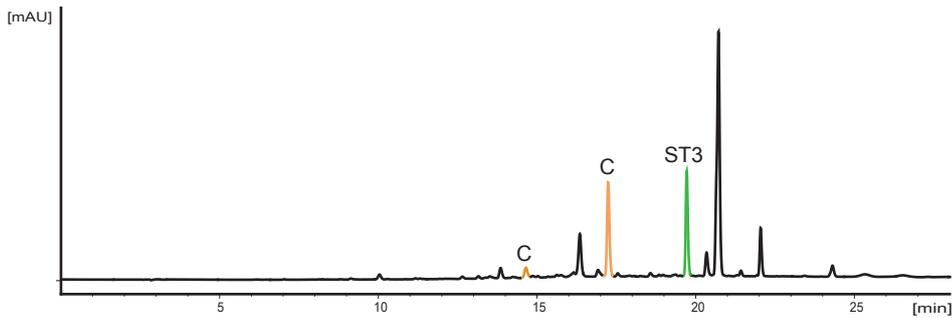
Abb. 5.9.: HPLC-Profile im Vergleich  $\text{CHCl}_3$ -Phase Rhizom *C. longa* ZIN 060037, ZIN 060038, ZIN 060039, ZIN 060040 und ZIN 060041 aus verschiedenen Märkten in Thailand, Bangkok. ST3 konnte mit einer Vergleichssubstanz durch Co-Chromatographie und UV-Spektrum identifiziert werden.

### 5.1.5. *Curcuma* spec.

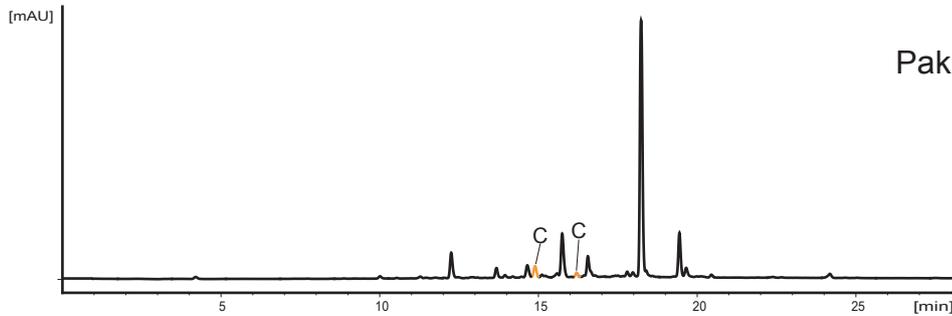
Vier weitere *Curcuma*-Arten konnten wegen fehlender Infloreszenzen nicht eindeutig bestimmt werden. Die HPLC-Chromatogramme (Abb. 5.10.) lassen darauf schließen, daß es sich nicht um *C. longa* handelt. ZIN 060001 und ZIN 06004 können aufgrund einer vermutlichen Akkumulation von Curcuminoiden (**C**) den beiden Individuen ZIN 060028 und ZIN 060014 gegenüber gestellt werden. Die zwei letzteren weichen durch das Zurücktreten der vermutlichen Curcuminoide (**C**) ab (Abb. 5.10.).



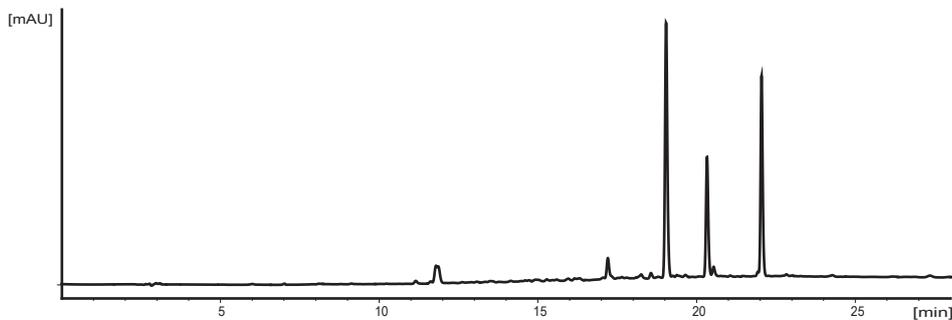
ZIN 060001  
Chatuchak-Markt



ZIN 060004  
Chatuchak-Markt



ZIN 060028  
Pak Thong Chai Market



ZIN 060014  
Chatuchak-Markt

**ST3** ar-Turmeron  
**C** vermutlich ein Curcuminoid

Abb. 5.10.: HPLC-Profile im Vergleich  $\text{CHCl}_3$ -Phase Rhizom *Curcuma spec.* ZIN 060001, ZIN 060004, ZIN 060028 und ZIN 060014. ST3 konnte mit einer Vergleichssubstanz durch Co-Chromatographie und UV-Spektrum identifiziert werden.

## 5.2. Biologische Aktivität

### 5.2.1. Bioautographische Tests auf DC-Platten mit *C. sphaerospermum*

Bezugnehmend auf die ausgeprägte antifungale Wirkung der *Zingiber*-Extrakte (Abb. 5.1.) wurden diese nun bei fünf verschiedenen Herkünften in Verdünnungsreihen von 12,5µg bis 200µg auf Dünnschichtplatten vergleichend gegen *C. sphaerospermum* (bioautographisch) getestet. Wie Abb. 5.11. zeigt, ergeben sich bei den Herkünften von *Z. montanum* (ZIN 060024, ZIN 060032) in allen Verdünnungsschritten die deutlichsten Hemmhöfe. Besonders schwach erscheint dagegen die Wirkung bei *Z. ottensii*.

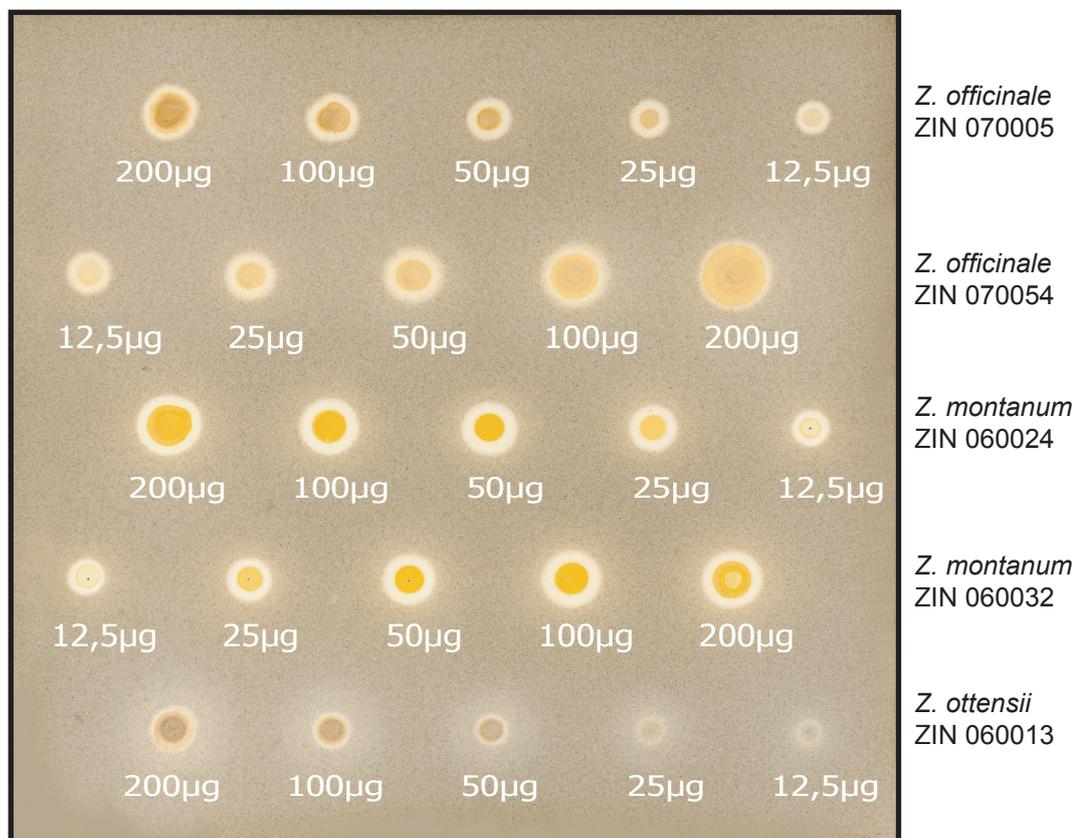


Abb. 5.11.: Verdünnungsreihe von antifungal wirksamen Gesamtextrakten auf DC-Platte besprüht mit einer Sporensuspension von *C. sphaerospermum*.

Substanz	Wirkung	Diffusion
<i>Z. officinale</i> ZIN 070005	mittel	schwach
<i>Z. officinale</i> ZIN 070054	mittel	schwach
<i>Z. montanum</i> ZIN 060024	stark	schwach
<i>Z. montanum</i> ZIN 060032	stark	schwach
<i>Z. ottensii</i> ZIN 060013	mittel	mittel

Tab. 5.1.: Auswertung der Verdünnungsreihen von antifungal wirksamen Gesamtextrakten auf DC-Platte besprüht mit *C. sphaerospermum*. Die Herkünfte der einzelnen Individuen sind in Tab. 3.1. nachzulesen.

### 5.2.1.1. *Z. montanum* (J. König) Link ex A. Dietr.

Auf der Suche nach den aktiven Reinstoffen wurden die verschiedenen Mitteldruck-Säulenfraktionen (MPLC) des Rhizom-Extrakts ZIN 060024 mit Dünnschicht-Chromatographie (DC) vergleichend analysiert. Demnach lassen sich die antifungalen Substanzen (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB2**), (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat (**PB4**) und (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (**PB3**) in Abb. 5.12. D auch mit anderen Detektionsmethoden (Abb. 5.12. A, B, C) detektieren und von den übrigen Stoffen unterscheiden. Zusammen mit dem hier weniger stark wirkenden (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB1**) wurden alle Stoffe isoliert und ihre Molekülstrukturen mit NMR- und MS-Analysen auf dem Institut für Organische Chemie aufgeklärt. Bei allen vier Stoffen handelt es sich um Derivate der Phenylbutenoide. Die am stärksten wirkenden Stoffe waren das (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (**PB3**) und sein Acetylesther (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat (**PB4**) (Abb. 5.12.).

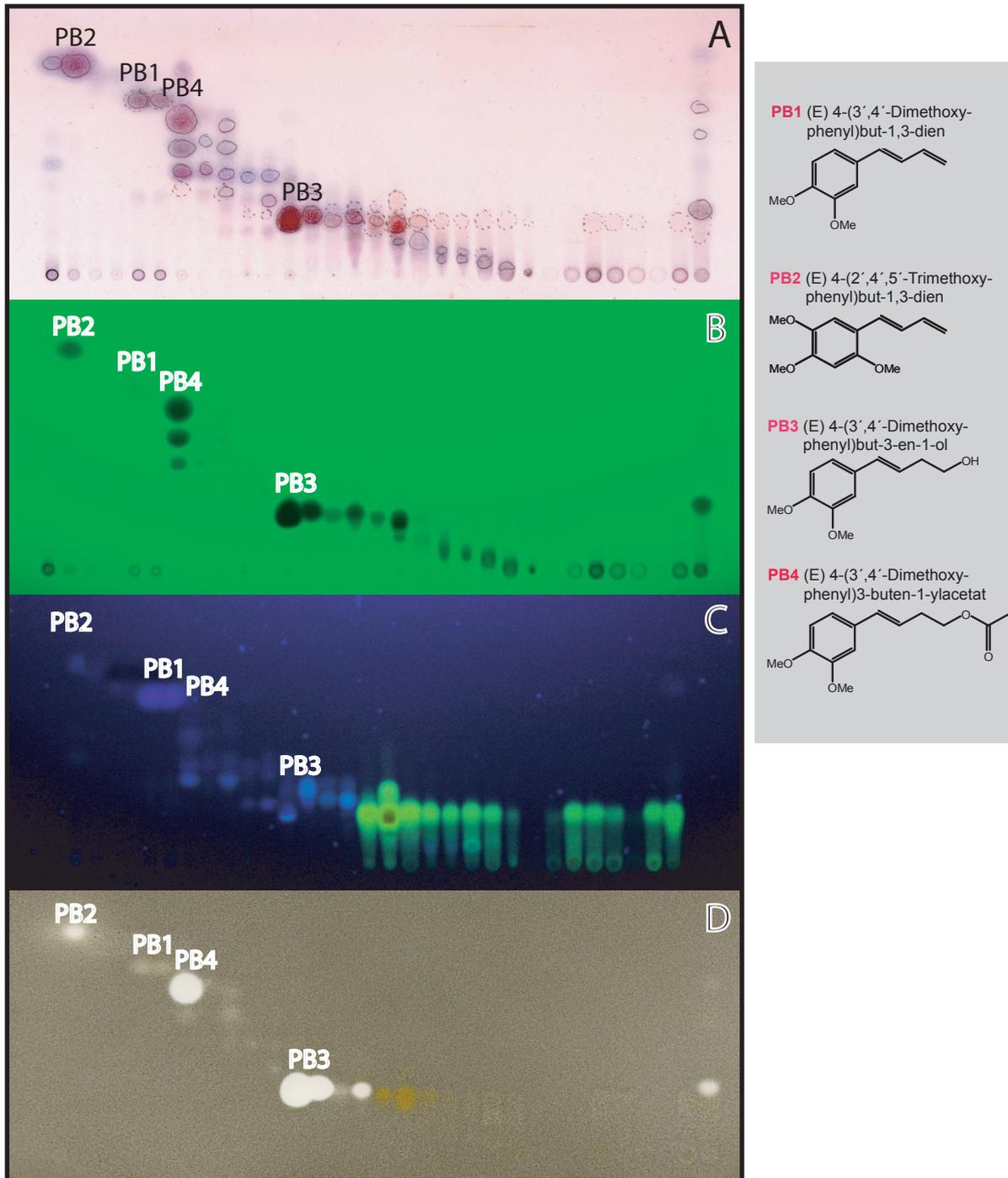


Abb. 5.12.: Auftrennung der MPLC-Fractionen *Z. montanum* ZIN 060024 (Thailand, Pak Thong Chai-Markt) mittels DC. Laufmittel: Et<sub>2</sub>O/PE/MeOH 60/40/5. A: DC detektiert mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; B: unbehandelte DC unter UV-Licht (254nm); C: unbehandelte DC unter UV-Licht (366nm); D: Bioautographie mit *C. sphaerospermum*

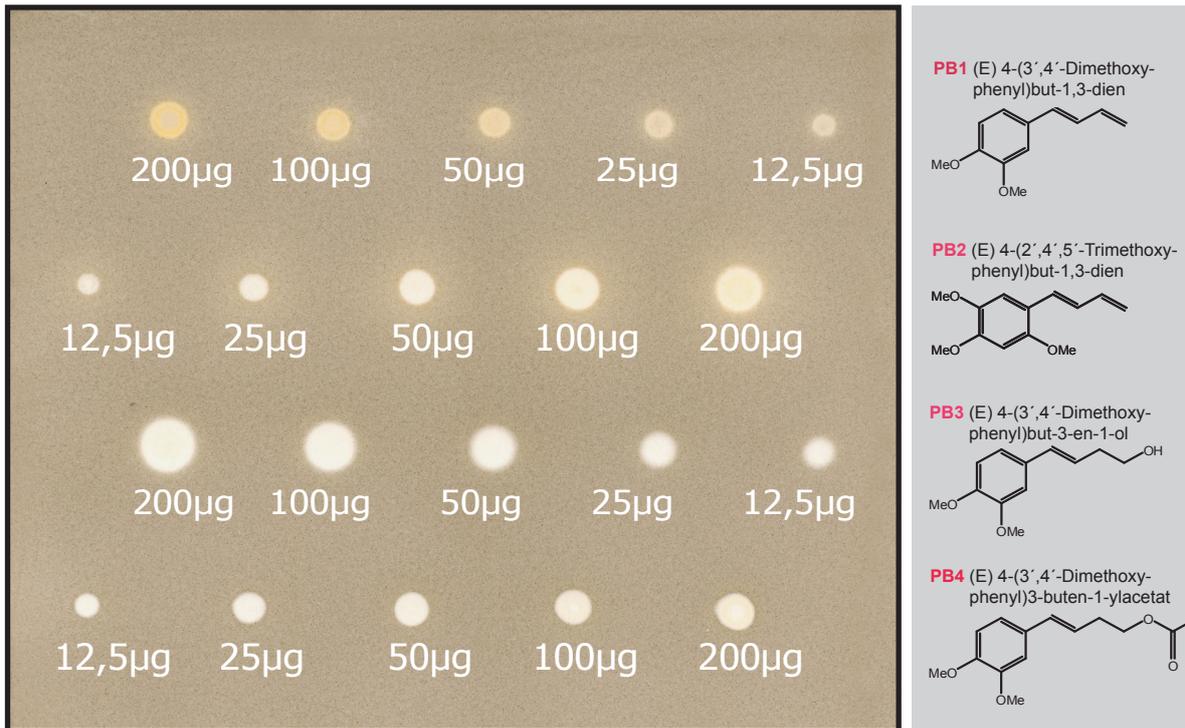


Abb. 5.13.: Verdünnungsreihen von antifungal wirksamen Phenylbutenoiden auf DC-Platte behandelt mit einer Sporensuspension von *C. sphaerospermum*.

Substanz	Wirkung	Diffusion
<b>PB1</b>	mittel	keine
<b>PB2</b>	stark	schwach
<b>PB3</b>	stark	keine
<b>PB4</b>	stark	keine

Tab. 5.2.: Auswertung der Verdünnungsreihen von antifungal wirksamen Phenylbutenoiden auf DC-Platte besprüht mit *C. sphaerospermum*.

### 5.2.1.2. *Z. officinale* Roscoe

Im Gegensatz zu *Z. montanum* dominiert bei den hier untersuchten Herkünften von *Z. officinale* die Stoffklasse der Gingerole (Abb. 5.14.). Aufgrund der bioautographischen Befunde kommt hier dem (6)-Gingerol (**G1**) eine stärkere antifungale Wirkung zu. Das Dehydratisierungsprodukt Shogaol (**G2**) wirkt nur sehr schwach, während das Hexahydrocurcumin, welches auch als Curcuminoid (**C1**) oder Diarylheptanoid bezeichnet werden kann, überhaupt keinen Hemmhof zeigt. Dementsprechend verhalten sich auch die Verdünnungsreihen der Reinstoffe, wo es nur bei (6)-Gingerol (**G1**) auch bei der niedrigsten Verdünnung noch zur Ausbildung eines deutlichen Hemmhofs kommt (Abb. 5.15.).

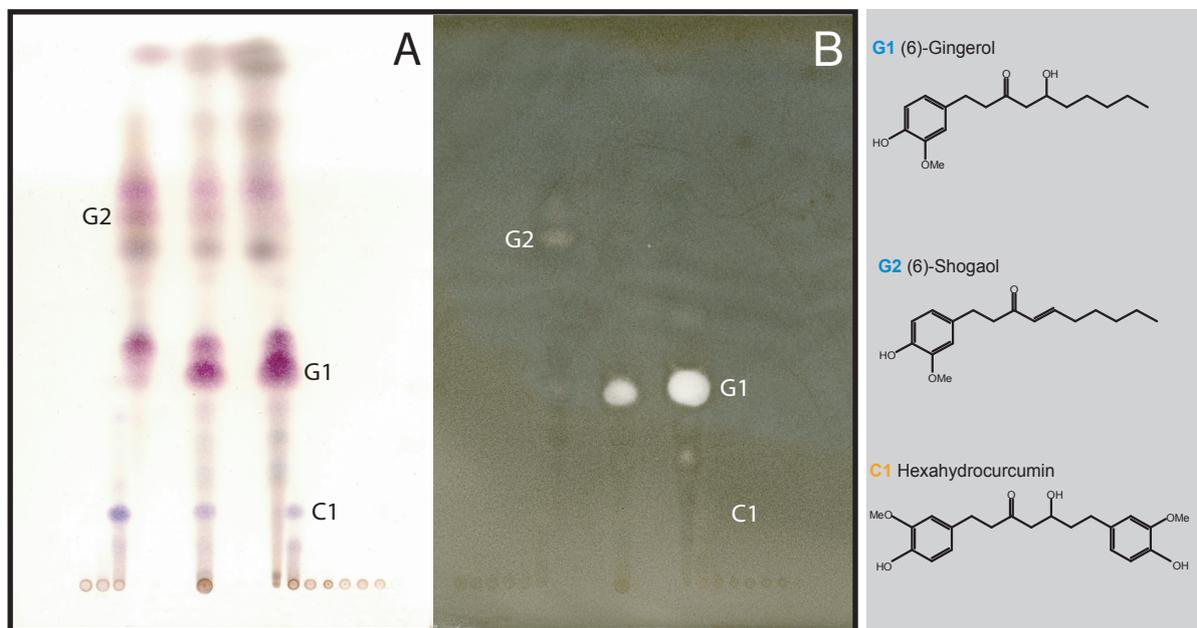


Abb. 5.14.: Auftrennung der Trockensäulen-Fractionen *Z. officinale* ZIN 070005 (Thailand, Pak Thong Chai Markt) mittels DC. Laufmittel: Et<sub>2</sub>O/PE/MeOH 60/40/5. A: DC detektiert mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; B: Bioautographie mit *C. sphaerospermum*

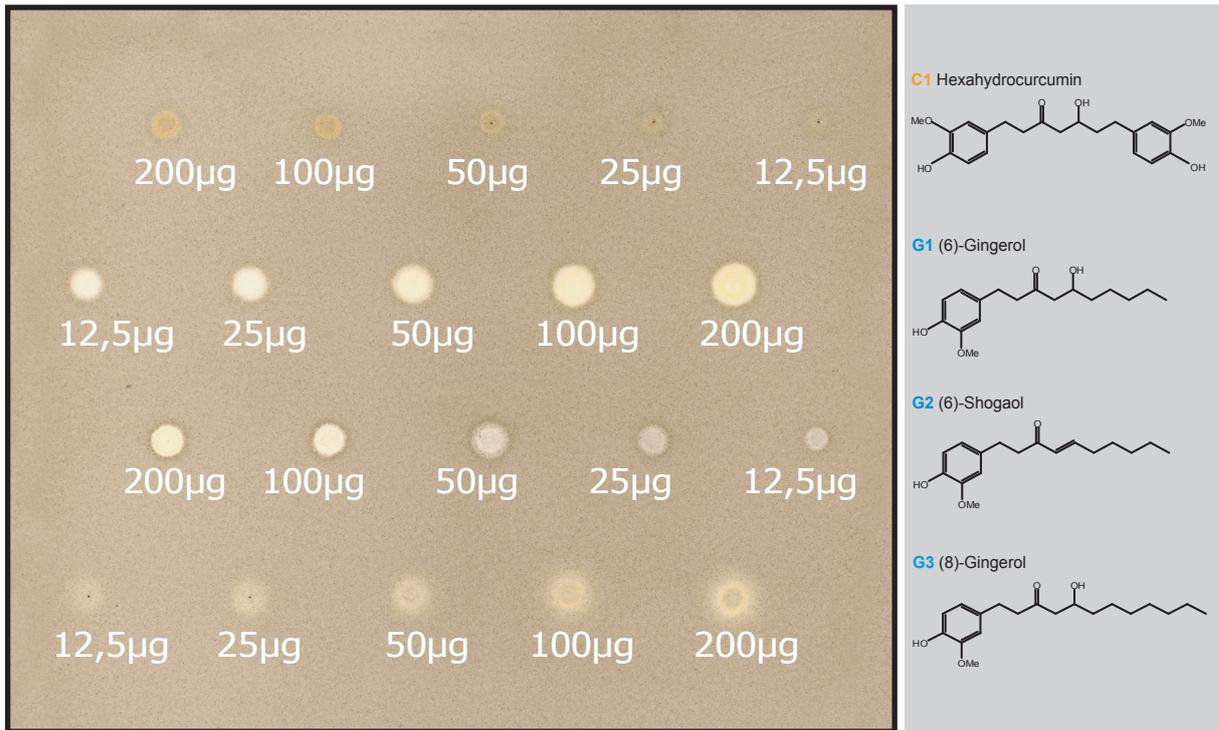


Abb. 5.15.: Verdünnungsreihen von antifungal wirksamen Substanzen auf DC-Platte behandelt mit einer Sporensuspension von *C. sphaerospermum*.

Substanz	Wirkung	Diffusion
<b>C1</b>	sehr schwach	keine
<b>G1</b>	stark	keine
<b>G2</b>	mittel	keine
<b>G3</b>	schwach	schwach

Tab. 5.3.: Auswertung der Verdünnungsreihen von antifungal wirksamen Substanzen auf DC-Platte behandelt mit Sporensuspension von *C. sphaerospermum*.

### 5.2.1.3. *Curcuma longa* L.

Aufgrund der intensiven Gelbfärbung war beim Rhizom-Extrakt von *Curcuma longa* die antifungale Wirkung in der Bioautographie zunächst nicht deutlich erkennbar (Abb. 5.1.). Erst bei einem Vergleich der entsprechenden Säulenfraktionen zeigte sich hier eine klare Hemmwirkung (Abb. 5.16.). Bei den aktiven Stoffen handelte es sich um die beiden bekannten Curcuminoide Curcumin (**C2**) und Demethoxycurcumin (**C3**). Beide Substanzen konnten in der vorliegenden Arbeit isoliert und ihre Strukturen durch NMR-Analysen aufgeklärt werden. Ihre antifungale Wirkung wurde auch durch Verdünnungsreihen mit ELISA-Tests in Mikrotiterplatten ermittelt (Abb. 5.18.). Auf eine geringere Aktivität lassen auch die weniger deutlichen Hemmhöfe von ar-Turmeron (**ST3**) und den zwei weiteren vermutlichen Sesquiterpenen (**ST**) schließen (Abb. 5.16.).

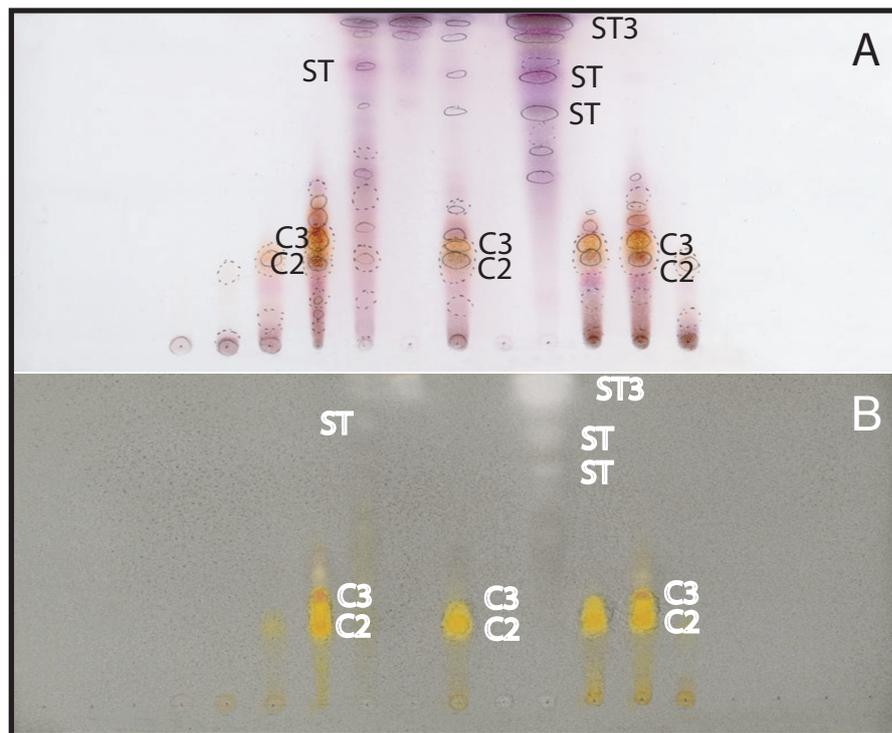


Abb. 5.16.: Auftrennung der Trockensäulen-Fractionen *C. longa* ZIN 060038 (Thailand, Chatuchak-Markt), mittels DC. Laufmittel: Et<sub>2</sub>O/PE/MeOH 60/40/5. A: DC detektiert mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; B: Bioautographie mit *C. sphaerospermum*

### 5.2.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Mikrotiterplatten

Genauere Aussagen über Dosis-Wirkungsbeziehungen der antifungal wirksamen Substanzen konnte aber erst durch ELISA-Tests in Mikrotiterplatten erreicht werden. Dazu wurde ein gelbes Tetrazoliumsalz (MTT) für eine enzymatische Farbreaktion verwendet (Kap. 3.4.4.). Wegen der raschen Keimung und der Vergleichbarkeit mit der Bioautographie auf DC-Platten wurde auch hier *C. sphaerospermum* als Testpilz eingesetzt. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (entspricht den Extinktionswerten bei 560nm). Diese Werte steigen, je mehr gelbes MTT (UV min. 560nm) durch die mitochondriale Dehydrogenase der noch lebenden Zellen von *C. sphaerospermum* in das violett-blaue Formazan (UV max. 560nm) umgewandelt wird. Die Berechnung der EC50-Werte (jene Konzentration, welche das Wachstum um 50% hemmt) erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 10. Für die Darstellung der Beziehung zwischen Wachstums-Hemmung und Wirkstoff-Konzentration wurde eine Regressions-Analyse der Einzelwerte nach der Wachstumsfunktion  $e^{(b_0+b_1xc)}$  durchgeführt (b<sub>0</sub>=Wachstum zum Zeitpunkt Null, b<sub>1</sub>=Wachstum zum Zeitpunkt der Messung, c=Konzentration der Testsubstanz) (NORRIS & RIBBONS, 1972). Mit den Daten aus diesem Regressionsmodell werden die EC50-Werte durch ein Probit-Analyse-Programm errechnet. Diese Versuchsreihen konnten aufgrund zu geringer Mengen nicht mit allen isolierten Reinstoffen durchgeführt werden. Aufgrund der Erfahrungen von früheren Ergebnissen der Abteilung für vergleichende Phytochemie erwies sich die Zimtsäure (**ZS**) als besonders aktiv. Sie wurde daher als Vergleichssubstanz mitgetestet. Um auch einen Einblick über die Aktivität des Ätherischen Öls von *Z. officinale* (ZIN 070005) zu gewinnen, wurde außerdem auch noch orientierend ein frisches Rhizom einer Wasserdampfdestillation unterzogen und mit HPLC-UV (Abb. 5.7.) analysiert.

Wie in Tab. 5.4. zu sehen, ist eine hohe Wirksamkeit bei (8)-Gingerol (**G3**) festzustellen, das bereits bei 1,30 µg/ml eine 50%ige Hemmung auf *C. sphaerospermum* zeigt. Ebenfalls gute Werte liefert (6)-Shogaol (**G2**) mit 6,01 µg/ml. Das Ätherische Öl von *Z. officinale* mit dem EC50-Wert von 13,67 µg/ml beinhaltet einen ebenso beachtlichen Anteil an antifungal Inhaltsstoffen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Bioautographie auf DC zeigen die Phenylbutenoide und Curcuminoid eine eher schlechte Wirkung (Abb. 5.12. und 5.18.).

<b>Substanz</b>	<b>EC50 (µg/ml)</b>
(G3) (8)-Gingerol	1,30 (0,62-2,24)
(G2) (6)-Shogaol	6,01 (4,60-7,86)
(G1) (6)-Gingerol	45,40 (21,27-149,57)
(C1) Hexahydrocurcumin	>170
(C2) Curcumin	>170
(C3) Demethoxycurcumin	106,87 (24,73-1316,05)
(PB1) Dimethoxyphenylbutadien	147,44 (102,72-272,53)
(PB2) Trimethoxyphenylbutadien	69,01 (14,73-1255,09)
(PB3) Dimethoxyphenylbutenol	>170
(PB4) Dimethoxyphenylacetat	>170
(ZS) Zimtsäure	25,71 (15,26-41,27)
Ätherisches Öl von <i>Z. officinale</i>	13,67 (5,84-45,81)

Tab. 5.4.: Auswertung des Bioassays MTT mit *C. sphaerospermum*, Formelbilder und Herkunftspflanzen der getesteten isolierten Reinstoffe sind dem Spektraldatenkatalog im Anhang (Kap.: 7.1.) zu entnehmen.

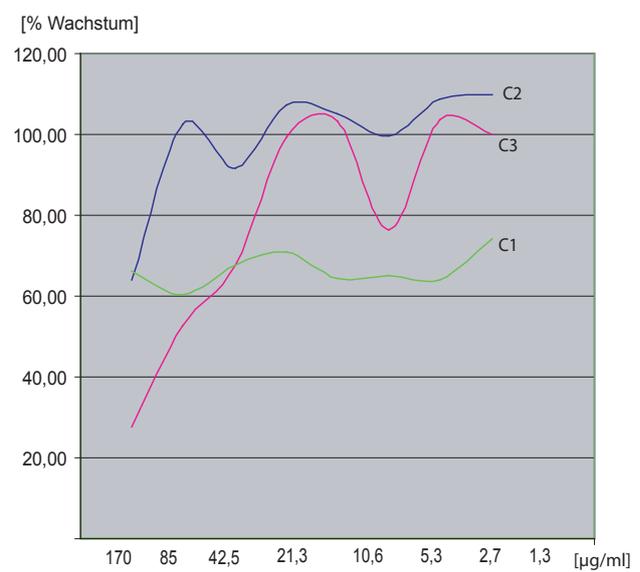


Abb. 5.18.: Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung von *C. sphaerospermum* anhand MTT-Bioassay (Mikrotiterplattentest/Elisa) durch die isolierten Reinstoffe und Vergleichssubstanz Zimtsäure (ZS). Die zu den Reinstoffen entsprechenden Formelbilder sind dem Spektraldatenkatalog (Kap. 7.1.) zu entnehmen.

- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>G1</b> (6)-Gingerol      | <b>PB1</b> (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien        |
| <b>G2</b> (6)-Shogaol       | <b>PB2</b> (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien    |
| <b>G3</b> (8)-Gingerol      | <b>PB3</b> (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-but-3-en-1-ol      |
| <b>C1</b> Hexahydrocurcumin | <b>PB4</b> (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat |
| <b>C2</b> Curcumin          | <b>ZS</b> Zimtsäure   |
| <b>C3</b> Demethoxycurcumin | <b>ÄÖ</b> Ätherisches Öl von <i>Z. officinale</i>           |

## Rohdaten für die Ermittlung der EC50-Werte

### (G2) (6)-Shogaol

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	µg/ml
0,1040	0,2110	0,2480	0,2890	0,2950	0,3180	0,3650	0,4310	0,4480	0,5340	0,4970	
0,0820	0,1580	0,1750	0,1960	0,2320	0,2570	0,3090	0,3600	0,3970	0,4410	0,4510	
0,0740	0,0950	0,1100	0,1410	0,1840	0,2260	0,3270	0,3840	0,4040	0,4330	0,3910	
0,0640	0,0640	0,0720	0,1030	0,1490	0,1970	0,2700	0,3290	0,3710	0,4110	0,3670	
<b>0,0810</b>	<b>0,1320</b>	<b>0,1513</b>	<b>0,1823</b>	<b>0,2150</b>	<b>0,2495</b>	<b>0,3178</b>	<b>0,3760</b>	<b>0,4050</b>	<b>0,4548</b>	<b>0,4265</b>	Ø
<b>17,34</b>	<b>23,56</b>	<b>26,98</b>	<b>34,36</b>	<b>41,13</b>	<b>47,99</b>	<b>60,28</b>	<b>68,00</b>	<b>71,96</b>	<b>85,12</b>	<b>86,01</b>	% W

### (G3) (8)-Gingerol

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	µg/ml
0,0570	0,0550	0,0570	0,0580	0,0880	0,1510	0,2100	0,2150	0,3010	0,2570	
0,0630	0,0560	0,0590	0,0590	0,0890	0,1440	0,2460	0,2580	0,3400	0,3810	
0,0620	0,0590	0,0610	0,0630	0,0940	0,1560	0,2120	0,2140	0,3250	0,3590	
0,0630	0,0590	0,0570	0,0630	0,1060	0,1860	0,2860	0,3100	0,4140	0,4240	
<b>0,0613</b>	<b>0,0573</b>	<b>0,0585</b>	<b>0,0608</b>	<b>0,0943</b>	<b>0,1593</b>	<b>0,2385</b>	<b>0,2493</b>	<b>0,3450</b>	<b>0,3553</b>	Ø
<b>13,11</b>	<b>10,22</b>	<b>10,44</b>	<b>11,45</b>	<b>18,03</b>	<b>30,63</b>	<b>45,24</b>	<b>45,08</b>	<b>61,30</b>	<b>72,62</b>	% W

### (C2) Curcumin

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	0,85	µg/ml
0,3600	0,6030	0,5470	0,5940	0,5950	0,5550	0,6090	0,6500	0,5630	0,5960	0,6580	0,6770	
0,3120	0,5520	0,5020	0,5730	0,5430	0,5280	0,5830	0,6160	0,5670	0,5490	0,6090	0,5660	
0,2890	0,5380	0,5140	0,5410	0,5080	0,5280	0,5590	0,5880	0,5270	0,5940	0,5670	0,5960	
0,2380	0,6030	0,4900	0,5660	0,5530	0,4630	0,5400	0,5780	0,5490	0,5690	0,5570	0,6240	
<b>0,2998</b>	<b>0,5740</b>	<b>0,5133</b>	<b>0,5685</b>	<b>0,5498</b>	<b>0,5185</b>	<b>0,5728</b>	<b>0,6080</b>	<b>0,5515</b>	<b>0,5770</b>	<b>0,5978</b>	<b>0,6158</b>	Ø
<b>64,16</b>	<b>102,46</b>	<b>91,55</b>	<b>107,18</b>	<b>105,17</b>	<b>99,74</b>	<b>108,65</b>	<b>109,96</b>	<b>97,99</b>	<b>108,00</b>	<b>120,54</b>	<b>120,86</b>	% W

### (C3) Demethoxycurcumin

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	µg/ml
0,1420	0,2850	0,3880	0,5220	0,5420	0,5170	0,5680	0,5900	0,5370	0,5980	0,6230	
0,1270	0,3120	0,3930	0,5230	0,5420	0,5270	0,5720	0,5630	0,5380	0,5830	0,5230	
0,1200	0,2830	0,3610	0,5320	0,5480	0,5270	0,5210	0,5630	0,4760	0,5590	0,5840	
0,1290	0,3020	0,3710	0,5260	0,5280	0,5430	0,5240	0,4950	0,5090	0,5720	0,6270	
<b>0,1295</b>	<b>0,2955</b>	<b>0,3783</b>	<b>0,5258</b>	<b>0,5400</b>	<b>0,5285</b>	<b>0,5463</b>	<b>0,5528</b>	<b>0,5150</b>	<b>0,5780</b>	<b>0,5893</b>	Ø
<b>27,72</b>	<b>52,75</b>	<b>67,47</b>	<b>99,12</b>	<b>103,30</b>	<b>76,32</b>	<b>103,62</b>	<b>99,97</b>	<b>91,51</b>	<b>108,19</b>	<b>118,82</b>	% W

### (G1) (6)-Gingerol

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	0,85	µg/ml
0,2460	0,2310	0,2810	0,3440	0,3360	0,3630	0,3970	0,4650	0,4740	0,5360	0,4690	0,4810	
0,2180	0,2910	0,2300	0,3190	0,3890	0,4110	0,3960	0,4320	0,3900	0,4500	0,5310	0,5360	
0,1750	0,2060	0,2770	0,2640	0,3310	0,3820	0,3230	0,3460	0,3630	0,4600	0,4820	0,5330	
0,1210	0,2520	0,2720	0,3160	0,3090	0,3570	0,4050	0,3900	0,4400	0,3620	0,2280	0,3810	
<b>0,1900</b>	<b>0,2450</b>	<b>0,2650</b>	<b>0,3108</b>	<b>0,3413</b>	<b>0,3783</b>	<b>0,3803</b>	<b>0,4083</b>	<b>0,4168</b>	<b>0,4520</b>	<b>0,4275</b>	<b>0,4828</b>	Ø
<b>40,67</b>	<b>43,73</b>	<b>47,27</b>	<b>58,58</b>	<b>65,28</b>	<b>72,76</b>	<b>72,13</b>	<b>73,83</b>	<b>74,05</b>	<b>84,60</b>	<b>99,62</b>	<b>94,76</b>	% W

### (C1) Hexahydrocurcumin

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	µg/ml
0,3530	0,3260	0,3790	0,4060	0,3100	0,3460	0,3850	0,4370	0,4070	
0,2820	0,3650	0,3790	0,3560	0,3340	0,3220	0,2910	0,4070	0,3420	
0,3730	0,3300	0,4210	0,3550	0,3670	0,3770	0,3510	0,3450	0,2860	
0,2310	0,3280	0,3400	0,3840	0,0970	0,3080	0,3200	0,4550	0,2280	
<b>0,3098</b>	<b>0,3373</b>	<b>0,3798</b>	<b>0,3753</b>	<b>0,2770</b>	<b>0,3383</b>	<b>0,3368</b>	<b>0,4110</b>	<b>0,3158</b>	Ø
<b>66,30</b>	<b>60,20</b>	<b>67,74</b>	<b>70,74</b>	<b>64,47</b>	<b>65,06</b>	<b>63,88</b>	<b>74,33</b>	<b>61,30</b>	% W

**(PB2) (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien**

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	0,85	µg/ml
0,1720	0,2210	0,2950	0,5010	0,3910	0,4380	0,4450	0,4610	0,4410	0,4480	0,3510	0,3710	
0,1460	0,2140	0,2890	0,3150	0,3400	0,3430	0,2990	0,3580	0,3370	0,3300	0,3420	0,3490	
0,1300	0,2000	0,3070	0,3190	0,3390	0,2990	0,2990	0,3870	0,3360	0,3330	0,3280	0,3500	
0,1340	0,2330	0,3210	0,3560	0,4160	0,3700	0,4000	0,4170	0,4500	0,4040	0,3150	0,4350	
<b>0,1455</b>	<b>0,2170</b>	<b>0,3030</b>	<b>0,3728</b>	<b>0,3715</b>	<b>0,3625</b>	<b>0,3608</b>	<b>0,4058</b>	<b>0,3910</b>	<b>0,3788</b>	<b>0,3340</b>	<b>0,3763</b>	Ø
<b>31,14</b>	<b>38,74</b>	<b>54,05</b>	<b>70,27</b>	<b>71,07</b>	<b>69,73</b>	<b>68,43</b>	<b>73,38</b>	<b>69,47</b>	<b>70,89</b>	<b>67,55</b>		% W

**(PB3) (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol**

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	0,85	µg/ml
0,1750	0,4230	0,4490	0,4350	0,4870	0,4370	0,4210	0,4380	0,3990	0,4850	0,4150	0,4750	
0,1470	0,4130	0,4440	0,4700	0,5060	0,5070	0,5210	0,5450	0,4730	0,5620	0,5260	0,5390	
0,1320	0,3800	0,4460	0,4830	0,5150	0,5320	0,5040	0,5550	0,5790	0,5010	0,4860	0,6010	
0,1380	0,3900	0,4440	0,4300	0,5220	0,4920	0,4930	0,5010	0,4570	0,5000	0,5230	0,5120	
<b>0,1480</b>	<b>0,4015</b>	<b>0,4458</b>	<b>0,4545</b>	<b>0,5075</b>	<b>0,4920</b>	<b>0,4848</b>	<b>0,5098</b>	<b>0,4770</b>	<b>0,5120</b>	<b>0,4875</b>	<b>0,5318</b>	Ø
<b>31,68</b>	<b>71,67</b>	<b>79,51</b>	<b>85,69</b>	<b>97,09</b>	<b>94,64</b>	<b>91,96</b>	<b>92,19</b>	<b>84,75</b>	<b>95,83</b>	<b>98,31</b>	<b>104,38</b>	% W

**(PB4) (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat**

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	0,85	µg/ml
0,1340	0,3360	0,3840	0,3390	0,3930	0,3860	0,4120	0,5630	0,5800	0,3890	0,6000	0,6530	
0,1450	0,3470	0,4260	0,3820	0,3960	0,3250	0,4560	0,5290	0,5830	0,5650	0,6310	0,6700	
0,1500	0,3760	0,4390	0,3500	0,5890	0,3920	0,5420	0,5500	0,6150	0,4470	0,6100	0,6640	
0,1490	0,4200	0,4700		0,6370	0,4580	0,5620	0,6110	0,6540	0,5240	0,6930	0,7010	
<b>0,1445</b>	<b>0,3698</b>	<b>0,4298</b>	<b>0,2678</b>	<b>0,5038</b>	<b>0,3903</b>	<b>0,4930</b>	<b>0,5633</b>	<b>0,6080</b>	<b>0,4813</b>	<b>0,6335</b>	<b>0,6720</b>	Ø
<b>30,93</b>	<b>66,00</b>	<b>76,66</b>	<b>67,30</b>	<b>96,37</b>	<b>75,07</b>	<b>93,52</b>	<b>101,87</b>	<b>108,03</b>	<b>90,08</b>	<b>127,75</b>	<b>131,91</b>	% W

**(ZS) Zimtsäure**

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	0,85	µg/ml
0,0460	0,0510	0,1430	0,2680	0,4050	0,5010	0,5980	0,6550	0,6380	0,6690	0,7000	0,7670	
0,0470	0,0510	0,1500	0,2780	0,3990	0,5170	0,5530	0,6360	0,6370	0,6480	0,6930	0,7280	
0,0470	0,0500	0,1470	0,2880	0,4000	0,5370	0,5850	0,6130	0,6680	0,6770	0,6600	0,7250	
0,0480	0,0520	0,1370	0,2720	0,4250	0,5220	0,6180	0,6480	0,6320	0,6760	0,6820	0,7440	
<b>0,0470</b>	<b>0,0510</b>	<b>0,1443</b>	<b>0,2765</b>	<b>0,4073</b>	<b>0,5193</b>	<b>0,5885</b>	<b>0,6380</b>	<b>0,6438</b>	<b>0,6675</b>	<b>0,6838</b>	<b>0,7410</b>	Ø
<b>10,06</b>	<b>9,10</b>	<b>25,73</b>	<b>52,13</b>	<b>77,91</b>	<b>99,88</b>	<b>111,64</b>	<b>115,38</b>	<b>114,38</b>	<b>124,94</b>	<b>137,88</b>	<b>145,45</b>	% W

**(PB1) (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien**

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	0,85	µg/ml
0,2230	0,3110	0,3050	0,3350	0,3240	0,3310	0,3670	0,3550	0,3400	0,3570	0,3470	0,3540	
0,2180	0,3280	0,3610	0,3090	0,3700	0,3270	0,3570	0,3240	0,3360	0,3700	0,3800	0,3960	
0,2140	0,3440	0,3560	0,3290	0,3410	0,3270	0,3200	0,3510	0,3270	0,3760	0,3690	0,3620	
0,2180	0,3440	0,3670	0,3340	0,3740	0,3330	0,3520	0,3220	0,3100	0,3390	0,3770	0,3720	
<b>0,2183</b>	<b>0,3318</b>	<b>0,3473</b>	<b>0,3268</b>	<b>0,3523</b>	<b>0,3295</b>	<b>0,3490</b>	<b>0,3380</b>	<b>0,3283</b>	<b>0,3605</b>	<b>0,3683</b>	<b>0,3710</b>	Ø
<b>46,71</b>	<b>59,22</b>	<b>61,94</b>	<b>61,60</b>	<b>67,39</b>	<b>63,38</b>	<b>66,21</b>	<b>61,13</b>	<b>58,32</b>	<b>67,48</b>	<b>74,26</b>	<b>72,82</b>	% W

**Ätherisches Öl von *Z. officinale***

170	85	42,5	21,25	10,6	5,3	2,66	1,33	0,66	0,33	0,17	0,85	µg/ml
0,1690	0,2280	0,2280	0,2620	0,2720	0,2620	0,3110	0,2670	0,3180	0,2930	0,3170	0,3310	
0,1850	0,2330	0,2400	0,2850	0,2930	0,2770	0,3370	0,2810	0,3180	0,3160	0,3380	0,3330	
0,1800	0,2180	0,2470	0,2730	0,2710	0,2650	0,3420	0,2790	0,3150	0,3190	0,3370	0,3350	
0,2050	0,2570	0,2580	0,3040	0,3000	0,3000	0,3810	0,3100	0,3220	0,3400	0,3570	0,3500	
<b>0,1848</b>	<b>0,2340</b>	<b>0,2433</b>	<b>0,2810</b>	<b>0,2840</b>	<b>0,2760</b>	<b>0,3428</b>	<b>0,2843</b>	<b>0,3183</b>	<b>0,3170</b>	<b>0,3373</b>	<b>0,3373</b>	Ø
<b>39,54</b>	<b>41,77</b>	<b>43,39</b>	<b>52,98</b>	<b>54,33</b>	<b>53,09</b>	<b>65,02</b>	<b>51,41</b>	<b>56,55</b>	<b>59,33</b>	<b>68,01</b>	<b>66,20</b>	% W

Tab. 5.5.: Rohdaten (Extinktionswerte aus Elisa-Bioassay durch Enzymreaktion in lebenden Pilzzellen (Kap. 3.4.4. und Kap. 5.2.2.) für die Ermittlung der EC50-Werte durch Regressions- und Probit-Analyse. Ø: Mittelwert der vier gemessenen Wiederholungen; % W: prozentuelles Wachstum des Pilzes *C. sphaerospermum* bezogen auf die Kontrolle.

## 6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die methanolischen Rhizom-Extrakte von 27 verschiedenen Herkünften der 3 Zingiberaceen-Gattungen *Zingiber*, *Curcuma* und *Alpinia* durch HPLC getrennt und mit UV-Diodenarray-Detektion vergleichend analysiert. Parallele Bioassays mit Bioautographie auf DC-Platten als auch mit ELISA-Tests in Mikrotiterplatten ergaben gleichzeitig Hinweise auf das Auftreten antifungaler Stoffe. Nachdem in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit von Christian Gilli eine genauere Untersuchung der Gattung *Alpinia* durchgeführt wird, wurden hier nur die Ergebnisse von *Zingiber*- und *Curcuma*-Herkünften eingehender behandelt. Demnach ergeben sich für die hier untersuchten *Zingiber*- und *Curcuma*-Arten deutliche Unterschiede in der Stoffzusammensetzung und ihrer antifungalen Aktivität. Nach PANCHAROEN et al. (2000) wird die Gattung *Zingiber* phytochemisch durch die Phenylbutenoide, Gingerole, Curcuminoide, Sesquiterpene und Flavonoide charakterisiert. Sowohl chemotaxonomisch als auch funktionell erwiesen sich dabei übereinstimmend mit der Literatur die drei Stoffklassen der Gingerole (AGARWAL et al., 2001; ENDO, et al., 1990), Phenylbutenoide (HAN et al., 2004 & 2005; JEENAPONGSA, 2003; NUGROHO et al., 1996; LU et al. 2008) und Curcuminoide (AK & GÜLCIN, 2008; NISHIYAMA et al., 2005) als besonders wichtig. Davon konnten hier drei Gingerole, vier Phenylbutenoide und drei Curcuminoide isoliert und ihre Molekülstrukturen in Zusammenarbeit mit dem Institut der Organischen Chemie der Universität Wien aufgeklärt werden. Durch Co-Chromatographie mit Vergleichs-Substanzen und Literaturvergleich gelang auch noch die Identifizierung eines Gingerol- (SCHWERTNER & RIOS, 2007) und dreier Sesquiterpen-Derivate (AKIYAMA et al., 2006; BEDNARCZYK et al., 1975; DENYER et al., 1994; SADHU et al., 2007; ZENG et al., 2007). Bereits bei der Bioautographie mit Roh-Extrakten ergaben sich für die Herkünfte von *Z. officinale* (ZIN 060054, 070005) deutliche Hemmzonen für eine dominierende Substanz, die als das bereits bekannte (6)-Gingerol (**G1**) (ZARATE et al., 1996) identifiziert werden konnte (Abb. 5.1). Zusammen mit kleineren Mengen von (6)-Shogaol (**G2**), (8)-Gingerol (**G3**) und Hexahydrocurcumin (**C1**) sowie variierenden Mengen eines nicht identifizierten Sesquiterpens (**ST**) und Zingiberen (**ST2**) bilden sie das charakteristische HPLC-Profil (Abb.5.6). Im Gegensatz zu früheren Befunden mit meist humanpathogenen Pilzen (FICKER et al., 2003) zeigte hier (8)-Gingerol (**G3**) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 1,30 µg/ml die stärkste antifungale Wirkung. Danach folgte (6)-Shogaol (**G2**) mit 6,01 µg/ml (Abb.5.4).

In Übereinstimmung mit früheren Befunden (TUNTIWACHWUTTIKUL et

al., 1981; LU et al., 2005; MASUDA & JITOE, 1995) können die Herkünfte von *Z. montanum* (ZIN 060024, ZIN 060032, ZIN 060035, ZIN 060036 und ZIN 090004) durch die Akkumulation der Phenybutenoide (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB1**), (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien (**PB2**), (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-but-3-en-1-ol (**PB3**) und (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat (**PB4**) von den anderen untersuchten *Zingiber*-Arten *Z. ottensii* (ZIN 060013) und *Z. spectabile* (ZIN 090008) klar unterschieden werden. In den letzten beiden Arten konnten weder Phenylbutenoide noch Gingerole und Curcuminoiden nachgewiesen werden (Abb. 5.8.), stattdessen dominiert in beiden Rhizom-Extrakten das auch von AKIYAMA et al. (2006) beschriebene Sesquiterpen Zerumbon (**ST1**). Aufgrund des UV-Spektrums konnte diese Verbindung sowohl im Gesamtextrakt als auch in den Säulenfraktionen nachgewiesen, aber wegen der vermutlich hohen Flüchtigkeit mit präparativer DC nicht isoliert werden. Die von AKIYAMA (2006) beschriebenen Kaempferolderivate und Diarylheptanoide konnten bei *Z. ottensii* (ZIN 060013) und *Z. spectabile* (ZIN 070005) hier nicht detektiert werden. Eine nähere Verwandtschaft zwischen den beiden Arten ergibt sich neben diesen chemischen Befunden auch durch blütenmorphologische Merkmale.

Wie auch von HOEHLE, 2006 und LECHTENBERG et al., (2004) beschrieben, werden die Herkünfte von *C. longa* (ZIN 060037, ZIN 060038 und ZIN 060039) durch das Auftreten von Curcumin (**C2**) und Demethoxycurcumin (**C3**) gekennzeichnet. Diese zeigten jedoch bei den hier durchgeführten Mikrotiterplatten-Assays nur mäßige Aktivität (Abb. 5.4.). Bei zwei weiteren noch unbekanntenen *Curcuma*-Arten (ZIN 060001 und ZIN 060004) wurde eine dominierende Verbindung detektiert, bei der es sich aufgrund des UV-Spektrums vermutlich auch um ein Curcuminoid (**C**) handelt. Die HPLC-Profile der Herkünfte ZIN 060028 und 060014 weichen jedenfalls deutlich von *C. longa* ab und lassen nur auf Spuren von Curcuminoiden (**C**) schließen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen keinen einheitlichen chemischen Trend für die Gattung *Zingiber* erkennen, jedoch weisen die verschiedenen Herkünfte auf eine artspezifische Stoffausstattung hin. Dies steht in weitgehender Übereinstimmung mit den Untersuchungen von JIANG et al. (2006), wo allerdings zwischen den verschiedenen Herkünften auf quantitative Unterschiede der, für die entzündungshemmende Wirkung verantwortlichen, Gingerole hingewiesen wird. Dies wird auch durch die Untersuchungen von RAMIREZ-AHUMADA et al. (2006) unterstrichen, wonach in *Z. officinale* und *C. longa* die enge biosynthetische Beziehung zwischen den Gingerolen und Diarylheptanoiden aufgezeigt wird. Auch die in der vorliegenden Arbeit durch ihre HPLC-Profile deutlich abweichenden

Herkünfte von *Z. ottensii* (ZIN 060013) und *Z. spectabile* (ZIN 090008) beinhalten beide nach AKIYAMA et al. (2006) Diarylheptanoide. Unter Berücksichtigung der beiden noch nicht identifizierten *Curcuma*-Arten ist auch hier mit keiner einheitlichen chemischen Charakterisierung auf Gattungsebene zu rechnen. Auch hier lassen die unterschiedlichen Stoffmuster auf eine stärkere chemische Differenzierung zwischen den Arten schließen. Berücksichtigt man aber einerseits die wenigen bisher untersuchten Arten der beiden Gattungen *Zingiber* und *Curcuma* und andererseits die engen biosynthetischen Zusammenhänge zwischen den Gingerolen, Curcuminoiden und Phenylbutenoiden, so erscheint hier noch jede chemotaxonomische Schlußfolgerung verfrüht.

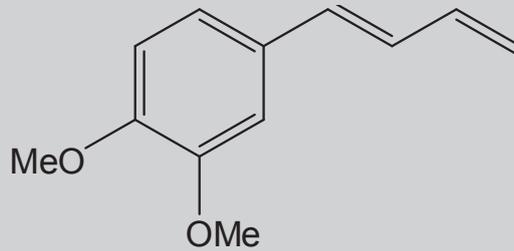
## **7. Anhang**

### **7.1. Spektraldatenkatalog**

Im Spektraldatenkatalog werden die Daten jener Substanzen zusammengefasst, die im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit isoliert oder co-chromatographisch identifiziert wurden. Angegeben werden neben dem Trivial- und IUPAC-Namen die Strukturformel, das UV- und IR-Spektrum, Herkunftspflanze und Organ, CAS-Nummer, Summenformel und Literaturzitat. Die vorhandenen  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten werden mit den entsprechenden Spektren auf einer zweiten Seite angeführt. Jene Substanzen welche lediglich aufgrund co-chromatographischer Analysen mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen identifiziert werden konnten sind entsprechend gekennzeichnet.

# (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)- but-1,3-dien

PB1



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

224 (max.), 202 (min.), 280 (sh), 290 (max.),  
310 (sh)

isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber montanum*

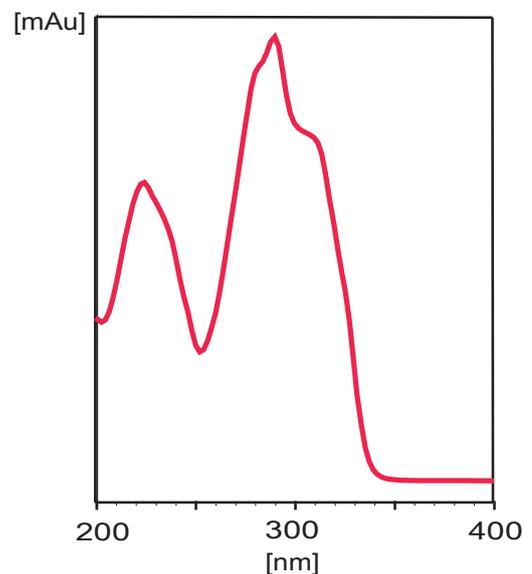
CAS-Nummer: 75560-74-6

Summenformel: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

mol.w.: 190,242

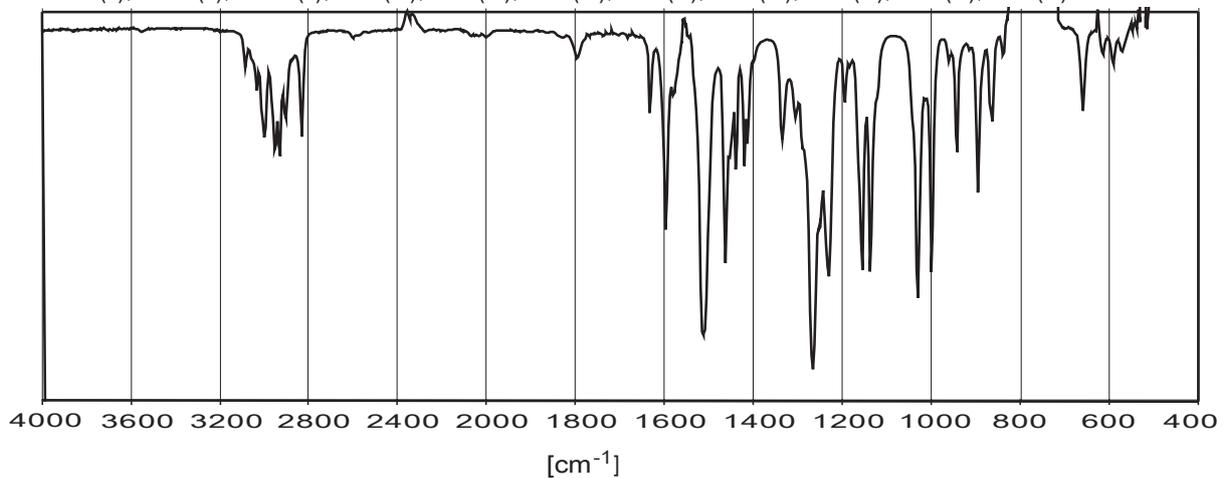
melt.p.: 37,5°C

Literatur: MASUDA et al., 1995



IR v CCl<sub>4</sub> cm<sup>-1</sup>:

3088 (w), 3036 (w), 3001 (m), 2954 (m), 2934 (m), 2908 (m), 2835 (m), 2604 (w), 1797 (w), 1634 (m), 1598 (m),  
1514 (s), 1464 (s), 1440 (m), 1421 (m), 1414(m), 1336 (m), 1307 (w), 1276 (s), 1232 (s), 1196 (w), 1157 (s),  
1138 (s), 1132 (s), 1000 (s), 944 (m), 896 (m), 864 (m), 840 (w), 660 (m), 616 (w), 593 (w), 572 (w)



# (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)- but-1,3-dien

**PB1**

H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Masuda, 1995

Position	Typ	δ (ppm)	Multiplizität	J HH (Hz)	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-2	CH	6,96	m		6,94; s
C-5	CH	6,82	d	8,1	6,80; d; 8,0
C-6	CH	6,94	d	8,1	6,93; d; (8,2 Hz)
C-1'	CH	6,67	dd	10,8; 15,0	6,66; dd; (10,2; 15,5 Hz)
C-2'	CH	6,54-6,44	m		6,53-6,40; m; 2H
C-3'	CH	6,54-6,45	m		6,53-6,40; m; 2H
C-4a'	CH	5,30	dd	1,7; 16,8	5,28; d; (16,9 Hz)
C-4b'	CH	5,13	d	10,5	5,11; d; (9,8 Hz)
C-3-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,91*	s		3,89*
C-4-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,88*	s		3,87*

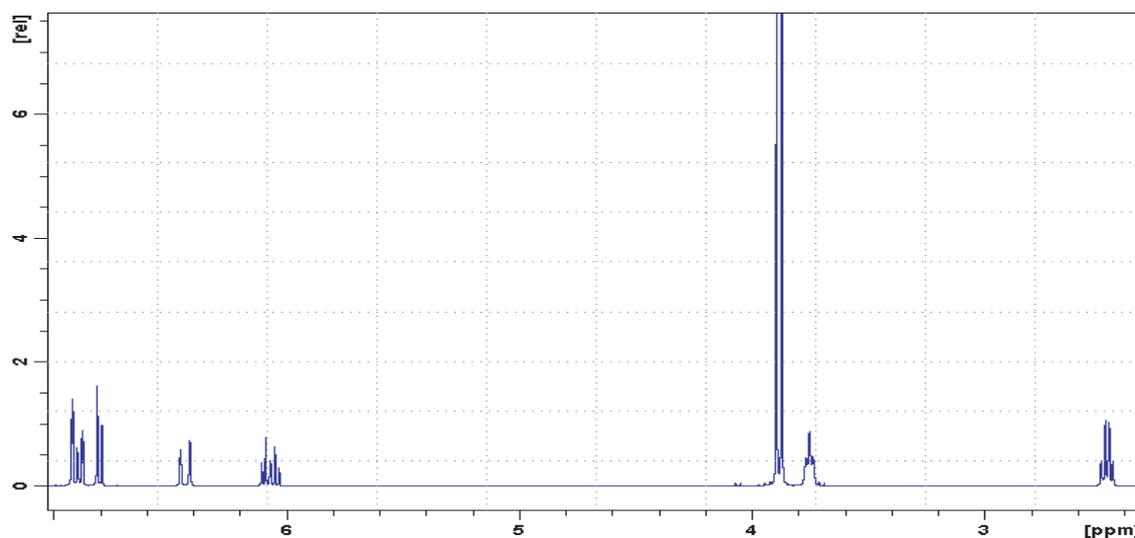
\*may be interchangeable

C13-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Kuroyanagi, 1980

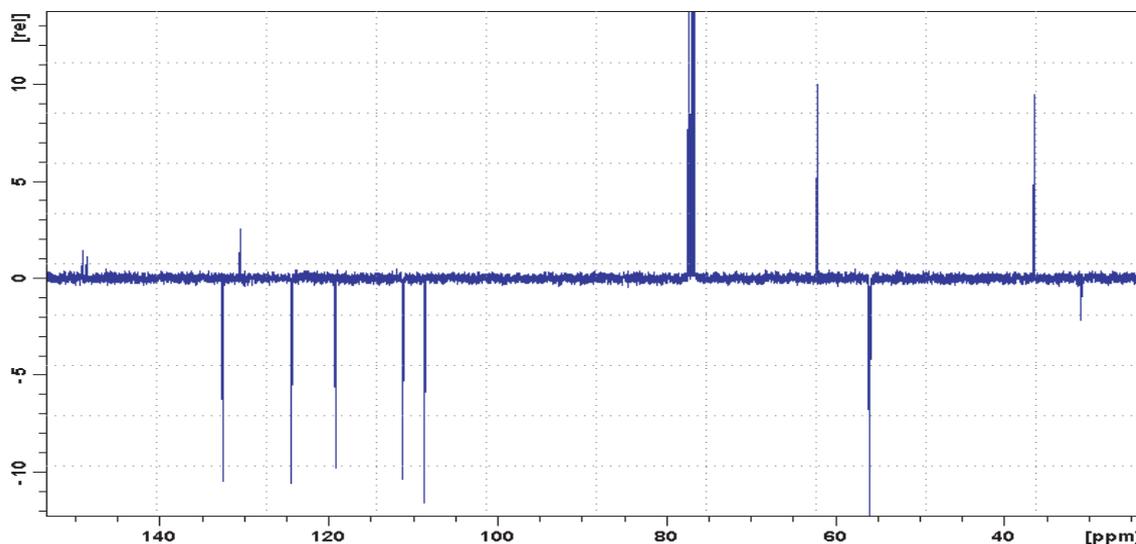
Position	δ (ppm)	Multiplizität	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-1	130,24	s	130,1
C-2	108,68	d	108,5
C-3	149,06	s	149,0
C-4	148,93	s	148,8
C-5	111,17	d	111,0
C-6	119,82	d	119,8
C-1'	127,85	d	127,8
C-2'	132,61	d	132,6
C-3'	137,22	d	137,2
C-4'	116,61	t	116,6
C-3-OCH <sub>3</sub>	55,90*	q	55,8
C-4-OCH <sub>3</sub>	55,80*	q	55,7

\*may be interchangeable

H-NMR

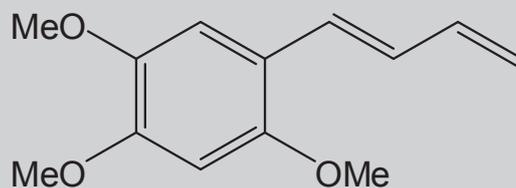


C13-NMR



# (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)- but-1,3-dien

PB2



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

222 (max.), 238 (sh), 252 (min.), 280 (max.),  
286 (sh), 302 (min.), 330 (max.)

isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber montanum*

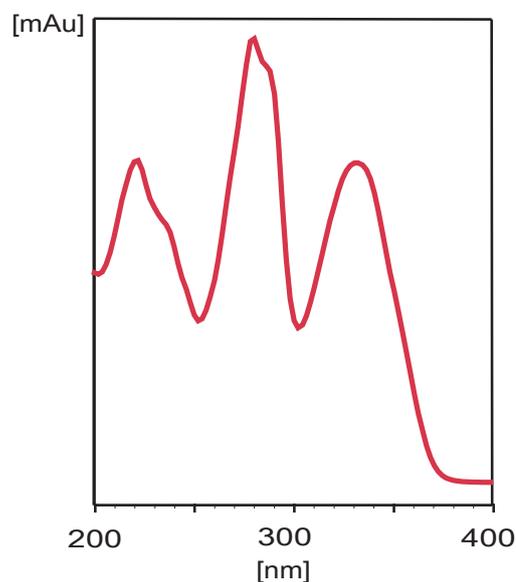
CAS-Nummer: 68305-21-5

Summenformel: C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>

mol. w.: 220,268

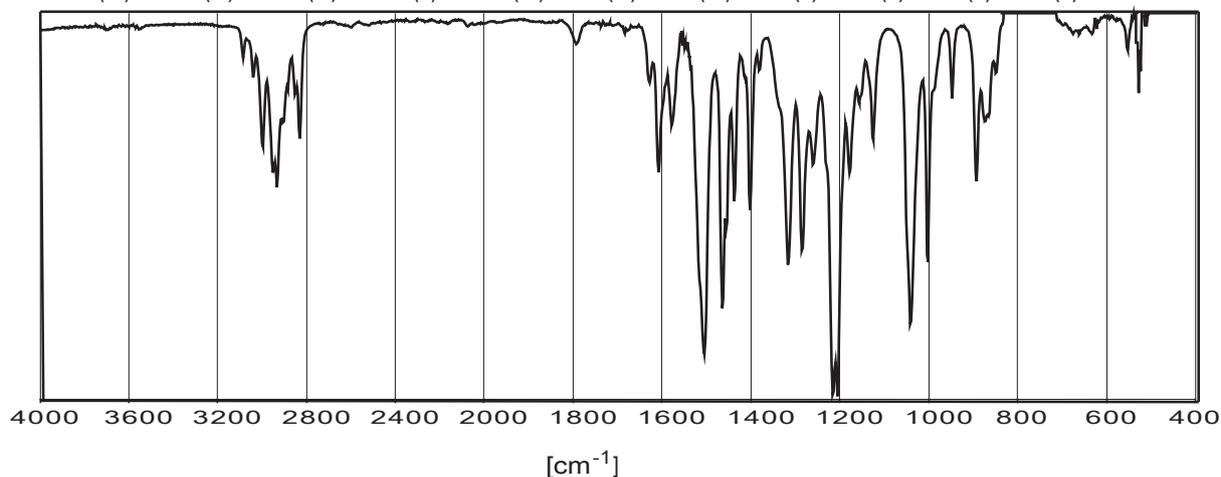
melt. p.: 56-58°C

Literatur: MASUDA & JITOE, 1995



IR v CCl<sub>4</sub> cm<sup>-1</sup>:

3087 (w), 3042 (w), 2999 (m), 2952 (m), 2934 (m), 2832 (m), 1793 (w), 1684 (w), 1628 (w), 1608 (m), 1578 (w),  
1505 (s), 1464 (s), 1456 (m), 1438 (m), 1402 (m), 1381 (w), 1317 (m), 1285 (m), 1260 (w), 1216 (s), 1205 (s),  
1179 (m), 1158 (w), 1126 (w), 1041 (s), 1003 (m), 948 (w), 894 (m), 874 (s), 849 (s), 554 (s), 529 (s)

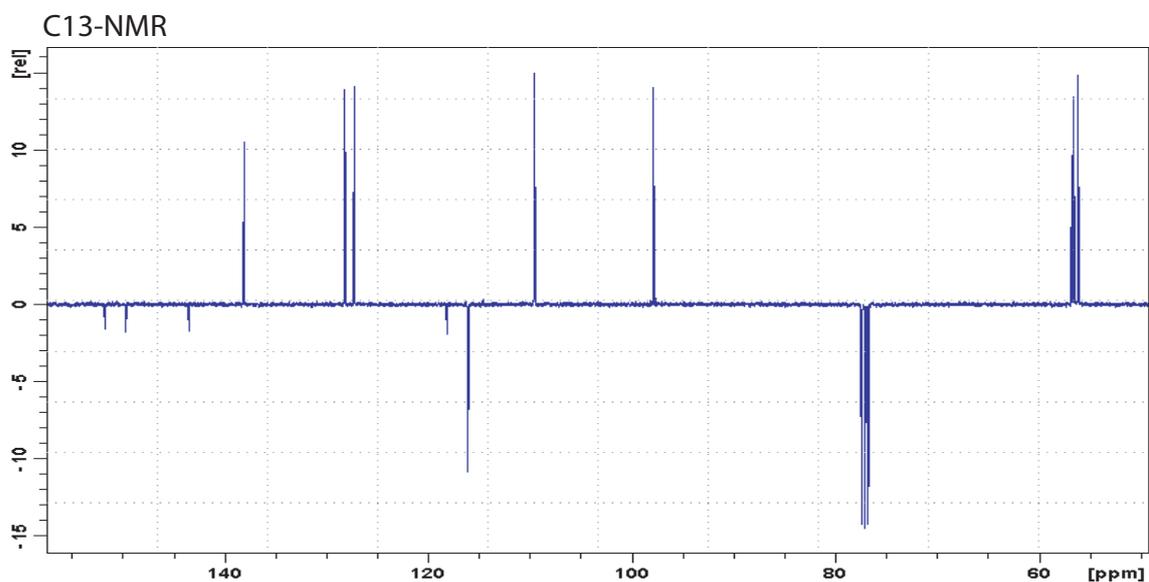
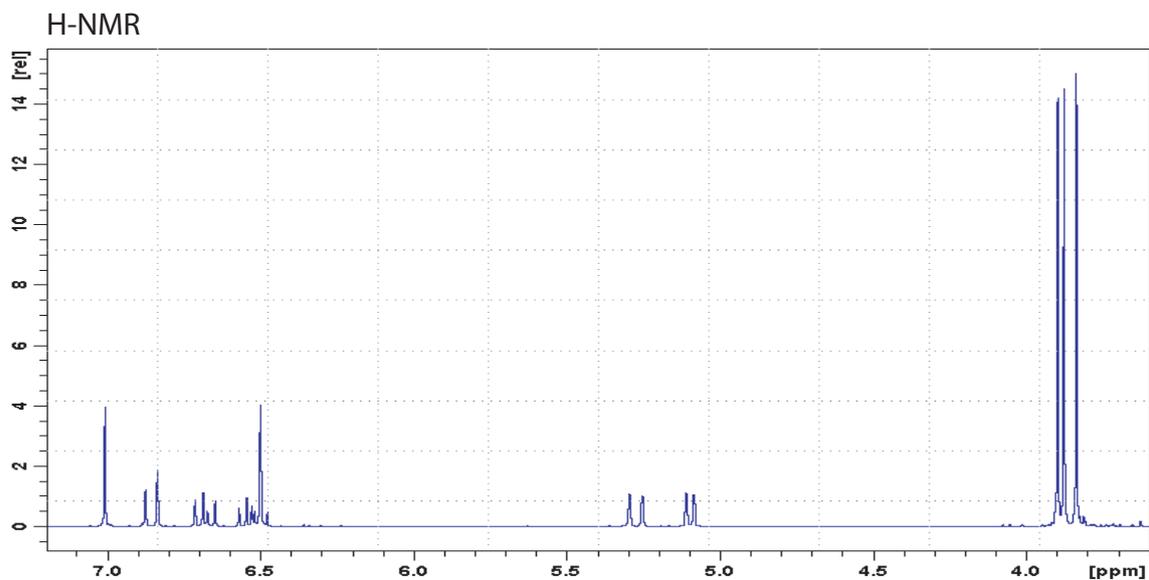


# (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)- **PB2** but-1,3-dien

H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Masuda, 1995

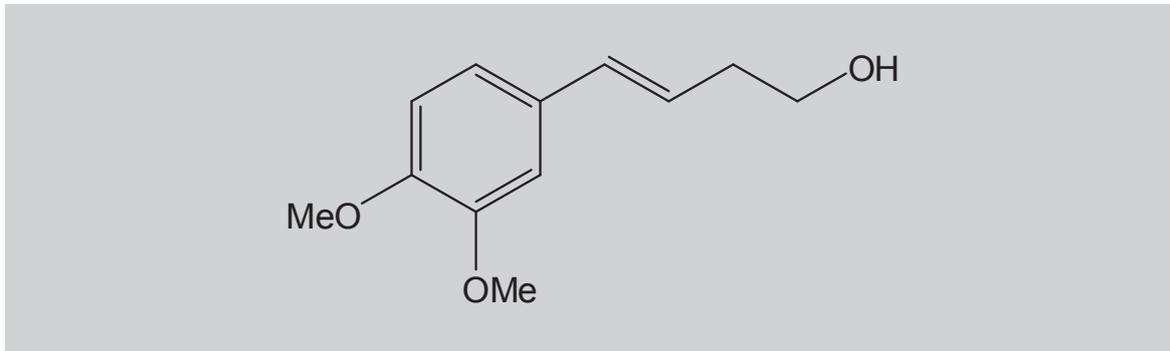
C13-NMR (CDCl<sub>3</sub>):

Position	Typ	δ (ppm)	Multiplizität	J HH (Hz)	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>	Position	δ (ppm)	Multiplizität
C-3	CH	6,50	s		6,51; s	C-1	118,05	s
C-6	CH	7,00	s		7,00; s	C-2	151,67	s
C-1'	CH	6,85	d	15,7	6,85; d; (16 Hz)	C-3	97,77	d
C-2'	CH	6,68	dd	10,4; 15,7	6,68; dd; (9, 16 Hz)	C-4	143,43	s
C-3'	CH	6,52	dt	10,1; 16,8	6,52; dt; (9, 16 Hz)	C-5	149,64	s
C-4a'	CH	5,27	br d	16,8	5,27; br d; (16 Hz)	C-6	109,48	d
C-4b'	CH	5,10	br d	10,1	5,07; br d; (9 Hz)	C-1'	127,17	d
C-2-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,84	s		3,83	C-2'	128,08	d
C-4-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,88	s		3,88	C-3'	137,97	d
C-5-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,90	s		3,90	C-4'	115,99	t
						C-2-OCH <sub>3</sub>	56,07	q
						C-4-OCH <sub>3</sub>	56,49	q
						C-5-OCH <sub>3</sub>	56,70	q



# (E) 4-(3', 4'-Dimethoxyphenyl)- but-3-en-1-ol

**PB3**



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

214 (max.), 238 (min.), 260 (max.), 266 (sh),  
298 (sh), 310 (sh)

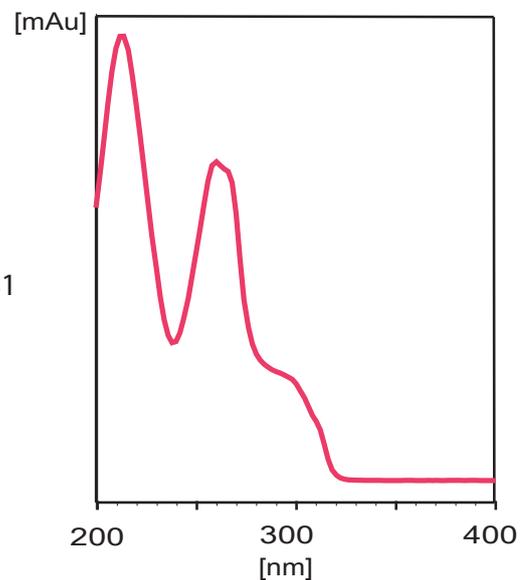
isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber montanum*

CAS-Nummer: 69768-97-4

Summenformel: C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>

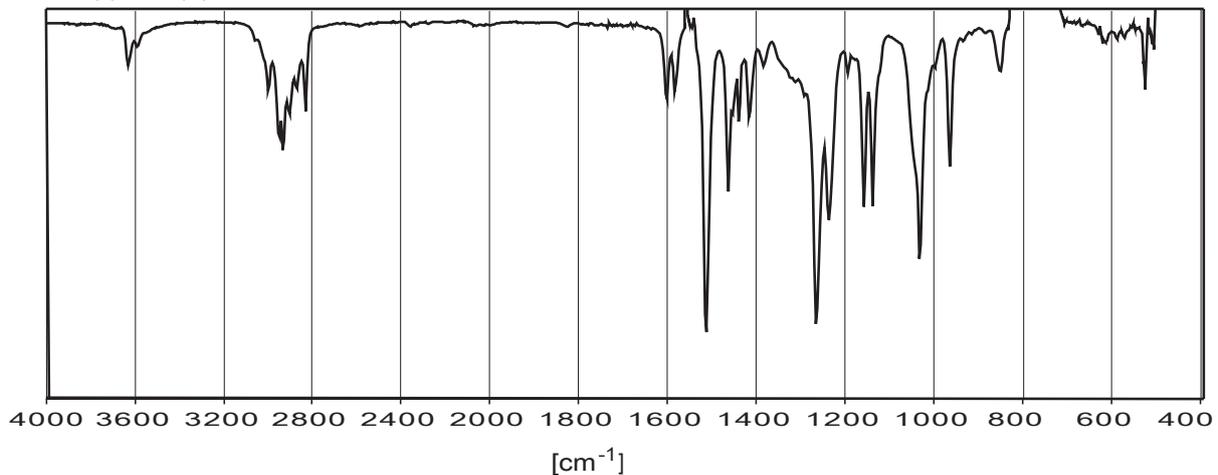
mol.w.: 208,257

Literatur: TUNTIWACHWUTTİKUL et al., 1981



IR v CCl<sub>4</sub> cm<sup>-1</sup>:

3635 (w), 3001 (w), 2954 (m), 2934 (m), 2908 (m), 2874 (w), 2834 (w), 1603 (w), 1584 (w), 1546 (w), 1514 (s),  
1464 (m), 1440 (w), 1417 (w), 1385 (w), 1266 (s), 1238 (m), 1195 (w), 1159 (m), 1139 (m), 1033 (s), 966 (m),  
852 (s), 623 (w)



# (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)- but-3-en-1-ol

**PB3**

H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Masuda, 1995

Position	Typ	δ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität	J HH (Hz)	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-2	CH	6,92	d	2,0	6,93 (d; J = 1,8 Hz)
C-5	CH	6,89	dd	8,2; 2,0	6,90; (dd; J = 8,5; 1,8 Hz)
C-6	CH	6,80	d	8,2	6,81 (d; J = 8,5 Hz)
C-1'	CH	6,43	br d	15,8	6,44 (d; J = 15,9 Hz)
C-2'	CH	6,07	dt	15,8; 7,2	6,08 (dt; J = 15,9; 6,7 Hz)
C-3'	CH <sub>2</sub>	2,47	qd	~ 6,7; ~ 1,4	2,48 (q; J = 6,7 Hz)
C-4'	CH <sub>2</sub>	3,75	t	6,1	3,76 (t; J = 6,7 Hz)
C-3-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,89 <sup>a</sup>	s		3,90 (s)
C-4-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,87 <sup>a</sup>	s		3,88 (s)

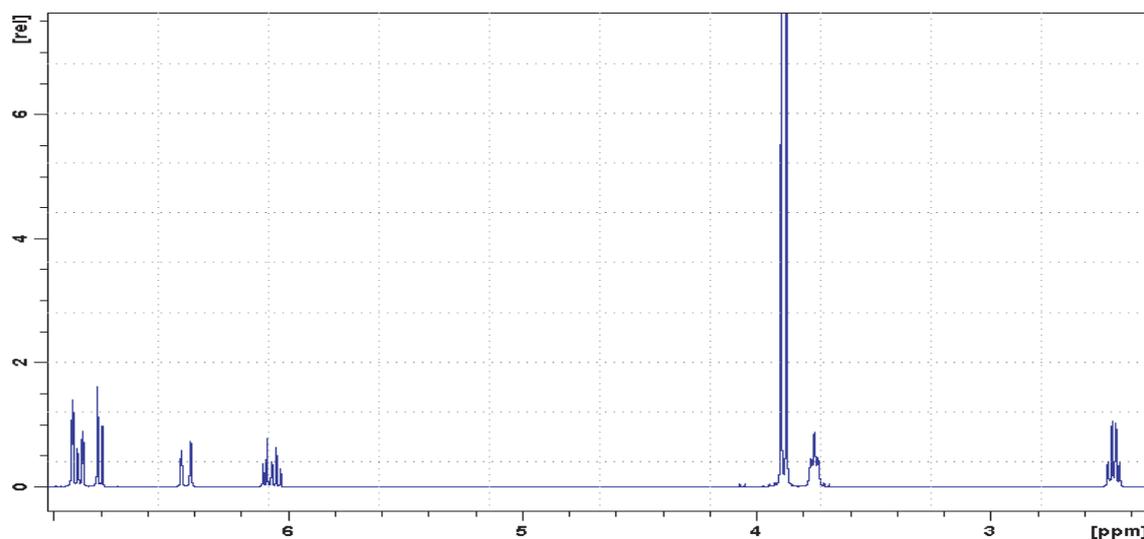
<sup>1</sup>Die Indizes <sup>a,b,...</sup> geben Vertauschbarkeiten an

C13-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Kuroyanagi, 1980

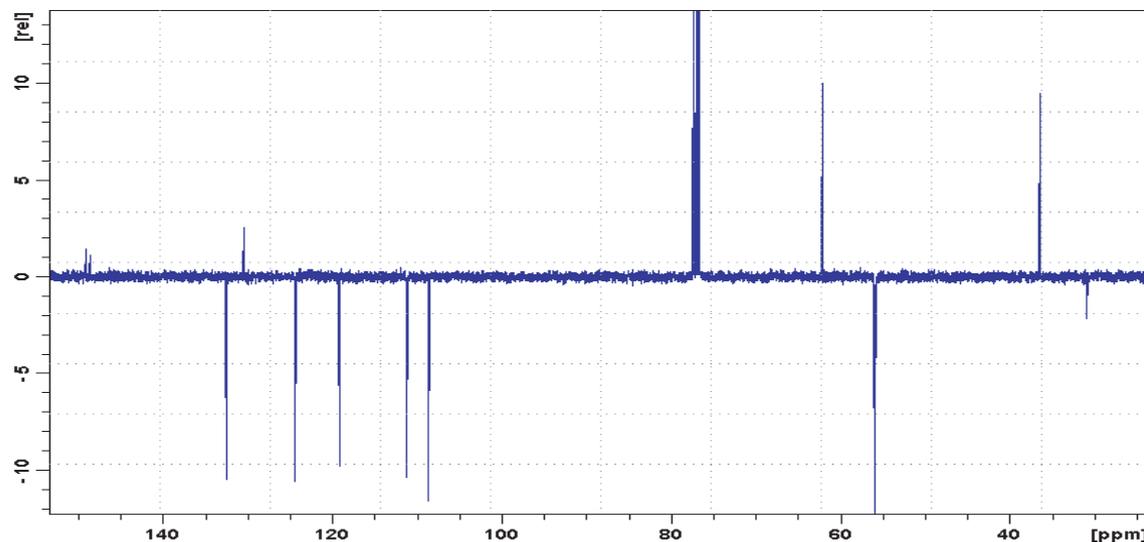
Position	δ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-1	130,40	s	130,5
C-2	108,59	d	108,8
C-3	149,03	s	149,1
C-4	148,59	s	148,6
C-5	111,16	d	111,3
C-6	119,13	d	119,1
C-1'	132,49	d	132,4
C-2'	124,32	d	124,4
C-3'	36,35	t	36,4
C-4'	62,10	t	62,1
C-3-OCH <sub>3</sub>	55,92 <sup>a</sup>	q	55,9
C-4-OCH <sub>3</sub>	55,81 <sup>a</sup>	q	55,8

<sup>1</sup>Die Indizes <sup>a,b,...</sup> geben Vertauschbarkeiten an

H-NMR

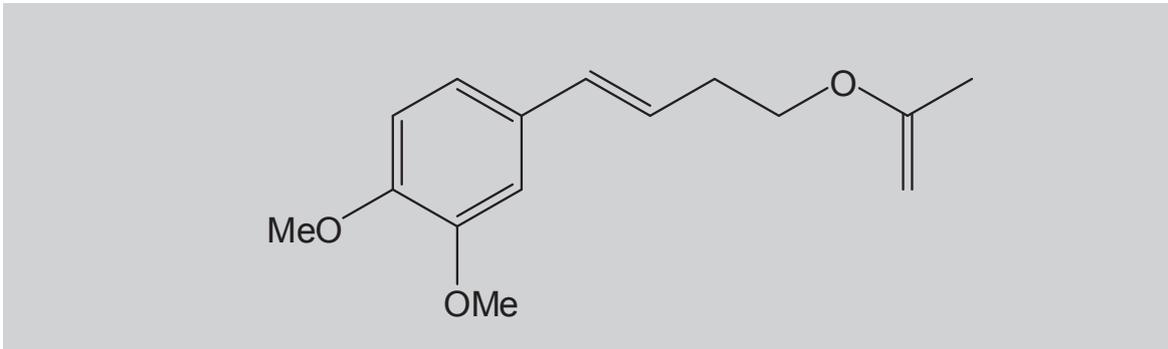


C13-NMR



# (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)- 3-buten-1-ylacetat

PB4



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

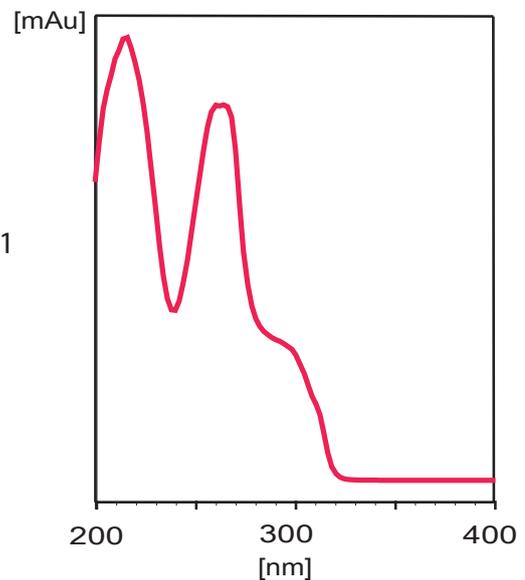
214 (max.), 238 (min.), 264 (max.), 298 (sh),  
310 (sh)

isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber montanum*

CAS-Nummer: 69768-98-5

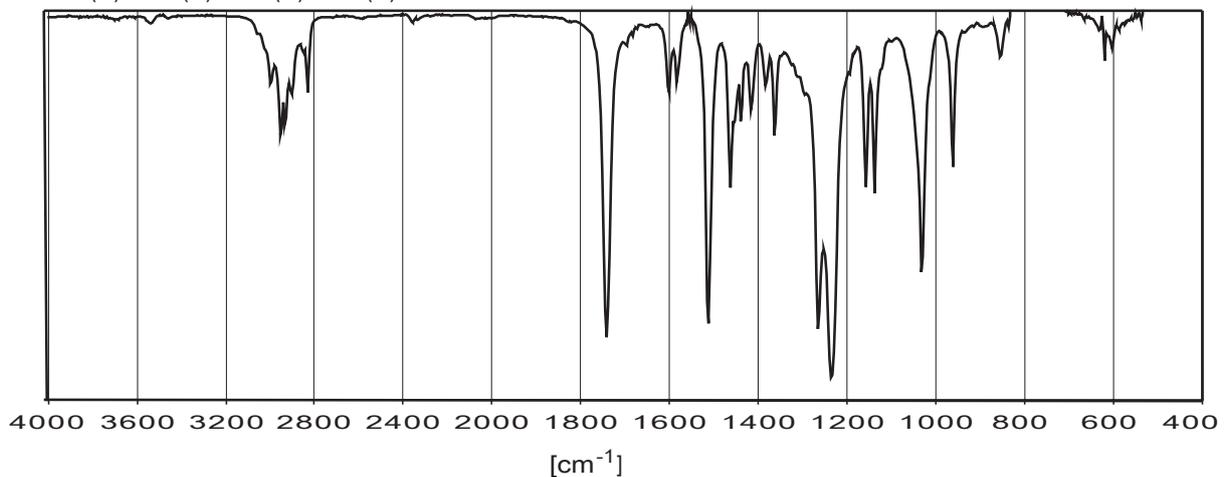
Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

Literatur: TUNTIWACHWUTTİKUL et al., 1981



IR v CCl<sub>4</sub> cm<sup>-1</sup>:

3000 (w), 2955 (m), 2934 (m), 2907 (w), 2834 (w), 2360 (w), 1742 (s), 1603 (w), 1584 (w), 1550 (w), 1514 (s),  
1464 (m), 1440 (w), 1417 (w), 1385 (w), 1364 (m), 1266 (s), 1238 (s), 1159 (m), 1139 (m), 1033 (s), 964 (m),  
856 (w), 634 (w), 605 (w), 529 (w)



# (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)- 3-buten-1-ylacetat

**PB4**

H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Lu, 2008

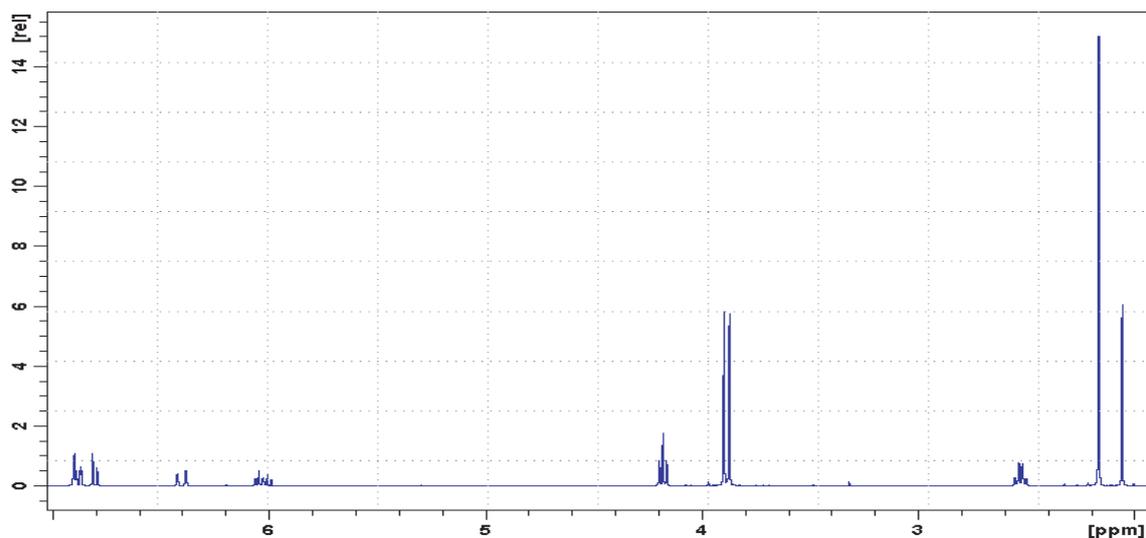
C13-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Lu, 2008

Position	Typ	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität	J HH (Hz)	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>	Position	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität
C-2	CH	6,90	d	1,9	6,88-6,90 (2H; m)	C-1	130,43	s
C-5	CH	6,80	d	8,13	6,81 (d; J = 8,0 Hz)	C-2	108,66	d
C-6	CH	6,88	dd	8,13; 1,9	6,88-6,90 (2H; m)	C-3	149,04	s
C-1'	CH	6,40	br d	15,8	6,41 (d; J = 15,5 Hz)	C-4	148,61	s
C-2'	CH	6,03	dt	15,8; 6,8	6,03 (dt; J = 15,5; 6,5 Hz)	C-5	111,18	d
C-3'	CH <sub>2</sub>	2,53	qd	6,8; 1,1	2,53 (q; J = 6,5 Hz)	C-6	119,10	d
C-4'	CH <sub>2</sub>	4,18	t	6,8	4,18 (t; J = 6,5 Hz)	C-1'	132,03	d
C-6'	CH <sub>3</sub>	2,06 <sup>a</sup>	s		2,06 (s)	C-2'	123,60	d
C-3-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,90 <sup>a</sup>	s		3,90 (s)	C-3'	32,31	t
C-4-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,87 <sup>a</sup>	s		3,88 (s)	C-4'	63,82	t
						C=O	171,11	s
						C-6'	20,98	q
						C-3-OCH <sub>3</sub>	55,93 <sup>a</sup>	q
						C-4-OCH <sub>3</sub>	55,82 <sup>a</sup>	q

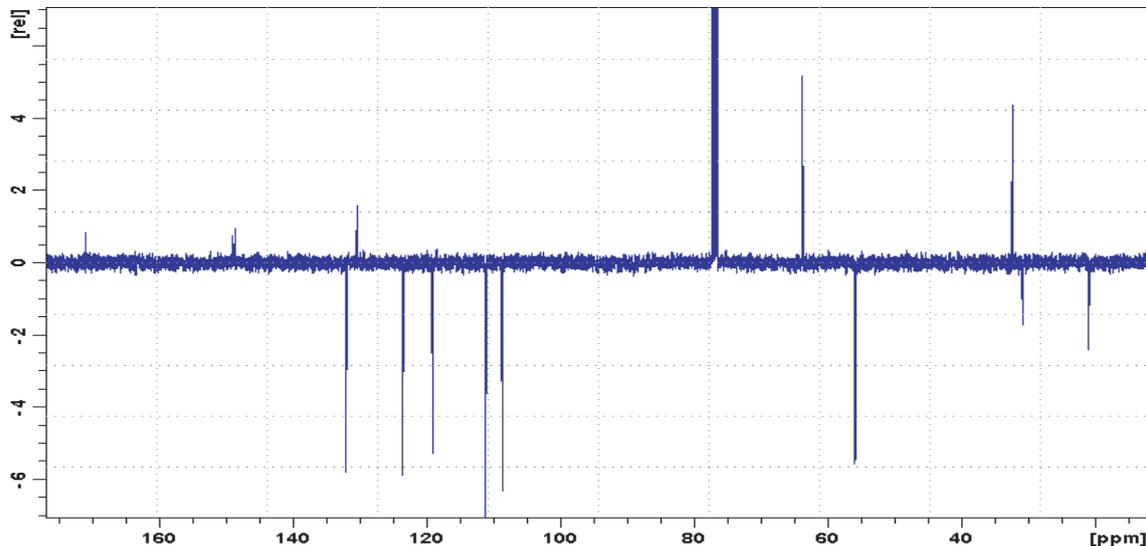
<sup>1</sup>Die Indizes <sup>a,b</sup>... geben Vertauschbarkeiten an

<sup>1</sup>Die Indizes <sup>a,b</sup>... geben Vertauschbarkeiten an

H-NMR



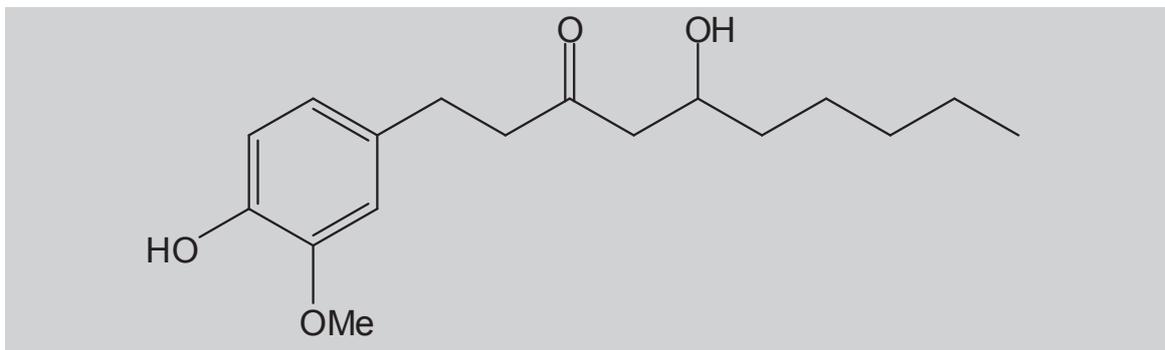
C13-NMR



# [6]-Gingerol

G1

(S)-5-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-decan-3-on



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

210 (max.), 218 (sh), 222 (sh), 254 (min.),  
282 (max.)

isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber officinale*

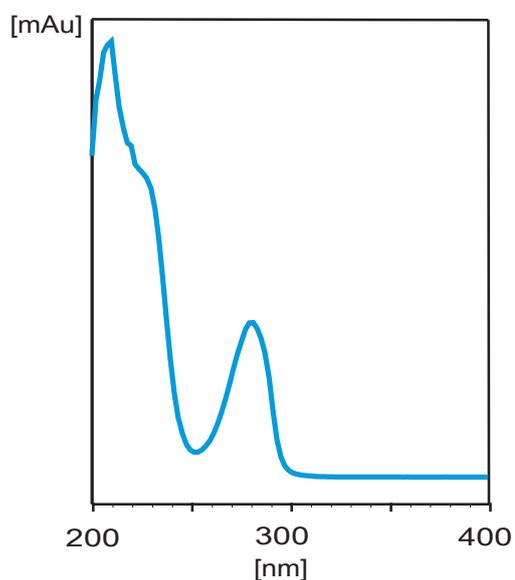
CAS-Nummer: 23513-14-6

Summenformel: C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>

mol. w.: 294,391

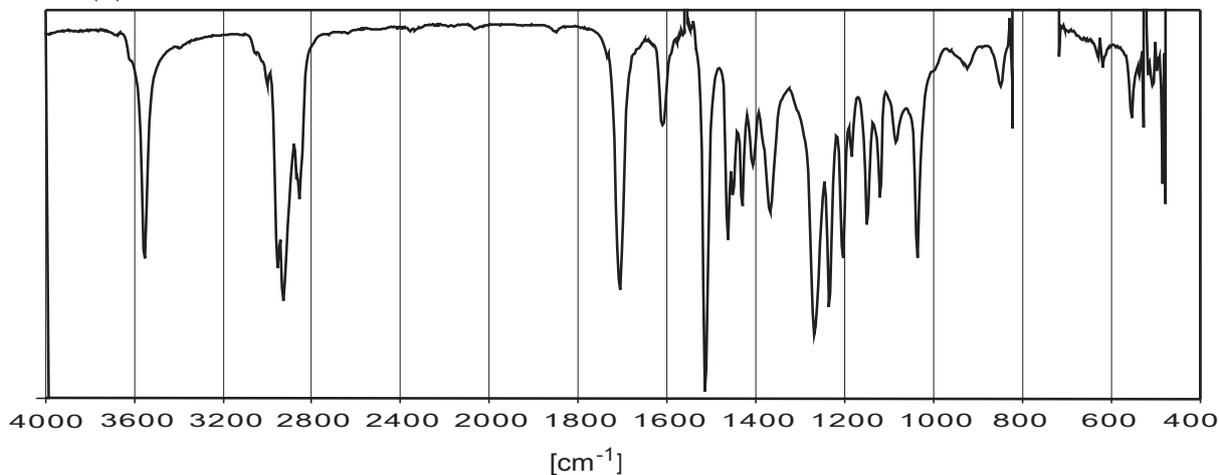
melt. p.: 10-41°C

Literatur: RAI et al., 2006



IR v CCl<sub>4</sub> cm<sup>-1</sup>:

3558 (s), 3004 (w), 2957 (s), 2931 (s), 2860 (m), 1707 (s), 1610 (w), 1515 (s), 1464 (m), 1452 (w), 1432 (w),  
1409 (s), 1370 (w), 1270 (s), 1236 (s), 1206 (m), 1186 (w), 1151 (w), 1122 (w), 1087 (w), 1039 (m), 926 (w),  
851 (w)



# [6]-Gingerol

G1

(S)-5-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-decan-3-on

H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Agarwal, 2001

Position	Typ	δ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität	J HH (Hz)	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-1	CH <sub>2</sub>	2,84	t	7,3	2,82-2,85 (2H; dd; J = 6,8 & 6,7 Hz)
C-2	CH <sub>2</sub>	2,73	t	7,3	2,72-2,75 (2H; dd; J = 6,8 & 6,96 Hz)
C-4a	CH	*	m		2,54-2,56 (1H; d; J = 6,39 Hz)
C-4b	CH	*	m		2,50-2,53 (1H; d; J = 9,93 Hz)
C-5	CH	4,02	m		4,02 (1H; m)
C-6	CH <sub>2</sub>	**	m		1,38 (2H; m)
C-7	CH <sub>2</sub>	**	m		****
C-8	CH <sub>2</sub>	**	m		****
C-9	CH <sub>2</sub>	**	m		****
C-10	CH <sub>3</sub>	0,88	t	6,8	0,88 (t; J = 6,64 Hz)
C-2'	CH	***			6,70 (1H; s)
C-5'	CH	6,82	d	8,0	6,81 (1H; d; J = 8 Hz)
C-6'	CH	***			6,67 (1H; dd; J = 3 & 8 Hz)
C-3'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,87	s		3,85 (3H; s)

<sup>1</sup>Die Indizes <sup>a,b</sup>... geben Vertauschbarkeiten an  
<sup>2</sup>2,43-2,60 (2H; m; H-4a, H-4b)

\*\* 1,22-1,53 (8H; m; H-7, H-8, H-9, H-6)

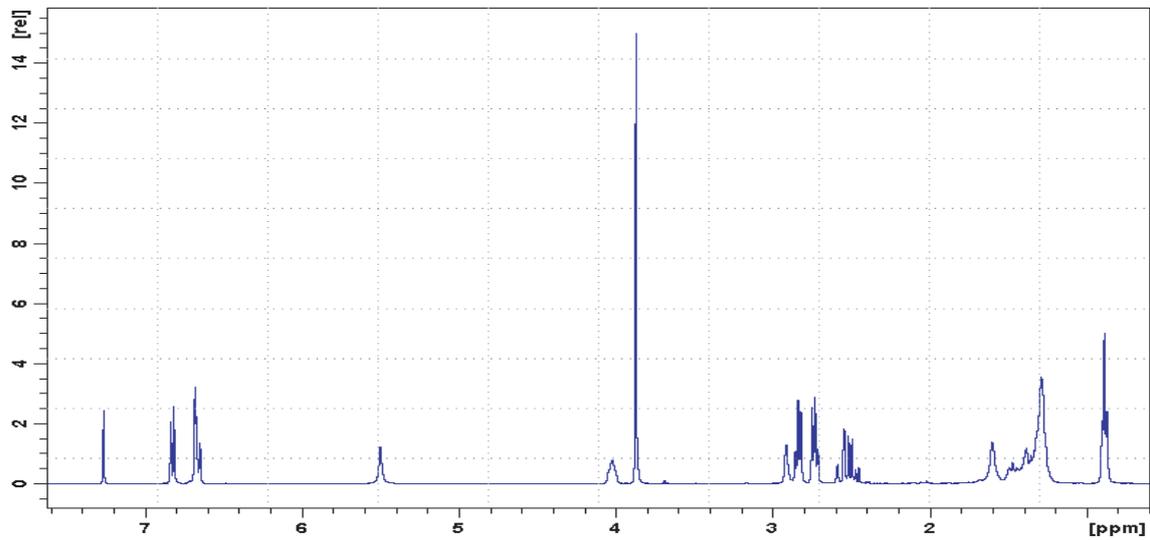
\*\*\* 6,63-6,7 (2H; m; H-6', H-2') zusammengewachsen - annehmbar dass es sich um dd und br s handelt

\*\*\*\* 1,27 (6H; m; H-7, H-8, H-9)

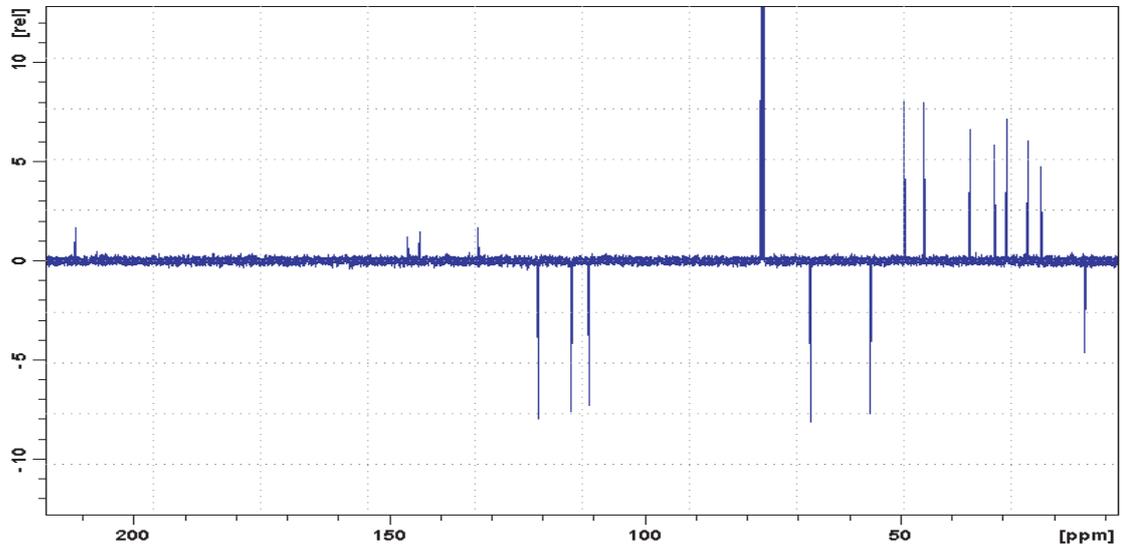
C13-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Fleming, 1999

Position	δ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-1	29,29	t	29,39
C-2	45,43	t	45,57
C-3	211,41	s	209,90
C-4	49,35	t	49,47
C-5	67,66	d	67,82
C-6	36,43	t	36,53
C-7	31,72	t	31,84
C-8	25,11	t	25,24
C-9	22,57	t	22,69
C-10	13,99	q	14,12
C-1'	132,64	s	131,01
C-2'	110,98	d	111,12
C-3'	146,44	s	144,89
C-4'	143,98	s	142,36
C-5'	114,38	d	114,62
C-6'	120,74	d	120,95
C-3'-OCH <sub>3</sub>	55,88	q	56,00

H-NMR



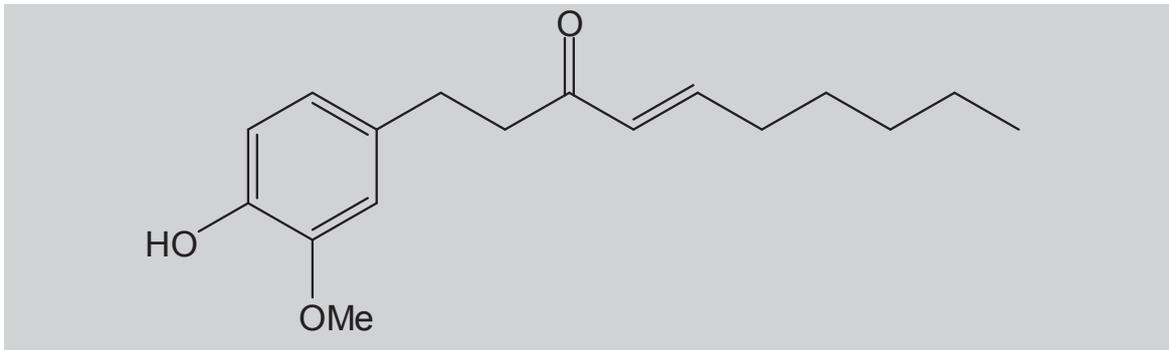
C13-NMR



# [6]-Shogaol

G2

(E)-1-(4'-hydroxy-3'-methoxy)phenyl-dec-4-en-3-on



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

202 (max.), 214 (min.), 226 (max.),  
262 (min.), 282 (max.)

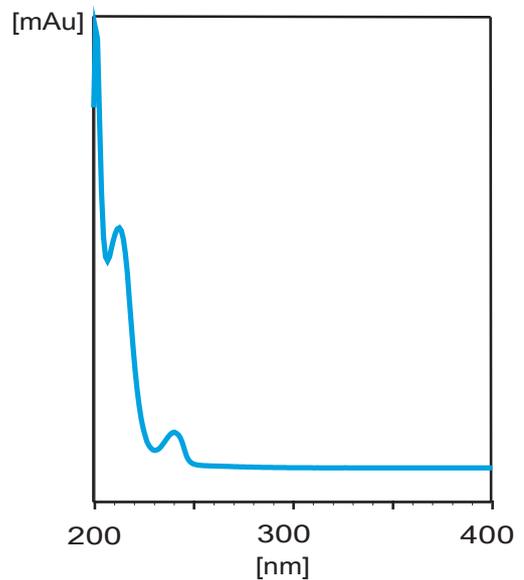
isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber officinale*

CAS-Nummer: 555-66-8

Summenformel: C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>

mol.w.: 276,376

Literatur: SCHWERTNER & RIOS, 2007



# [6]-Shogaol



(E)-1-(4'-hydroxy-3'-methoxy)phenyl-dec-4-en-3-on

H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):

Position	Typ	δ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität	J HH (Hz)
C-1	CH <sub>2</sub>	*	m	
C-2	CH <sub>2</sub>	*	m	
C-4	CH	6,09	dt	15,9; 1,5
C-5	CH	6,81	dt	15,9; 7,0
C-6	CH <sub>2</sub>	2,19	tdd	-7,4; 7,0; 1,5
C-7	CH <sub>2</sub>	1,45	m	
C-8	CH <sub>2</sub>	**	m	
C-9	CH <sub>2</sub>	**	m	
C-10	CH <sub>3</sub>	0,89	t	6,9
C-2'	CH	6,71	d	1,9
C-5'	CH	6,82	d	8,0
C-6'	CH	6,68	dd	8,0; 1,9
C-3'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,94	s	

<sup>1</sup>Die Indizes <sup>a,b</sup>...geben Vertauschbarkeiten an

<sup>2</sup>2,8-2,9 (4H; m; H-1, H-2)

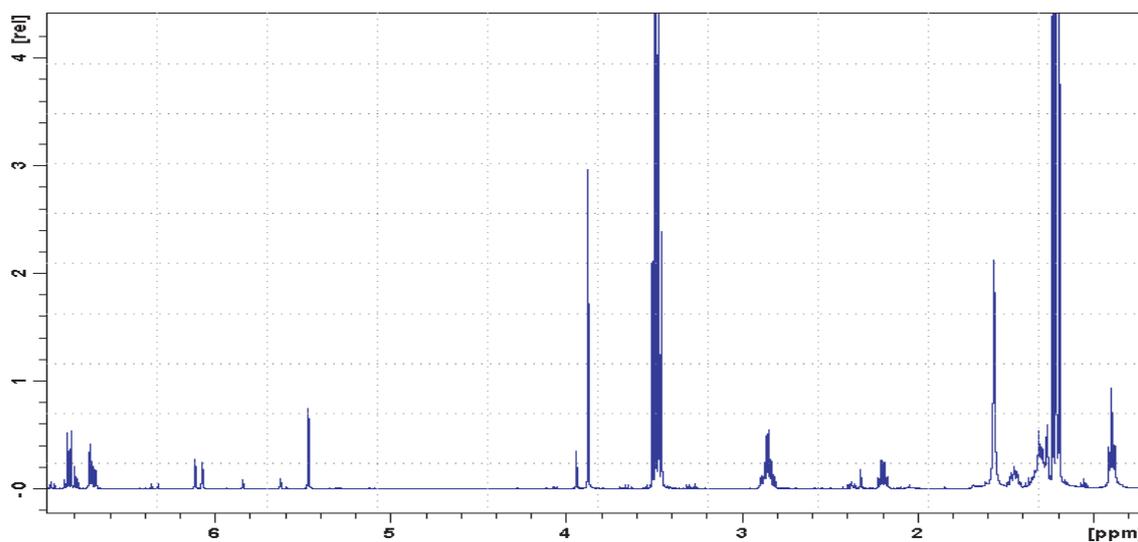
<sup>3</sup>1,24-1,39 (4H; m; H-8, H-9) + Dreck und in Ether rein

C13-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Fleming,1999

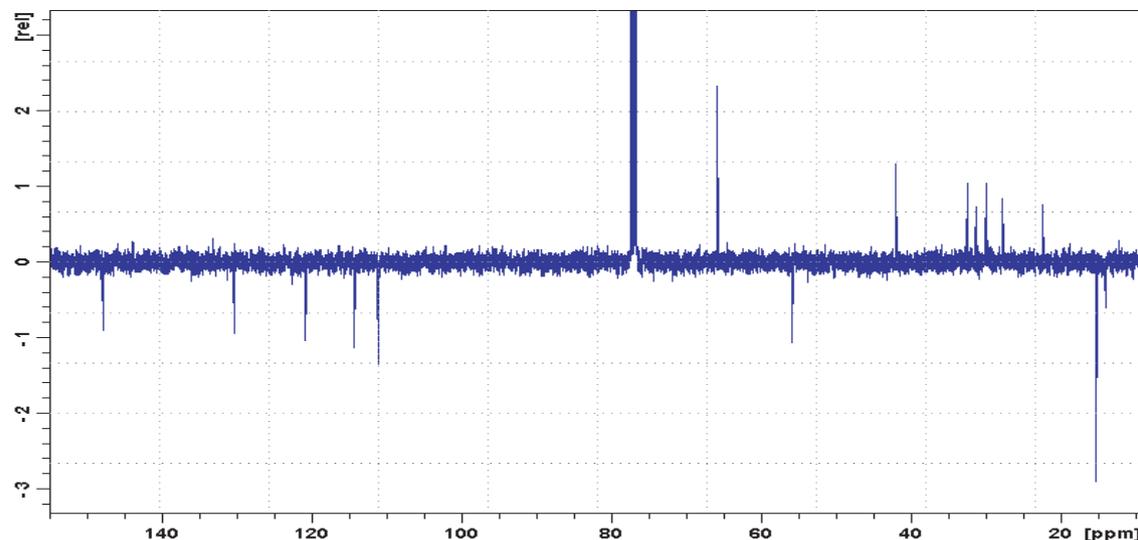
Position	δ (ppm)	Multiplizität	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-1	29,88	t	29,87
C-2	41,99	t	41,98
C-3	*	s	199,77
C-4	147,83	d	147,84
C-5	130,32	d	130,30
C-6	32,44	d	32,43
C-7	31,33	d	31,32
C-8	27,77	d	27,76
C-9	22,41	d	22,41
C-10	13,93	t	13,93
C-1'	*	s	133,24
C-2'	111,10	d	111,08
C-3'	*	s	146,36
C-4'	*	s	143,86
C-5'	114,29	d	114,27
C-6'	120,81	d	120,79
C-3'-OCH <sub>3</sub>	55,88	q	55,86

\*Singulets in meinem Spektrum nicht ersichtlich, zu wenig Substanz  
Zuweisung durch Vergleich mit 6-Gingerol-Spektrum bzw. Abschätzung (C-6 bis C-10)

H-NMR



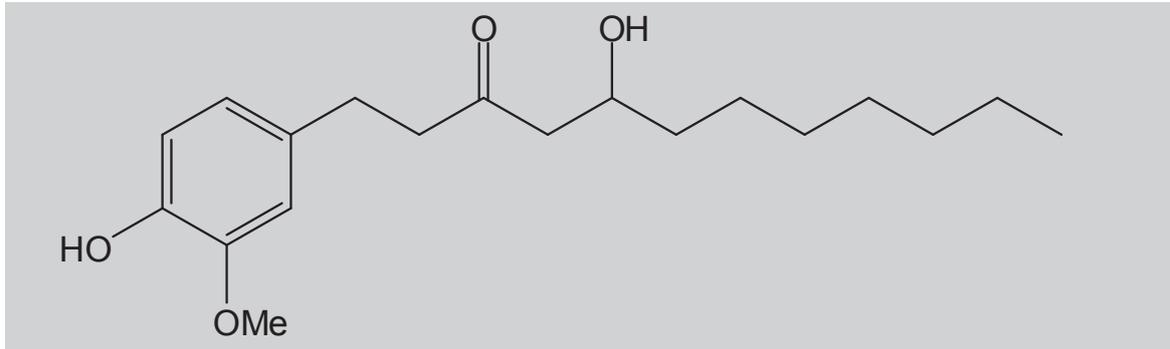
C13-NMR



# [8]-Gingerol

G3

(S)-5-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-dedecan-3-on



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

210 (max.), 218 (sh), 222 (sh), 254 (min.),  
282 (max.)

isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber officinale*

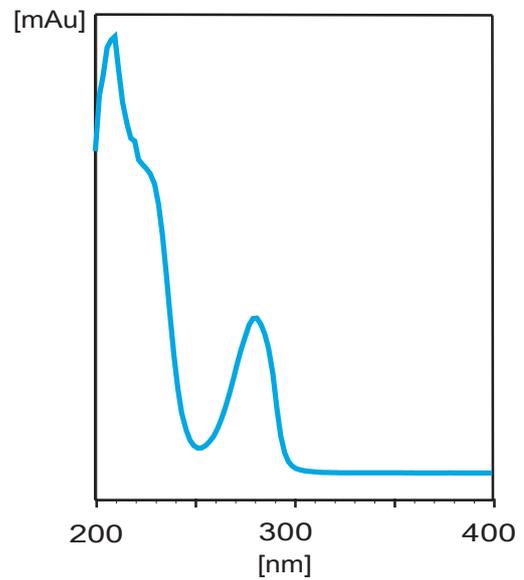
CAS-Nummer: 23513-08-8

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>

mol. w.: 322,445

melt. p.: 32-34°C

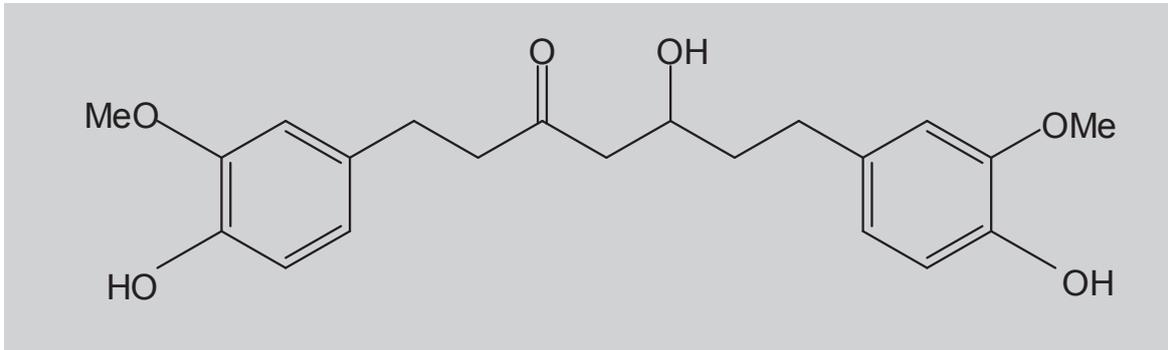
Literatur: SCHWERTNER & RIOS, 2007



# Hexahydrocurcumin

C1

5-Hydroxy-1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-heptan-3-on



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

207 (max.), 216 (sh), 220 (max.), 226 (sh),  
252 (min), 282 (max.)

isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber officinale*

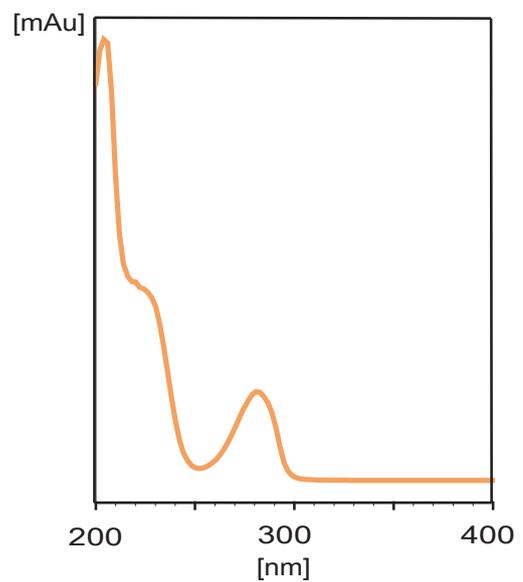
CAS-Nummer: 39886-84-5

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>

mol. w.: 374,434

melt. p.: 80-82°C

Literatur: HOEHLE et al., 2006  
YAMAGISHI et al., 1972



# Hexahydrocurcumin

C1

(5-Hydroxy-1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-heptanon

H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Lee, 2005

C13-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Uehara, 1987

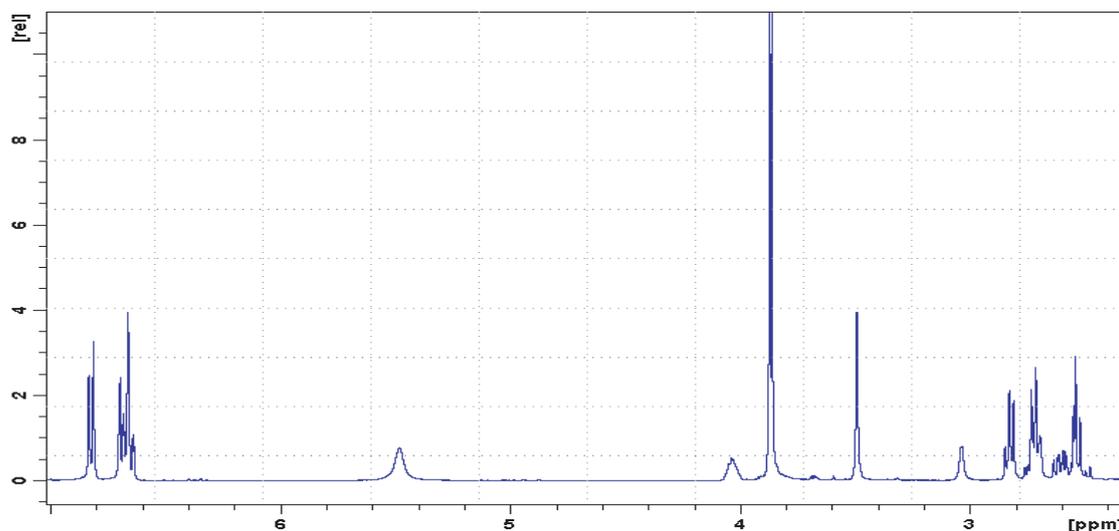
Position	Typ	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-1	CH <sub>2</sub>	2,83	m	**
C-2	CH <sub>2</sub>	~ 2,71	m	**
C-4	CH <sub>2</sub>	2,46-2,56	m	**
C-5	CH	4,04	m	4,02 (2H; m)
C-6	CH <sub>2</sub>	~ 1,60-1,75	m	1,58-1,78 (2H; m)
C-7a	CH	~ 2,60	m	**
C-7b	CH	~ 2,73	m	**
C-2'	CH	*	m	
C-5'	CH	6,83	br s	
C-6'	CH	*	m	
C-2''	CH	*	m	
C-5''	CH	6,81	br s	
C-6''	CH	*	m	
C-3'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,84 <sup>a</sup>	q	3,84 <sup>b</sup>
C-3''-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,83 <sup>a</sup>	q	3,83 <sup>b</sup>

Position	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup>	Multiplizität	Vergleichsspektrum <sup>2</sup>
C-1	29,28	t	29,3
C-2	45,39	t	45,4
C-3	211,35	s	211,3
C-4	49,35	t	49,4
C-5	66,87	d	67,0
C-6	38,33	t	38,3
C-7	31,41	t	31,4
C-1'	132,54 <sup>e</sup>	s	132,6
C-2'	110,96 <sup>f</sup>	d	111,1 <sup>a</sup>
C-3'	146,44 <sup>g</sup>	s	146,5
C-4'	144,00 <sup>h</sup>	s	143,8 <sup>b</sup>
C-5'	114,38 <sup>i</sup>	d	114,5 <sup>c</sup>
C-6'	120,91 <sup>j</sup>	d	120,8 <sup>d</sup>
C-1''	133,68 <sup>e</sup>	s	133,7
C-2''	111,06 <sup>f</sup>	d	111,2 <sup>a</sup>
C-3''	146,40 <sup>g</sup>	s	146,5
C-4''	143,74 <sup>h</sup>	s	144,0 <sup>b</sup>
C-5''	114,24 <sup>i</sup>	d	114,4 <sup>c</sup>
C-6''	120,72 <sup>j</sup>	d	120,9 <sup>d</sup>
C-3'-OCH <sub>3</sub>	55,87	q	55,9
C-3''-OCH <sub>3</sub>	55,87	q	55,9

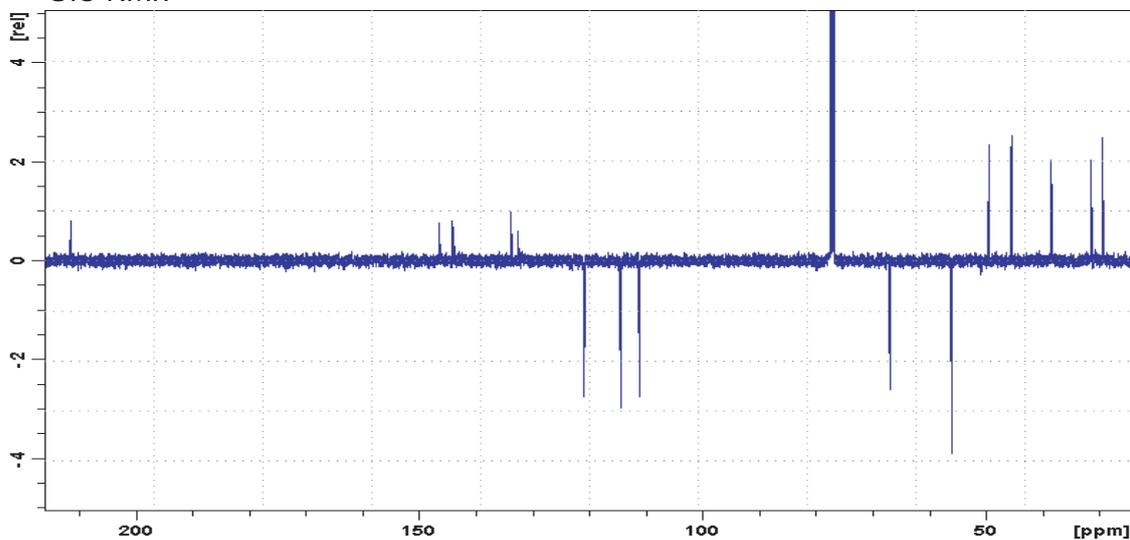
<sup>1</sup>Die Indizes <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j</sup> geben Vertauschbarkeiten an  
<sup>a</sup> 6,63-6,71 (4H; m)  
<sup>\*\*</sup> 2,50-2,84 (8H; m)

<sup>1</sup>Die Indizes <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j</sup> geben Vertauschbarkeiten an

H-NMR



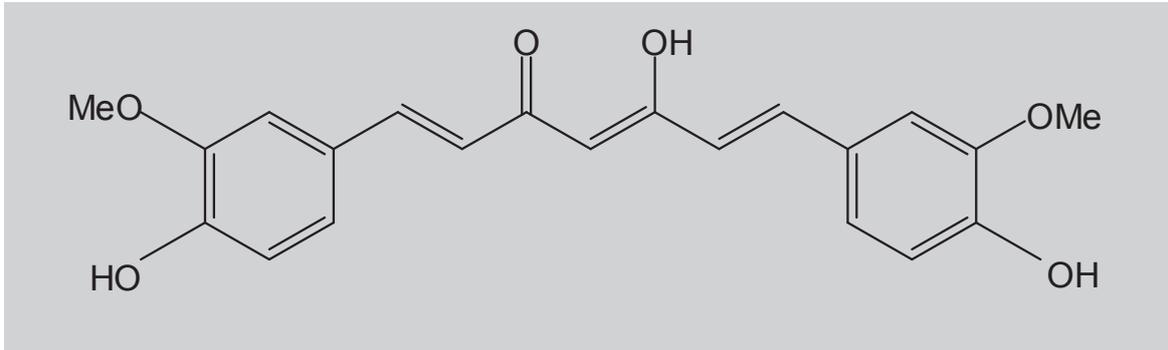
C13-NMR



# Curcumin

C2

(1E,6E)-1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:

252 (min.), 260 (max.), 306 (min.), 428 (max.)

isoliert aus Rhizom von  
*Curcuma longa*

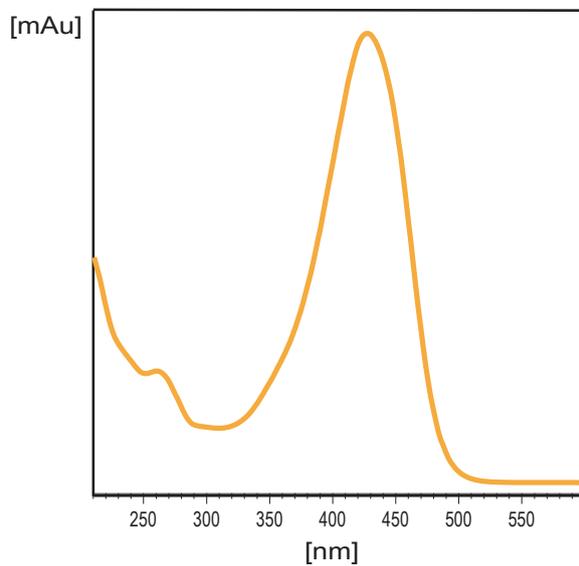
CAS-Nummer: 458-37-7

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>

mol. w.: 368,386

melt. p.: 183-184°C

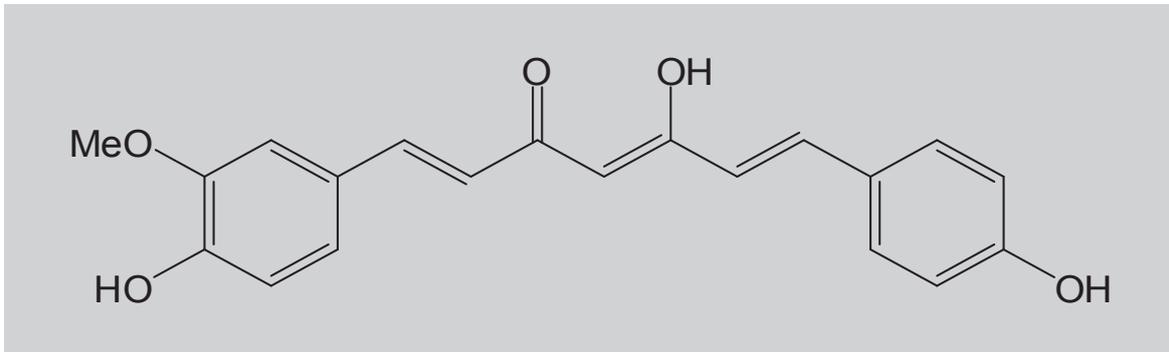
Literatur: LECHTENBERG et al., 2004  
HOEHLE et al., 2006



# Demethoxycurcumin

C3

5-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-  
1,4,6-heptatrien-3-on



UV-VIS  $\lambda_{\text{MeOH/H}_2\text{O}}$  nm:

222 (min.), 246 (max.), 278 (min.), 420 (max.)

isoliert aus Rhizom von  
*Curcuma longa*

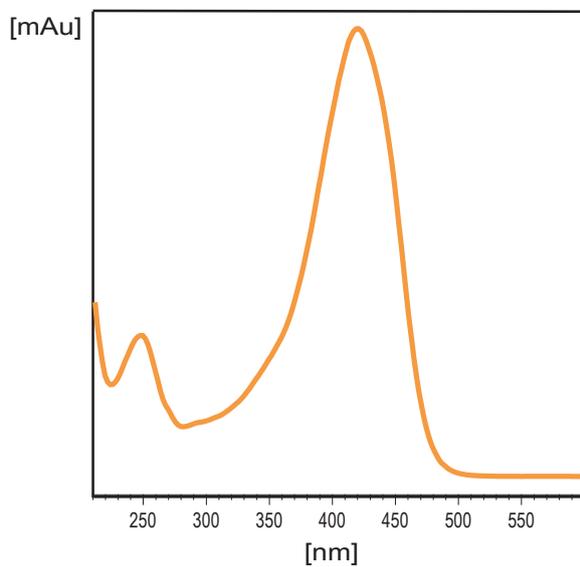
CAS-Nummer: 5762450

Summenformel:  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$

mol. w.: 338,36

melt. p.: 168-169°C

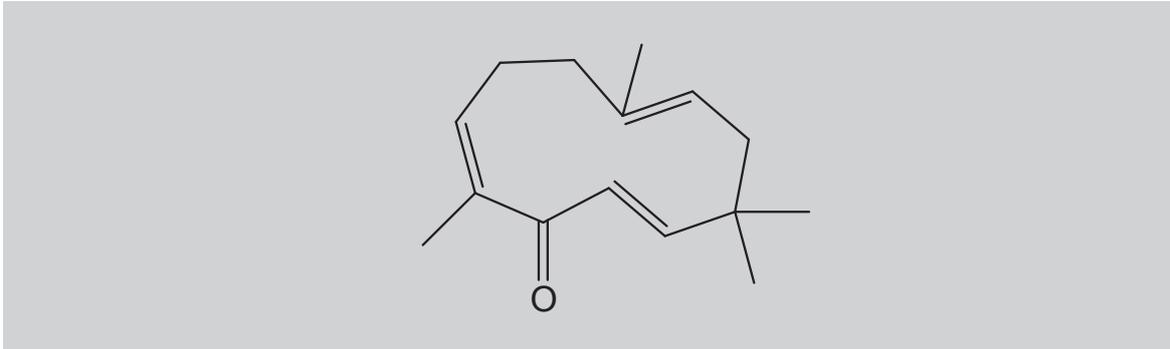
Literatur: LECHTENBERG et al., 2004  
HOEHLE et al., 2006



# Zerumbon

ST1

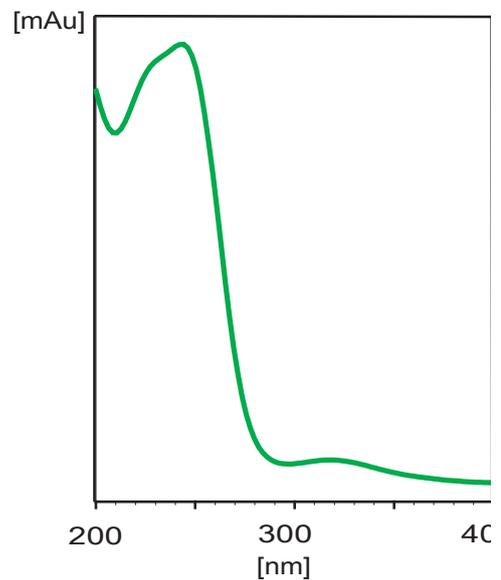
(2E, 6E, 10E)-2,6,10-Cycloundecatrien-1-one, 2,6,9,9-tetramethyl



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:  
210 (min.), 250 (max.)

isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber ottensii*

CAS-Nummer: 471-05-6  
Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O  
mol. w.: 218,339  
melt. p.: 65-66°C  
Literatur: AKIYAMA et al., 2006

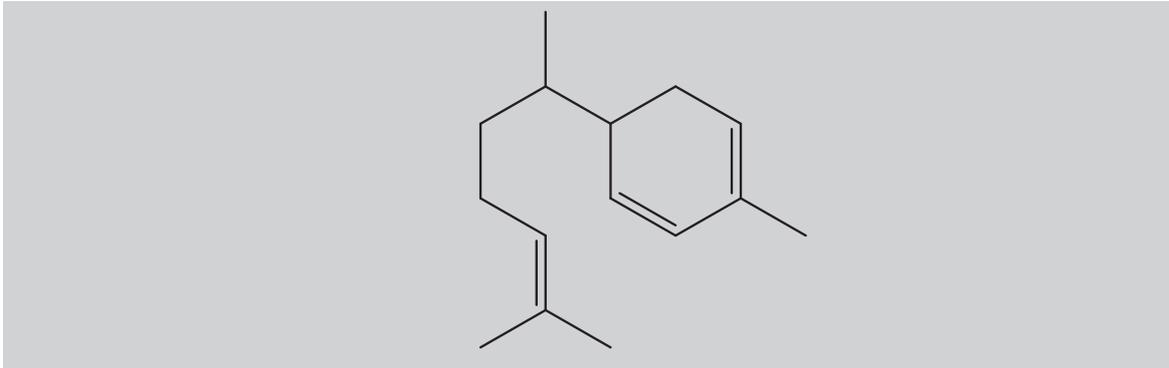


Identifizierung durch Co-Chromatographie

# Zingiberen

ST2

(5R)-1,3-Cyclohexadiene, 5-[(1S)-1,5-dimethyl-4-hexen-1-yl]-2-methyl



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:  
210 (max.)

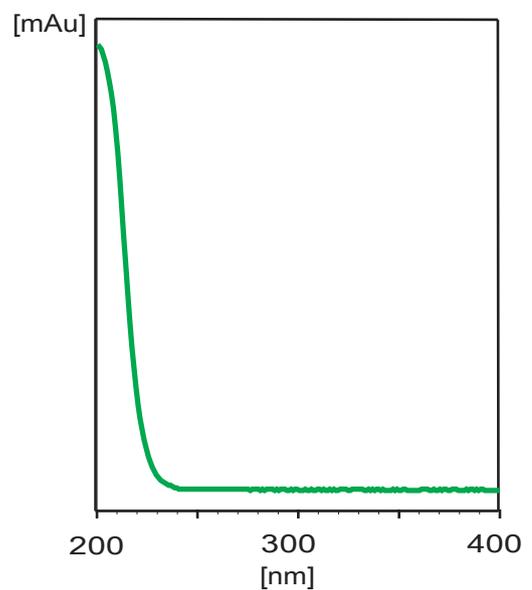
isoliert aus Rhizom von  
*Zingiber officinale*

CAS-Nummer: 495-60-3

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>

mol. w.: 204,356

Literatur: DENYER et al., 1994

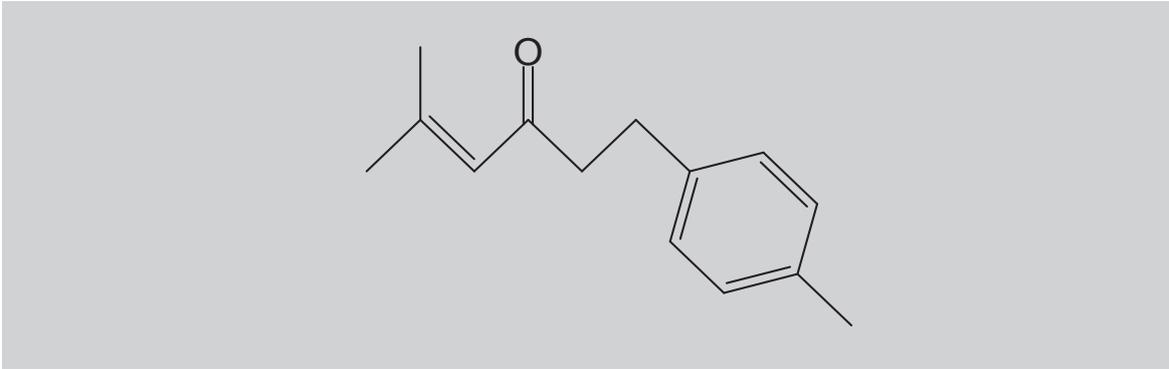


Identifizierung durch Co-Chromatographie

# ar-Turmeron

2-Methyl-6-p-tolyl-hept-2-en-4-on

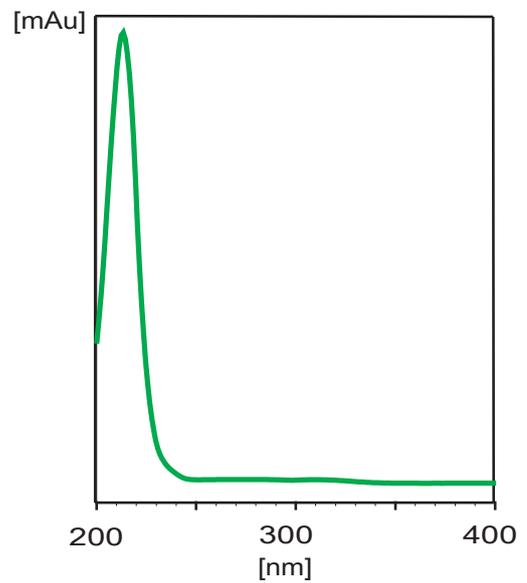
ST3



UV-VIS  $\lambda$  MeOH/H<sub>2</sub>O nm:  
236 (max.)

isoliert aus Rhizom von  
*Curcuma longa*

CAS-Nummer: 38142-58-4  
Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O  
mol. w.: 216,323  
Literatur: MARTINS et al., 2001



Identifizierung durch Co-Chromatographie

## 7.2. Abbildungen der Herbarbelege



Z. officinale ZIN 070006



Z. officinale ZIN 070054



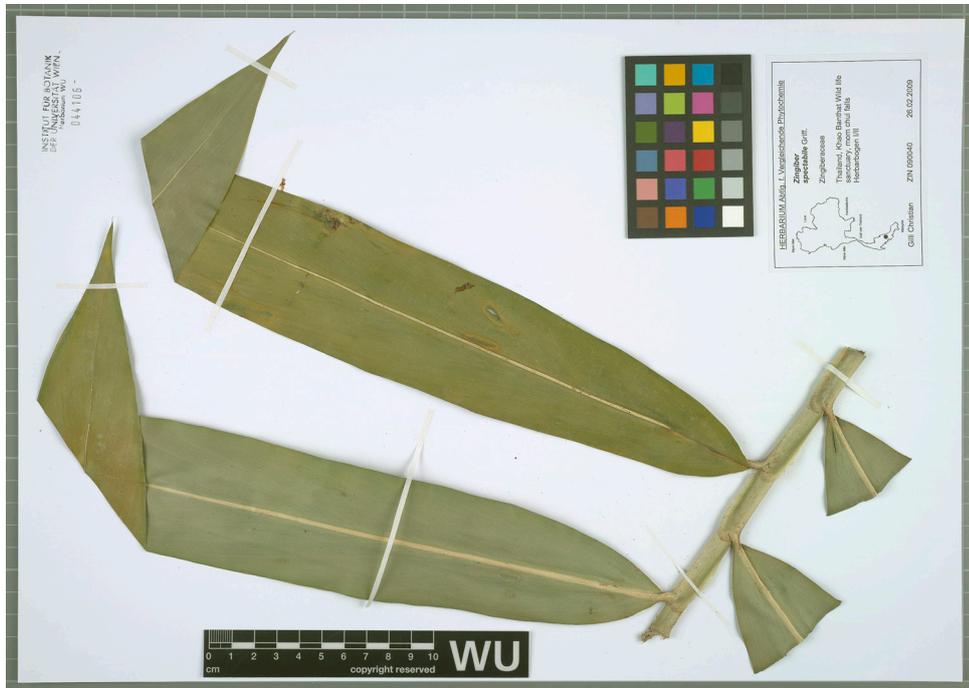
*Z. montanum* ZIN 070024



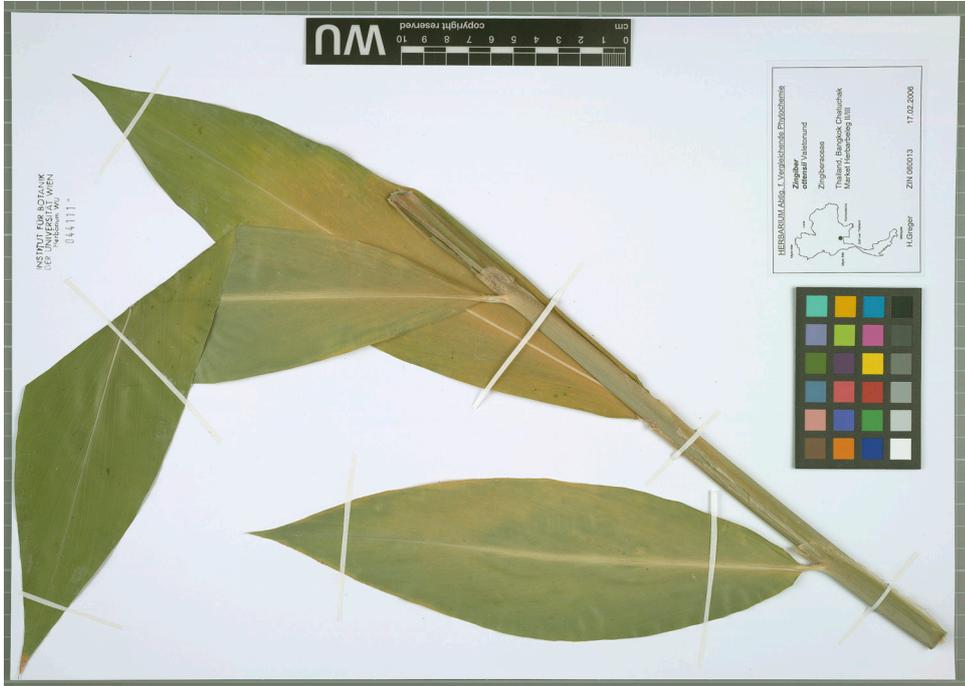
*Z. montanum* ZIN 070032



Z. spectabile ZIN 090040



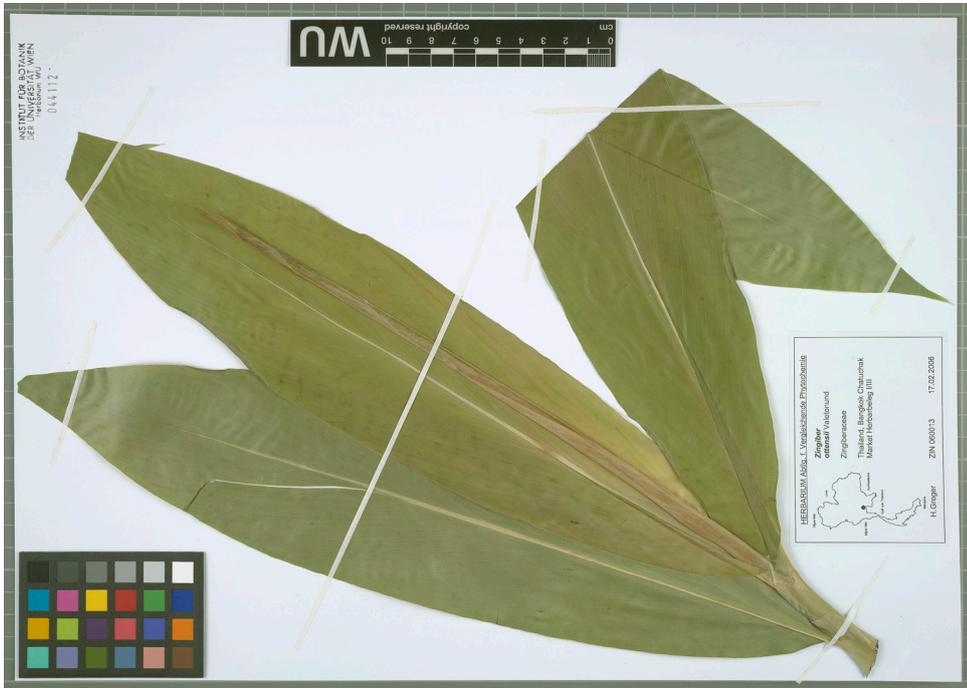
Z. spectabile ZIN 090040



Z. *tenuis* ZIN 060013



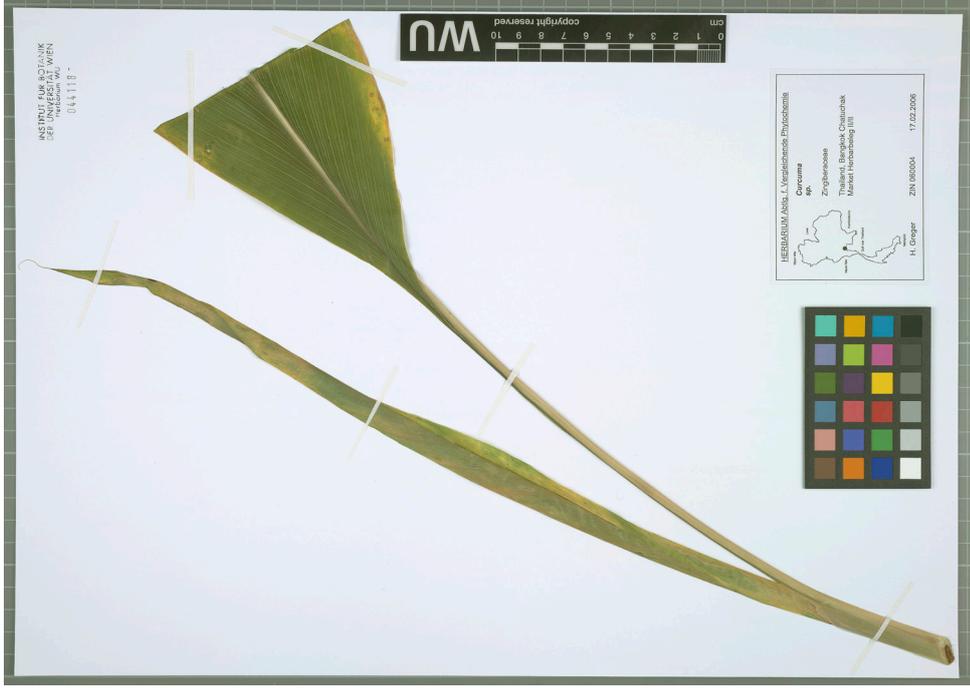
Z. *tenuis* ZIN 060013



*Z. ottensii* ZIN 060013



*C. longa* ZIN 070007



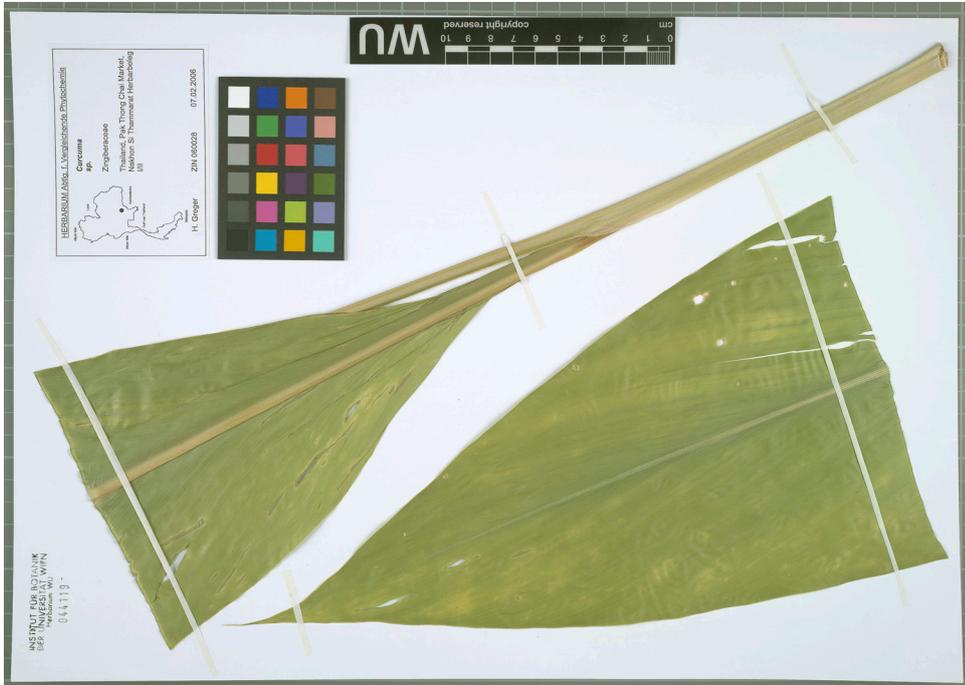
*Curcuma* sp. ZIN 060004



*Curcuma* sp. ZIN 060004



*Curcuma* sp. ZIN 060028



*Curcuma* sp. ZIN 060028



*Curcuma* sp. ZIN 060014

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Harald Greger bedanken. Durch seine besondere Gabe den Studenten die Vielfältigkeit und Wichtigkeit der Phytochemie näherzubringen wurden meine Interessen und Neugier geweckt. In der Zeit der Diplomarbeit konnte ich mehr lernen als in der gesamten Studienzeit zuvor. Besonders bedanken möchte ich mich auch für den Freiraum bei der Gestaltung der Diplomarbeit, aber auch für den immer gegebenen roten Faden und das Gefühl für fachliche Gespräche und Diskussionen immer willkommen zu sein.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Karoline Peter und Prof. Dr. Otmar Hofer. Durch Ihre Bemühungen konnten meine isolierten Verbindungen mittels Messung und Interpretation von NMR- und Massenspektren aufgeklärt werden.

Einen weiteren wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit leistete Johann Schinnerl. Das Erlernen der praktischen Arbeit hab ich allein ihm zu verdanken. Für technische Probleme aber auch für alle anderen Problemstellungen und netten Gespräche war er immer der richtige Ansprechpartner.

Ein großes Dankeschön schulde ich auch Thomas Pacher, Markus Hofbauer und Stefan Mikulicic für die Mithilfe bei den Biotests und den vielen netten Stunden die wir gemeinsam verbrachten.

Besonderen Dank verdienen auch meine Kollegen Andrea Zraunig, Celine Zhradnik, David Lyon, Christian Gilli und Markus Hofbauer, die in der Zeit der Diplomarbeit zu Freunden wurden. Ohne sie wäre ein so gutes Arbeitsklima und so viel Freude an der Arbeit nicht möglich gewesen. Für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft beim Lösen von kleineren und auch größeren Problemen und für die vielen netten Gespräche auf der Terrasse möchte ich mich noch einmal herzlich bedanken.

Vielen Dank auch an die Firma Rigler GmbH, die mich zur Zeit des Studiums finanziell und wohnungstechnisch so großzügig unterstützte.

Ein großes Danke geht auch an meine Eltern, meine Schwester Simone und Max für die finanzielle und moralische Unterstützung während des Studiums, und auch auf die Beharrlichkeit meiner Eltern die Matura abzuschließen, ohne jene mein weiterer Bildungsweg nicht möglich gewesen wäre.

### 7.3. Literaturverzeichnis

- ARGAWAL, M., WALIA, S., DHINGRA, S., KHAMBAY, B. PS., 2001: Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. *Pest Manag Sci* 57, 289-300.
- AK, T., GÜLCIN, I., 2008: Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions* 174, 27-37.
- AKIYAMA, K., KIKUZAKI, H., AOKI, T., OKUDA, A., LAJIS, N. H., NAKATANI, N., 2006: Terpenoids and a Diarylheptanoid from *Zingiber ottensii*. *J. Nat. Prod.* 69, 1637-1640.
- ALTMANN, F. P., 1976: Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem. Cytochem.* 9, 1-56.
- APG (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP), 1998: An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 85, 831-553.
- BABY, S., MATHEW, D., ANIL, J. J., RAJANI, K., SREEJA, P. C., VARUGHESE, G., 2007: Phenylbutanoid-rich rhizome oil of *Zingiber neesatum* from Western Ghats, southern India. *Flavour Fragr. J.* 22, 521-524.
- BARANOWSKI, J. D., 1985: Storage stability of processed ginger paste. *J. Food Sci.* 50, 932-933.
- BEDNARCZYK, A. A., GALETTO, W. G., KRAMER, A., 1975: Cis- and trans- $\beta$ -Sesquiphellandrol. Two new Sesquiterpene Alcohols from Oil of Ginger (*Zingiber officinale*, Roscoe). *J. Agric. Food Chem.* 23, 499-501.
- BHATTARAI, S., TRAN, V. H., DUKE, C. CH., 2001: The stability of gingerol and shogaol in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.* 90, 1658-1664.
- BRADER, G., 1997: Inhaltsstoffe aus Rutaceen und ihre biologische Aktivität bei *Spodoptera littoralis* (Noctuidae – Lepidoptera). Dissertation, Universität Wien.
- BRANNEY, T. M. E., 2005: Hardy Gingers. Timber Press, Cambridge.
- BREITMAIER, E., 1999: Terpene- Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone. Teubner Stuttgart, Leipzig.
- CHAPPELL, J., 1973: The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* 107, 1-6.
- DAHLGREN, R., CLIFFORD, H. T., YEO, P. F., 1985: The families of the monocotyledons. Springer-Verlag, Berlin.
- DEDOV, V. N., TRAN, V. H., DUKE, C. C., CONNOR, M., CHRISTIE, M., J., MANDADI, S., ROUFOGALIS, B. D., 2002: Gingerols: A novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *Br. J. Pharmacol.* 137, 793-798.
- DENIZOT, F., LANG, R., 1986: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods* 89, 271-277.

- DENNIFF, P., MACLEOD, I., WHITING, D. A., 1980: Studies in the biosynthesis of [6]-gingerol, pungent principle of ginger (*Zingiber officinale*). J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2637-2644.
- DENNIFF, P., WHITING, D. A., 1976: Biosynthesis of [6]-gingerol, pungent principle of *Zingiber officinale*. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 711-712.
- DENYER, C. V., JACKSON, P., LOAKES, D. M., ELLIS, M. R., YOUNG, D. A. B., 1994: Isolation of Antirhinoviral Sesquiterpenes from ginger (*Zingiber officinale*). Journal of Natural Products 57, 658-662.
- ENDO, K., KANNO, E., OSHIMA, Y., 1990: Structures of antifungal Diarylheptanones, Gingerenones A, B, C and Isogingerenone B, isolated from the rhizomes of *Zingiber officinale*. Phytochemistry 29, 797-799.
- ENGELMEIER, D., 1997: Antifungale Isocumarine aus der *Artemisia dracunculus*-Gruppe (Asteraceae): Verbreitung und Aktivität. Diplomarbeit, Universität Wien.
- ENGELMEIER, D., 2002: Biotests with phytopathogenic microfungi for determination of antifungal activities from different natural compounds. Dissertation, Universität Wien.
- FICKER, C., SMITH, M. L., AKPAGANA, K., GBEASSOR, M., ZHANG, J., DURST, T., ASSABGUI, R., ARNASON, J. T., 2003: Bioassay-guided Isolation and Identification of antifungal compounds from ginger. Phytother. Res. 17, 897-902.
- FRAGA, B.M., 2001: Natural Sesquiterpenoids. Nat. Prod. Rep. 18, 650-673.
- FREIMOSER, F. M., JAKOB, C. A., AEBI, M., TUOR, U., 1999: The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. Applied and Environmental Microbiology 65, 3727-3729.
- FUHRMANN, B., ROSENBLAT, M., HAYEK, T., COLEMAN, R., AVIRAM, M., 2000: Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein-deficient mice. J. Nut. 130, 1124-1131.
- GERSHENZON, J., CROTEAU, R., 1991: Terpenoids. In: ROSENTHAL, G. A., BERENBAUM, M. R. (Ed.): Herbivores. Their interactions with secondary plant metabolites. San Diego-New York, Academic press, 2nd ec., Vol. I, 165-219.
- GRZANNA, R., LINDMARK, L., FRONDOZA, C. G., 2005: Ginger – An herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. J. Med. Food 8, 125-132.
- GOVINDARAJAN, V. S., 1982: Ginger-chemistry, technology and quality evaluation. Part 1, Crit. Rev. Food Nutr. 17, 1-96.
- HAN, A. R., KIM, M. S., JEONG, Y. H., LEE, S. K., SEO, E. K., 2005: Cyclooxygenase-2 inhibitory Phenylbutenoids from the rhizomes of *Zingiber cassumunar*. Chem. Pharm. Bull. 53, 1466-1468.

- HAN, A. R., MIN, H. Y., WINDONO, T., JEOHN, G. H., JANG, D. S., LEE, S. K., SEO, E. K., 2004: A new cytotoxic phenylbutenoid dimer from the thizomes of *Zingiber cassumunar*. *Planta Med.* 70, 1095-1097.
- HARBORNE, J. B. 1993: Biochemistry in plant pollination. In: HARBORNE, J. B., (Ed.): Introduction to Ecological biochemistry. Fourth Ed., London-New York, Academic Press, 36-70.
- HASHEMI, S.R., ZULKIFLI, I., ZUNITA, Z., SOMCHIT, M.N., 2008: The Effect of Sterilization Methods on Antibacterial Activity of Aqueous Extract of Herbal Plants. *J. Biol. Sci.* (8/6), 1072-1076.
- HEGNAUER, R., 1963: Chemotaxonomie der Pflanzen II: Monocotyledoneae. Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart, 451-471.
- HOEHLE, S. I., PFEIFFER, E., SOLYOM, A. M., METZLER, M., 2006: Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *J. Agric. Food Chem.* 54, 756-764.
- IRESON, R. Ch., JONES, J. L. D., ORR, S., COUGHTRIE, M. H. M., BOOCOCK, D. J., WILIAMS, M. L., FARMER, P. B., STEWARD, W. P., GESCHER, A. J., 2002: Metabolism of the Cancer Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Intestine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11, 105-111.
- JEENAPONGSA, R., YOOVATHAWORN, K., SRIWATANAKUL, K. M., PONGPRAYOON, U., 2003: Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology* 87, 143-148.
- JIANG, H., TIMMERMANN, B. N., GANG, D. R., : Characterization and identification of diarylheptanoids in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 509-518.
- JIANG, H., XIE, Z., KOO, H. J., McLAUGHLIN, S. P., 2006: Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber* species: Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Phytochemistry* 67, 1673-1685.
- JUDD, W. S., STEVENS, P., CAMPBELL, C., KELLOGG, E., 1999: Plant systematics: A phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- KIMURA, I., PANCHO, L. R., KOIZUMI, T., KIMURA, M., 1989: Chemical structural requirement in gingerol derivatives for potentiation of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha-induced contraction in isolated mesenteric veins of mice. *J. Pharmaco-biodyn* 12, 220-227.
- KITA, T., IMAI, S., SAWADA, H., SETO, H., 2009: Isolation of Dihydrocurcuminoids from Cell Clumps and Their Distribution in Various Parts of Turmeric (*Curcuma longa*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1113-111.
- KRESS, W. J., 1990: The phylogeny and classification of the Zingiberales. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 77, 698-721.

- KRESS, W. J., PRINCE, L. M., HAHN, W. J., ZIMMER, E. A., 2001: Unraveling the evolutionary radiation of the families of the Zingiberales using morphological and molecular evidence. *Syst. Biol.* 50, 926-944.
- KRESS, W. J., PRINCE, L. M., WILLIAMS, K. J., 2002: The phylogeny and new classification of the Gingers (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. *Amer. J. Bot.* 89, 1682-1696.
- KRESS, W.J., LIU, A.-Z., NEWMAN, M., LI, Q.-J., 2005: The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A complex and phylogenetic genus of Gingers. *Amer. J. Bot.* 92, 167-178.
- LARSEN, K., LARSEN, S. S., 2006: Gingers of Thailand. Maerim, Chiang Mai, Thailand.
- LARSEN, K., LOCK, J. M., MAAS, H., MAAS, P. J. M., 1998: Zingiberaceae. In K. Kubitzki (ed.), *The family and genera of vascular plants*. Vol. 4, 474-495, Springer-Verlag, Berlin.
- LATZEL, Ch., 2000: Untersuchungen zu Intermediaten und Mechanismen der alternativen Terpenbiosynthese in Pflanzen. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilian-Universität München.
- LECHTENBERG, M., QUANDT, B., NAHRSTEDT, A., 2004: Quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma* rhizomes and rapid differentiation of *Curcuma domestica* Val. and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by capillary electrophoresis. *Phytochem. Anal.* 15, 152-158.
- LU, Y., LIU, R., BERTHOLD, A., PAN, Y., 2008: Rapid screening of bioactive components from *Zingiber cassumunar* using elution-extrusion counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1181, 33-44.
- LU, Y., SUN, C., WANG, Y., PAN, Y., 2005: Preparative isolation and purification of two phenylbutenoids from the rhizomes of *Zingiber cassumunar* by upright counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1089, 258-262.
- MARTINS, A. P., SALGUEIRO, L., GONCALVES, M. J., PROENCA DA CUNHA, A., CANIGUERAL, S., MAZZONI, V., TOMI, F., CASANOVA, J., 2001: Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of Three Zingiberaceae from S. Tome e Principe. *Planta Med.* 67, 580-584.
- MASUDA, T., JITOE, A., 1995: Phenylbutenoid monomers from the Rhizomes of *Zingiber cassumunar*. *Phytochemistry* 39, 459-461.
- MINGHETTI, P., SOSA, S., CILURZO, F., CASIRAGHI, A., ALBERTI, E., TUBARO, A., LOGGIA, R. D., MONTANARI, L., 2007: Evaluation of the tropical anti-inflammatory activity of ginger dry extracts from solutions and plasters. *Planta Med.* 73, 1525-1530.
- NAKATANI, N., JITOE, A., MASUDA, T., YONEMORI, S., 1991: Flavonoid Constituents of *Zingiber zerumbet* Smith. *Agric. Biol. Chem.* 55, 455-460.

- NISHIYAMA, T., MAE, T., KISHIDA, H., TSUKAGAWA, M., MIMAKI, Y., KURODA, M., SASHIDA, Y., TAKAHASI, K., KAWADA, T., NAKAGAWA, K., KITAHARA, M., 2005: Curcuminoids and Sesquiterpenoids in Turmeric (*Curcuma longa* L.) Suppress an Increase in Blood Glucose Level in Type 2 Diabetic KK-Ay Mice. *J. Agric. Food Chem.* 53, 959-963.
- NORRIS, J.R., RIBBINS, D.W., 1972: *Methods in Microbiology*. Academic Press London and New York, Vol. 7A, 153-190.
- NUGROHO, B.W., SCHWARZ, B., WRAY, V., PROKSCH, P., 1996: Insecticidal constituents from rhizomes of *Zingiber cassumunar* and *Kaempferia rotunda*. *Phytochemistry* 41, 129-132.
- NUHN, P., 1997: *Naturstoffchemie- Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*. 3. neu bearbeitete Auflage, Hirzel S. Verlag, Stuttgart.
- OHLOFF, G., 1990: *Riechstoffe und Geruchssinn: Die molekulare Welt der Düfte*. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- PACHER, T., 2005: *Phytochemical analyses within two tropical plant genera Glycosmis (Rutaceae) and Stemona (Stemonaceae) in special consideration of the formation of phytoalexins and artifacts*. Dissertation, Universität Wien.
- PAMPLONA, Ch. R., DE SOUZA, M. M., MACHADO, M. S., FILHO, V. C., NAVARRO, D., YUNES, R. A., MONACHE, F. D., NIERO, R., 2005: Seasonal Variation and Analgesic Properties of Different Parts from *Curcuma zedoaria* Roscoe (Zingiberaceae) Grown in Brazil. *Z. Naturforsch.* 61c, 6-10.
- PANCHAROEN, O., PRAWAT, U., TUNTIWACHWUTTIKUL, P., 2000: *Phytochemistry of the Zingiberaceae*. *Studies in Natural Products Chemistry*, 23 Part D, 797-865.
- PANCHO, L. R., KIMURA, I., UNNO, R., KURONO, M., KIMURA, M., 1989: Reversed effects between crude and processed ginger extracts on PGF<sub>2</sub> alpha-induced contraction in mouse mesenteric veins. *Jpn. J. Pharmacol.* 50, 243-246.
- PEDERSEN, L. B., 2004: Phylogenetic analysis of the subfamily Alpinioideae (Zingiberaceae), particularly *Etilingera* Giseke, based on nuclear and plastid DNA. *Plant Syst. Evol.* 245, 239-258.
- RAI, S., MUKHERJEE, K., MAL, M., WAHILE, A., SAHA, B. P., MUKHERJEE, P. K., 2006: Determination of 6-gingerol in ginger (*Zingiber officinale*) using high-performance thin-layer chromatography. *J. Sep. Sci.* 29, 2292-2295.
- RAMIREZ-AHUMADA, M. C., TIMMERMANN, B. N., 2006: Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry* 67, 2017-2029.

- SADHU, S. K., KHATUN, A., OHTSUKI, T., ISHIBASHI, M., 2007 : First isolation of sesquiterpenes and flavonoids from *Zingiber spectabile* and identification of zerumbone as the major cell growth inhibitory component. *Natural Product Research* 21, 1242-1247.
- SCHRÖDER, J., 1997: A family of plant-specific polyketide synthases; facts and predictions. *Trends Plant Sci.* 2, 373-378.
- SCHWARZ, M.K., 1994: Terpen-Bioynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. Thesis Nr. 10951, ETH Zürich.
- SCHWERTNER, H. A., RIOS, D. C., 2007: High-performance liquid chromatographic analysis of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol and 6-shogaol in ginger-containing dietary supplements, spices, teas and beverages. *J. Chromatogr. B* 856, 41-47.
- SOMPARN, P., PHISALAPHONG, C., NAKORNCHAI, S., UNCHERN, S., MORALES, N. P., 2007: Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 74-78.
- SPECHT, C. D., KRESS, W. J., STEVENSON, D. W., DESALLE, R., 2001: A molecular phylogeny of *Costaceae* (Zingiberales). *Molecular Phylogeny and Evolution* 21, 333-345.
- THEILANDE, I., 1999: A synopsis of the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) in Thailand. *Nord. J. Bot.* 19, 389-410.
- TUNTIWACHWUTTIKUL, P., LIMCHAWFAR, B., REUTRAKUL, V., PANCHAROEN, O., KUSAMRAN, K., BYRNE, L. T., 1980: Syntheses of some constituents of *Zingiber cassumunar*. *Aust. J. Chem.* 33, 913-916.
- TUNTIWACHWUTTIKUL, P., PANCHAROEN, O., JAIPETCH, T., REUTRAKUL, V., 1981: Phenylbutenoids from *Zingiber cassumunar*. *Phytochemistry* 20, 1164-1165.
- WU, D., LARSEN, K., 2000: *Curcuma longa*. *Flora of China* 24, 259-362.
- WOHLMUTH, H., SMITH, M. K., BROOKS, L. O., MYERS, S. P., LEACH, D. N., 2006: Essential Oil Composition of Diploid and Tetraploid Clones of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1414-1419.
- YAMAGISHI, T., HAYASHI, K., MITSUHASHI, H., 1972: Isolation of Hexahydrocurcumin, Dihydrogingerol and Two Additional Pungent Principles from Ginger. *Chem. Pharm. Bull.* 20, 2291-2292.
- YOSHIOKA, H., MABRY, T.J., TIMMERMANN, B.N., 1973: Sesquiterpene Lactones: Chemistry: NMR and Plant Distribution. University of Tokyo Press.
- ZALAR, P., HOOG, G.S., SCHROERS, H.J., CROUS, P.W., GROENEWALD, J.Z., GUNDE-CIMERMAN, N., 2007: Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology* 58, 157-183.

ZARATE, R., YEOMAN, M. M., 1996: Changes in the amounts of [6]gingerol and derivatives during a culture cycle of ginger, *Zingiber officinale*. *Plant Sci.* 121, 115-122.

ZARATE, R., YEOMAN, M. M., 1994: Studies of the cellular localization of the phenolic pungent principle of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. *New Phytol.* 126, 295-300.

ZENG, Y.C., QIU, F., TAKAHASHI, K., LIANG, J.M., QU, G.X., YAO, X.S., 2007: New Sesquiterpenes and Calebin Derivatives from *Curcuma longa*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 940-943.

ZOGHBI, M. G. B., ANDRADE, E. H. A., 2005: Volatiles of the *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm. and *Zingiber spectabile* Griff.: Two Zingiberaceae Cultivated in the Amazon. *J. Essent. Oil Res.* 17, 209-211.

## Abstract

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Reinstoffe (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1,3-dien, (E) 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-dien, (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, (E) 4-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-3-buten-1-ylacetat, (6)-Gingerol, (8)-Gingerol, (6)-Shogaol, Zingiberen, Zerumbon, ar-Turmeron, Hexahydrocurcumin, Curcumin und Demethoxycurcumin aus den Rhizomen von *Zingiber officinale* Roscoe, *Z. montanum* (J. König) Link ex A. Dietr., *Z. ottensii* Valetton, *Z. spectabile* Griff. und *Curcuma longa* L. chromatographisch isoliert oder co-chromatographisch identifiziert. Die Chloroform-Phasen der methanolischen Gesamtextrakte der Rhizome und die isolierten Reinstoffe wurden weiters mit dem Pilz *Cladosporium sphaerospermum* Penz. mittels Bioautographie und Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Mikrotiterplatten auf ihre Bioaktivität überprüft.

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN:

Staatsbürgerschaft: Österreich  
Familienstand: ledig  
Geburtsdatum: 10.08.1977

## WERDEGANG:

05.2008 - 10.2009 Technischer Assistent/Projektmitarbeiter  
05.2006 - 05.2008 Diplomarbeit, Durchführung Bioassay  
09.2000 – 05.2006 Studium Biologie – Botanik  
Universität Wien, Rennweg 14, 1030 Wien  
(09.2000 – 05.2008 Technische Angestellte Fa. Rigler GmbH, 15 Std.)  
07.1996 – 09.2000 Technische Angestellte Fa. Rigler GmbH  
09.1991 – 07.1996 Höhere Technische Lehranstalt – Wirtschaftsingenieur  
3340 Waidhofen/Ybbs  
09.1983 – 07.1991 Haupt- und Volksschule  
3293 Gaming

