Nichtsteroidale Antiandrogene natürlichen und synthetischen Ursprungs zur Behandlung des Prostatakarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Sonja Schleich

aus Fulda

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 30.03.2005 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Rudolf Matusch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hanefeld

Tag der mündlichen Prüfung am 30.03.2005

Wissenschaft in Dissertationen

Band 782

Nichtsteroidale Antiandrogene natürlichen und synthetischen Ursprungs zur Behandlung des Prostatakarzinoms

von

Sonja Schleich

Marburg
2005

Zugl.: Univ. Marburg, Diss. 2005

© Görich & Weiershäuser Verlag
Deutschhausstr. 42, 35037 Marburg;
Fax: 06421-614198; *verlag@gwv-marburg.de*

Herstellung: Görich & Weiershäuser
Marburg 04/2005

ISBN 3-89703-637-1

Die vorliegende Arbeit entstand am

Fachbereich Pharmazie

im Institut für Pharmazeutische Chemie

der Philipps-Universität Marburg

auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Rudolf Matusch

Für das interessante Themengebiet, seine stets großzügige fachliche, finanzielle und persönliche Unterstützung sowie für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis

möchte ich ihm an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Danksagungen

Herrn Alexander-Philipp Scheffler der Firma Euromed S.A., Barcelona danke ich für die Bereitstellung der Rinde von Pygeum africanum.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie in Marburg danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit, insbesondere gilt mein Dank der NMR-Abteilung und der massenspektroskopischen Abteilung.

Sehr herzlich danke ich Herrn Floris van Elsäcker für seine hilfsbereite Unterstützung im Labor und seine freundliche, humorvolle Art.

Meinen Kollegen Frau Pia Konstanze An, Frau Tanja Buß, Frau Daniela Heller, Herrn Christian Rack, Herrn Thomas Rösler, Frau Sabine Schirra, Herrn Khaled Shannoon und Herrn Dr. Oliver Wachsmuth danke ich sehr herzlich für ihre Kollegialität und zahlreiche fröhliche Stunden innerhalb und außerhalb des Labors.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Aria Baniahmad vom Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und Frau Maria Papaioannou vom Genetischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen für die sehr gute Zusammenarbeit und die Durchführung der pharmakologischen Tests.

Meiner Familie sowie meinen Freundinnen Frau Julia Jacob, Frau Christina Engelhardt und Frau Anja Bauereiß danke ich sehr für ihre private Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt schließlich Herrn Dr. Sascha Illgner für das Korrekturlesen des Manuskriptes, seine fachlichen Stellungnahmen und seine liebevolle Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Für meine Eltern

In Liebe und Dankbarkeit

Wenn jemand sucht, dann geschieht es leicht, daß sein Auge nur noch das Ding sieht, das er sucht, daß er nichts zu finden, nichts in sich einzulassen vermag, weil er nur an das Gesuchte denkt, weil er ein Ziel hat, weil er vom Ziel besessen ist.

Finden aber heißt: frei sein, offen stehen, kein Ziel haben.

Hermann Hesse, *Siddhartha*

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Aufgabenstellung	5
3.	Hintergründe	6
3.1.	Androgene	6
3.2.	Der Androgenrezeptor (AR)	8
3.3.	Die benigne Prostatahyperplasie (BPH)	10
3.4.	Das Prostatakarzinom (PCa)	11
4.	Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. (Pygeum africanum)	15
4.1.	Botanische Beschreibung und Verbreitung	15
4.2.	Ernte und Verwendung der Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm.	17
4.3.	Pharmakologie von Pygeum-Extrakten und deren Inhaltsstoffe	18
5.	Herstellung von Extrakten mit potentiell antiandrogener Wirkung	20
5.1.	Selektive Extrakte aus Pygeum	20
5.2.	Ethanolischer Gesamtextrakt aus Pygeum	22
5.3.	Extrakt aus Serenoa repens	22
5.4.	Extrakt aus Cucurbita pepo	23

6. MMTV-Luc Reportergen-Assay zum Test auf antiandrogene Wirkung 24

6.1. Methode des Luciferase-Assays 24

6.2. Ergebnisse des Luciferase-Assays der Extrakte 26

7. Wirkungsorientierte Fraktionierung des selektiven Dichlormethanextraktes aus Pygeum 28

7.1. Gradientenextrographie des selektiven Dichlormethanextraktes 29

7.1.1. Analytische Entwicklung einer geeigneten extrographischen Methode 29

7.1.2. Präparative Durchführung der Gradientenextrographie 32

7.2. HPLC-Analytik des selektiven Dichlormethanextraktes und der Extrographiefraktionen 33

7.3. Ergebnisse des Luciferase-Assays der Extrographiefraktionen 34

7.3.1. HPLC-Analytik der wirksamen Extrographiefraktionen F06, F07 und F08 35

8. Isolierung von Wirkstoffen aus den wirksamen Fraktionen 37

8.1. Präparative HPLC-Trennung der wirksamen Fraktion F08 37

8.2. Ergebnisse des Luciferase-Assays der isolierten Substanzen 38

8.3. Strukturaufklärung der isolierten Wirkstoffe 39

8.3.1. Benzoesäure (1) 39

8.3.2. Atrarsäure (2) 41

8.3.3. *N*-Butylbenzolsulfonamid (3) 47

8.4. Vergleich der Leitstrukturen mit Strukturen anderer Pygeum-Inhaltsstoffe 53

8.5. Test auf synergistische Effekte der beiden Leitstrukturen 54

8.6. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Atrarsäure (2) 56

9. Versuche mit dem Pygeum-Handelspräparat Tadenan® 59

9.1. Ergebnisse des Luciferase-Assays von Tadenan® 59

9.2. Analytik von Tadenan® 60

10. Optimierung der Leitstrukturen 64

10.1. Synthese von Arylsulfonamiden 65

10.1.1. Darstellung von *N*-Monoalkylarylsulfonamiden durch Aminolyse von Sulfonsäurechloriden 66

10.1.2. Antiandrogene Wirkung der Sulfonamide 72

10.1.3. Struktur-Wirkungsbeziehungen der Sulfonamide 74

10.2. Synthese von Atratаten 76

10.2.1. Darstellung von Atratаten durch Umesterung von Atrarsäure (2) 76

10.2.2. Antiandrogene Wirkung der Atratate 80

10.2.3. Struktur-Wirkungsbeziehungen der Atratate 82

11. Rezeptorspezifität der Leitstrukturen 83

11.1. Rezeptorspezifität von NBBS (3) 83

11.2. Rezeptorspezifität von Atrarsäure (2) 85

12. Wachstumshemmung von Prostatakrebszellen durch Atrarsäure (2), NBBS (3) und 2-Hydroxyflutamid 87

13. Zusammenfassung und Ausblick 89

Experimenteller Teil **Seite**

1. Allgemeine Methoden und Materialien 93

1.1. Chromatographie 93

1.1.1. HPLC-Geräte 93

1.1.2. Übersicht über die verwendeten analytischen HPLC-Methoden 94

1.1.3. Übersicht über die verwendeten präparativen HPLC-Methoden 97

1.1.4. Verwendete Lösungsmittel 100

1.2. Spektroskopie 101

1.2.1. NMR-Spektren 101

1.2.2. Massenspektrometrische Feinbestimmungen 102

1.2.3. Elektronenspektren 103

1.2.4. Infrarotspektren 103

1.2.5. Schmelztemperaturen 103

1.3. Chemikalien für die Synthesen 103

1.4. Zellkulturen und Assays 104

1.4.1. Chemikalien und Hormone 104

1.4.2. Zellkultur und Reporter-Assay 104

1.4.3. Wachstumshemmung 106

2. Extraktherstellung 106

2.1. Selektive Extrakte aus Pygeum 106

2.2. Ethanolischer Gesamtextrakt aus Pygeum 109

2.3. Extrakt aus Serenoa repens 110

2.4. Extrakt aus Cucurbita pepo 110

2.5. Luciferase-Assay der Extrakte 111

3. Gradientenextrographie des selektiven Dichlormethanextraktes 112

3.1. Analytische Entwicklung einer geeigneten extrographischen Methode 112

3.2. Präparative Durchführung der Gradientenextrographie 113

3.3. Luciferase-Assay der Extrographiefraktionen 115

4. Isolierung von Substanzen aus den Extrographiefraktionen 117

4.1. Luciferase-Assay der isolierten und synthetisierten Substanzen 118

4.2. Test auf synergistische Effekte der beiden Leitstrukturen 120

5. Synthesen und Substanzenverzeichnis 121

5.1. Benzoesäure (1) 121

5.2. Atrarsäure (2) 123

5.3. NBBS (3) 125

5.4. Methylbenzolsulfonamid (4) 127

5.5. Ethylbenzolsulfonamid (5) 129

5.6. Propylbenzolsulfonamid (6) 131

5.7. Pentylbenzolsulfonamid (7) 133

5.8. Laurylbenzolsulfonamid (8) 135

5.9. Geranylbenzolsulfonamid (9) 137

5.10. Butyltoluolsulfonamid (10) 139

5.11. Butyl-4-fluorbenzolsulfonamid (11) 141

5.12. Hydroxyethylbenzolsulfonamid (12) 143

5.13. 4-Fluorhydroxyethylbenzolsulfonamid (13) 145

5.14. Butyl-3-trifluormethylbenzolsulfonamid (14) 147

5.15. Geranyl-3-trifluormethylbenzolsulfonamid (15) 149

5.16. Butyl-4-nitro-3-trifluormethylbenzolsulfonamid (16) 151

5.17. Geranyl-4-nitro-3-trifluormethylbenzolsulfonamid (17) 153

5.18. 2,4-Dihydroxy-3,6-dimethylbenzoesäure (18) 155

5.19. Ethylatratat (19) 155

5.20. Propylatratat (20) 157

5.21. Isopropylatratat (21) 159

5.22. Butylatratat (22) 161

5.23. Geranylatratat (23) 163

5.24. Hybrid aus 2 und 3 (24) 165

5.25. Ethyl-2,4-dihydroxy-6-methylbenzoat (25) 167

5.26. Methyl-3,5-dibrom-2,4-dihydroxybenzoat (26) 167

5.27. Methyl-2-hydroxy-3-methylbenzoat (27) 167

5.28. Methyl-2,4-dihydroxybenzoat (28) 167

5.29. Methyl-2,4-dihydroxy-3-methylbenzoat (29) 168

5.30. Methyl-2,6-dihydroxy-3,5-dimethylbenzoat (30) 168

5.31. Dünnschichtchromatographie der Sulfonamide 168

Literatur- und Quellenverzeichnis 169

Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen responsives Element
ATP	Adenosintriphosphat
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
^{13}C-NMR	breitbandentkoppeltes ^{13}C-NMR-Spektrum
DBD	DNA-Bindedomäne
DC	Dünnschichtchromatographie
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGF	epidermal growth factor
EI	Elektronenstossionisation
ELSD	Evaporative-Light-Scattering-Detector (Lichtstreudetektor)
ER	Östradiolrezeptor
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GR	Glucocorticoidrezeptor
HGPIN	prostatische intraepitheliale Neoplasie, „high grade“

HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
^{1}H-NMR	vollständig gekoppeltes ^{1}H-NMR-Spektrum
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	High resolution
HRE	Hormon responsives Element
HSP	Hitzeschockproteine
HTML	Hyper Text Mark up Language
http	Hyper Text Transfer Protocol
IC_{50}	halbmaximale Hemmkonzentration
IR	Infrarotspektroskopie
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
LBD	Ligandenbindedomäne
LC	Liquid Chromatography
LH	luteinisierendes Hormon
MG	Molekulargewicht
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MS	Mass Spectroscopy
NBBS	*N*-Butylbenzolsulfonamid
NCE	new chemical entity
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCa	Prostate cancer

PDA	Photodiode-Array-Detector
ppm	parts per million
PR	Progesteronrezeptor
PSA	prostataspezifisches Antigen
RAR	Retinsäurerezeptor
RP	Reversed Phase
TFA	Trifluoroacetic acid, Trifluoressigsäure
TGF-β	transforming growth factor-β
TR	Thyroidrezeptor
UV	ultraviolett-, Ultraviolettspektroskopie
VDR3	Vitamin D_3-Rezeptor
Vis	visible, sichtbarer Bereich
www	world wide web

Theoretischer Teil

1. Einleitung

Die Entwicklung eines neuen Arzneimittels beginnt in der Regel mit der Suche nach einem Wirkstoff, der sich von einer zuvor genau charakterisierten Leitstruktur ableitet. Eine Leitstruktur sollte folgende Voraussetzungen erfüllen:

- eine einfache chemische Struktur, die durch Methoden der kombinatorischen und medizinischen Chemie leicht optimiert werden kann,
- Zugehörigkeit zu einer Serie von Strukturen mit etablierten Struktur-Wirkungsbeziehungen, in der bestimmte Substrukturen der Wirkung zugeordnet werden (Pharmakophore),
- günstige Patentsituation,
- gute Eigenschaften bezüglich seiner Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung (ADME) [1].

Im „high throughput screening“ werden wirksame Leitstrukturen erfasst, die man zunächst als „Hits“ bezeichnet und aus denen später die „Leads“ ausgewählt werden. Die Miniaturisierung des Einzeltests und die synchrone Testführung auf einer Mikrotiterplatte ermöglichen hier einen wesentlich schnelleren Probendurchsatz bei reduziertem Substanzbedarf. Getestet werden zunächst Substanzen aus firmeninternen Bibliotheken. Solche Bibliotheken können neben rein synthetischen und durch kombinatorische Chemie gewonnenen Substanzen auch Naturstoffe und semisynthetische Stoffe, die durch Derivatisierung eines Naturstoffes entstanden sind, sowie Vakzine und Proteine enthalten. Naturstoffe nehmen als Leitstrukturen für neue Arzneimittel eine bedeutende Rolle ein. Etwa 40% der in den letzten Jahren zugelassenen Arzneimittel sind Naturstoffe, Naturstoffderivate oder Naturstoffanaloga. Vor allem Krebstherapeutika, Antiinfektiva und Antihypertensiva sind hier zu nennen.

So sind 62% der „New chemical entities“ (NCE) von 1981-2002 auf dem Krebssektor kleine Moleküle nicht synthetischen Ursprungs [2,3].

Naturstoffe bergen den großen Vorteil der Biodiversität, die sich in einer enormen Vielfalt an unterschiedlichen Strukturen äußert [4]. Naturstoffe haben eine biologische Geschichte. Ihre Biosynthese beinhaltet eine wiederholte Interaktion mit Enzymen und ihre biologische Funktion beruht auf der Bindung an bestimmte Proteine [5]. Es überrascht also keineswegs, dass viele Naturstoffe verglichen mit ihren synthetischen Konkurrenten eine höhere Bindungsaffinität zu Proteinen aufweisen und damit eine Bioaktivität wahrscheinlicher machen. Dafür verantwortlich ist außerdem ihre häufig vorliegende sterisch komplexe Struktur. Synthetische Substanzen sind weniger komplex, haben eine niedrigere durchschnittliche Molekularmasse und enthalten mehr Heteroatome [6]. Allerdings sind Synthetika wesentlich leichter zugänglich als Naturstoffe, die erst aufwändig aus biologischem Material isoliert werden müssen. Die moderne kombinatorische Chemie und die Nutzung von Syntheserobotern ermöglicht die Herstellung beträchtlicher Mengen neuer Substanzen in kürzester Zeit.

Ein viel versprechender Mittelweg zwischen synthetischer und natürlicher Gewinnung einer neuen Wirksubstanz manifestiert sich in der partialsynthetischen Derivatisierung von Naturstoffen. Der Naturstoff dient hier als Leitstruktur und wird mit Methoden der kombinatorischen Chemie weiter optimiert, um einen noch potenteren Wirkstoff mit verbesserten pharmakologischen und technologischen Eigenschaften zu erhalten [4,7]. So kann man einen ganzen Pool neuer Verbindungen mit dem Naturstoff als Vorbild kreieren. Das wohl populärste Beispiel eines derivatisierten Naturstoffes ist die Acetylsalicylsäure (Aspirin®), die ihr Vorbild im Salicin der Weidenrinde findet und heute mit 40.000 t pro Jahr vollsynthetisch hergestellt wird [2]. Auch das Zytostatikum

Paclitaxel (Taxol®) gehört zur Gruppe der partialsynthetisch gewonnenen Arzneistoffe: Aufgrund des geringeren Vorkommens des Wirkstoffes selbst in der pazifischen Eibe derivatisiert man den in weitaus größerer Menge in europäischen Eibenarten vorliegenden Biosynthesevorläufer 10-Deacetylbaccatin III in den eigentlichen Wirkstoff oder in wirksamere Derivate wie z.B. Docetaxel [8].

Ein ganz neuer Ansatz, der sich die Biodiversität von natürlichen Substanzen zu Nutze macht, schlägt vor, zwei oder mehr Naturstoffe miteinander zu einem Hybrid zu kombinieren. Sind seine Einzelkomponenten biologisch aktiv, so ist die Wahrscheinlichkeit in einem Hybrid einen neuen Wirkstoff zu finden deutlich höher als bei nach dem Zufallsprinzip synthetisierten Substanzen. Mit dieser Methode lassen sich Wirkstoffe kombinieren, die unterschiedliche molekulare Angriffsorte besitzen. Das Hybrid ist unter Umständen noch wesentlich potenter als die Einzelkomponenten, weil diese sich synergistisch ergänzen. Ein Beispiel für ein natürliches Hybrid ist das Vitamin E, bei welchem die terpenoide Seitenkette mit der Zellmembran interagiert, während die phenolische Grundstruktur, die sich von der Shikimisäure herleitet, als Radikalfänger dient [9].

Bei der Wirkstoffsuche für ein bestimmtes Target steht man zunächst einer unüberschaubaren Vielzahl von Substanzen gegenüber, unabhängig davon, ob man nach einem synthetischen oder natürlichen Vertreter Ausschau hält. Um die hohe Anzahl an potentiellen Leitstrukturen zu reduzieren, haben verschiedene Wissenschaftler versucht, definierte Regeln aufzustellen, die bestimmte Kandidaten von vornherein ausschließen [1,6,10,11]. Christopher Lipinski hat hierzu eine ausführliche statistische Studie betrieben und die Ergebnisse 1997 in den „Rule of five“ zusammengefasst, in deren vier Unterpunkten jeweils die Zahl fünf oder ein Vielfaches davon eine Rolle spielt

[10,12]. Die „Rule of five“ besagt, dass eine schlechte Absorption und Permeation eines Wirkstoffes dann wahrscheinlich ist, wenn er

- mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donatoren,
- mehr als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren,
- eine relative Molekülmasse größer als 500 g/mol und
- einen Verteilungskoeffizienten log P größer fünf

aufweist. Substrate, für die es biologische Transporter gibt, werden von den Regeln ausgeschlossen. Die „Rule of five“ trifft bei etwa 90% der Phase-II-Verbindungen zu. Kombiniert man die Parameter Molekülmasse und log P, ist dies sogar zu über 99% der Fall. Die Regeln von Lipinski bieten also einen Anhaltspunkt dafür, wie eine Leitstruktur auszusehen hat. Ausnahmen wie z.B. das Chemotherapeutikum Vinblastin mit einer Molekülmasse von 811 g/mol dürfen nicht übersehen werden.

2. Aufgabenstellung

Seit 1969 ist in Frankreich das Arzneimittel Tadenan®, welches einen Extrakt aus der Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. (Pygeum africanum) enthält, zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (BPH) zugelassen [13]. Die BPH zeichnet sich durch eine gutartige Vergrößerung der Prostata aus und kann im weiteren Verlauf in die maligne Form, das Prostatakarzinom (PCa), entarten. Das Wachstum der Prostata wird von den männlichen Geschlechtshormonen, den Androgenen, reguliert. Ein möglicher Therapieansatz zur Behandlung des Prostatakarzinoms sieht die Blockierung des Androgenrezeptors vor, um dem weiteren Wachstum der Prostata entgegenzusteuern. Mittels eines Androgenrezeptor abhängigen Genexpressionsassays konnte unser Kooperationspartner am Genetischen Institut Gießen die antiandrogene Aktivität von Tadenan® nachweisen, was die Anwendung dieses Medikaments als Prostatakrebstherapeutikum interessant werden lässt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nun, die antiandrogen wirkenden Naturstoffe aus der Rinde von Pygeum africanum zu isolieren, da ein Extrakt mit einer Vielzahl an Inhaltsstoffen nur bei Kenntnis aller wirksamen Substanzen samt ihrer genauen Wirkstärke standardisierbar ist und außerdem eine höhere Belastung des Organismus bewirkt. Zunächst sollte die Wirksamkeit von verschiedenen Pygeum-Extrakten mit der Wirksamkeit von gebräuchlichen Phytopharmaka, die bei BPH angewendet werden, verglichen werden. Mittels wirkungsorientierter Fraktionierung sollte dann die Isolierung der wirksamen Verbindungen vorgenommen werden. Weiterhin sollte eine Optimierung der Leitstrukturen im Hinblick auf eine gesteigerte antiandrogene Aktivität erfolgen. Aus diesem Pool an getesteten Verbindungen sollten dann erste Hinweise auf bestehende Struktur-Wirkungsbeziehungen gewonnen werden.

3. Hintergründe

Um den in der vorliegenden Arbeit ausgewählten Therapieansatz zur Behandlung des Prostatakarzinoms besser verstehen zu können, sollen im Folgenden die Hintergründe zur Entstehung dieser Krankheit beschrieben werden.

3.1. Androgene

Die Androgene fungieren als männliche Sexualhormone und sind für eine normale Geschlechtsentwicklung unentbehrlich. Sie werden in den Leydigschen Zwischenzellen der Hoden gebildet. Ihre Biosynthese erfolgt wie bei den anderen Steroidhormonen aus Cholesterol über Pregnenolon, weitere Zwischenprodukte sind Progesteron und Androstendion, welches zu dem Hauptvertreter der Androgene, dem Testosteron, reduziert wird [14]. Testosteron kann weiter in das wesentlich schwächer wirksame Androsteron umgewandelt werden. Beide C_{19}-Steroide können zu 5 α-Dihydro-testosteron metabolisiert werden, welches eine deutlich höhere Affinität zum Androgenrezeptor aufweist als das Testosteron selbst (Abb. 1). Der Abbau von Testosteron wird von dem Enzym 5 α-Reduktase katalysiert. Die 5 α-Reduktase existiert in zwei Isotypen, Typ I und Typ II [15]. Typ II kommt vorwiegend im Gewebe der Prostata vor, während Isotyp I die dominierende Form in den talgbildenden Sebocyten darstellt [16]. Interessanterweise ist die Typ I mRNA Expression drei- bis viermal größer in malignem als in benignem Prostatagewebe, wohingegen die Expression von Typ II mRNA bei beiden gleich ist [17]. Arzneistoffe wie das zur Behandlung der BPH und der androgenetischen Alopezie zugelassene Finasterid (Proscar®) inhibieren vor

allem Isotyp II, so dass dieser Wirkstoff für die Therapie des Prostatakarzinoms weniger geeignet ist [18].

Die Regulation der Testosteronabgabe erfolgt über einen Regelkreis vom Hypothalamus, welcher in etwa zwei- bis vierstündigen Intervallen das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) freisetzt. Dieses wiederum stimuliert den Hypophysenvorderlappen zur Ausschüttung von luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-stimulierendem Hormon (FSH). LH reguliert über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Testosteronproduktion in den Leydigschen Zwischenzellen. FSH steuert und verursacht die Bildung von Inhibin in den Sertoli-Zellen, welches wiederum erneute FSH-Freisetzung hemmt [14,15].

Testosteron fördert im männlichen Körper die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale, reguliert zusammen mit FSH die Spermiogenese und stimuliert in den Nebenhoden, der Samenblase und in der Prostata die Bildung der für die Vitalität der Spermien benötigten Substanzen, wie z.B. Fructose und Zitronensäure. Außerdem besitzen die Androgene eine anabole Wirkung und fördern die Calzifizierung der Knochen und den Schluß der Epiphysenfuge [14].

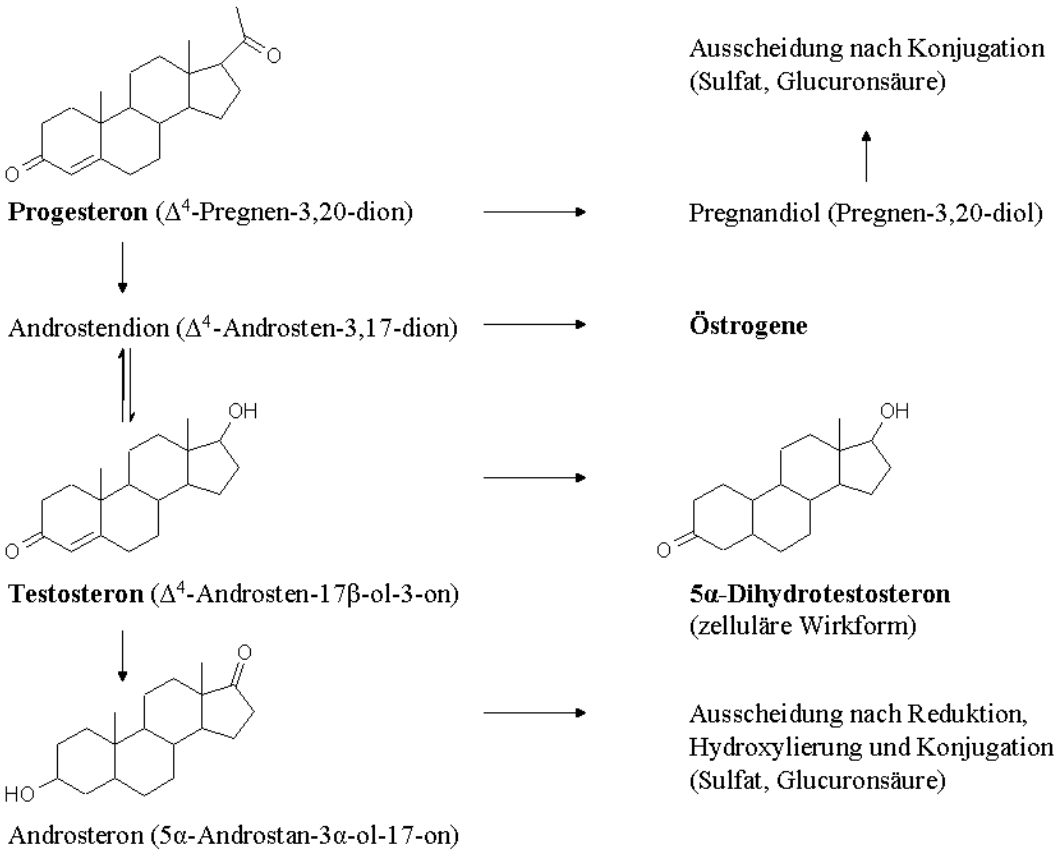


Abb. 1: Biosynthese der Androgene nach [14].

3.2. Der Androgenrezeptor (AR)

Der Androgenrezeptor zählt zu der Familie der Steroidhormonrezeptoren, an die nukleäre Hormone als Liganden binden. Nukleäre Hormone sind kleine lipophile Moleküle, die problemlos durch die Zell- und Kernmembran diffundieren können und im Zellkern mit hoher Affinität an ihren Rezeptor binden. Zu den Steroidhormonrezeptoren gehören neben dem AR auch der Östradiolrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor (PR), der Glucocorticoidrezeptor (GR), der Mineralocorticoidrezeptor (MR), der Thyroidrezeptor (TR), der Vitamin D_3-Rezeptor (VDR3) und der Retinsäurerezeptor (RAR). Diese Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, d.h. sie interagieren in einem

ligandenabhängigen Mechanismus mit spezifischen DNA-Sequenzen und regulieren so die Transkription von Zielgenen [19,20]. Die Steroidhormonrezeptoren zeichnen sich durch ihren gemeinsamen modularen Aufbau aus und verfügen über eine amino-(N)-terminale Transaktivierungsregion, eine zentral gelegene DNA-Bindedomäne (DBD) und eine carboxy-(C)-terminale Ligandenbindedomäne (LBD) [21-24]. Die DBD beinhaltet zwei hochkonservierte Zinkfinger-Motive, welche an den Hormon responsiven Elementen (HRE) an die DNA binden. Eine flexible D-Region, Scharnier- oder Hinge-Region genannt, verbindet die DBD mit der LBD und kodiert u.a. für die Kernlokalisierungssequenz, welche den Transfer des Rezeptors vom Cytoplasma in den Kern vermittelt [25-27]. Die ca. 250 Aminosäuren der LBD bilden am carboxy-terminalen Ende (C-Terminus) 12 α-Helices (Abb. 2). In Helix 12 (HF 12) befindet sich die ligandenabhängige AF2-Domäne, die für die Interaktion mit Kofaktoren und den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie von Bedeutung ist [28-30]. Nach seiner Synthese liegt der AR als nicht-ligandengebundener Rezeptor (Aporezeptor) komplexiert mit Hitzeschockproteinen (HSP) im Cytoplasma vor. HSP 90, 70 und 56 stabilisieren die Tertiärstruktur in einer Konformation, welche Androgenbindung ermöglicht [31,32]. Nach Androgenbindung an den Rezeptor erfolgt die Dissoziation von den HSPs und die Rezeptordimerisierung. Im Zellkern bindet der AR an die Androgen responsiven Elemente der DNA und rekrutiert Koregulatoren, die über Mediatoren die Transkription der entsprechenden Gene veranlassen [33,34].

Abb. 2: Funktionelle Domänen des AR nach [21]. Der humane AR besteht aus etwa 919 Aminosäuren. NTD - Amino-(N)-terminale Transaktivierungsregion; DBD - DNA-Bindedomäne; LBD - Carboxy-(C)-terminale Ligandenbindedomäne. Die AF1 Domäne liegt in der NTD und die AF2 Domäne in der LBD. Die ungefähre Lage der Helix 12 (H12) ist eingezeichnet, ebenso die Polyglutamin- $(Gln)_{\sim 22}$ und die Polyglycin- $(Gly)_{\sim 24}$ Repeats.

3.3. Die benigne Prostatahyperplasie (BPH)

Bei der benignen Prostatahyperplasie handelt es sich um eine gutartige Vergrößerung des glandulären Epithels, des Bindegewebes und der glatten Muskulatur in der Transitionalzone der Prostata [35]. Von der BPH betroffen sind 50% aller über 60 Jahre alten Männer, bei den über 75-Jährigen sind es sogar 75% [36]. Damit bedingt die BPH die häufigste Form einer Blasenfunktionsstörung beim Mann.

Die Symptomatik umfasst obstruktive und irritative Beschwerden. Zu den obstruktiven Symptomen zählen ein abgeschwächter Harnstrahl, eine verlängerte Miktionszeit, Nachträufeln und Restharn, während sich die irritativen Symptome in einer erhöhten Miktionsfrequenz, einer schmerzhaften Miktion und einer Dranginkontinenz äußern [37,38]. Zur Ätiologie der BPH werden momentan verschiedene Hypothesen diskutiert. Die DHT-Hypothese benennt als Ursache der BPH den im Alter erhöhten Spiegel an intrazellulärem Dihydrotestosteron (DHT) bedingt durch eine erhöhte Aktivität der 5 α-

Reduktase und eine Überexpression an Androgenrezeptoren [39]. Andere Hypothesen sehen die Krankheitsursache in der Verschiebung des Östrogen/Androgen-Gleichgewichtes zugunsten einer erhöhten Östradiolkonzentration, während zirkulierendes, freies Testosteron abnimmt. Weiterhin werden Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor; EGF), der transformierende Wachstumsfaktor β (transforming growth factor-β; TGF-β) und der Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor; FGF) überexprimiert und diese verursachen eine gesteigerte Zellproliferation [40].

Zur medikamentösen Behandlung der BPH sind neben α-Adrenorezeptorenblockern wie das Doxazosin (Cardura®) und 5 α-Reduktasehemmer wie das Finasterid (Propecia®) zahlreiche Phytopharmaka auf dem Markt [41-43]. In Deutschland sind Präparate aus den Früchten der Sägepalme (Sabal serrulata = Serenoa repens), aus der Brennesselwurzel (Urtica dioica), aus Kürbissamen (Cucurbita pepo), aus Roggenpollen (Secale cereale) und aus der Wurzel der afrikanischen Lilie (Hypoxis rooperi) zur Behandlung der BPH zugelassen [44-46]. Medikamente, die Extrakte aus Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. enthalten, sind besonders in Frankreich, Italien und den USA weit verbreitet.

3.4. Das Prostatakarzinom (PCa)

Das Prostatakarzinom (PCa = Prostate cancer) ist die häufigste Krebserkrankung unter Männern in der westlichen Welt und stellt nach Lungenkrebs die zweithäufigste zum Tode führende Krebsart dar [47]. Obwohl das Prostatakarzinom in seiner Ätiologie nicht direkt mit der BPH verknüpft ist, zeigen Patienten mit einer schweren Form der BPH sehr ähnliche Genanomalien wie Prostatakrebspatienten [38]. Während die BPH

vor allem die Transitionalzone der Prostata befällt, tritt ein Karzinom bevorzugt in der peripheren Zone auf [48].

Die Ursachen für die Entstehung eines Prostatakarzinoms liegen in diversen Gendefekten, die meist familiär prädisponiert auftreten [49-52]. So kommen bei Erkrankten unter anderem diverse Mutationen des Androgenrezeptors vor. Eine reduzierte Aktivität der 5 α-Reduktase Typ II hingegen verringert das Risiko zur Entwicklung eines Karzinoms [53]. Des Weiteren können verschiedene Tumorsuppressorgene wie z.B. Rb Gen auf Chromosom 13 q von Mutationen betroffen sein und somit inaktiviert werden. Auf der anderen Seite trägt eine Überfunktion an Onkogenen zur Tumorentstehung bei [54,55]. Eine große Rolle spielen außerdem Methylierungen von wichtigen wachstumsregulierenden und detoxifizierenden Genen, die so funktionsunfähig werden und dem Krebs den Weg ebnen. Einen großen Beitrag leisten nach neuestem Stand der Wissenschaft auch Entzündungsprozesse, aus denen präneoplastische oder neoplastische Läsionen hervorgehen [49].

Als wichtigsten prämalignen Vorläufer des klinisch relevanten Prostatakarzinoms sieht man heute die prostatische intraepitheliale Neoplasie, „high grade“ (HGPIN) an, die typische Differenzierungs- und Proliferationsstörungen zeigt [48].

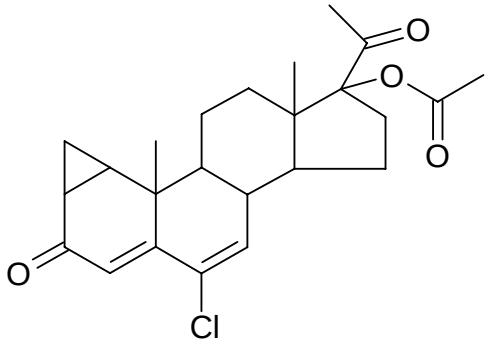
Den Grad eines Prostatakarzinoms bestimmt man nach der Gleason-Klassifikation. Die Gleason-Skala reicht von Grad zwei für hoch differenzierte bis Grad zehn für undifferenzierte Tumore [56]. Zur Krebserkennung empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Urologie neben der Tastuntersuchung eine jährliche Kontrolle des PSA-Wertes ab dem 50. Lebensjahr. Schließlich steigt die Konzentration an **p**rostata**s**pezifischem **A**ntigen (PSA) bei Vorliegen eines Karzinoms über den Schwellenwert von 4 ng/ml.

Anschließende digitale rektale Untersuchungen der Prostata, transrektaler Ultraschall und Prostatabiopsien ermöglichen die eindeutige Diagnose [57].

Die Anfangstherapie zur Behandlung eines Prostatakarzinoms besteht gewöhnlich in einer Entfernung der Prostata durch radikale Prostatektomie oder einer Bestrahlung, um die entarteten Zellen zu entfernen [58]. Das fortgeschrittene, metastasierende Prostatakarzinom lässt sich durch eine lindernde Hormontherapie behandeln. Bereits 1941 entdeckten Huggins und Hodges, dass eine Reduktion der im Blut zirkulierenden Testosteronmenge die Krankheitssymptome abschwächt [59,60]. Die heutzutage durchgeführte totale Androgenblockade beinhaltet die Kombination aus operativer und chemischer Kastration [61]. Die reinen Antiandrogene Bicalutamid (Casodex®), Flutamid (Fugerel®) und Nilutamid (Anandron®) wirken selektiv auf die Androgenrezeptoren der Targetorgane, während Cyproteronacetat (Androcur®) auch Progesteron- und Glucocorticoidrezeptoren besetzt (Abb. 3). Allerdings kann die Hormontherapie den fortgeschrittenen Prostatakrebs nicht heilen. Die Behandlung bewirkt zunächst eine antiandrogenabhängige Hemmung des Tumorwachstums. Nach durchschnittlich zwei Jahren tritt allerdings eine Therapieresistenz ein. Zunächst ermöglicht eine Überexpression von verschiedenen Koaktivatoren die Aktivierung des Androgenrezeptors durch nichtandrogene Steroide. Später können sogar Antiandrogene wie der aktive Flutamid-Metabolit 2-Hydroxyflutamid den Androgenrezeptor aktivieren und der Tumor wird androgenunabhängig [62]. Androgenentzug bewirkt keine Apoptose dieser androgenunabhängigen Krebszellen, welche schließlich zum Tod des Krebspatienten führen [63].

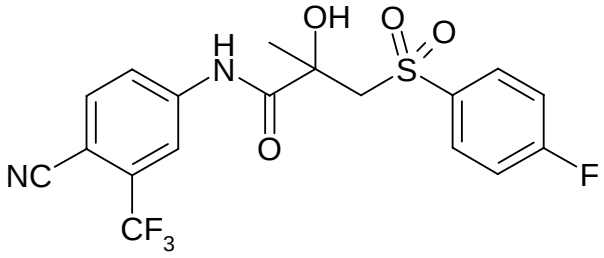
Das Ziel der modernen Prostatakrebstherapie ist es also, neue Medikamente mit anderen Angriffspunkten zu finden, die auch androgenunabhängige Prostatakrebszellen in ihrem Wachstum hemmen [64,65].

Steroidales Antiandrogen:

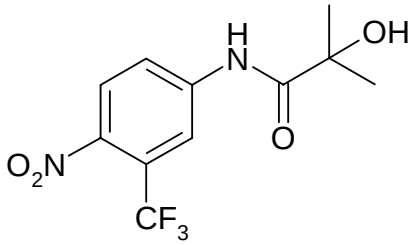


Cyproteronacetat

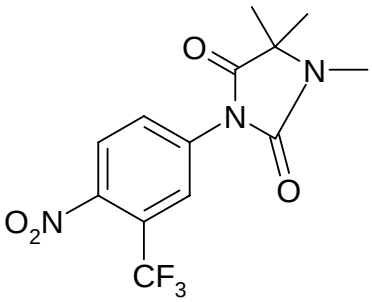
Nichtsteroidale Antiandrogene:



Bicalutamid



2-Hydroxyflutamid



Nilutamid

Abb. 3: Strukturformeln der zur Behandlung des Prostatakarzinoms eingesetzten Antiandrogene.

4. Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. (Pygeum africanum)

Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. mit dem obsoleten botanischen Bestimmungsnamen Pygeum africanum (Hook. f.) gehört zur Unterfamilie Prunoideae der Rosaceae. Zu den Prunoideae zählen Holzpflanzen mit Steinfrüchten. Die Gattung Prunus ist die Umfassendste in ihrer Unterfamilie, zu ihr gehören außerdem die Kirsche (Prunus avium L.), der Pfirsich (Prunus persica L.), die Pflaume (Prunus domestica L.) und die Mandel (Prunus dulcis (Mill.) D.A. Webb). Der afrikanische Pflaumenbaum Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. kommt als einzige Art dieser Gattung auf dem afrikanischen Kontinent vor und sollte sich so bezüglich seiner Inhaltsstoffe von den anderen Vertretern unterscheiden [66].

4.1. Botanische Beschreibung und Verbreitung

Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. ist ein immergrüner Laubbaum mit hängenden Zweigen, der eine Höhe von bis zu 35 m erreichen kann. Seine Rinde ist dunkelbraun bis gräulich, von rauer Struktur und mit longitudinalen Rissen. Die Blätter sind matt oder glänzend, dick und ledrig, eliptisch-oblong bis eiförmig, wechselständig angeordnet und bis zu 15 cm lang und 5 cm breit. Die Blätterstiele sind meist pink oder rot. Die Blütenstände sind geschlossen oder offen, aufrecht, ausbreitend oder hängende Trauben mit einer Länge von 3,5 bis 8 cm. Die Blüten (7 bis 20 pro Traube) haben einen tassenartigen Blütenkelch von 3,5 bis 5,5 mm Durchmesser und sind außen kahl und innen behaart. Der Blütenkelch besteht aus fünf dreieckigen Flügeln, die fünf Kronblätter sind crèmeweiß und die 25 bis 30 Staubblätter tragen 1,5 bis 2 mm lange

Filamente. Die Früchte sind rote bis dunkelrot-braune Steinfrüchte und rund bis oval (breiter als lang) mit einer leichten Grube (Abb. 4).

Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. wächst bevorzugt auf 1000 bis 2500 m Höhe in den bergigen Wäldern von Westafrika (Ghana, Kamerun), Ostafrika (Äthiopien, Kenia, Uganda, Tansania, Ostkongo), Südafrika (Angola, Sambia, Simbabwe, Malawi, Mosambik, Natal, Südafrika) und Madagaskar.

Die Rinde, die gequetschten Blätter und die Früchte haben einen starken Geruch nach Bittermandel, welcher von cyanogenen Glykosiden hervorgerufen wird [67,68].

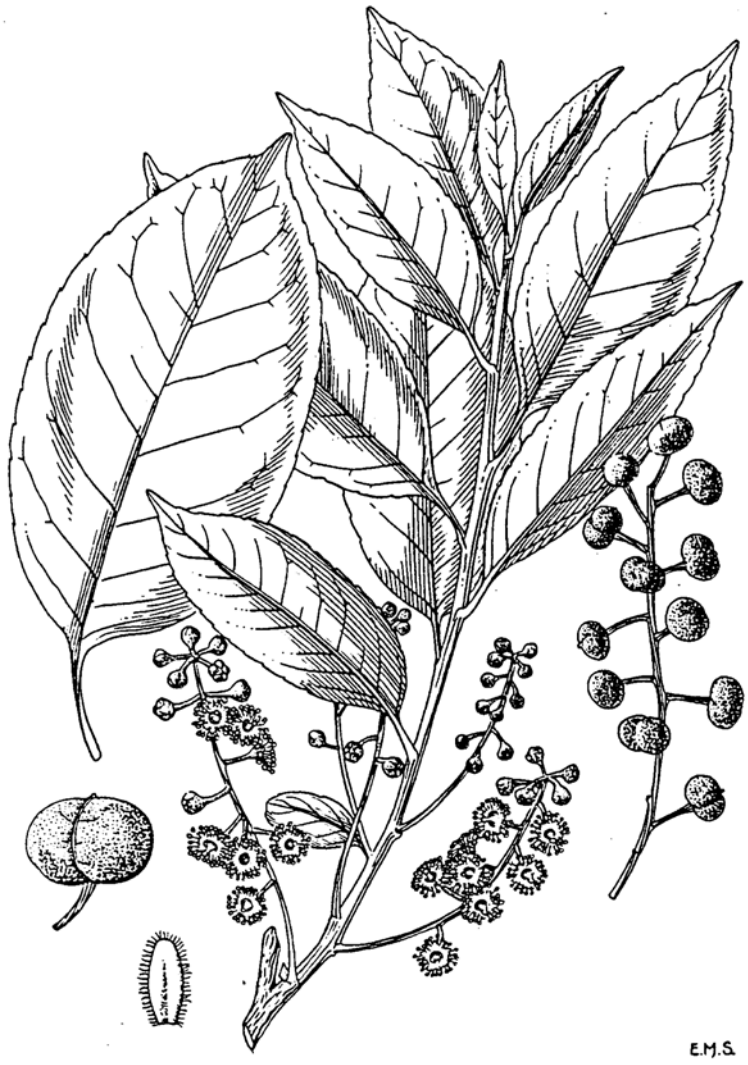


Abb. 4: Blätter, Blüten und Früchte von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. [69].

4.2. Ernte und Verwendung der Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm.

Die Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. wird ausschließlich wild geerntet. Die steigende Nachfrage nach Pygeum-Extrakten ab den 70er Jahren brachte eine destruktive Ernte der Rinde mit sich und der Baumbestand ist derart zurückgegangen, dass Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. seit 1995 zu einer gefährdeten Species zählt und in den CITES Appendix II aufgenommen wurde (CITES = Convention of International Trade in Endangered Species) [69-71]. Seitdem werden immer wieder Versuche unternommen, diese Heilpflanze zu kultivieren [72].

Die afrikanische Urbevölkerung verwendet seit dem Altertum das Holz des afrikanischen Pflaumenbaums für die Herstellung von Möbeln und Werkzeugen. Aus der Rinde und den Blättern werden traditionell Heilmittel und Tees zur Behandlung von Fieber, Malaria, Brustschmerzen, Magenschmerzen, Obstipation und Gonorrhoe hergestellt [66]. 1966 patentierte das französische Unternehmen Debat Laboratoires die Wirkung von Pygeum-Extrakten bei der Therapie der BPH [73,74]. Seit 1969 ist das Präparat Tadenan® von Debat in Frankreich und den USA weit verbreitet [13]. In Deutschland allerdings ist dieser Chloroformextrakt nicht zugelassen, hier zählen vor allem Extrakte aus der Beere der amerikanischen Sägepalme (Serenoa repens, Permixon®) zu den gebräuchlichsten Phytotherapeutika zur Behandlung der BPH [75,76].

4.3. Pharmakologie von Pygeum-Extrakten und deren Inhaltsstoffe

Der Chloroformextrakt aus Pygeum, der in Tadenan® enthalten ist, besteht aus einer komplexen Mischung von unterschiedlichen lipophilen Inhaltsstoffen, wie Phytosterole (Hauptsteroid β-Sitosterol), pentacyclische Triterpene (Ursolsäure, Oleanolsäure), kurzkettige Fettsäuren (Laurin- und Myristinsäure), langkettige ungesättigte Fettsäuren, sowie die linearen Alkohole *n*-Tetracosanol und *n*-Docosanol, die u.a. verestert mit Ferulasäure vorliegen (Abb. 5) [77-80].

Der genaue Wirkmechanismus von Tadenan® bei der Therapie der BPH ist bislang nicht bekannt, aber zahlreiche in vitro- und in vivo-Studien geben Anhaltspunkte über die pharmakologische Aktivität der Inhaltsstoffe.

Die Phytosterole hemmen die Prostaglandinbildung in der Prostata, so dass Entzündungsprozesse bei der BPH und der chronischen Prostatitis gemildert werden [81,82].

Den pentacyclischen Triterpenen wie Ursol- und Oleanolsäure werden antiödematöse Wirkungen und eine Inhibierung der Glycosyl-Transferase, die in inflammatorische Prozesse involviert ist, zugeschrieben [67].

Die mit Ferulasäure veresterten Alkohole *n*-Docosanol und *n*-Tetracosanol senken den Blutcholesterolspiegel und somit die Testosteronbildung aus Cholesterol [83].

Desweiteren zeigte der Pygeum-Extrakt in vitro eine Inhibierung der 5 α-Reduktase und der Aromatase und somit reduzierte Dihydrotestosteron- und Östrogenspiegel [84].

Außerdem wird gleichzeitig eine konzentrationsabhängige phytoöstrogene Wirkung des Extraktes diskutiert [85,86].

Zahlreiche in vivo-Studien mit dem Handelspräparat Tadenan® geben weitere Anhaltspunkte zur Pharmakologie im menschlichen und tierischen Körper. Die Studien

zeigen, dass Tadenan® die Proliferation von Prostatafibroblasten bei der Ratte inhibiert, die Produktion von 5-Lipoxygenase Metaboliten wird gehemmt und die sekretorische Aktivität der Prostata wird gesteigert. Darüber hinaus zeigt der Pygeum-Extrakt auch in vivo antiinflammatorische und antiödematöse Wirkung [87-95].

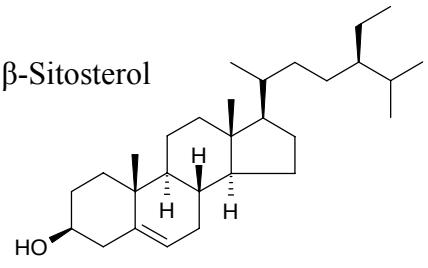
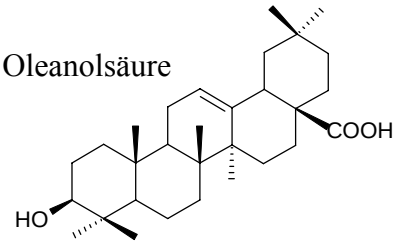
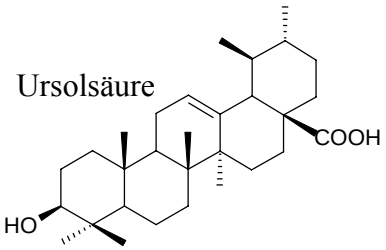
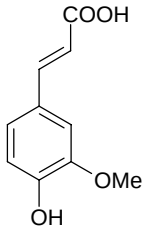
Phytosterole	β-Sitosterol 
Pentacyclische Triterpene	Oleanolsäure  Ursolsäure 
Fettsäuren	Laurinsäure ($CH_3(CH_2)_{10}COOH$) Myristinsäure ($CH_3(CH_2)_{12}COOH$)
Langkettige Alkohole	*n*-Docosanol ($CH_3(CH_2)_{20}CH_2OH$) *n*-Tetracosanol ($CH_3(CH_2)_{22}CH_2OH$)
Aromatische Carbonsäuren	 *trans*-Ferulasäure

Abb. 5: Bekannte Inhaltsstoffe aus der Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm.

5. Herstellung von Extrakten mit potentiell antiandrogener Wirkung

Zur Behandlung von BPH-bedingten Miktionsbeschwerden nehmen verschiedene traditionelle Pflanzenextrakte einen hohen Stellenwert ein. Diese Pflanzenextrakte werden mit unterschiedlichen Extraktionsverfahren wie z.B. Ethanol-, Chloroform-, Hexan- oder CO_2-Extraktion gewonnen [96,97]. Präparate aus Serenoa repens (Permixon®), Cucurbita pepo (Cysto-Urgenin®) und Pygeum africanum (Tadenan®) gehören zu den meist untersuchten Phytopharmaka auf diesem Sektor [75,98].

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene Extrakte aus diesen drei Pflanzen hergestellt, um deren antiandrogene Wirkung miteinander zu vergleichen. Ihre Herstellungsweise soll in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

5.1. Selektive Extrakte aus Pygeum

Zur gezielten Fraktionierung des Rindenmaterials von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. sollten zunächst selektive Extrakte hergestellt werden.

Im Allgemeinen zeichnen sich die Inhaltsstoffe von pflanzlichen Drogen durch ihr hohes Maß an Biodiversität aus, die sich in einer enormen Vielfalt an unterschiedlichsten Verbindungen äußert. Um trotzdem Extrakte mit einer überschaubaren Anzahl an Inhaltsstoffen zu erhalten, hat es sich bewährt, eine Vorfraktionierung nach Löslichkeit in Lösungsmitteln steigender Polarität vorzunehmen [99]. Die resultierenden selektiven Extrakte sind aufgrund der Einschränkung des Polaritätsbereiches und der Anreicherung von Substanzen geringerer Konzentration leichter chromatographisch zu handhaben und ermöglichen so nach weiterer Fraktionierung schließlich die Isolierung von wirksamen Inhaltsstoffen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prozedur der selektiven Extraktion zweimal vorgenommen. Die Droge wurde gesiebt, anschließend in *n*-Hexan mit einem Ultra-Turrax weiter zerkleinert und schließlich in eine beidseitig mit Stahlfritten verschlossene Edelstahlkartusche (40 x 10 cm bzw. 80 x 10 cm) gefüllt. Mittels einer HPLC-Pumpe wurden die Lösungsmittel nach steigender Polarität (*n*-Hexan, Dichlormethan, Methanol, Methanol/Wasser (50/50) und Wasser) durch die befüllte Kartusche befördert. Die so erfolgte Extraktion wurde jeweils bis zur Erschöpfung vorgenommen und die gewonnenen Extrakte wurden anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt. Dieses im Arbeitskreis entwickelte Extraktionsverfahren ist äußerst schonend, sowohl Temperaturbelastung als auch direkte Sauerstoff- und Lichteinwirkung auf die Droge werden so vermieden. Wesentlich ist aber, dass dadurch die Inhaltsstoffe in fünf nach Polarität geordneten Extrakten vorsortiert sind und so besser chromatographiert werden können.

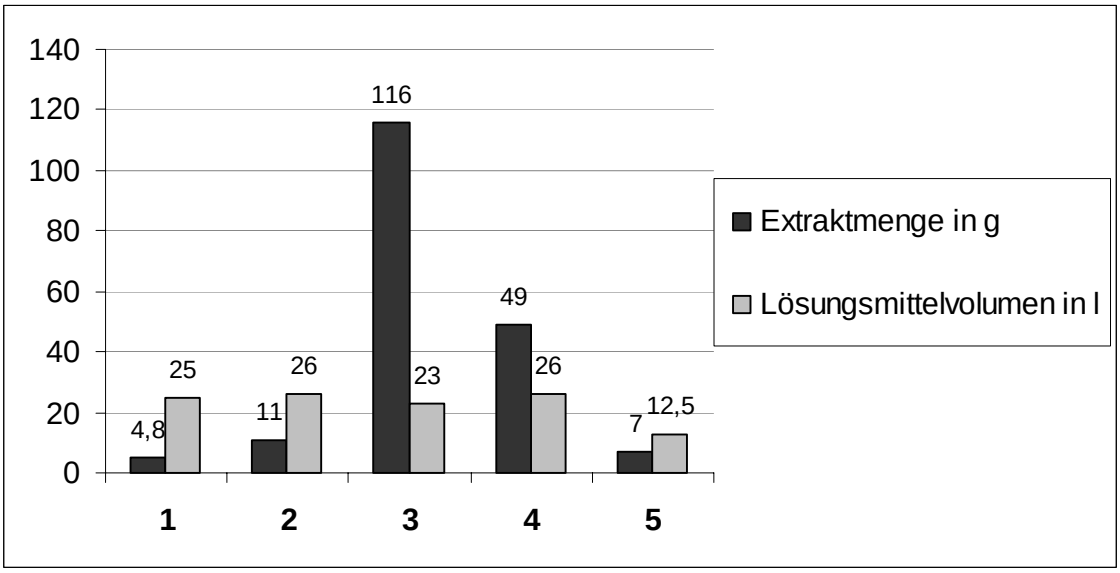


Abb. 6: Resultierende Mengen an selektiven Extrakten aus 1,7 kg Pygeum-Rinde und dazu verwendete Lösungsmittelvolumina. 1 = sel. Hexanextrakt, 2 = sel. CH_2Cl_2-Extrakt, 3 = sel. MeOH-Extrakt, 4 = sel. MeOH/H_2O-Extrakt, 5 = sel. H_2O-Extrakt.

Betrachtet man die Massenanteile der selektiven Extrakte an der Gesamtextraktmenge (Abb. 6), so wird deutlich, dass die Droge überwiegend Methanol-lösliche Bestandteile enthält. Die lipophilen Extrakte aus *n*-Hexan und Dichlormethan fallen weniger gewichtig aus. Im Allgemeinen befinden sich im Hexanextrakt Harze, Öle, Fette oder fettähnliche Substanzen, die langkettigen Alkohole und Fettsäuren aus Pygeum müssten also hier zu finden sein. Die in Pygeum vorkommenden Phytosterole und pentacyclischen Triterpene lassen sich im Dichlormethanextrakt vermuten. Stark polare Pflanzeninhaltsstoffe wie Aminosäuren, anorganische Salze oder Saccharide hingegen werden erst mit Methanol/Wasser oder Wasser extrahiert.

5.2. Ethanolischer Gesamtextrakt aus Pygeum

Neben den selektiven Extrakten wurde auch ein ethanolischer Gesamtextrakt aus der Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. hergestellt, um diesen bezüglich seiner antiandrogenen Wirkstärke direkt mit ethanolischen Extrakten aus Kürbis und Sabal vergleichen zu können (Kapitel 5.3. und Kapitel 5.4., Theoretischer Teil).
Hierzu wurden 300 g der gesiebten Droge in absolutem Ethanol mit einem Ultra-Turrax weiter zerkleinert und in mehreren Portionen mit insgesamt 5 l Ethanol extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt filtriert und schließlich unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt.

5.3. Extrakt aus Serenoa repens

Die amerikanische Sägepalme Serenoa repens gehört zur Familie der Arecaceae. Ihre purpurfarbenen bis schwarzen Früchte nennt man Sabalfrüchte und aus ihnen werden

die Präparate zur Behandlung der BPH hergestellt. Sie enthalten neben Phytosterolen und fetten Ölen auch Flavonoide und Carotinoide [100,101].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fluidextrakt (40%) der Firma Caelo unter Vakuum bis zur Trockne eingeengt und dem Luciferase-Assay zum Test auf antiandrogene Wirkung zugeführt (Kapitel 6, Theoretischer Teil).

5.4. Extrakt aus Cucurbita pepo

Der Arzneikürbis Cucurbita pepo zählt zur Familie der Cucurbitaceae und bildet meterlange Ranken. Die gerippten oder glattschaligen orangefarbenen Früchte enthalten zahlreiche Samen, die pharmazeutisch verwendet werden (Semen Cucurbitae). Zu den Inhaltstoffen gehören fettes Öl, Phytosterole, Tocopherol, Mineralstoffe und die bitteren Cucurbitacine [102,103].

Zur Herstellung des ethanolischen Gesamtextraktes wurden 15 g Kürbissamen gemahlen, in absolutem Ethanol mittels Ultra-Turrax zerkleinert und in mehreren Portionen mit 500 ml Ethanol extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde filtriert und anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt.

6. MMTV-Luc Reportergen-Assay zum Test auf antiandrogene Wirkung

Die potentiell antiandrogene Wirkung der in Kapitel 5 (Theoretischer Teil) gewonnenen Extrakte wurde anhand des Androgenrezeptor abhängigen MMTV-luc Reportergen-Assays, im Folgenden kurz mit Luciferase-Assay bezeichnet, untersucht.

Diese pharmakologischen in vitro-Untersuchungen wurden am Genetischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Aria Baniahmad durchgeführt.

6.1. Methode des Luciferase-Assays

Bei diesem Assay dient das Enzym Luciferase als Reportergen. Die Luciferase ist eine Oxidoreduktase aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer Photinus pyralis, die das Substrat Luciferin in Anwesenheit von Luftsauerstoff, ATP und Mg^{2+}-Ionen zu Oxyluciferin dehydriert, die dabei freiwerdende Energie wird als Licht emitiert (Abb.7).

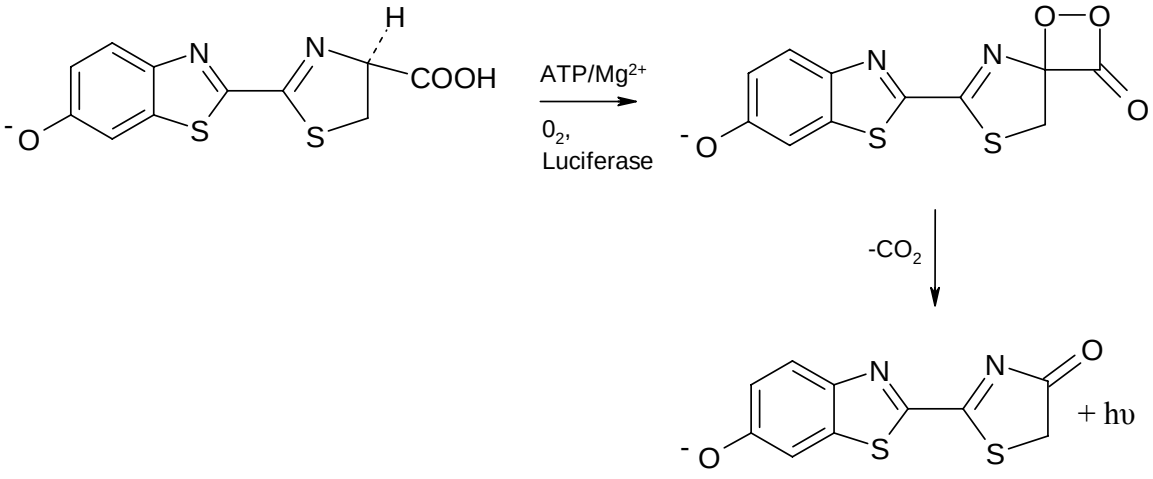
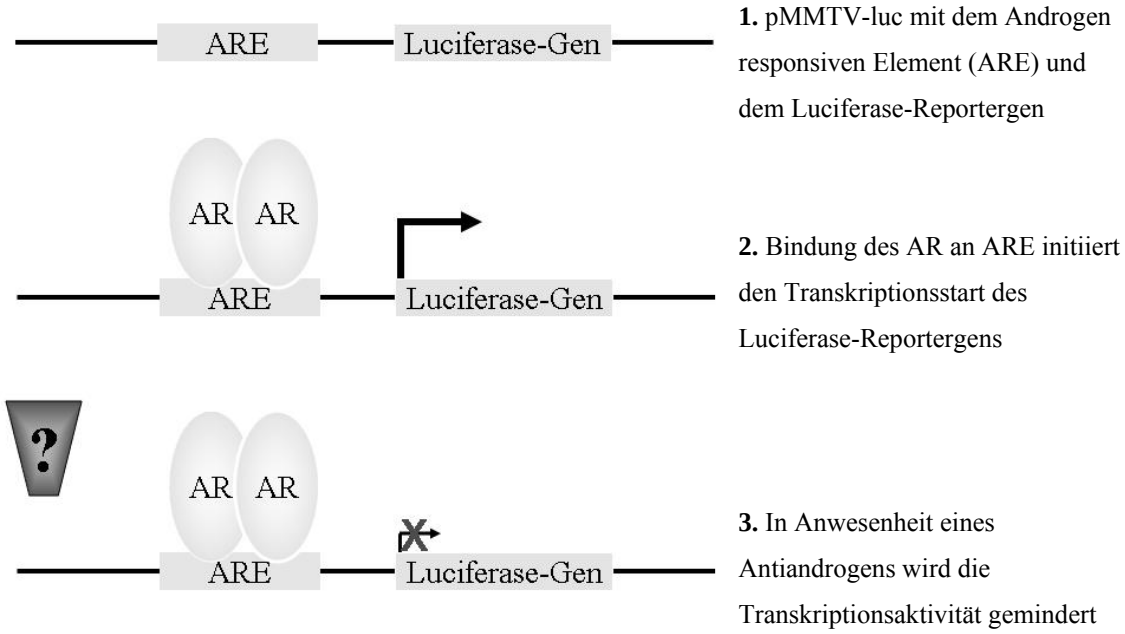


Abb. 7: Die dem Luciferase-Assay zu Grunde liegende Reaktion. Aus der Reaktion resultiert eine Chemilumineszenz [107].

Das Reportergen Luciferase befindet sich auf dem Plasmid pMMTV-luc (MMTV = **M**ouse **m**ammary **t**umor **v**irus), auf welchem außerdem das **A**ndrogen **r**esponsive **E**lement (ARE) lokalisiert ist. pMMTV-luc wird zusammen mit dem AR Expressionsvektor in Fibroblasten der Affenniere transfiziert. Wird nun ein Androgen hinzugegeben, bindet dieses im Komplex mit dem AR an das Androgen responsive Element. Dieser Vorgang initiiert nun die Transkription des nachfolgenden Gens, nämlich die des Luciferase-Reportergens. Die Menge an exprimierter Luciferase ist direkt proportional zur bei Hinzugabe von Luciferin freiwerdenden Lichtmenge, die über die Messung der Emission bei $\lambda = 562$ nm quantifiziert werden kann. Ist nun neben dem Androgen auch eine antiandrogene Substanz oder ein antiandrogener Extrakt präsent, ist die Transaktivierung des Luciferase-Reportergens durch das Androgen responsive Element gehemmt, es wird nachfolgend bei Substratzugabe entsprechend weniger Lichtenergie frei (Abb. 8). Da die Abnahme an Lichtmenge direkt proportional zur Hemmwirkung des Antiandrogens ist, eignet sich dieser Assay hervorragend für die Suche nach neuen antiandrogenen Leitstrukturen [104-107].



1. pMMTV-luc mit dem Androgen responsiven Element (ARE) und dem Luciferase-Reportergen

2. Bindung des AR an ARE initiiert den Transkriptionsstart des Luciferase-Reportergens

3. In Anwesenheit eines Antiandrogens wird die Transkriptionsaktivität gemindert

Abb. 8: Schematische Darstellung des Plasmids pMMTV-luc.

6.2. Ergebnisse des Luciferase-Assays der Extrakte

Die Extrakte aus Kapitel 5 (Theoretischer Teil) wurden nun mit dem Luciferase-Assay in zwei Konzentrationen (300 µg/ml und 600 µg/ml) auf ihre antiandrogene Bioaktivität untersucht. Die antiandrogene Wirkung wurde zur Auswertung als prozentuale Inhibition gegenüber einer Kontrolle berechnet, der nur reines Lösungsmittel zugesetzt wurde (Abb. 9). Der wirksamste Extrakt sollte dann einer weiteren wirkungsorientierten Fraktionierung unterzogen werden.

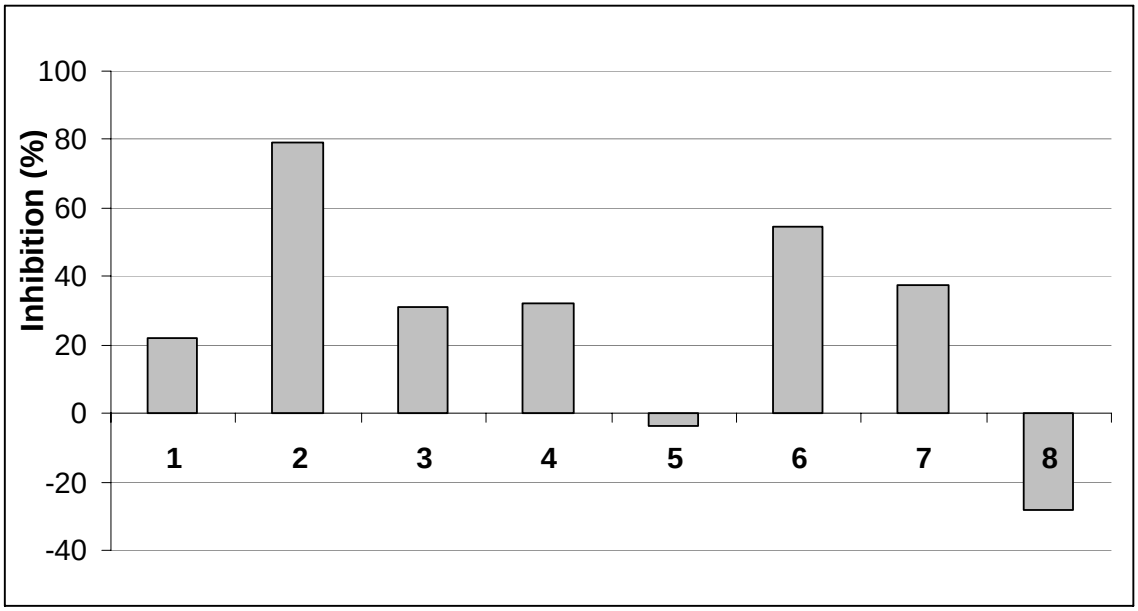


Abb. 9: Ergebnisse des Luciferase-Assays der hergestellten Extrakte bei 600 µg/ml dargestellt als Inhibition der Androgenrezeptor vermittelten Transaktivierung des Luciferase-Reportergens in Prozent. 1 = sel. Hexanextrakt aus Pygeum, 2 = sel. CH_2Cl_2-Extrakt aus Pygeum, 3 = sel. MeOH-Extrakt aus Pygeum, 4 = sel. MeOH/H_2O-Extrakt aus Pygeum, 5 = sel. H_2O-Extrakt aus Pygeum, 6 = EtOH-Extrakt aus Pygeum, 7 = Caelo-Extrakt aus Serenoa repens, 8 = EtOH-Extrakt aus Cucurbita pepo.

Abbildung 9 zeigt, dass der selektive Hexanextrakt aus Pygeum eine schwache antiandrogene Wirkung aufweist, die vermutlich auf den hohen Gehalt an freien und veresterten Fettsäuren und langkettigen Alkoholen zurückzuführen ist [75].

Der selektive Dichlormethanextrakt aus Pygeum offenbarte im Assay den größten antiandrogenen Effekt, dieser Extrakt wurde daher für die weitere wirkungsorientierte Fraktionierung ausgewählt (Kapitel 7, Theoretischer Teil).

Mit zunehmender Hydrophilie der selektiven Pygeum-Extrakte nimmt die antiandrogene Wirkung deutlich ab.

Der ethanolische Gesamtextrakt aus Pygeum zeigte wiederum einen starken Effekt. Das deutet darauf hin, dass mit Ethanol die gleichen antiandrogenen Substanzen extrahiert wurden wie im selektiven Dichlormethanextrakt. Dieser ist noch wirksamer, da hier die Anreicherung der Wirksubstanzen gelang.

Der Extrakt aus den Früchten der Sägepalme zeigte im Assay eine moderate Inhibierung der Androgenwirkung. Dieses Ergebnis könnte als Ausgangspunkt für weitere Studien dienen, in denen man die Wirksubstanzen aus Serenoa repens auffindet.

Der Extrakt aus Kürbissamen erwies sich im Test erstaunlicherweise als schwach androgen. Zur Behandlung von BPH-bedingten Miktionsbeschwerden dienen allerdings deutlich lipophilere Extrakte. Meist werden die ausgepressten Öle der Samen verwendet, so dass sich ein anderes Spektrum an Inhaltsstoffen für die Handelspräparate (z.B. Cysto-Urgenin®) ergibt [98].

7. Wirkungsorientierte Fraktionierung des selektiven Dichlormethanextraktes aus Pygeum

Bei der Suche nach der aktiven Verbindung aus einem komplexen Gemisch zahlreicher Substanzen hat sich die Methode der wirkungsorientierten Fraktionierung bewährt. Hierzu wird zunächst das komplexe Gemisch, in diesem Fall der pflanzliche Extrakt, auf seine biologische Wirkung hin getestet. Beim Auftreten eines deutlichen Effektes wird die Probe chromatographisch aufgetrennt und alle Fraktionen erneut auf Wirksamkeit getestet. In der Regel ist die Wirkung nicht über alle Fraktionen verteilt, sondern findet sich in wenigen klar definierten wieder, da hier eine Anreicherung der aktiven Substanzen stattgefunden hat. Die aktiven Fraktionen werden dann ausgewählt und mit einem anderen Trennverfahren weiter fraktioniert. Dieses Vorgehen wird mit immer spezifischeren Trennmethoden so oft wiederholt, bis man schließlich die aktiven Substanzen isoliert hat. Die Kombination von unterschiedlichen Trennverfahren (selektive Extraktion, Ausschütteln, Normalphasen- und Umkehrphasen-chromatographie usw.) reduziert die Anzahl an Fraktionierungsschritten und damit den zeitlichen Aufwand. Die isolierten Substanzen werden dann mit verschiedenen analytischen Methoden identifiziert und quantifiziert und schließlich als Einzelsubstanz und in Mischungen aller aktiven Verbindungen auf ihre Wirksamkeit getestet. Besteht Übereinstimmung zwischen einer Referenzsubstanz und der aus dem Extrakt isolierten Verbindung, so gelten die identifizierten Substanzen als bestätigt [108].

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenso verfahren. Zunächst wurde der Extrakt mit der höchsten Wirksamkeit ausgewählt. Dieses war der selektive Dichlormethanextrakt aus Pygeum, der aufgrund der Vorgehensweise der selektiven Extraktion schon

vorfraktioniert ist. Die weitere Fraktionierung des Extraktes erfolgte mit Gradientenextrographie, einer Chromatographie auf Normalphase.

7.1. Gradientenextrographie des selektiven Dichlormethanextraktes

Das Verfahren der Extrographie wurde in den 70er Jahren von Halász für die Fraktionierung von Erdöldestillationsrückständen entwickelt [109,110]. Es dient der Auftrennung von komplexen Gemischen, deren Inhaltsstoffe einen breiten Polaritätsbereich umfassen. Das komplexe Gemisch wird mit einem groben Stufengradienten in eine überschaubare Anzahl an Fraktionen mit jeweils engerem Polaritätsbereich getrennt. Dies hat eine Anreicherung von Substanzen bestimmter Polarität in der jeweiligen Fraktion zur Folge. Dieses Verfahren wurde in zwei Jahrzehnten im Arbeitskreis für die Auftrennung von pflanzlichen Extrakten modifiziert, wobei insbesondere die Probenzone auf wenige Zentimeter verkürzt wurde. Auf diese Weise können in relativ kurzer Zeit große Mengen an Extrakt fraktioniert werden.

7.1.1. Analytische Entwicklung einer geeigneten extrographischen Methode

Für die extrographische Auftrennung des selektiven Dichlormethanextraktes aus Pygeum sollte zunächst ein geeigneter Lösungsmittelgradient im analytischen Maßstab entwickelt werden. Der Lösungsmittel-, Sorbentien- und Extraktverbrauch kann dabei gering gehalten werden und durch mehrere Vorversuche können die Parameter für ein späteres Upscaling der Methode festgelegt werden.

Bei der Extrographie wird zunächst der Extrakt in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und auf die etwa fünffache Menge an grobem Kieselgel aufgezogen. Hierzu vereinigt man das Kieselgel mit der klaren Extraktlösung, behandelt diesen Ansatz mit Ultraschall und entfernt anschließend am Rotatiosverdampfer unter langsamem Drehen des Kolbens das Lösungsmittel bis ein trockenes, rieselfähiges Material zurückbleibt. Dieser Vorgang bewirkt eine Vorsortierung der Probenmoleküle auf dem Kieselgel. Die äußerst polaren Silanolgruppen des Kieselgels adsorbieren an ihrer Oberfläche zunächst die Probenmoleküle höchster Polarität. Diese neue Oberfläche aus polaren Verbindungen adsorbiert wiederum etwas weniger polare Substanzen aus dem Extrakt. Es entstehen so mehrere Schichten aus Probenmolekülen abnehmender Polarität in den Kieselgelporen. An der neuen Porenoberfläche befinden sich also die apolarsten Substanzen. Daraus ergibt sich auch zwingend, dass der gelöste Extrakt in einer einzigen Portion vollständig auf das Kieselgel gegeben werden muß und nicht portionsweise, da dann bei jeder Portion nach Abzug des Lösungsmittels wieder alle Polaritäten der Substanzen neu aufgezogen würden. Das Kieselgel mit dem aufgezogenen Extrakt wird in die Trennsäule vor das chromatographische Bett aus feinem Kieselgel (Macherey – Nagel Si60, 15-25 μm) gepackt. Beginnt man dann den Lösungsmittelgradienten mit einem lipophilen Eluenten, werden zunächst nur die lipophilen Substanzen an der Oberfläche gelöst und dem chromatographischen Trennbett zugeführt. Im Verlauf des Gradienten steigert man die Polarität des Eluenten, so dass nun auch immer stärker polare Substanzen der Chromatographie zur Verfügung gestellt werden. Die Vorsortierung der Probenmoleküle auf dem Kieselgel ermöglicht somit eine Fraktionierung großer Substanzmengen. Einer Überladung des Trennbettes

wird vorgebeugt, da die Probenmoleküle nicht auf einmal, sondern nach und nach geordnet in Gruppen unterschiedlicher Polarität ins Trennbett gelangen.

Der für den selektiven Dichlormethanextrakt am besten geeignete Lösungsmittelgradient wurde anhand einer Reihe an Vorversuchen mit verschiedenen Gradienten ermittelt. Als lipophilste Lösungsmittelkomponente wurde wie bei der selektiven Extraktion *n*-Hexan gewählt. Im weiteren Verlauf des Gradienten sollte langsam und gleichmäßig Dichlormethan hinzugemischt werden, da eine Auftrennung des Extraktes, der ja auch mit diesem Lösungsmittel hergestellt wurde, damit am besten erfolgen müsste. Anschließend erfolgt das Beimischen von Methanol und schließlich das von Wasser in relativ kurzer Zeit, da derart polare Verbindungen im Dichlormethanextrakt kaum zu vermuten sind. Zu allen Eluenten wurde 0,1% Trifluoressigsäure hinzugesetzt, um saure Verbindungen an ihrer Dissoziation zu hindern (Abb. 10).

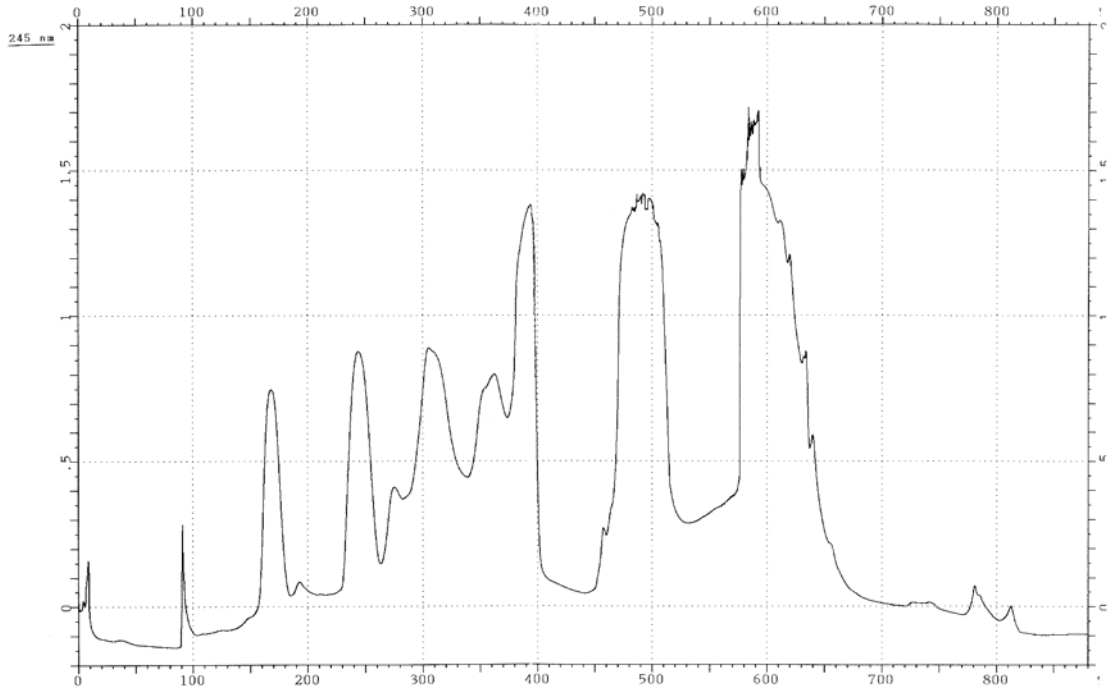


Abb. 10: Chromatogramm der optimierten analytischen Extrographie des selektiven Dichlormethanextraktes aus Pygeum, Methode ***A1****, λ = 245 nm.*

7.1.2. Präparative Durchführung der Gradientenextrographie

Die Extrographie wurde im präparativen Maßstab zweimal mit dem selektiven Dichlormethanextrakt aus Pygeum durchgeführt (Extrographie 1 = **E1** und Extrographie 2 = **E2**). Das Upscaling in den Großmaßstab erforderte die Anpassung der Säulendimension und der Flussrate des Elutionsmittels. Als Säule diente eine mit Kieselgel befüllte Edelstahlkartusche (Merck Prepbar® 40 x 10 cm), deren Füllung mit Hilfe eines Presswerkzeuges und eines variablen Säulenkopfes verdichtet wurde. Die Probenzone bestehend aus dem aufgezogenen Extrakt befand sich unten im Chromatographierohr. Die Eluenten wurden mit einer Flussrate von 120 ml/min mit einer HPLC-Pumpe von unten nach oben gepumpt, um Lufteinschlüsse zu vermeiden (Abb. 11) (Methode **B1**, Experimenteller Teil).

Fraktion	Zeit(Min)	Masse(mg)	Fraktion	Zeit(Min)	Masse(mg)
F01	0-148	3	F19	615-630	799
F02	149-184	52	F20	631-638	292
F03	185-204	33	F21	639-659	1338
F04	205-229	63	F22	660-663	20
F05	230-238	14	F23	664-671	327
F06	239-261	61	F24	672-692	634
F07	262-266	30	F25	693-703	157
F08	267-293	243	F26	704-724	333
F09	294-331	380	F27	725-749	350
F10	332-338	17	F28	750-771	393
F11	339-356	164	F29	772-784	316
F12	357-369	119	F30	785-803	141
F13	370-373	38	F31	804-820	57
F14	374-375	71	F32	821-828	58
F15	376-562	110	F33	829-836	1
F16	563-581	44	F34	837-858	126
F17	582-592	24	F35	859-880	1
F18	593-614	1537			

*Abb. 11: Fraktionierungsschema der präparativen Extrographie **E1**, Methode **B1**.*

7.2. HPLC-Analytik des selektiven Dichlormethanextraktes und der Extrographie-fraktionen

Die bei der präparativen Gradientenextrographie erhaltenen 35 Fraktionen (Kapitel 7.1.2., Theoretischer Teil) wurden HPLC-analytisch auf ihre Zusammensetzung untersucht und untereinander und mit dem unfraktionierten selektiven Dichlormethanextrakt verglichen (Abb. 12). Dabei wurden alle Fraktionen in gleichen Mengen chromatographiert, so dass ein direkter Konzentrationsvergleich jeweils gleicher Verbindungen in den einzelnen Fraktionen anhand der UV-Absorption und damit der Flächen im Chromatogramm vorgenommen werden konnte.

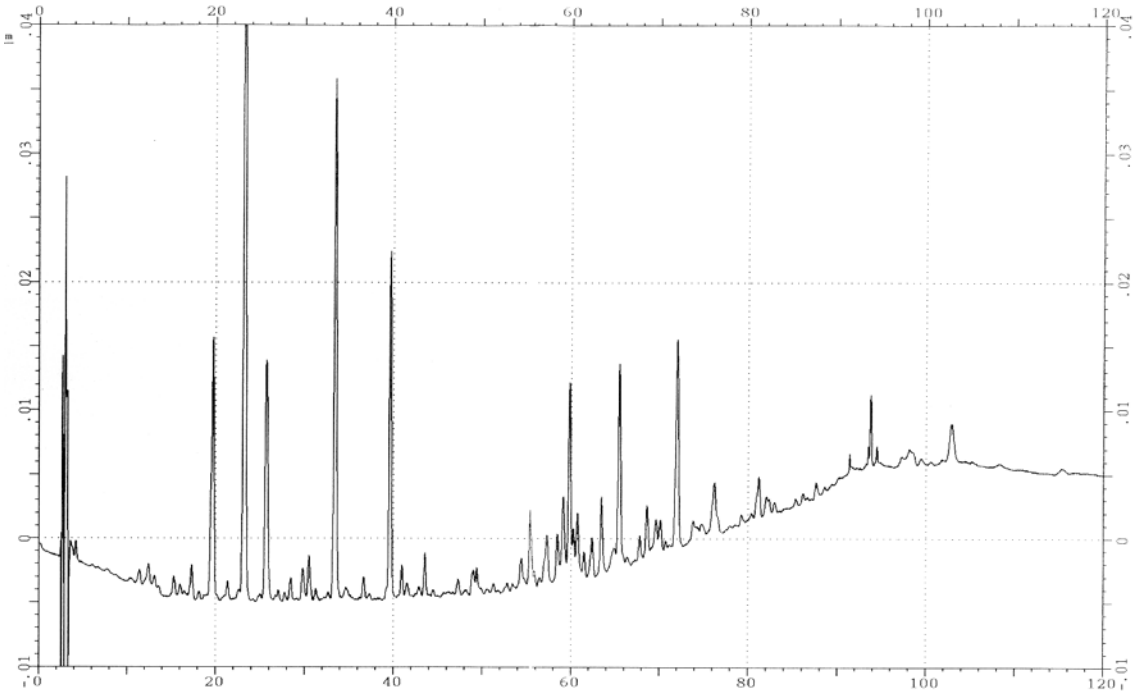


Abb. 12: Übersichtschromatogramm des selektiven Dichlormethanextraktes aus Pygeum, aufgenommen mit Methode ***A2****, λ = 254 nm.*

Vergleicht man die Chromatogramme der Extrographiefraktionen mit dem Übersichtschromatogramm, erkennt man deutlich die mit der Extrographie geglückte stoffliche Abtrennung der Inhaltsstoffe voneinander. Einige Substanzen reicherten sich in den entsprechenden Fraktionen stark an. Aus Fraktion F12 kristallisierte beim Abrotieren des Lösungsmittels Benzoesäure (1) aus, die anhand ihres ^{1}H-NMR-Spektrums identifiziert werden konnte (Kapitel 8.3.1., Theoretischer Teil).

7.3. Ergebnisse des Luciferase-Assays der Extrographiefraktionen

Die 35 Fraktionen aus Kapitel 7.1.2. wurden dem Luciferase-Assay zum Test auf antiandrogene Wirkung zugeführt. Alle Fraktionen wurden in den Konzentrationen 30 µg/ml und 60 µg/ml getestet. Von den 35 Fraktionen erwiesen sich drei als äußerst wirksam, nämlich die benachbarten Fraktionen F06, F07 und F08 (Abb. 13).

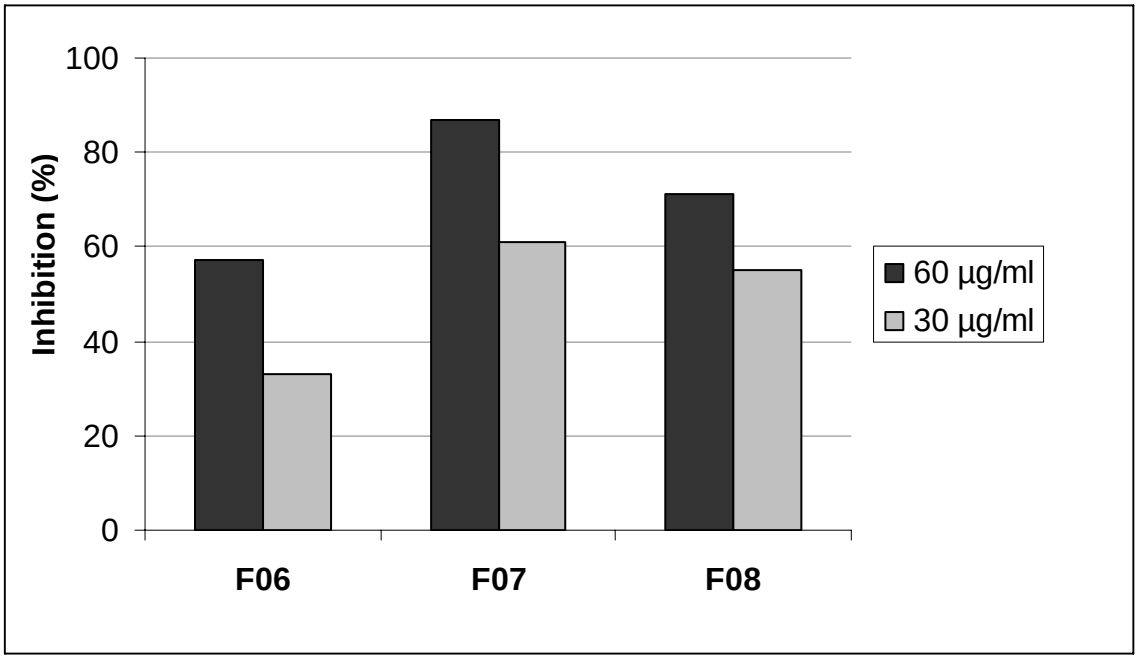


Abb. 13: Ergebnisse des Luciferase-Assays der Extrographiefraktionen F06, F07 und F08 dargestellt als Inhibition der Androgen induzierten Luciferase-Aktivität in Prozent.

7.3.1. HPLC-Analytik der wirksamen Extrographiefraktionen F06, F07 und F08

Beim Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Fraktionen F06, F07 und F08 wird deutlich, dass alle drei Fraktionen ein sehr ähnliches Profil an Inhaltsstoffen aufweisen. Die Anzahl an Peaks hat sich im Vergleich zum unfraktionierten selektiven Dichlormethanextrakt deutlich reduziert. Besonders der Doppelpeak bei einer Retentionszeit von 39 Minuten (in Abb. 14a/b/c bezeichnet mit P9/P10, Isolierung und Strukturaufklärung siehe Kapitel 8.2. und Kapitel 8.3., Theoretischer Teil) fällt auf, da er in allen anderen 32 Fraktionen nicht gefunden wird. Diese Tatsache erweckt die Vermutung, dass es sich bei einer der beiden oder sogar beiden Substanzen, die sich unter dem Doppelpeak verbergen, um die wirksamen Komponenten aus Pygeum handeln könnte.

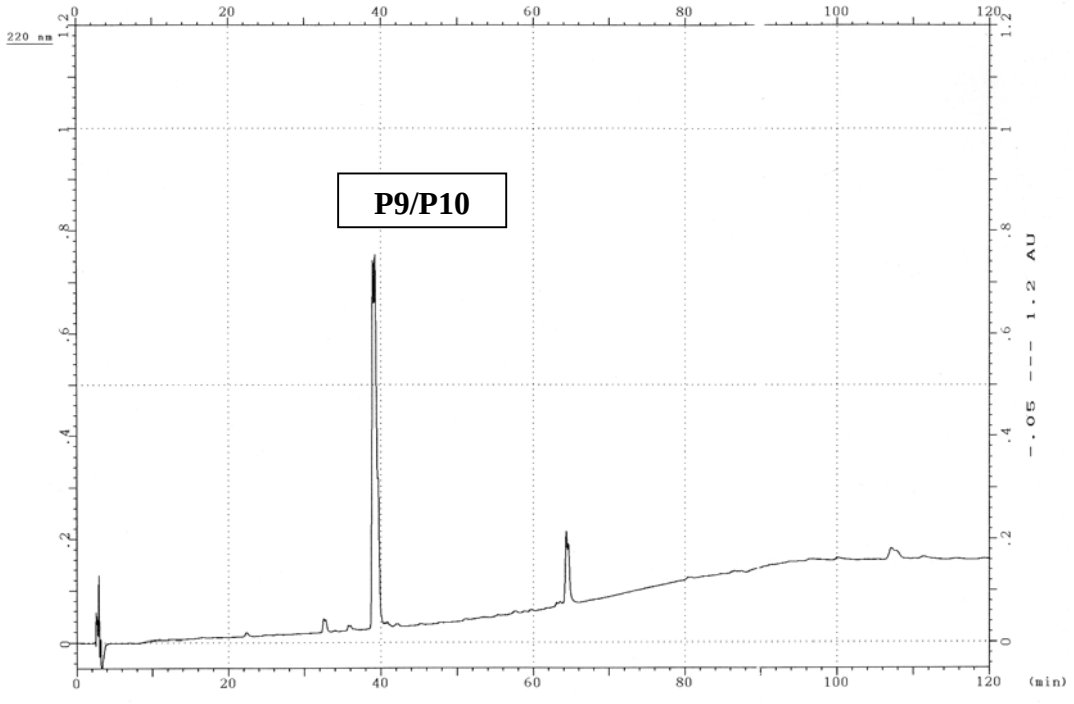


*Abb. 14a: RP18-HPLC-Chromatogramm der Extrographiefraktion F06, aufgenommen mit Methode **A2** bei einer Messwellenlänge von λ = 220 nm.*

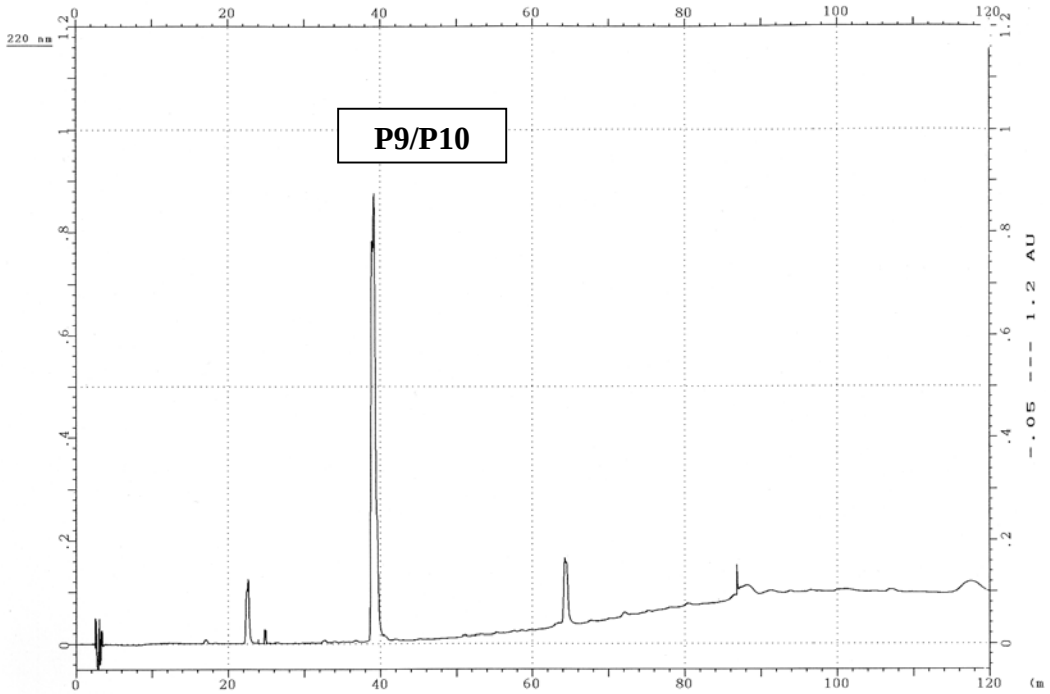


*Abb. 14b: Chromatogramm der Extrographiefraktion F07, Methode **A2**, λ = 220 nm.*

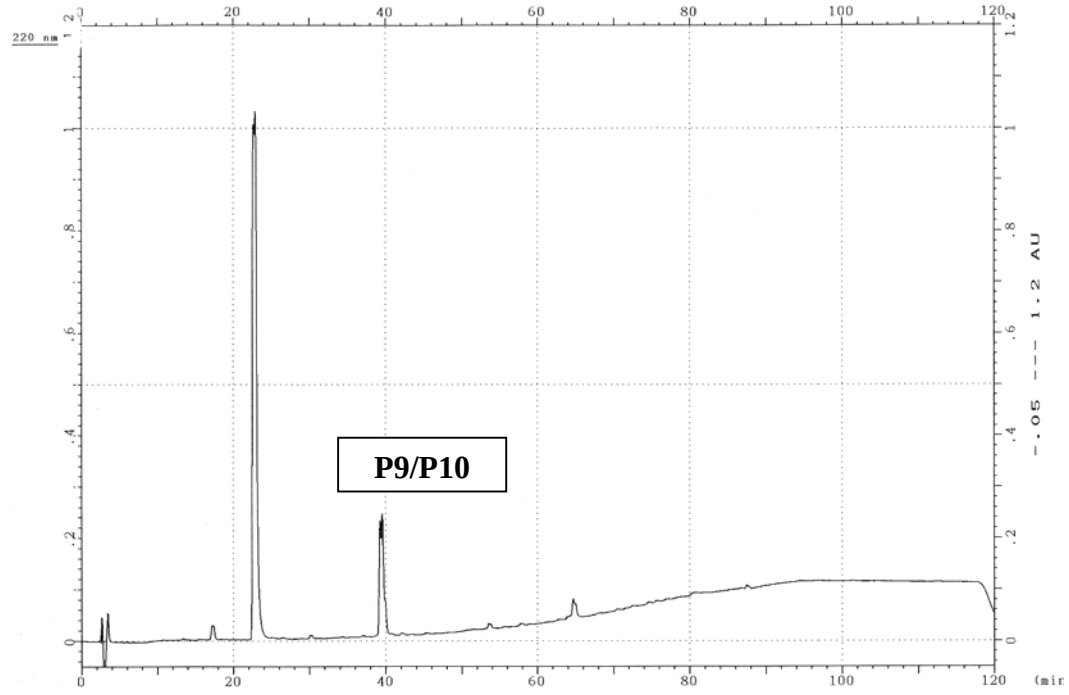


*Abb. 14c: Chromatogramm der Extrographiefraktion F08, Methode **A2**, λ = 220nm.*

8. Isolierung von Wirkstoffen aus den wirksamen Fraktionen

Zur weiteren Vorgehensweise der wirkungsorientierten Fraktionierung stand nun die letzte Trennstufe an, nämlich die Isolierung der Wirkstoffe aus den antiandrogen wirksamen Extrographiefraktionen.

8.1. Präparative HPLC-Trennung der wirksamen Fraktion F08

Von den drei wirksamen Extrographiefraktionen F06, F07 und F08 wurde nun für die weitere präparative Auftrennung die in ausreichender Menge vorhandene Fraktion F08 ausgewählt. Die analytische Trennmethode **A2** wurde gekürzt und durch Anpassung der Säulendimension und der Flussrate in den präparativen Maßstab überführt (Abb. 15). Nach mehreren Trennungen konnten die Substanzen P3, P5, P7, P9 und P10 in für den Assay ausreichender Menge erhalten werden.

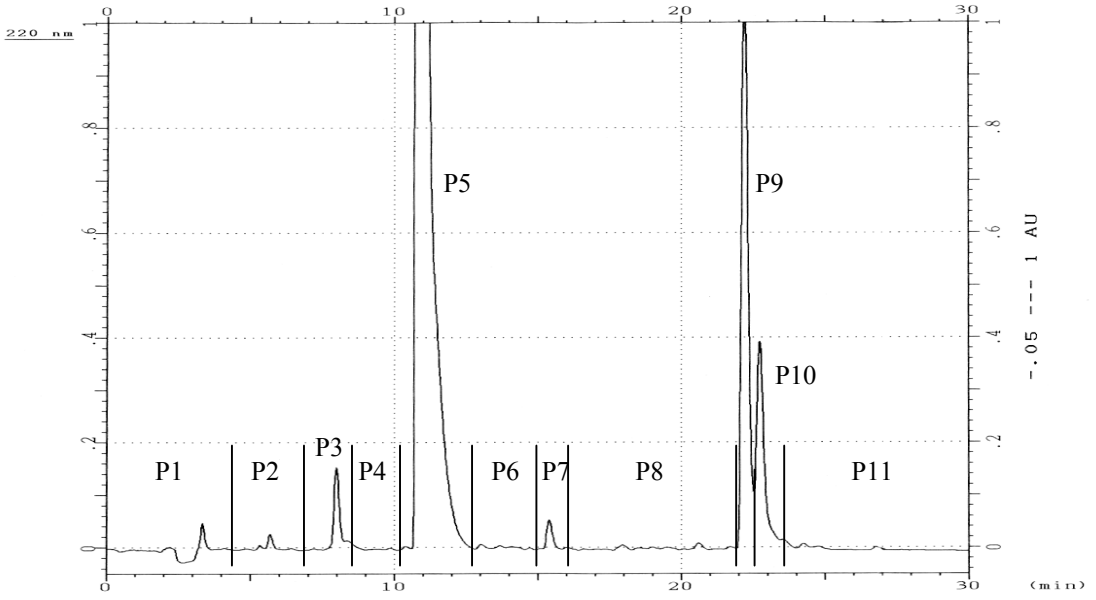


*Abb. 15: Chromatogramm der präparativen Trennung von F08 mit eingezeichnetem Fraktionierungsschema, Methode **B3**, λ = 220 nm.*

8.2. Ergebnisse des Luciferase-Assays der isolierten Substanzen

Die isolierten Substanzen P3, P5, P7, P9 und P10 wurden mittels Luciferase-Assay auf ihre antiandrogene Wirkung getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

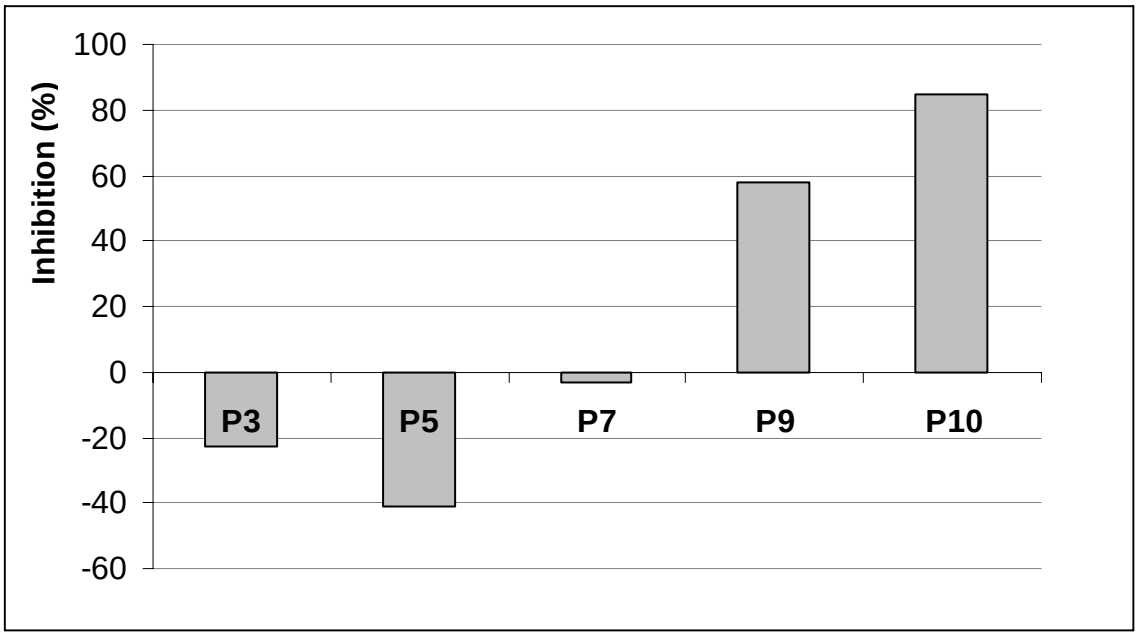


Abb. 16: Ergebnisse des Luciferase-Assays der isolierten Substanzen P3, P5, P7, P9 und P10 dargestellt als Inhibition der Androgen induzierten Luciferase-Aktivität in Prozent. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 30 µg/ml getestet.

Aus Abbildung 16 geht deutlich hervor, dass es sich bei den Substanzen P9 und P10 um die antiandrogen wirksamen Verbindungen aus Pygeum handelt. Verbindung P5 zeigte im Assay eine moderate androgene Wirkung, P3 erwies sich als schwach androgen und P7 ließ keinen signifikanten Effekt erkennen.

Vor der präparativen Trennung von F08 wurde die Fraktion in dem Lösungsmittelgemisch der chromatographischen Anfangsbedingungen gelöst (20% Acetonitril, 80% Wasser). Es blieb ein Rückstand, der abfiltriert und durch Lösen in

Ethanol/DMSO auch getestet werden konnte. Der Rückstand zeigte im Luciferase-Assay keinen Effekt.

8.3. Strukturaufklärung der isolierten Wirkstoffe

Die Substanzen P5 und P10 konnten bei dieser Trennung in für eine Strukturaufklärung ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden. Von Substanz P9 wurde allerdings nur sehr wenig gewonnen und zudem konnte man im ^{1}H-NMR-Spektrum erkennen, dass die Substanz verunreinigt sein musste. Aus diesem Grund wurden erneut selektive Extrakte aus Pygeum hergestellt, eine zweite Extrographie (**E2**) wurde durchgeführt und schließlich gelang die erneute Isolierung von P9 aus den Fraktionen G08, G09 und G10, die in ihrer Zusammensetzung den Fraktionen F06, F07 und F08 der Extrographie 1 (**E1**) entsprechen, in ausreichender Menge und Reinheit.

8.3.1. Benzoesäure (1)

Substanz P5 konnte anhand des ^{1}H-NMR-Spektrums, des Schmelzpunktes und des Massenspektrums eindeutig als Benzoesäure (1) identifiziert werden. Diese Substanz wurde bereits in Fraktion F12 gefunden, aus der sie beim Abrotieren des Lösungsmittels sublimierte und am oberen kühleren Kolbenrand in typischer Kristallform resublimierte (Kapitel 7.2., Theoretischer Teil).

Benzoesäure (1) ist ein im Pflanzenreich weit verbreiteter Naturstoff, der unter anderem bereits aus der Rinde von Homalium cochinchinensis und Uvaria mocoli isoliert wurde [111,112]. Benzoesäure (1) liegt in der Pflanze frei oder als Glykosid vor und dient als Intermediat in der Biosynthese von zahlreichen Naturstoffen wie beispielsweise

Salicylsäure [113]. Pflanzen synthetisieren Benzoesäure (1) aus Phenylalanin über die Zwischenstufe Zimtsäure. Die Biosynthese von aktivierter Benzoesäure ist in Abbildung 17 wiedergegeben [114].

Es ist allgemein bekannt, dass Benzoesäure (1) antimikrobielle Eigenschaften aufweist und in Konzentrationen von 0,05% bis 0,1% als Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird [115].

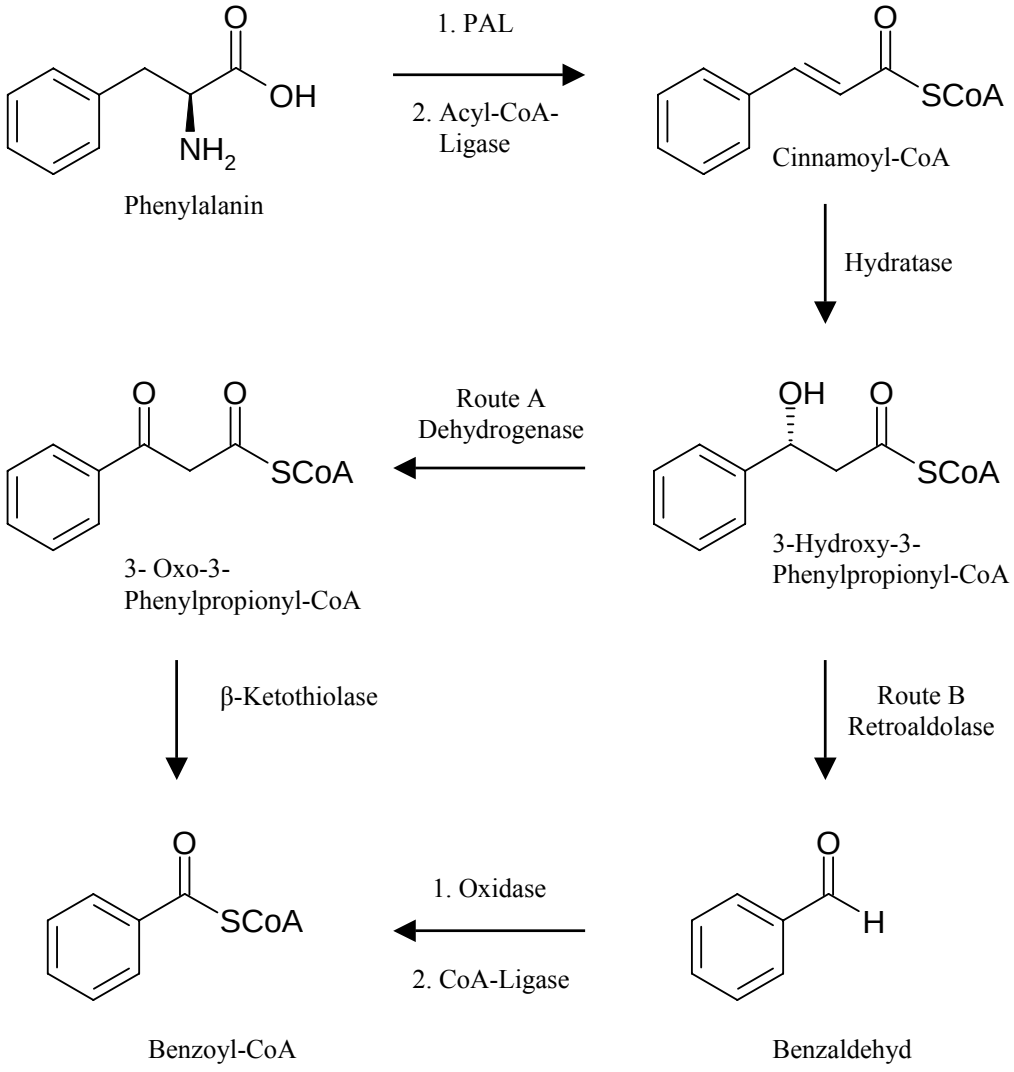


Abb. 17: Zwei mögliche Biosynthesewege zur Darstellung von Benzoyl-CoA über Cinnamoyl-CoA. PAL = Phenylalanin-Ammonium-Lyase [114].

8.3.2. Atrarsäure (2)

Zur Strukturaufklärung der Substanz P9 dienten die Aufnahmen von ^{1}H-NMR-, ^{13}C-NMR-, UV-, IR- und EI-MS-Spektren. P9 konnte als Methyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat mit dem Trivialnamen Atrarsäure (2) identifiziert werden (Abb. 18).

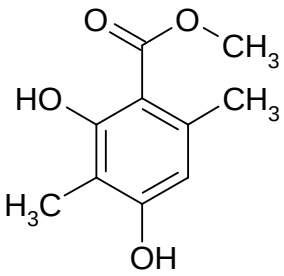


Abb. 18: Strukturformel von (2), eine der beiden isolierten Wirksubstanzen aus Prunus africana (Hook. f.) Kalkm., 2 wird auch als Methyl-β-Orcinolcarboxylat bezeichnet.

Atrarsäure (2) wurde als farblose Nadeln aus Fraktion F08 isoliert (Kapitel 8.1., Theoretischer Teil). Die Substanz hat einen charakteristischen holzigen Geruch. Das IR-Spektrum einer Lösung von 2 in Chloroform zeigt neben den Absorptionsbanden für die Methoxycarbonyl-Gruppe zwei Banden für die beiden Hydroxyl-Gruppen. Die OH-Valenzschwingung bei ν_{max} = 3040 cm^{-1} deutet auf das Vorliegen einer intramolekularen Wasserstoffbrücke hin, die das Molekül zwischen der Hydroxyl-Gruppe an Position C-2 und der Carbonyl-Gruppe ausbildet. Bei Verdünnung der Lösung bleibt die Bande in gleicher Lage bestehen. Die Absorptionsbande der OH-Valenzschwingung bei ν_{max} = 3400 cm^{-1} verschiebt sich bei Verdünnung der Probe allerdings zu größeren Wellenzahlen, was ein Hinweis für das Vorliegen einer intermolekularen Wasserstoffbrücke ist. Die Verdünnung bewirkt ein Aufbrechen der intermolekularen Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxyl-Gruppe an C-4 und der Carbonyl-Gruppe eines zweiten Moleküls, wodurch sich die Bindungsstärke der OH-

Gruppe erhöht und somit ein höherer Energiebetrag zur Anregung der Valenzschwingung nötig ist [116,117].

Die intramolekulare Wasserstoffbrücke lässt sich auch im ^{1}H-NMR-Spektrum erkennen. Das Signal des Protons der an der intramolekularen Wasserstoffbrücke beteiligten Hydroxyl-Gruppe an C-2 ist ungewöhnlich scharf und stark ins tiefe Feld verschoben (δ = 11,98 ppm). Bei einem HD-Tausch wird dieses Proton nicht in dem Maße gegen Deuterium ausgetauscht wie das Proton der anderen Hydroxyl-Gruppe an C-4. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die intramolekulare Wasserstoffbrücke deutlich stärker sein muss als die intermolekulare. Abbildung 19 zeigt die Aufnahme der Kristallstruktur der Atrarsäure [116].

Das ^{1}H-NMR-Spektrum der Atrarsäure weist sechs Singuletts auf. Die Signale der Methyl-Gruppen befinden sich bei Verschiebungen von δ = 2,03 ppm und δ = 2,39 ppm. Ein Singulett mit der Signalintensität von drei Protonen bei der Verschiebung von δ = 3,85 ppm deutet auf eine Methoxycarbonyl-Gruppe hin, was die Signale im ^{13}C-NMR-Spektrum bei δ = 51,8 ppm und δ = 172,6 ppm bestätigen. Das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigt eine extrem hochfeldige Verschiebung des Signals für die Methyl-Gruppe an C-3 bei δ = 7,6 ppm, was sich mit den stark elektronenziehenden Effekten der beiden Hydroxyl-Gruppen an den Nachbar-C-Atomen erklären lässt. Diese Position der Methyl-Gruppe ließ sich mit einem HMBC-Experiment (HMBC = **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation) bestätigen, welches im Spektrum ein Kreuzsignal für die ^{3}J(C,H)-Kopplung zwischen den Methyl-Protonen an C-3 mit C-2 und C-4 aufweist.

Die Zuordnung aller Protonen zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen wurde durch die Aufnahme eines HMQC-Spektrums (HMQC = **H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence) realisiert.

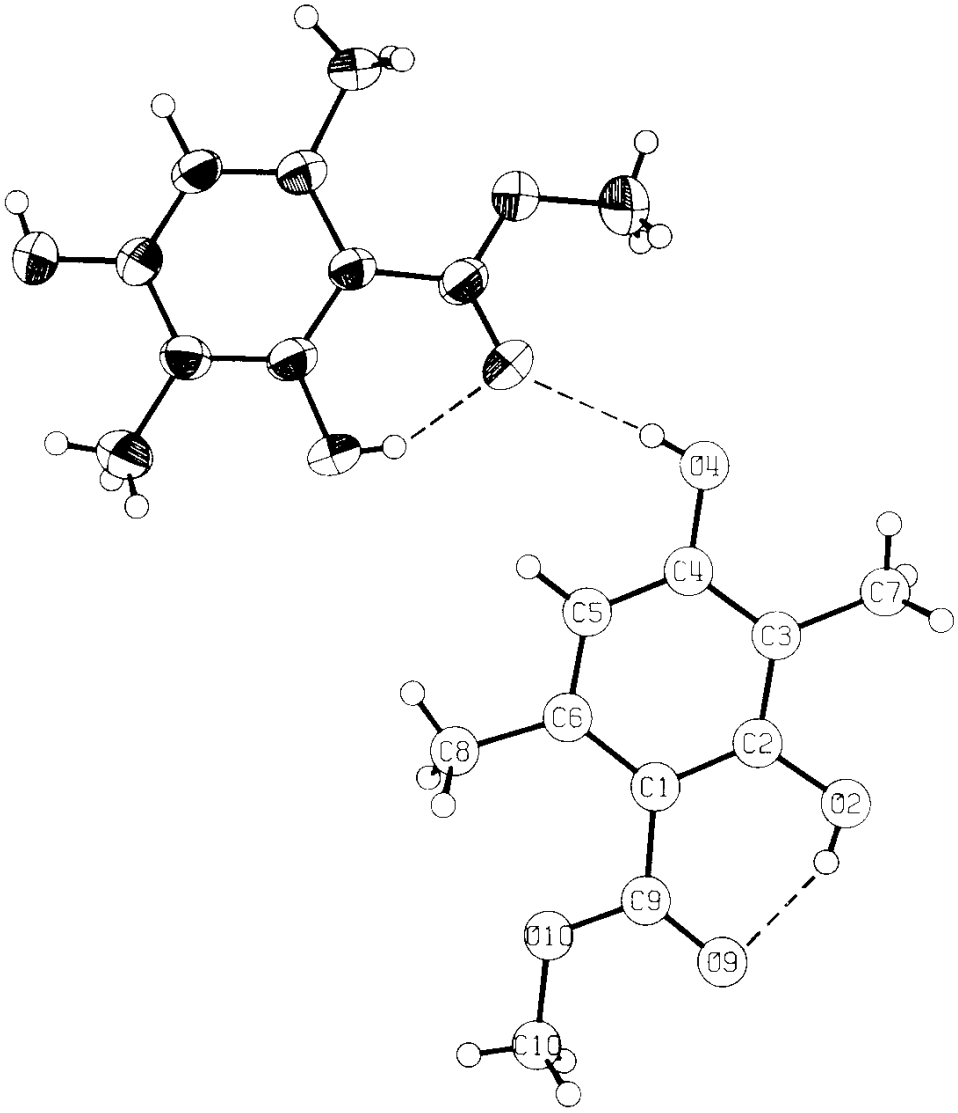


Abb. 19: Kristallstruktur von Atrarsäure (2), die als wasserstoffverbrücktes Dimer vorliegt [116].

Das EI-Massenspektrum von 2 ergibt einen Molekülionenpeak bei *m/z* 196. Die Summenformel $C_{10}H_{12}O_4$ konnte durch die Massenfeinbestimmung bestätigt werden. Das Spektrum zeigt außerdem die beiden charakteristischen Fragmentionenpeaks der Atrarsäure (2). Das Fragmention bei *m/z* 164 entsteht durch die Abspaltung von Methanol, bei der die Methoxy-Gruppe der Methoxycarbonyl-Gruppe mit dem Proton

der Hydroxyl-Gruppe an C-2 Methanol bildet und als dieses abgespalten wird. Dies ist charakteristisch für eine Methylsalicylat-Partialstruktur. Eine weitere Fragmentierung bewirkt die Abspaltung von Kohlenmonoxid, es entsteht der zweite Fragmentionenpeak bei *m/z* 136 (Abb. 20).

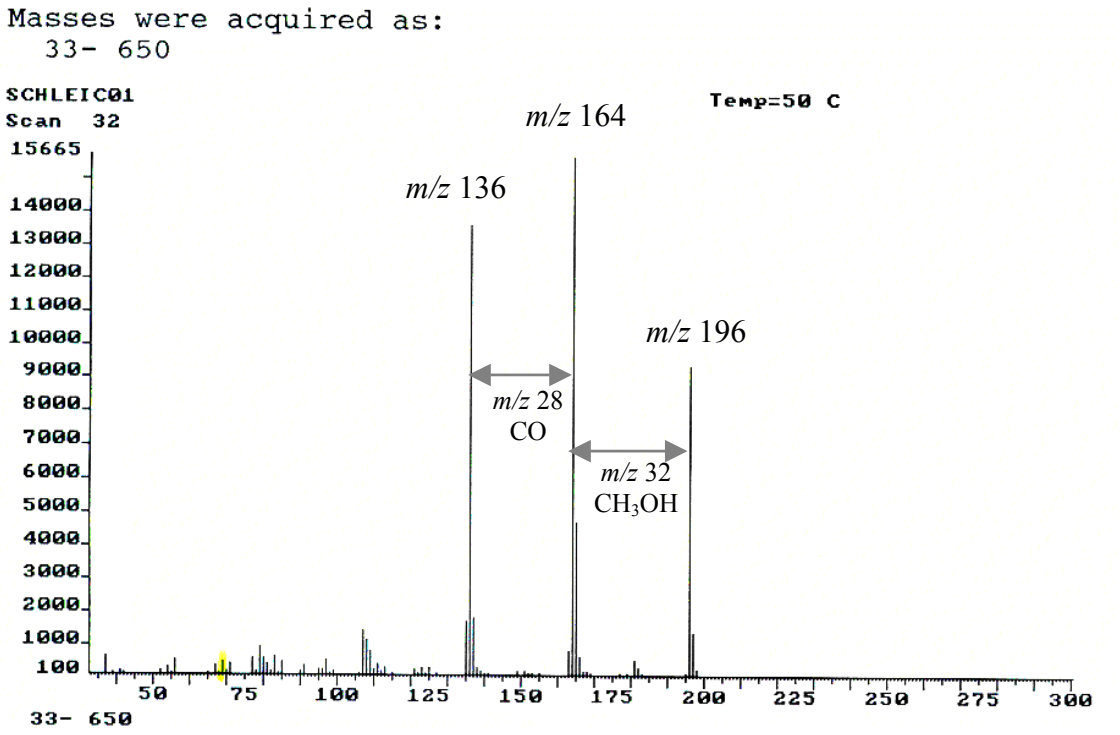


Abb. 20: EI-Massenspektrum von Atrarsäure (2).

Das UV-Spektrum von Atrarsäure (2) zeigt drei Maxima bei λ = 217, 245 und 307 nm. Alkalische Bedingungen bewirken eine Gelbfärbung der Lösung und damit eine bathochrome Verschiebung der Maxima im UV-Spektrum.

Es ist möglich, 2 aus Aceton umzukristallisieren, um monokline Kristalle zu erhalten. Außerdem gibt Atrarsäure (2) aufgrund der Salicylat-Partialstruktur eine violette Färbung mit Eisen(III)chlorid-Lösung. Alle analytischen Daten befinden sich in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten [118-120].

Zur Gehaltsbestimmung von Atrarsäure (2) im selektiven Dichlormethanextrakt aus Pygeum wurde anhand der resultierenden Peakflächen im HPLC-Chromatogramm eine Eichgerade mit einer Referenzsubstanz von 2 mit einer Reinheit von über 99% erstellt. Es ergab sich ein Gehalt von 0,16% (m/m) von 2 im selektiven Dichlormethanextrakt.

Atrarsäure (2) wurde bereits aus dem Rindenmaterial von verschiedenen höheren Pflanzen isoliert, wie z.B. Newbouldia laevis [118], Alseodaphne andersonii [120], Acer nikoense [121], Xylosma velutina [122] und Ekebergia pterophylla [123].

Atrarsäure (2) ist aber außerdem als Flechteninhaltsstoff bekannt [124-131]. Flechten sind Epiphyten, d.h. symbiotische Organismen, die aus Pilzen (Mycobiont) und Algen (Photobiont) bestehen. 2 kann in Flechten frei vorliegen und außerdem dient sie als Baustein von Depsiden und Depsidonen. Beispielsweise ist der bekannte Flechteninhaltsstoff Atranorin ein Depsid aus Atrarsäure (2) und Hematomminsäure und wird von verschiedenen Lichen-Arten über den Polyketidstoffwechsel synthetisiert (Abb. 21 und Abb. 22).

Diese Tatsache wirft die Frage auf, ob Atrarsäure (2) tatsächlich ein sekundärer Metabolit von Prunus africana (Hook. f) Kalkm. ist oder ob die Rinde des Baumes von einer Flechte befallen war, die 2 als Polyketid über den Acetat-Polymalonat-syntheseweg gewinnt.

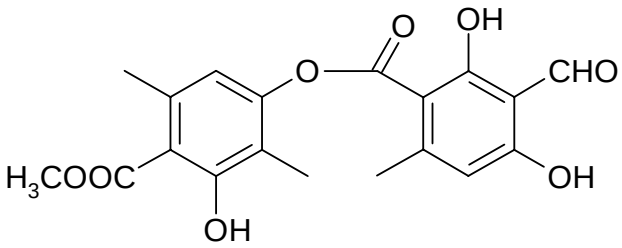


Abb. 21: Strukturformel von Atranorin, einem Depsid aus Atrarsäure (2) und Hematomminsäure (5-Formyl-β-Orsellinsäure).

Atrarsäure (2) zählt zu den Flechtensäuren, die Polyacetate sind und deren Biogenese durch die Pilzkomponente des Flechtenthallus erfolgt. 2 gilt wie andere Flechtensäuren auch als antimikrobiell und nematozid [127,131].

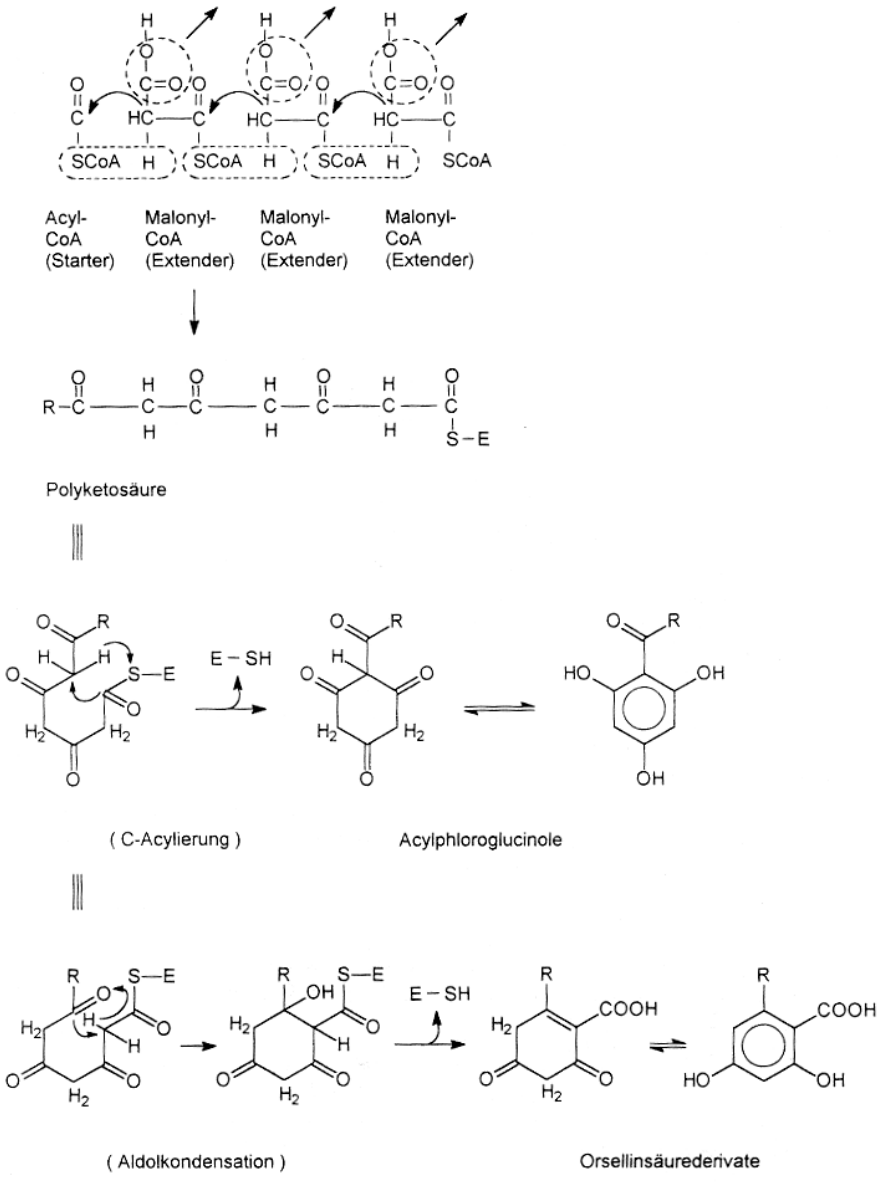


Abb. 22: Biogenese von Polyketiden, dargestellt am Beispiel der Acylphloroglucinole und Orsellinsäurederivate [127]. Zur Biosynthese von Atrarsäure (2) erfolgt im Anschluß die C-Methylierung an C-3 und die Veresterung der Säurefunktion, R = CH_3.

Atrarsäure (2) kann mittlerweile auch vollsynthetisch aus 3-Methyl-4-methylen-2-oxetan und Acetessigsäuremethylester hergestellt werden (Abb. 23) [132].

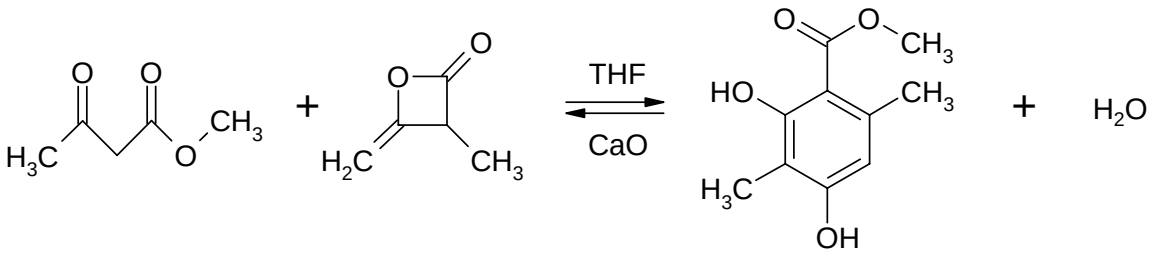


Abb. 23: Synthese von Atrarsäure (2) nach [132].

Bei der Betrachtung der Rindendroge von Pygeum africanum unter dem Mikroskop erkennt man deutlich Hyphen, die das Vorliegen einer Flechte bestätigen. Dies weist darauf hin, dass Atrarsäure (2) aus dem Polyketidstoffwechsel der Flechte stammt und kein sekundärer Pflanzenmetabolit von Pygeum africanum ist.

8.3.3. *N*-Butylbenzolsulfonamid (3)

Die Substanz P10 konnte anhand ihrer ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren, der Massenfeinbestimmung, des IR- und des UV-Spektrums als *N*-Butylbenzolsulfonamid (NBBS) (3) identifiziert werden (Abb. 24).

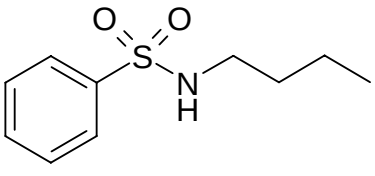


Abb. 24: Strukturformel von 3, die zweite isolierte Wirksubstanz aus Prunus africana (Hook. f.) Kalkm.

NBBS (3) wurde aus der Extrographiefraktion F08 (E1) als farblose ölige Substanz isoliert (Kapitel 8.1., Theoretischer Teil). Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigt drei Kernresonanzsignale für die am Aromaten gebundenen Protonen mit dem für einen monosubstituierten Aromaten typischen Kopplungsmuster des AA´BB´X-Systems. Die *ortho*-Protonen ergeben näherungsweise ein Dublett mit der Signalintensität von zwei Protonen bei δ = 7,85 ppm, die Protonen in *meta*-Stellung zeigen ein angenähertes Triplett mit einer Signalintensität von zwei Protonen bei δ = 7,49 ppm und das *para*-Proton ergibt etwa ein Triplett mit dem Integral von einem Proton bei einer chemischen Verschiebung von δ = 7,57 ppm. Die Kernresonanzsignale der Butyl-Gruppe von NBBS (3) lassen sich im Hochfeld erkennen. Die endständige Methyl-Gruppe ergibt ein Triplett mit dem Integral von drei Protonen bei δ = 0,82 ppm, die beiden benachbarten Methylen-Gruppen zeigen jeweils ein Sextett und ein Quintett mit Signalintensitäten von jeweils zwei Protonen bei δ = 1,26 ppm und δ = 1,42 ppm.

Für das Amid-Proton und die Protonen der benachbarten Methylen-Gruppe (C-1`) ergibt sich ein interessantes Phänomen. So zeigt das ^{1}H-NMR-Spektrum aus verdünnter Lösung (c < 5mg / 70µl $CDCl_3$) ein angedeutetes Triplett für das Proton der Amid-Gruppe und ein scharfes Quartett für die Protonen der benachbarten Methylen-Gruppe bei δ = 2,95 ppm (Abb. 26a). Das bedeutet, dass das Amid-Proton mit der gleichen Kopplungskonstante von ^{3}J(H,H) = 5,8 Hz wie die Protonen an C-2` mit den Protonen an C-1` koppelt. Bei einer konzentrierten NMR-Probe verschwindet die Kopplung des NH-Protons mit den Protonen an C-1`. Das Amid-Proton zeigt nun ein Singulett im ^{1}H-NMR-Spektrum. Außerdem verschiebt sich die Lage des Signals ins tiefe Feld, da mit zunehmender Konzentration die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrücken begünstigt wird und das Amid-Proton dadurch stärker entschirmt wird. Die Aufspaltung

des Quartetts bei einer chemischen Verschiebung von δ = 2,95 ppm wird mit zunehmender Konzentration schwächer und das Quartett geht bei sehr hohen Konzentrationen schließlich in ein Triplett über aufgrund der verschwundenen Kopplung mit dem Amid-Proton und der gebliebenen Kopplung mit den beiden C-2`-Protonen (Abb 26b).

Abbildung 25 gibt die Erklärung für diesen Effekt. Hier wird verdeutlicht, dass in konzentrierter Lösung die NBBS (3)-Moleküle so dicht beieinander liegen, dass der Austausch der Amid-Protonen zwischen den Molekülen schnell erfolgen kann. Ist diese Austausch-Frequenz höher als die Verschlusszeit der Kamera (NMR-Gerät), wird der magnetische Effekt der drei möglichen Spinzustände bei Kopplung mit den beiden Methylen-Protonen gemittelt und es erscheint ein Singulett anstelle des Tripletts (Abb. 25).

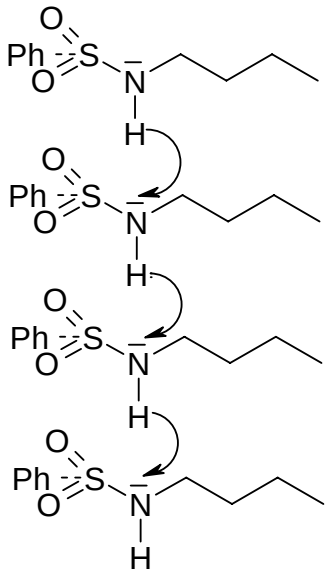


Abb. 25: Schneller intermolekularer Austausch der Amid-Protonen von NBBS (3) in konzentrierter Lösung (c » 5mg / 70µl $CDCl_3$).

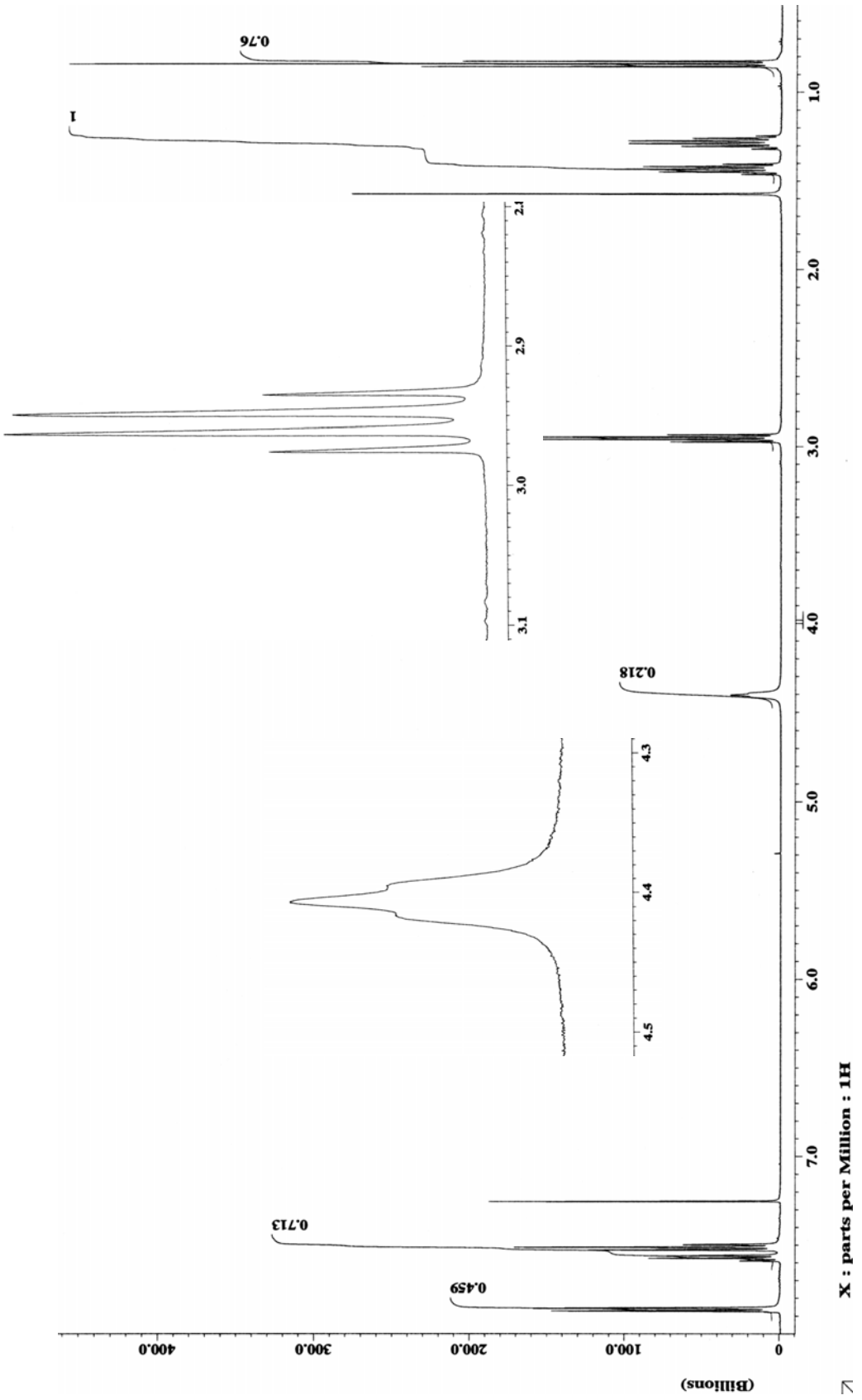


Abb. 26a: [1]H-NMR-Spektrum von 3 in verdünnter Lösung.

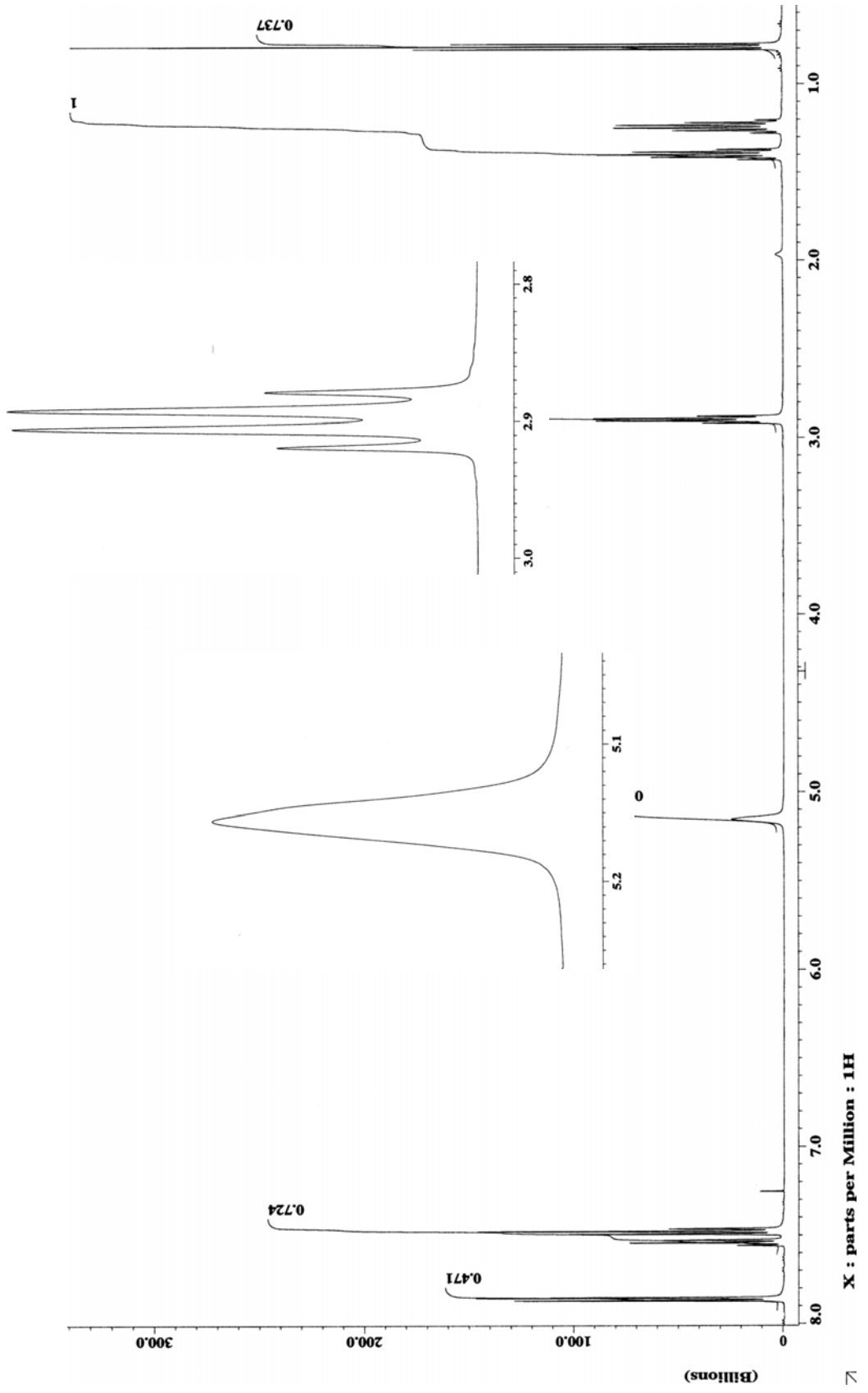


Abb. 26b: ^{1}H-NMR-Spektrum von 3 in konzentrierter Lösung.

Zur Gehaltsbestimmung von NBBS (3) im selektiven Dichlormethanextrakt aus Pygeum wurde anhand der resultierenden Peakflächen im HPLC-Chromatogramm eine Eichgerade mit einer Referenzsubstanz von 3 mit einer Reinheit von über 99,9% erstellt. Es ergab sich ein Gehalt von 0,33% (m/m) von 3 im selektiven Dichlormethanextrakt.

NBBS (3) wird als Weichmacher in der Produktion von Polyamiden und Copolyamiden wie z.B. antistatischer Nylonkompositionen oder hitzestabiler Polymere in Konzentrationen von bis zu 30% eingesetzt [133-135]. Außerdem dient 3 als Edukt bei der Synthese von Sulfonylcarbamat-Herbiziden [136]. 3 gilt als äußerst stabil und biologisch nahezu nicht abbaubar, so dass sich diese Substanz in verschiedenen Kompartimenten des Ökosystems anreichert. So wurde 3 bereits in Grundwasser, in Flußwasser, in Trinkwasser, in Deponiesickerwasser, in Wein, in Schnee und sogar im Urin von Beuteltieren gefunden [137-144]. Im Grundwasser kommt NBBS (3) in Konzentrationen von bis zu 140 µg/l vor [137].

Möglicherweise hat sich die ölige Substanz 3, die mit dem Grundwasser aufgenommen wurde, in den lipophilen Kompartimenten der Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. wie etwa im Harz angereichert. Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. ist ein Baum von etwa 30 Metern Höhe, der über seine Lebensjahre gesehen eine unüberschaubare Menge an Wasser zu sich nimmt, so dass damit auch die Menge an aufgenommener Substanz 3 aus dem Grundwasser durchaus bemerkenswerte Ausmaße annehmen kann.

Der in der Umwelt angereicherte Weichmacher 3 kann also aufgrund seiner antiandrogenen Eigenschaften über die Nahrungskette in das endokrine System von Tieren und Menschen eingreifen. Toxizitätsstudien haben ergeben, dass 3 in Mengen von 100 µg bei weiblichen Neuseeland-Hasen neurotoxisch wirkt und eine chronische

langsam fortschreitende Myelopathie induzieren kann, wenn es intrazisternal appliziert wird [145,146].

Neben dem Vorliegen von NBBS (3) als in der Umwelt angereicherte Substanz gibt es in der Literatur auch Hinweise auf natürliche Quellen. So wurde 3 bereits als fungizide Substanz aus dem Bakterienstamm *Pseudomonas* sp. AB2 isoliert [147]. NBBS (3) kann demnach also auch als Stoffwechselprodukt von Pseudomonas in die Droge gelangt sein.

8.4. Vergleich der Leitstrukturen mit Strukturen anderer Pygeum-Inhaltsstoffe

Die antiandrogene Wirkung der beiden aus Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. isolierten Substanzen Atrarsäure (2) und NBBS (3) wurde mit der Aktivität von anderen bekannten Inhaltsstoffen aus dieser Pflanze (Kapitel 4.3., Theoretischer Teil) verglichen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf β-Sitosterol gerichtet, da diese Substanz als Hauptvertreter der Phytosterole oft für die positiven Effekte von Phytopharmaka auf die erkrankte Prostata verantwortlich gemacht wird [41].

Des Weiteren wurden die pentacyclischen Triterpene Ursol- und Oleanolsäure, sowie Ferulasäure, die in nicht unwesentlichen Megen in Prunus-Arten vorkommt, mitgetestet. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse des Luciferase-Assays, bei dessen Ausführung alle Substanzen in einer Konzentration von 10^{-5} M getestet wurden.

β-Sitosterol zeigte im Luciferase-Assay eine moderate antiandrogene Wirkung von 23% Inhibition (Säule 1) und in der gleichen Größenordnung bewegt sich die Ursolsäure (Säule 2). Die isolierten Leitstrukturen 2 und 3 (Säulen 6 und 5) sind deutlich potenter und hemmen die Androgenwirkung zu 92% (2) und 85% (3). Oleanolsäure (Säule 3) und Ferulasäure (Säule 4) erwiesen sich im Assay sogar als stark androgen.

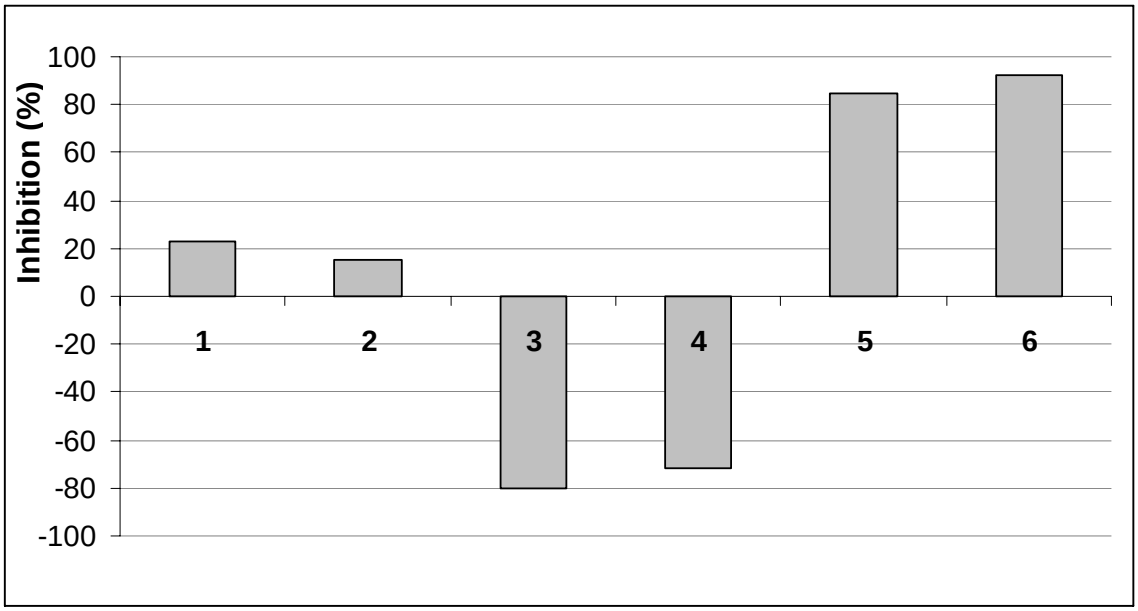


Abb. 27: Ergebnisse des Luciferase-Assays zum Test auf antiandrogene Wirkung von diversen Inhaltsstoffen aus Pygeum dargestellt als Inhibition der Androgen induzierten Luciferase-Aktivität in Prozent. 1 = β-Sitosterol, 2 = Ursolsäure, 3 = Oleanolsäure, 4 = Ferulasäure, 5 = NBBS (3), 6 = Atrarsäure (2).

8.5. Test auf synergistische Effekte der beiden Leitstrukturen

Es ist vorstellbar, dass die beiden isolierten Leitstrukturen Atrarsäure (2) und NBBS (3) aufgrund der Verschiedenheit der chemischen Strukturen einen unterschiedlichen molekularen Angriffspunkt am Androgenrezeptor besitzen. Wäre dies tatsächlich der Fall, könnte das bedeuten, dass eine Kombination der beiden Substanzen eine bedeutende Wirksteigerung im Vergleich zu den Einzelsubstanzen verursachen würde. Solche synergistischen Effekte von Substanzkombinationen sind beispielsweise von dem Polyphenol-Gesamtextrakt aus Grünem Tee bekannt. So zeigt (-)-Epigallocatechingallat (EGCG) in Kombination mit anderen krebspräventiven Arzneistoffen wie Tamoxifen oder Sulindac eine weitaus höhere Induktion der

Apoptose von Lungenkrebs-Zellen als einer der Wirkstoffe allein [148]. Beim Vorliegen von synergistischen Effekten erfolgt also keine Addition der Einzelwirkungen, sondern vielmehr potenziert sich die Aktivität bei der Substanzkombination.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Kombination der beiden antiandrogenen Substanzen Atrarsäure (2) und NBBS (3) ein synergistisches Potential aufweist. Hierzu wurden 2 und 3 zunächst als Einzelsubstanzen in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM mit dem Luciferase-Assay getestet (Abb. 28). 2 zeigt bei 10 µM eine komplette Inaktivierung des Androgenrezeptors (AR) und bei 1 µM immer noch einen starken Effekt. 3 ist bei beiden Konzentrationen unter den vorliegenden Bedingungen etwas schwächer wirksam als 2. Kombiniert man 10 µM 2 mit 10 µM 3 im Verhältnis 1:1 erfolgt eine nahezu vollständige Inaktivierung des AR. Die Kombination aus jeweils der Hälfte von 1 µM 2 und 10 µM 3 bewirkt eine Hemmung des AR wie etwa beide Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen allein. Das bedeutet also, dass sich die Wirkung der beiden Einzelsubstanzen in der Kombination exakt addiert und keine Potenzierung der Wirkung und damit kein synergistischer Effekt der Kombination von 2 und 3 eintritt. 10 µM 2 mit 1 µM 3 bewirkt wiederum eine vollständige Inaktivierung des AR, und beide Substanzen bei einer Konzentration von insgesamt 1 µm haben wiederum etwa den gleichen Effekt wie die Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen allein.

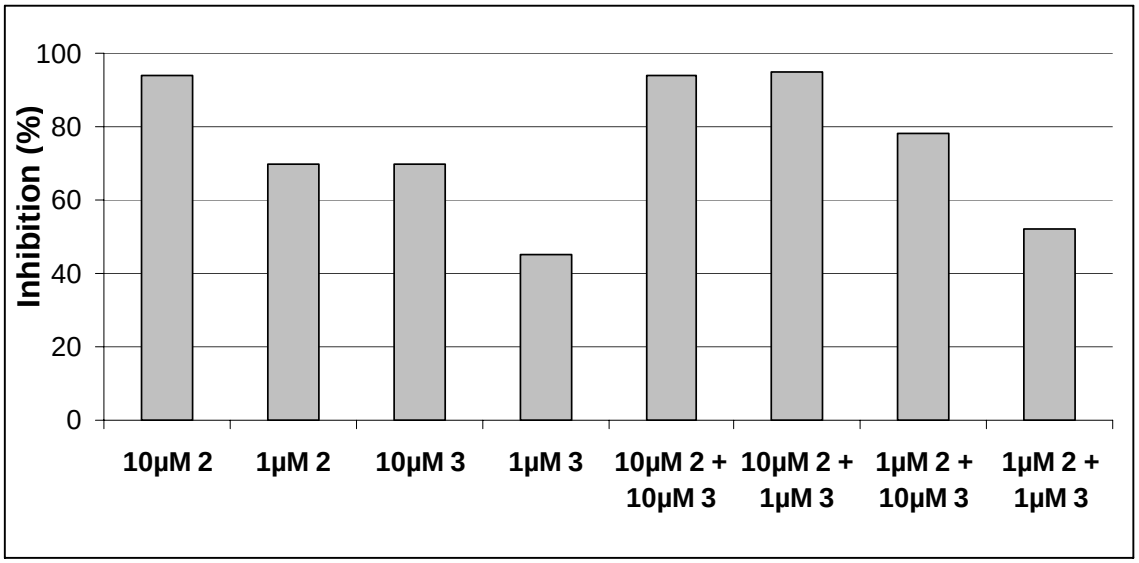


Abb. 28: Ergebnisse des Luciferase-Assays zum Test auf Vorliegen eines Synergismusses zwischen den beiden Wirksubstanzen Atrarsäure (2) und NBBS (3). Bei den Substanzkombinationen wurde jeweils die Hälfte der Stammlösung mit der angegebenen Molarität im Vergleich zu den Einzelsubstanzen dem Assay zugeführt.

8.6. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Atrarsäure (2)

Von den beiden in Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. gefundenen Leitstrukturen scheint besonders die der Atrarsäure (2) interessant für weitere Studien zu sein. Der Flechteninhaltsstoff 2 erwies sich außerdem im Assay um eine Zehnerpotenz aktiver als NBBS (3). Aus diesem Grund wurde besonderes Augenmerk auf diese Substanz gerichtet und zur genauen Bestimmung der optimalen antiandrogenen Wirkkonzentration eine Konzentrations-Kurve angefertigt. Hierzu wurde 2 in fünf Konzentrationen im Luciferase-Assay getestet (Abb. 29).

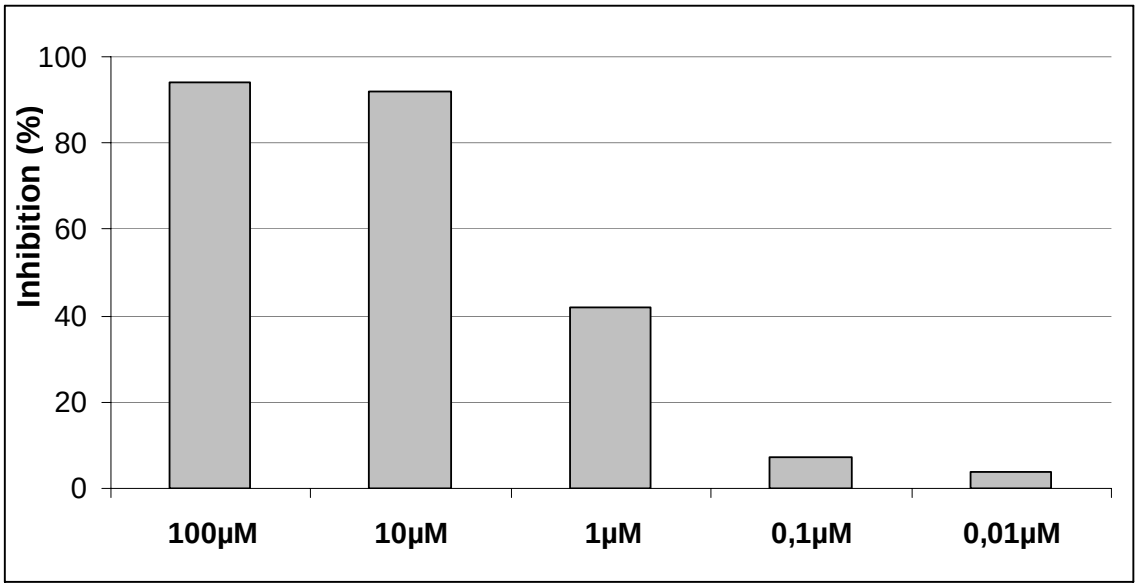


Abb. 29: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Atrarsäure (2). Bei einer Konzentration von 100 µM und 10 µM erfolgt eine komplette Inaktivierung des AR. Bei 1 µM ist die Inhibierung signifikant und bei 0,1 µM und 0,01 µM ist 2 schließlich nicht mehr wirksam.

Anhand dieser Konzentrations-Kurve lassen sich Aussagen über den IC_{50}-Wert treffen. Der IC_{50}-Wert ist definiert als die halbmaximale Hemmkonzentration, d.h. diejenige Konzentration einer Wirksubstanz, bei der eine Inhibition von 50% eintritt [149]. Der IC_{50}-Wert stellt keine absolute Größe dar, sondern bezieht sich immer auf bestimmte Versuchsbedingungen wie im vorliegenden Fall auf die im Test eingesetzte Hormonmenge (Kapitel 1.4., Experimenteller Teil).

Trägt man in einem Koordinatensystem die Inhibition in Prozent auf die Ordinate und den dekadischen Logarithmus der Konzentration auf die Abszisse ein, so ergibt sich für den Wirkungsbereich von 0,1 µM bis 10 µM eine Gerade, die sich durch lineare Regression ermitteln lässt. Durch Einsetzen der Inhibition von 50% in die ermittelte Geradengleichung lässt sich der Logarithmus der halbmaximalen Hemmkonzentration

direkt berechnen beziehungsweise am Abszissenabschnitt im Diagramm ablesen (Abb. 30).

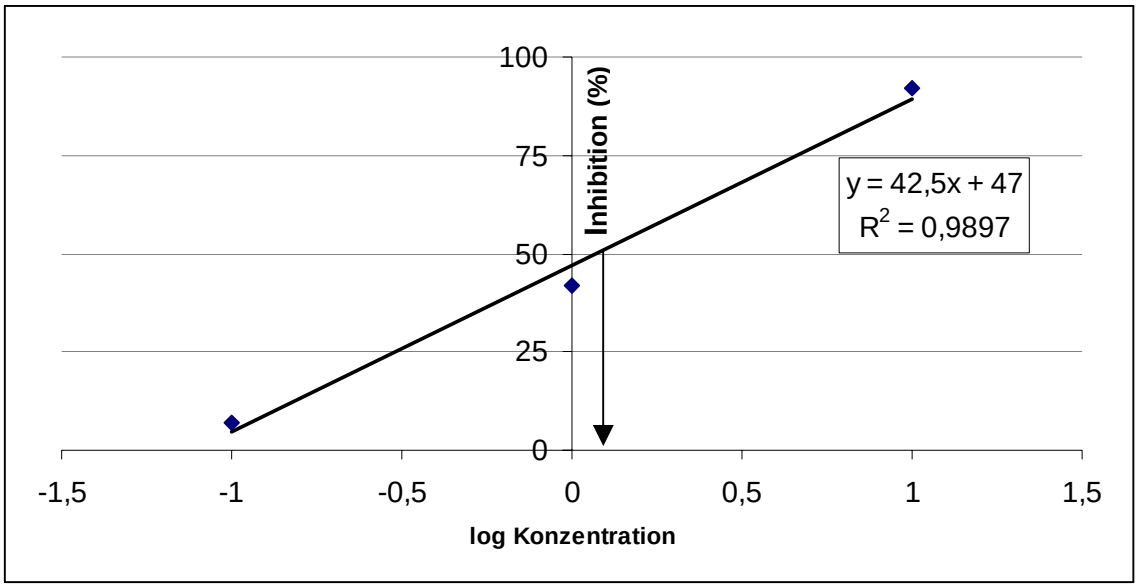


Abb. 30: Näherungsweise Ermittlung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC_{50}-Wert) von Atrarsäure (2). Trägt man die gemessene Inhibition gegen die logarithmische Konzentration in µM auf, so ergibt sich für den Wirkungsbereich der Atrarsäure (2) von 10^{-1} µM bis 10^{1} µM (0,1 – 10 µM) eine Proportionalität mit guter Korrelation. Der IC_{50}-Wert läßt sich aus der Geradengleichung berechnen, für (2) ergibt sich unter den vorliegenden Testbedingungen ein IC_{50}-Wert von 1,2 µM.

9. Versuche mit dem Pygeum-Handelspräparat Tadenan®

Das Arzneimittel Tadenan® der französischen Firma Debat Laboratoires ist in verschiedenen Ländern zur Behandlung von BPH-bedingten Miktionsbeschwerden zugelassen und heutzutage besonders in den USA weit verbreitet (Kapitel 2. und Kapitel 4.3., Theoretischer Teil). Tadenan® enthält pro Weichgelatine-Kapsel 50 mg eines Chloroformextraktes aus der Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. und 150 mg Erdnussöl als Arzneistoffträger. Die Tagesdosierung für die Therapie der BPH beträgt zwei Kapseln pro Tag, also 100 mg Chloroformextrakt.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben den eigens hergestellten Pygeum-Extrakten außerdem das Fertigarzneimittel Tadenan® sowohl bezüglich seiner antiandrogenen Wirkung als auch bezüglich seiner Inhaltsstoffe in die Untersuchungen einbezogen.

9.1. Ergebnisse des Luciferase-Assays von Tadenan®

Tadenan® wurde mittels Luciferase-Assay auf seine antiandrogene Wirkung getestet und mit drei verschiedenen selektiven Dichlormethanextrakten aus Pygeum verglichen.

Die Herstellung der selektiven Dichlormethanextrakte X1 und X2 erfolgte aus 1,7 kg und 3,1 kg der pulverisierten Rindendroge (Kapitel 5.1., Theoretischer Teil). Der selektive Dichlormethanextrakt X3 wurde aus 340 g einer anderen Drogencharge hergestellt (Extraktherstellung Kapitel 2.1., Experimenteller Teil). Im Luciferase-Assay zeigen alle drei selektiven Dichlormethanextrakte aus Pygeum einen sehr starken antiandrogenen Effekt. Tadenan® ist unter den gegebenen Bedingungen ähnlich wirksam (Abb. 31).

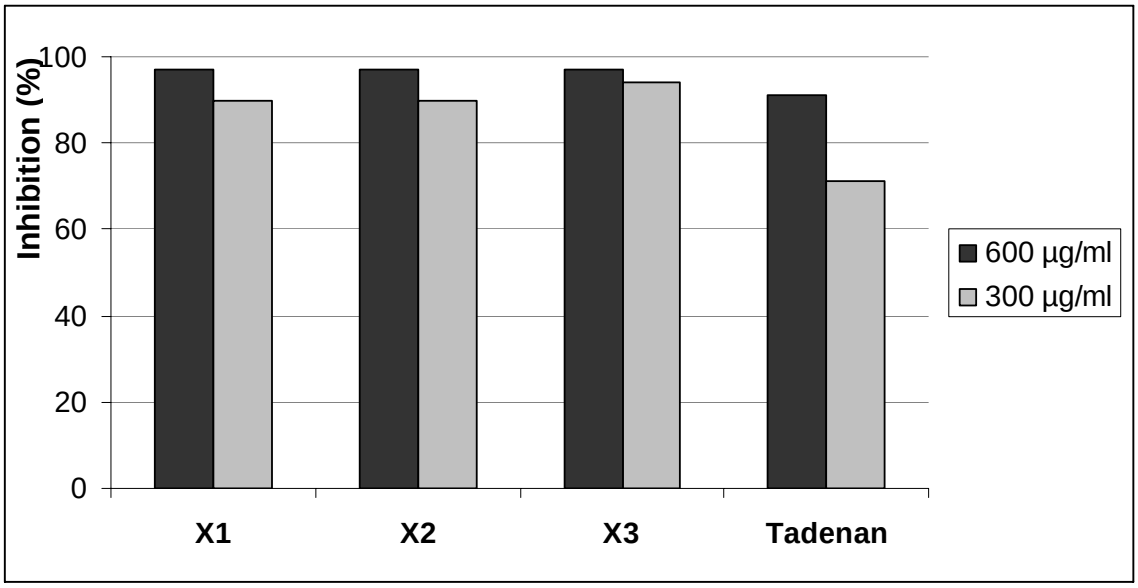


Abb. 31: Ergebnisse des Luciferase-Assays von Tadenan® im Vergleich zu den selektiven Dichlormethanextrakten X1, X2 und X3 aus Pygeum. Alle Extrakte bewirken eine nahezu komplette Inaktivierung des AR, was die Reproduzierbarkeit des Testsystems bestätigt. Tadenan® zeigt eine vergleichbare Wirkung.

9.2. Analytik von Tadenan®

Aufgrund der bestätigten antiandrogenen Wirkung von Tadenan® sollte nun untersucht werden, ob in dem im Präparat enthaltenen Chloroformextrakt ein ähnliches Spektrum an Inhaltsstoffen vorliegt wie im selektiven Dichlormethanextrakt. Hierzu wurde eine Kapsel Tadenan® exakt wie bei dem Assay aufgearbeitet. Der Inhalt einer Kapsel wurde mit 1 ml Ethanol versetzt und die unlöslichen Bestandteile aus dem Erdnussöl abfiltriert. Diese Lösung wurde per HPLC auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Das resultierende Chromatogramm wurde mit dem Übersichtschromatogramm des selektiven Dichlormethanextraktes verglichen (Abb. 32).

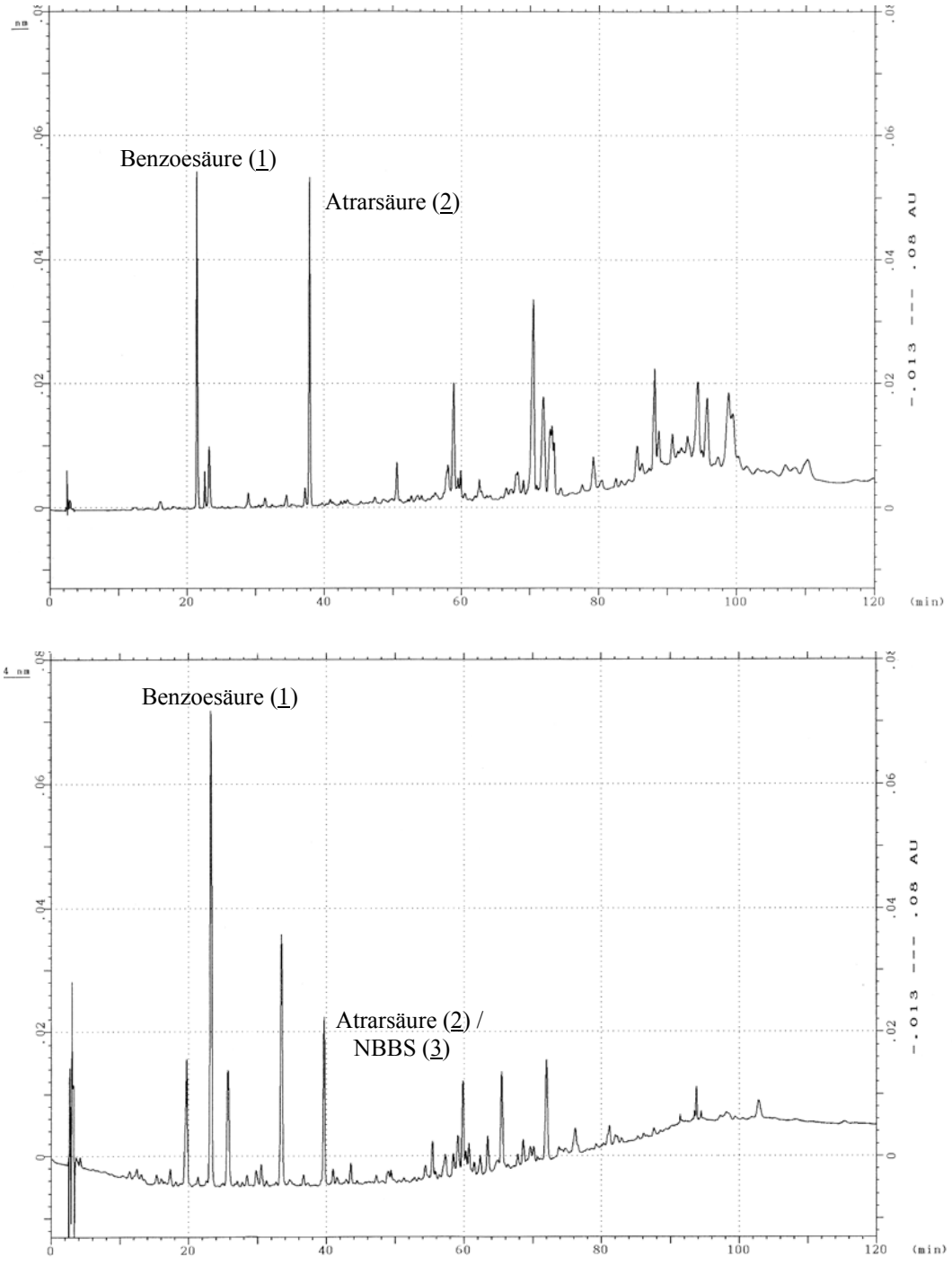


Abb. 32: Vergleich der Chromatogramme von Tadenan® (oben) und dem selektiven Dichlormethanextrakt (unten), Methode ***A2****, λ = 254 nm. Tadenan® enthält wie Pygeum eine bedeutende Menge an Benzoesäure (1) und Atrarsäure (2). Spiking mit Referenzsubstanzen bestätigte dies. NBBS (3) lässt sich nur in Spuren nachweisen.*

Vergleicht man die beiden Übersichtschromatogramme des Tadenan®-Extraktes und des selektiven Dichlormethanextraktes miteinander, so erkennt man neben einigen Gemeinsamkeiten auch deutliche Unterschiede. Beide Extrakte enthalten ähnliche Mengen an den isolierten Verbindungen Benzoesäure (1) und Atrarsäure (2). Außerdem stimmen weitere nicht identifizierte Peaks in Retentionszeit und UV-Spektrum überein. Allerdings sieht man auch, dass im Chromatogramm des selektiven Dichlormethanextrakts mehr Peaks bei niedrigeren Retentionszeiten als im Tadenan®-Extrakt zu finden sind. In diesem wiederum übertreffen Größe und Anzahl der Peaks im hinteren Teil des Chromatogramms den selektiven Dichlormethanextrakt. Die Erklärung liegt auf der Hand: Bei der Flüssigchromatographie beginnt man den Lösungsmittelgradienten mit geringer Elutionskraft, im Fall der Umkehrphasen-chromatographie ist dies das polare Wasser. Zunächst werden also die relativ polaren Substanzen eluiert. Im Laufe des Gradienten steigert sich die Elutionskraft des Fließmittels durch Hinzumischen einer lipophileren Lösungsmittelkomponente wie beispielsweise Acetonitril. Dadurch werden auch zunehmend lipophile Substanzen eluiert. Insgesamt lässt sich feststellen, dass mit zunehmender Retentionszeit die lipophilen Eigenschaften der eluierten Substanzen zunehmen. Das bedeutet also, dass im selektiven Dichlormethanextrakt insgesamt polarere Verbindungen als im Chloroformextrakt von Tadenan® zu finden sind. Die sehr lipophilen Verbindungen, die erst mit 100% Acetonitril von der Säule gespült werden (Retentionszeit größer 80 Minuten), sind im selektiven Dichlormethanextrakt deutlich reduziert vorhanden. Bei dem Vergleich der Herstellungsweisen der beiden Extrakte wird der Unterschied klar. Zum einen wird der Extrakt in Tadenan® aus Chloroform angefertigt, der Pygeum-Extrakt aus Dichlormethan. Beide Lösungsmittel unterscheiden sich zwar kaum

hinsichtlich ihrer Lipophilie, aber bezüglich der Dipol-Eigenschaften, die beim Dichlormethan im Gegensatz zum Chloroform deutlicher ausgeprägt sind. Damit werden also Inhaltsstoffe mit Dipolcharakter von Dichlormethan besser extrahiert als von Chloroform. Außerdem ist der selbst hergestellte Dichlormethanextrakt selektiv, die sehr lipophilen Inhaltsstoffe aus Pygeum wurden bereits mit Hexan entfernt. Der Chloroformextrakt aus Tadenan® dagegen ist ein Gesamtextrakt. Dazu kommt, dass bei der Herstellung des selektiven Dichlormethanextraktes aus Pygeum erschöpfend extrahiert wurde, also so lange Lösungsmittel zugeführt wurde, bis keine weiteren Inhaltsstoffe mehr gelöst werden konnten. Aus 1,7 kg Droge resultierten auf diese Weise 11 g Extrakt, das Droge/Extrakt-Verhältnis beträgt also 1700/11 = 157. Bei der Herstellung des Tadenan®-Extraktes werden aus 1000 kg Droge nur 5 kg Extrakt gewonnen, das Droge/Extrakt-Verhältnis beträgt hier also 200 und die Ausbeute an Extrakt ist geringer [150]. Es ist somit klar, dass im selektiven Dichlormethanextrakt eine wesentlich bessere Konzentrierung von speziell in diesem Lösungsmittel löslichen Substanzen stattfindet als in einem Chloroformextrakt, bei dessen Herstellung keine erschöpfende Extraktion vorgenommen wurde.

Neben dem Tadenan®-Extrakt wurde außerdem der selektive Methanolextrakt aus Pygeum mit Atrarsäure (2) gespiked. Der Methanolextrakt zeigt eine deutliche Anhäufung von hydrophilen Verbindungen im vorderen Teil des Chromatogramms und enthält eine geringe Menge an Atrarsäure (2), was wiederum die Restaktivität dieses Extraktes im Luciferase-Assay erklärt (Kapitel 6.2., Theoretischer Teil). Ein aus Pygeum africanum hergestellter Chloroformextrakt (Kapitel 2.1., Experimenteller Teil) enthält ein ganz ähnliches Spektrum an Inhaltsstoffen wie Tadenan®.

10. Optimierung der Leitstrukturen

In der Forschung nach neuen Arzneistoffen erfolgt im Anschluss an die Identifizierung der Leitstruktur ihre Optimierung zu einem klinischen Kandidaten sowie die Bereitstellung ausreichender Mengen dieser Substanzen für weitere Untersuchungen und die Entwicklung. Der letzte Punkt stellt besonders bei Naturstoffen eine Herausforderung dar, da deren Isolierung mit hohem technischem und zeitlichem Aufwand verbunden ist. Daher werden rein synthetische Wirkstoffe in der Regel bevorzugt als Arzneistoffkandidaten ausgewählt.

Die Leitstrukturoptimierung stellt einen der wichtigsten Schritte bei der Suche nach neuen Medikamenten in der gesamten Arzneimittelforschung dar. Die Leitstruktur muss durch strukturelle Variation so verbessert werden, dass ihr Eigenschaftsprofil bestimmte Kriterien für eine therapeutische Anwendung erfüllt. Die Optimierung erfolgt im Hinblick auf pharmakologische, technologische, chemische und physikalische Eigenschaften wie Wirkstärke, Selektivität, Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion, Toxizität sowie Synthese-Möglichkeiten und physikalische Stoff-eigenschaften [7].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Optimierung der beiden aus Pygeum isolierten Leitstrukturen Atrarsäure (2) und NBBS (3) auf ihre antiandrogene Wirkstärke und Selektivität sowie auf die Möglichkeit einer einfachen chemischen Synthese. So gelang die Synthese von vierzehn Sulfonamiden und sechs Atrataten, die in ihrer antiandrogenen Aktivität miteinander verglichen wurden. Es konnten erste Aussagen über Struktur-Wirkungsbeziehungen getroffen und die optimierten Strukturen ausgewählt werden.

10.1. Synthese von Arylsulfonamiden

Die Substanzklasse der Sulfonamide nimmt in der Pharmazie einen hohen Stellenwert ein, denn sie beinhaltet zahlreiche Arzneistoffe mit unterschiedlichen Anwendungsgebieten. Bereits im Jahre 1932 entdeckte der Bakteriologe Gerhard Domagk die antibiotische Wirksamkeit des Sulfonamids Sulfachrysoidin (Prontosil®). Auch heute noch werden Sulfonamid-Antibiotika zur Behandlung von bakteriellen Darmerkrankungen eingesetzt. Der Wirkmechanismus beruht auf ihrer Funktion als kompetitive Antagonisten für *p*-Aminobenzoesäure, was eine Hemmung der Folat-Synthese bewirkt. Außerdem werden Langzeitsulfonamide in Kombination mit Dihydrofolatreduktase-Hemmstoffen als antiprotozoische Arzneistoffe eingesetzt. Ein weiteres Beispiel für ein pharmakologisch wirksames Sulfonamid ist das Sultiam (Ospolot®), welches als Carboanhydrase-Hemmstoff in der Therapie der Epilepsie zur Anwendung kommt [151]. Darüber hinaus gelten verschiedene Sulfonamide als fungizid und werden in der Produktion von Pflanzenschutzmitteln verwendet [136]. Fast alle therapeutisch verwendeten Sulfonamide leiten sich von der Benzolsulfonsäure ab. Aliphatische Sulfonamide hingegen sind unter den Arzneistoffen kaum anzutreffen.

Sulfonamide scheinen also molekularbiologisch interessante Substanzen zu sein, die gut mit verschiedenen Proteinen in Interaktion treten können und so unterschiedliche pharmakologische Wirkungen entfalten. Dabei spielt sicherlich die Elektronenverteilung der funktionellen Gruppe ($R\text{-}SO_2NHR`$ für *N*-Monoalkylsulfonamide oder $R\text{-}SO_2NR`R``$ für *N*-Dialkylsulfonamide) eine bedeutende Rolle. Der Schwefel mit den beiden stark elektronenziehenden Sauerstoffatomen bewirkt aufgrund des negativen induktiven Effektes bei *N*-Monoalkylsulfonamiden eine Abschwächung der NH-Bindungsstärke und erhöht somit die Acidität des Amid-Protons. Sulfonamide aus

primären Aminen haben je nach den Substituenten einen mehr oder weniger ausgeprägten sauren Charakter und sind daher in wässrigem Alkali unter Salzbildung löslich [152].

Das Sulfonamid NBBS (3) zeigte im Luciferase-Assay eine Inhibition der Androgen induzierten Luciferase-Aktivität von etwa 80% bei einer Konzentration von 10^{-5} M (Kapitel 8.4., Theoretischer Teil). Diese Wirkstärke sollte durch Variation der NBBS-Grundstruktur noch gesteigert werden. Zunächst wurde eine Reihe von Sulfonamiden mit unterschiedlichen Amino-Alkyl-Ketten synthetisiert, später kam dann die Variation der Aryl-Struktur hinzu.

10.1.1. Darstellung von *N*-Monoalkylarylsulfonamiden durch Aminolyse von Sulfonsäurechloriden

Primäre Sulfonsäureamide lassen sich durch Eintropfen von einem mol Sulfonsäurechlorid zu 500 ml konzentriertem Ammoniak einfach darstellen. Das benötigte Sulfonsäurechlorid kann man zuvor aus der wasserfreien Sulfonsäure und Phosphorpentachlorid oder Thionylchlorid synthetisieren [152].

Zur Synthese der Strukturvarianten von NBBS (3) wurde direkt vom Arylsulfonsäurechlorid und dem primären aliphatischen Amin ausgegangen (Abb. 33). Die Reaktion des Säurechlorids mit dem Amin kann ohne Lösungsmittel durch einfaches Mixen der beiden Komponenten im Mörser mit Pistill erfolgen [153]. Da allerdings im Fall der NBBS-Strukturvarianten beide Komponenten überwiegend in flüssiger Form vorliegen, wurde ein Dreihalskolben mit Rührer, Rückflusskühler, Thermometer und Tropftrichter bevorzugt. Das Amin wurde im Überschuss vorgelegt und das Sulfonsäurechlorid langsam unter Rühren hinzugetropft. Die Reaktion ist stark

exotherm und verläuft quantitativ. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes wurde mit Wasser versetzt und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde per Dünnschichtchromatographie verfolgt (Methode **DC1**, Experimenteller Teil).

Das Verhältnis Amin : Sulfonsäurechlorid betrug in den Reaktionen 2 : 1, bei den gasförmigen Aminen Methyl- und Ethylamin wurde eine wässrige Lösung und das vierfache Äquivalent an Amin im Vergleich zum Säurechlorid eingesetzt.

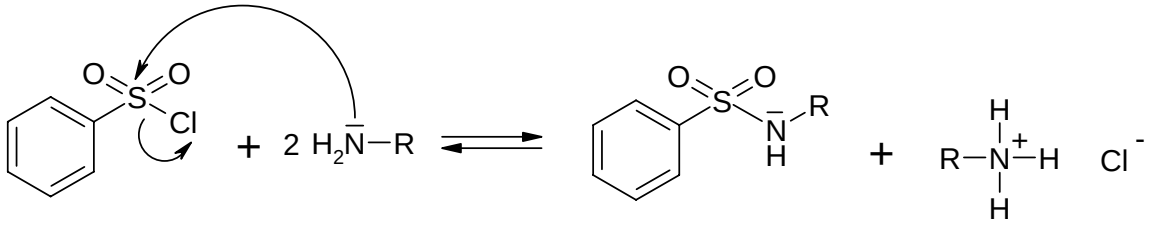
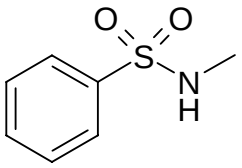


Abb. 33: Die Reaktion von Benzolsulfonsäurechlorid mit einem primären aliphatischen Amin ergibt unter Abspaltung von HCl das Arylsulfonamid in quantitativer Ausbeute.

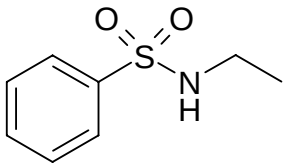
Bei dieser Reaktion greift das freie Elektronenpaar des Amin-Stickstoffs nucleophil am Schwefel des Sulfonsäurechlorids an. Dabei entsteht neben dem Reaktionsprodukt auch Salzsäure, die das überschüssige Amin protoniert. Das Amin-Salz verbleibt beim Ausschütteln des Sulfonamids mit Dichlormethan in der wässrigen Phase und kann so abgetrennt werden.

Auf diese Weise wurde zunächst eine Reihe von *N*-Monoalkylbenzolsulfonamiden mit verschiedenen Alkylketten hergestellt. Als Edukte dienten das flüssige Benzolsulfonsäurechlorid und die entsprechende primäre Aminkomponente. Die Strukturformeln der Sulfonamide mit variabler Alkylkette sind in Abbildung 34 dargestellt. Hier ist außerdem das *N*-Geranylbenzolsulfonamid (9) aufgeführt. Diese

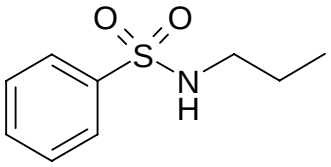
Substanz wurde synthetisiert, da man sich aufgrund der terpenoiden Seitenkette eine bessere Membrandurchgängigkeit erhoffte.



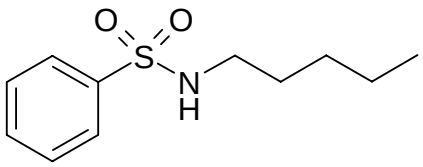
(4)



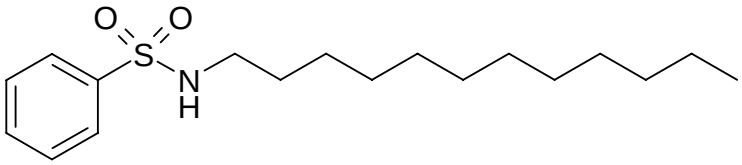
(5)



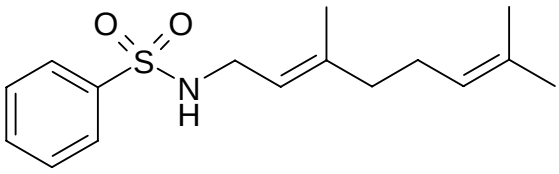
(6)



(7)



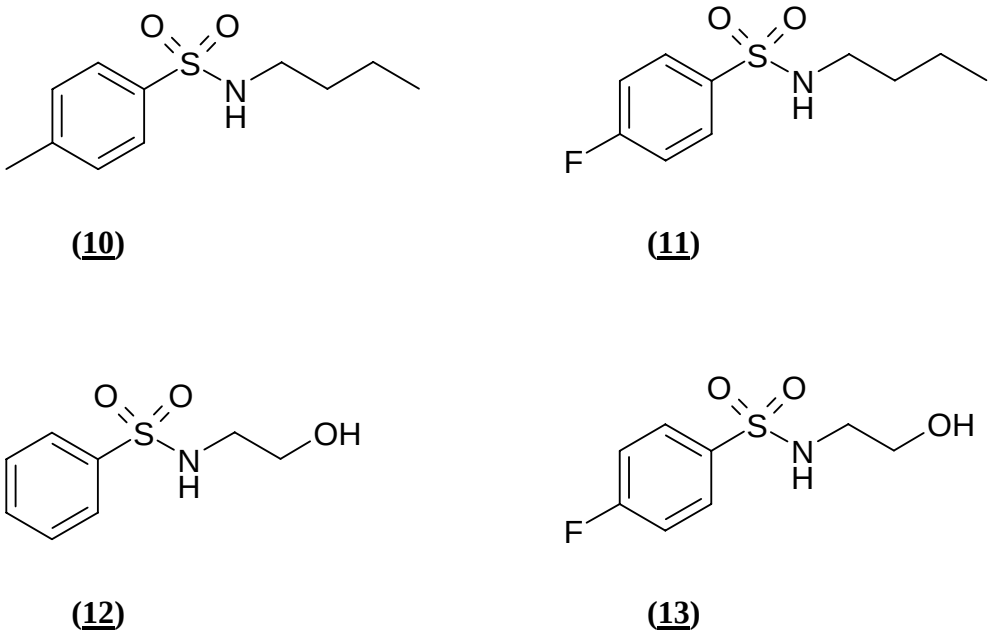
(8)



(9)

Abb. 34: Erste Reihe an Strukturvarianten von NBBS (3) mit unterschiedlichen Stickstoff-Substituenten.

Die nächste Reihe an synthetisierten Sulfonamiden beinhaltet sowohl die Einführung von Substituenten am Aromaten (10 und 11) als auch eine Variation der Aminoalkylkette mit einer endständigen Hydroxyl-Gruppe (12 und 13) (Abb. 35)



(10) **(11)**

(12) **(13)**

Abb. 35: Zweite Reihe an Strukturvarianten von NBBS (3).

Die Verbindungen 10 und 11 wurden ausgehend von 4-Toluolsulfonsäurechlorid und 4-Fluorbenzolsulfonsäurechlorid mit Butylamin auf die gleiche Weise wie die Verbindungen 4 bis 9 hergestellt.

Die Synthese der Verbindungen 12 und 13 konnte nicht auf diese Weise erfolgen, da hier die Hydroxyl-Gruppe des eingesetzten Ethanolamins mit der Amino-Gruppe konkurriert. Es entsteht also neben dem Sulfonsäureamid auch eine gewisse Menge an Sulfonsäureester (Abb. 36).

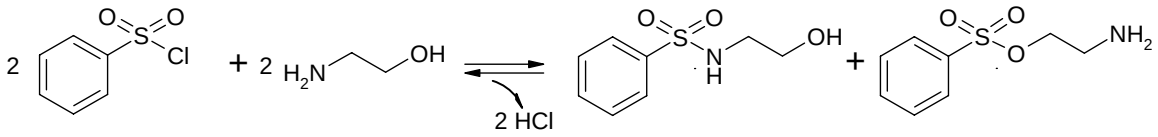
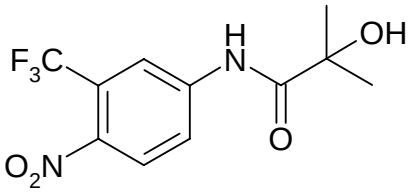


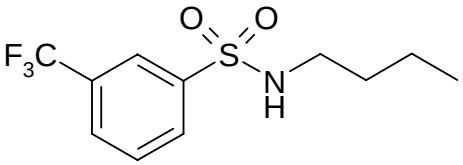
Abb. 36: Die Reaktion von Benzolsulfonsäurechlorid mit Ethanolamin führt zu einem Produktgemisch aus N-2-Hydroxyethylbenzolsulfonamid (12) und 2-Aminoethyl-benzolsulfonsäureester.

Allerdings gelang die Synthese von 12 und 13 nach der Vorschrift aus [154]. Hier werden zunächst ein Äquivalent Benzolsulfonsäurechlorid bzw. 4-Fluorbenzol-sulfonsäurechlorid mit 2,2 Äquivalenten Ethanolamin in *ortho*-Xylol fünf Stunden refluxiert. Nach Beendigung der Reaktion setzt sich am Boden eine viskose Flüssigkeit ab, die abgetrennt wird. Hierbei handelt es sich um das Sulfonamid, das aufgrund des Aminüberschusses und seines aciden Charakters deprotoniert vorliegt und sich damit von der organischen Phase absetzt. Der Sulfonsäureester hingegen hat keine sauren Eigenschaften und verbleibt gelöst in der Xylol-Phase. Anschließend wird das abgetrennte Sulfonamid mit wässrigem Alkali versetzt bis eine klare Lösung entsteht. Durch Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure fällt das Sulfonamid wieder in gereinigter Form als gelber Sirup aus. Nach Abtrennen des Sulfonamides wird dieses mit Aceton versetzt. Das Sulfonamid geht dabei in Lösung und das beim Ansäuern entstandene mit ausgefällte Kochsalz verbleibt als Bodensatz und kann durch Filtration entfernt werden. Das Aceton wird am Rotationsverdampfer abgezogen und man erhält das gereinigte Produkt.

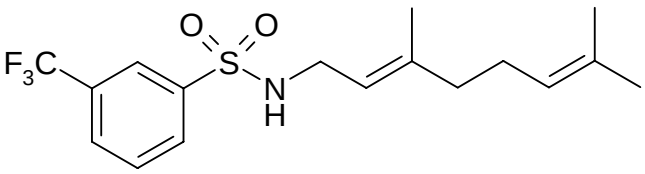
Bei der dritten Reihe an Strukturvarianten von NBBS (3) orientierte man sich an der Struktur der antiandrogenen Substanz 2-Hydroxyflutamid. 2-Hydroxyflutamid ist der aktive Metabolit von Flutamid (Fugerel®) (Abb. 37).



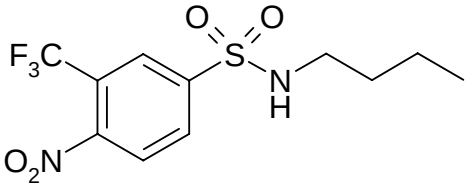
2-Hydroxyflutamid



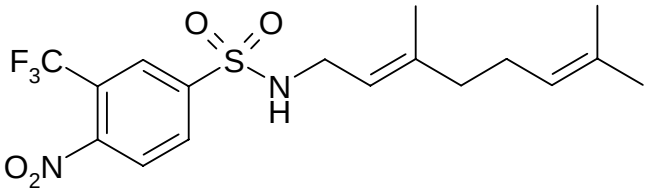
(14)



(15)



(16)



(17)

Abb. 37: Dritte Reihe an Strukturvarianten von NBBS (3). Als Vorbild fungierte das Substitutionsmuster des Aromaten der antiandrogenen Substanz 2-Hydroxyflutamid.

Die Einführung einer Trifluormethyl-Gruppe in *meta*-Stellung erhöht die Lipophilie des Moleküls. Dadurch sollte eine bessere Durchgängigkeit durch die Zellmembran gewährleistet sein. Die zusätzliche Nitro-Gruppe bei 16 und 17 in *para*-Stellung bewirkt eine weitere Verbesserung der lipophilen Eigenschaften. Die Geranyl-Seitenkette soll die Verankerung in biologischen Membranen verbessern.

Die Synthese von 14 bis 17 erfolgte ausgehend von 3-Trifluormethylbenzolsulfonsäurechlorid bzw. 4-Nitro-3-trifluormethylbenzolsulfonsäurechlorid und Butylamin bzw. Geranylamin. 4-Nitro-3-trifluormethylbenzolsulfonsäurechlorid liegt bei Raumtemperatur als Feststoff vor, so dass Dichlormethan als Lösungsmittel verwendet wurde.

10.1.2. Antiandrogene Wirkung der Sulfonamide

Die 14 synthetisierten Sulfonamide 4 bis 17 wurden auf ihre antiandrogenen Wirkungen getestet (Abb. 38 - 40), die in Kapitel 10.1.3. des Theoretischen Teils diskutiert werden.

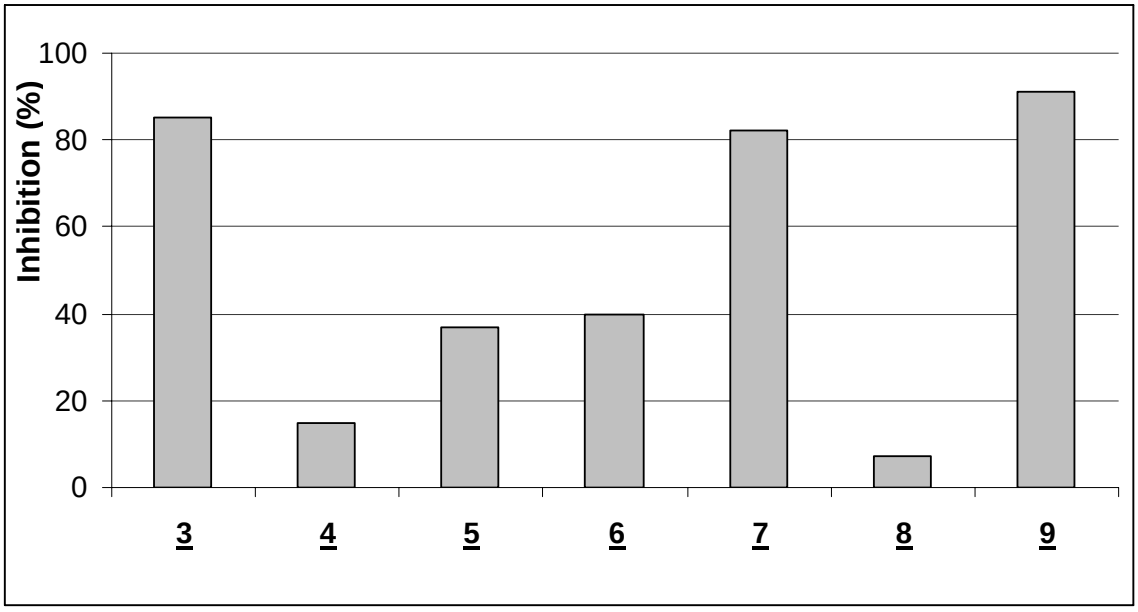


Abb. 38: Ergebnisse des Luciferase-Assays der ersten Reihe an Strukturvarianten von NBBS (3) bei einer Konzentration von 10^{-5} M (Abb. 34).

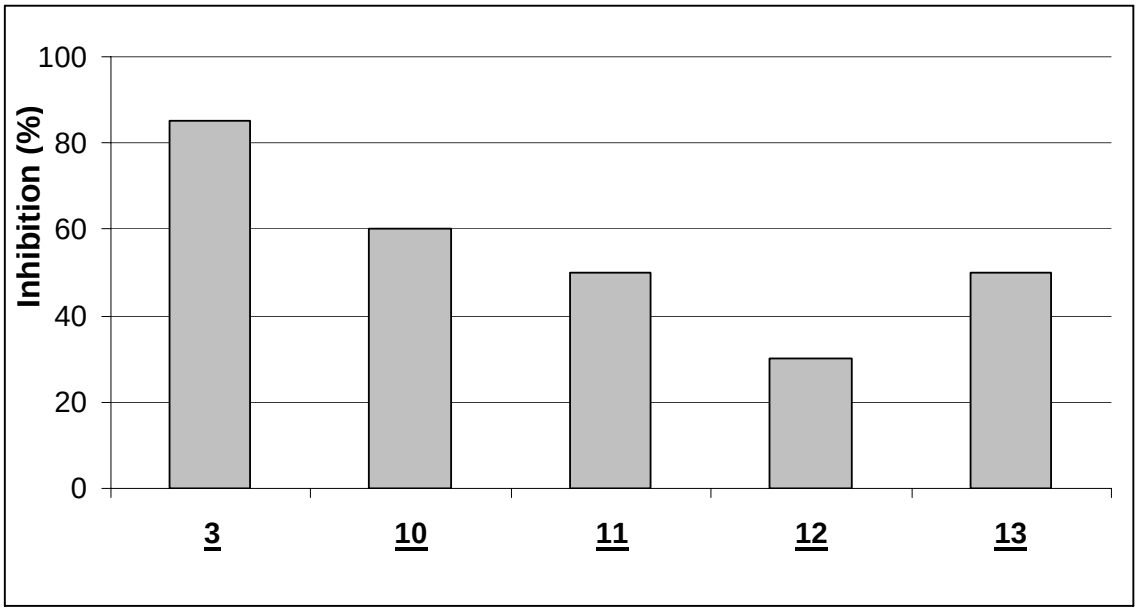


Abb. 39: Ergebnisse des Luciferase-Assays zum Test auf antiandrogene Wirkung der zweiten Reihe an Strukturvarianten von 3 bei einer Konzentration von 10^{-5} M (Abb. 35).

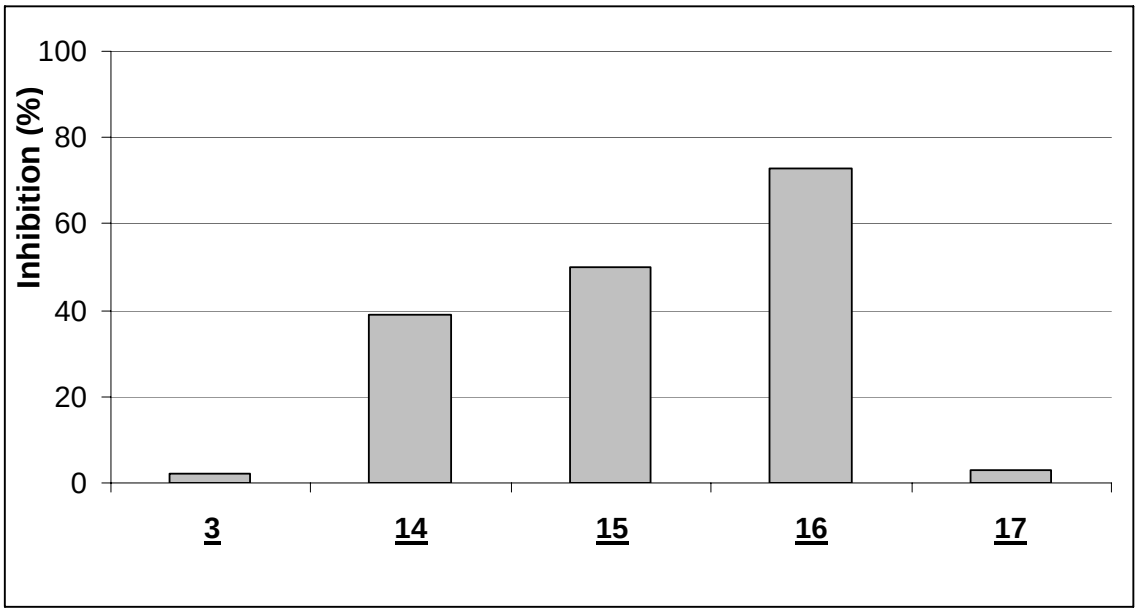


Abb. 40: Ergebnisse des Luciferase-Assays der dritten Reihe an Strukturvarianten von 3 bei einer Konzentration von 10^{-6} M (Abb. 37). 3 ist in dieser Konzentration hier nicht mehr wirksam, die Substanzen 14, 15 und 16 sind allerdings hoch potent.

10.1.3. Struktur-Wirkungsbeziehungen der Sulfonamide

Eines der Hauptanliegen der naturwissenschaftlich orientierten pharmakologischen Forschung ist es, die Beziehungen zwischen der chemischen Struktur und der damit verbundenen pharmakologischen Wirkung zu erkennen und für neue Substanzen vorauszusagen [155]. Man versucht also, aus einer Substanzklasse den für die Wirkung verantwortlichen Molekülteil, den Pharmakophor, zu finden. Dies kann gelingen, wenn man eine Reihe an Substanzen mit gleichem Grundkörper auf ihre pharmakologische Aktivität testet und miteinander vergleicht.

In der vorliegenden Arbeit sollten nun die Ergebnisse des Luciferase-Assays der 14 Sulfonamide dazu dienen, Hinweise für bestehende Struktur-Wirkungsbeziehungen zu gewinnen und die optimierte Struktur ausgewählt werden.

Zunächst wurden die Ergebnisse des Luciferase-Assays für die erste Reihe an Strukturvarianten von NBBS (3) ausgewertet (Abb. 34 und Abb. 38). Bei dieser Reihe sollte der Einfluss der Kettenlänge auf die antiandrogene Wirksamkeit untersucht werden. Man erkennt, dass sich die Wirkung mit zunehmender Kettenlänge von Methyl- bis Butyl-Seitenkette langsam steigert (4, 5, 6, 3). Die Pentyl-Seitenkette (7) bewirkt bei 10^{-5} M etwa die gleiche Aktivität wie der Butyl-Rest (3). Eine lange Alkylkette von 12 Kohlenstoff-Atomen (8) bewirkt schließlich einen völligen Wirkungsverlust. In dieser ersten Reihe ist Substanz 9 mit der Geranyl-Seitenkette die wirksamste Verbindung, die auch bei 10^{-6} M noch eine gewisse Aktivität zeigt. Wie erwartet erfolgt hier offensichtlich durch die Interaktion dieser terpenoiden Seitenkette mit der Zellmembran eine bessere Durchgängigkeit durch die Membran und damit eine erhöhte intrazelluläre Wirkstoffkonzentration.

Bei der zweiten Reihe an Strukturvarianten von 3 wurde das Substitutionsmuster am Aromaten variiert (10 und 11) und bei 12 und 13 eine hydrophile Hydroxyl-Gruppe an der Seitenkette eingeführt (Abb. 35 und Abb. 39). Diese Strukturvarianten bewirkten keine Aktivitätssteigerung, aber auch keine außerordentliche Wirkminderung, so dass diese Variationen als verhältnismäßig indifferent einzustufen sind.

Bei der dritten Reihe an Strukturvarianten von 3 wählte man als Seitenkette Butyl- (14 und 16) und Geranyl-Reste (15 und 17), die bei der ersten Reihe die besten Ergebnisse brachten (Abb. 37 und Abb. 40). Am Aromaten führte man eine Trifluormethyl-Gruppe ein. Diese übt einen starken negativen induktiven Effekt aus und vermindert so die Elektronendichte am Aromaten, was wiederum die Lipophilie des gesamten Moleküls deutlich steigert. 16 und 17 weisen zusätzlich eine Nitro-Gruppe auf. 14 und 15 sind beide etwa gleich wirksam und zwar deutlich aktiver als 3. Die Trifluormethyl-Gruppe in *meta*-Position hat also einen deutlichen Einfluß auf die Aktivität, der Wechsel von Butyl- (14) auf Geranyl-Rest (15) bewirkt hier eine geringe zusätzliche Steigerung der Aktivität. Die zusätzliche Nitro-Gruppe bei 16 in *para*-Position erhöht abermals die Lipophilie des Moleküls und bewirkt eine weitere Aktivitätserhöhung. 16 stellt für die Sulfonamide das Aktivitätsoptimum dar. 17 ist allerdings nicht mehr wirksam. Dies könnte daran liegen, dass dieses Molekül nun zu lipophil ist und außerdem mit 406 g/mol eine relativ hohe Molekularmasse aufweist. Dies könnte zur Folge haben, dass dieses Molekül nur schlecht durch die Biomembran diffundieren kann und so die intrazelluläre Konzentration zu niedrig ist. Die „rule of five“ von Lipinski bestätigen dies: die Absorption und Permeation eines Wirkstoffes mit einem Verteilungskoeffizient log P größer als 5 ist aufgrund der hohen Lipophilie unwahrscheinlich. Mit steigender Molekularmasse nimmt die Absorption ebenfalls ab [10,12].

10.2. Synthese von Atratаten

Neben der Leitstruktur NBBS (3) wurde außerdem Atrarsäure (2) als antiandrogen wirksame Substanz aus Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. isoliert (Kapitel 8.3.2., Theoretischer Teil). Atrarsäure (2) erwies sich im Luciferase-Assay als sehr potent, die halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50}-Wert) beträgt etwa 1,2 µM (Kapitel 8.6., Theoretischer Teil). Diese Leitstruktur sollte nun ebenso wie NBBS (3) (Kapitel 10.1., Theoretischer Teil) bezüglich ihrer antiandrogenen Wirkstärke optimiert werden, wobei auf einen einfachen Syntheseweg geachtet wurde.

10.2.1. Darstellung von Atratаten durch Umesterung von Atrarsäure (2)

Die Atrarsäure (2) trägt den IUPAC-Namen Methyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat. Die Bezeichnung „Säure“ ist etwas irreführend, da die Carbonsäure-Funktion von 2 nicht frei vorliegt, sondern mit Methanol verestert ist. Dennoch hat 2 aufgrund der beiden phenolischen Hydroxyl-Gruppen und der phenylogen Carbonyl-Gruppe saure Eigenschaften. Allgemein bezeichnet man die in Flechten vorliegenden Polyacetate wie 2 als Flechtensäuren. Flechtensäuren sind aus vier Acetatresten aufgebaut und daher Tetraketide. Die antibiotische Wirkung von Flechtensäuren ist schon lange bekannt. Einer medizinischen Anwendung in größerem Umfang stand zunächst der Mangel an den langsam wachsenden Flechten als Rohmaterial entgegen [127]. 2 lässt sich mittlerweile allerdings vollsynthetisch gewinnen und wird im Handel mit einer Reinheit von über 99% angeboten (Kapitel 8.3.2., Theoretischer Teil) [132].

Zur Strukturoptimierung von Atrarsäure (2) sollte eine Reihe von Substanzen synthetisiert werden, die sich in der Ester-Gruppe von 2 unterscheiden. Hierzu wurde

zunächst versucht, eine sauer katalysierte Veresterung von 2,4-Dihydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure (18) mit verschiedenen primären aliphatischen Alkoholen durchzuführen. Infolge der geringen Carbonylaktivität reagieren Carbonsäuren im Allgemeinen nur langsam mit Alkoholen. Der Zusatz von starken Mineralsäuren wie Schwefelsäure und das Refluxieren über mehrere Stunden kann die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich beschleunigen [152]. Die Reaktion von 18 mit einem primären Alkohol wie beispielsweise Ethanol lieferte allerdings nicht den gewünschten Ester, da 18 aufgrund seiner Salicylat-Struktur in der Hitze mit Mineralsäuren decarboxyliert (Abb. 41).

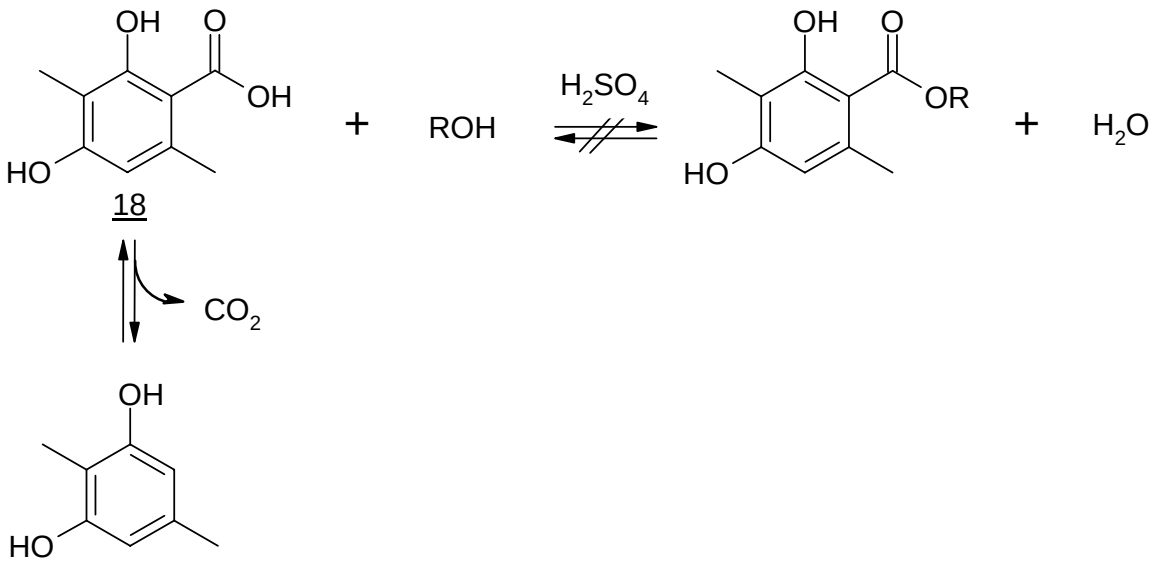


Abb. 41: Das Erhitzen von 2,4-Dihydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure (18) und einem primären aliphatischen Alkohol führt in Anwesenheit von Schwefelsäure nicht zur gewünschten Veresterung der Carboxyl-Gruppe, sondern bewirkt eine Decarboxylierung von 18.

Allerdings lieferte eine alkalisch katalysierte Umesterung von Atrarsäure (2) mit einem primären Alkohol den gewünschten Ester. Hierzu rührt man 2 über Nacht mit etwas mehr als der äquimolaren Menge an Kaliumhydroxid in einer Lösung des entsprechenden primären aliphatischen Alkohols (Abb. 42). Da diese Umesterung nicht quantitativ verläuft, muß das Reaktionsprodukt mittels präparativer HPLC aus dem Gemisch isoliert werden (Methoden **A3** – **A8** und **B4** – **B9**, Experimenteller Teil).

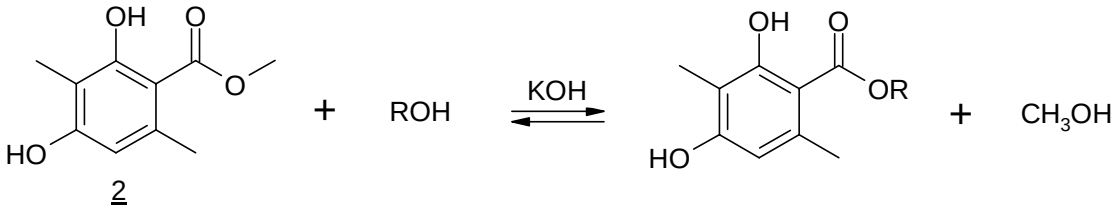
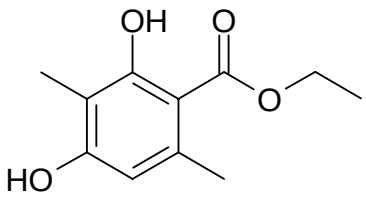


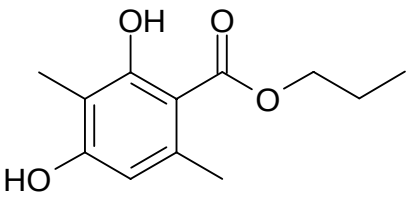
Abb. 42: Umesterung von Atrarsäure (2) unter alkalischen Bedingungen mit der entsprechenden Alkohol-Komponente im Überschuß.

Auf diese Weise gelang die Synthese der Atratate Ethyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat (19), Propyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat (20), Isopropyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat (21), Butyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat (22) und Geranyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat (23) (Abb.43).

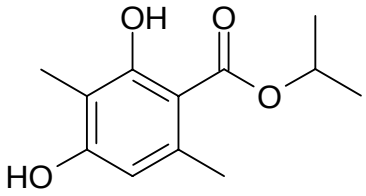
Als weitere Strukturvariante sollte eine Kombination der beiden Leitstrukturen Atrarsäure (2) und NBBS (3) zu einem Hybrid erfolgen. Ein solches Hybrid aus zwei Arzneistoffen ist unter Umständen noch wirksamer als die beiden Einzelsubstanzen allein, weil diese sich synergistisch ergänzen könnten [9]. So wurde 24 aus *N*-2-Hydroxyethylbenzolsulfonamid (12) und Atrarsäure (2) durch Umesterung hergestellt (Abb. 43).



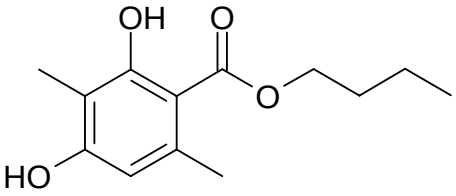
19



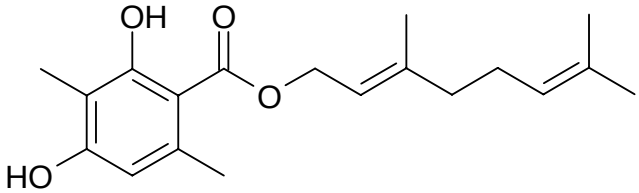
20



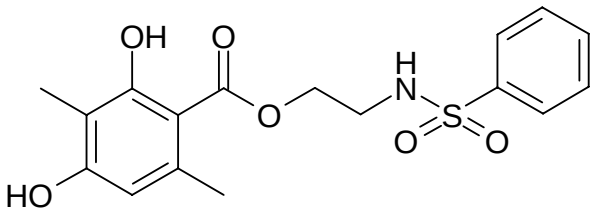
21



22



23



24

Abb. 43: Synthetisierte Strukturvarianten der Atrarsäure (2).

10.2.2. Antiandrogene Wirkung der Atratate

Die Atratate 19 – 24 wurden nun auf ihre antiandrogene Wirksamkeit getestet und mit der Aktivität von Atrarsäure (2) verglichen (Abb. 44).

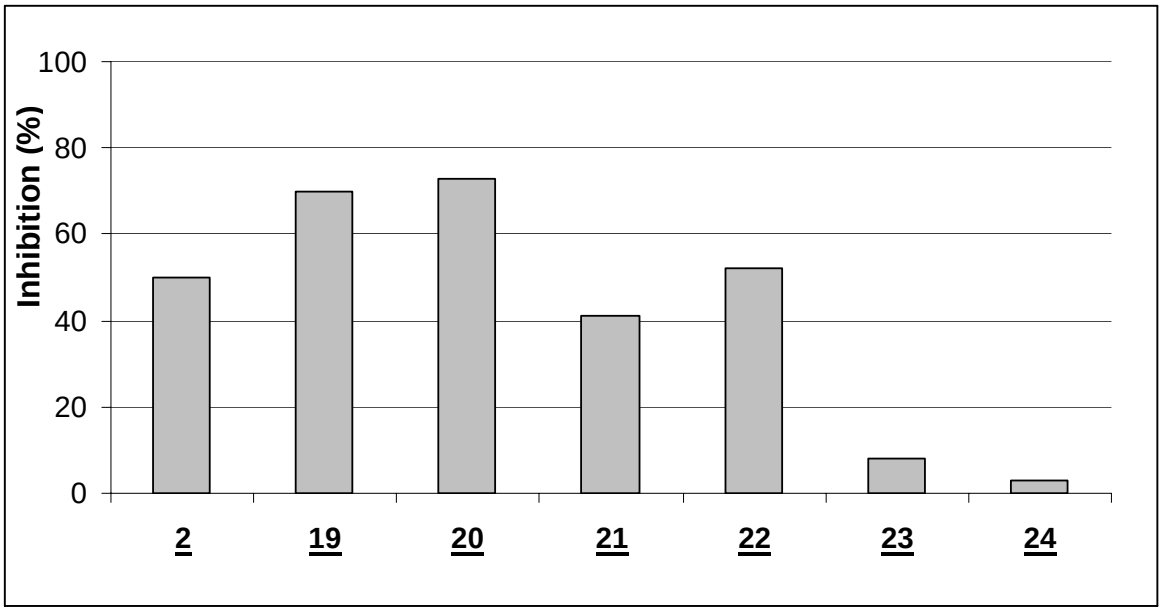
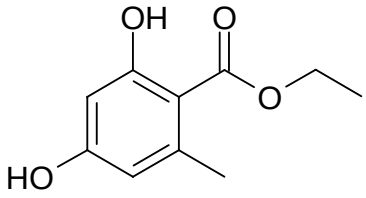
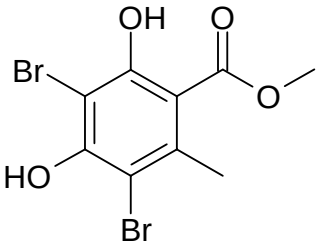


Abb. 44: Ergebnisse des Luciferase-Assays der synthetisierten Strukturvarianten der Atrarsäure (2) bei einer Konzentration von 10^{-6} M. 19 = Ethylatratat, 20 = Propylatratat, 21 = Isopropylatratat, 22 = Butylatratat, 23 = Geranylatratat, 24 = Hybrid aus 2 und 3 (Abb. 43).

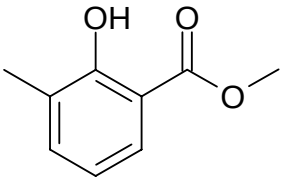
Neben den synthetisierten Strukturvarianten der Atrarsäure (2) wurden außerdem verschiedene im Handel erhältliche Referenzsubstanzen mit ähnlichen Strukturen auf ihre antiandrogene Wirkung getestet. Auch die freie Säure von 2, nämlich 2,4-Dihydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure (18) wurde dem Luciferase-Assay zugeführt, erwies sich aber als unwirksam. Aus den Ergebnissen sollten erste Hinweise auf bestehende Struktur-Wirkungsbeziehungen gewonnen werden (Abb. 45).



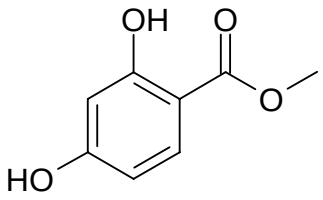
25



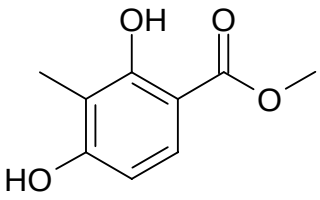
26



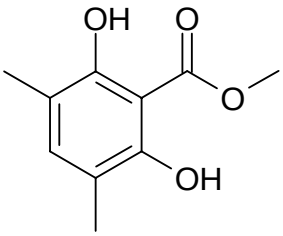
27



28



29



30

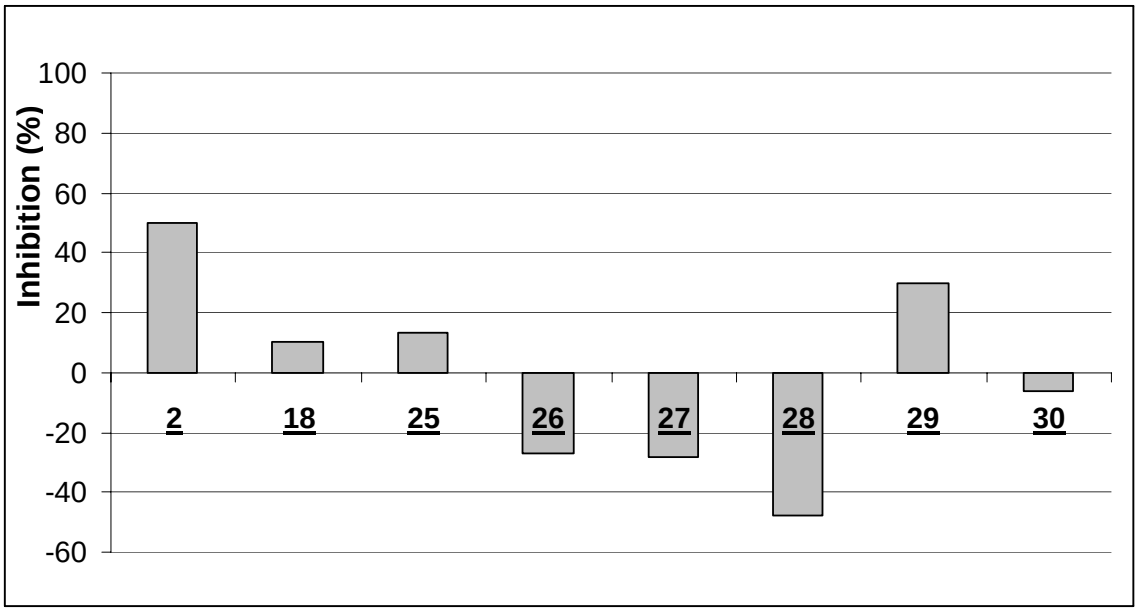


Abb. 45: Ergebnisse des Luciferase-Assays der Referenzsubstanzen, die mit Atrarsäure (2) strukturverwandt sind, bei einer Konzentration von 10^{-6} M. 29 zeigte eine Inhibition der Androgen induzierten Luciferase-Aktivität von 30%, ist also etwas weniger wirksam als 2. Die freie Säure 18 sowie 25, 26, 27, 28 und 30 sind nicht antiandrogen wirksam.

10.2.3. Struktur-Wirkungsbeziehungen der Atratate

Zunächst soll die Reihe der Strukturvarianten der Atrarsäure (2) betrachtet werden, die sich in der Ester-Gruppe von 2 unterscheiden (Abb. 43 und Abb. 44). Der Luciferase-Assay offenbarte für den Isopropyl- (21) und den Butyl-Ester (22) etwa gleiche antiandrogene Wirkungen wie für 2, nämlich eine Inhibition der Androgen induzierten Luciferase-Aktivität von ungefähr 50% bei einer Konzentration von 10^{-6} M.

Der Ethyl- (19) und der Propyl-Ester (20) dagegen zeigen Inhibitionen von über 70% bei gleicher Konzentration, so dass diese Varianten als etwas aktiver als 2 angesehen werden müssen.

23 und 24 weisen keine antiandrogene Aktivität auf. 24 hat mit 365 g/mol eine relativ hohe Molekularmasse, was die Permeation des Wirkstoffes erschwert.

Die Referenzsubstanzen 25 – 30 unterscheiden sich in ihrem Substitutionsmuster am Aromaten von 2 (Abb. 45). Lediglich 29 zeigt eine antiandrogene Aktivität bei 10^{-6} M von etwas geringerer Wirkstärke als 2. 29 unterscheidet sich von 2 durch das Fehlen der Methyl-Gruppe an Position 6. Diese Methyl-Gruppe am Aromaten scheint also nicht essentiell für die antiandrogene Wirkung der Atratate zu sein, alle anderen Substituenten von 2 hingegen schon.

Diese Ergebnisse bestätigen die Selektiviät des Testsystems und verdeutlichen, dass die Positionen der Methyl- und der Hydroxyl-Gruppen am Aromaten der Atrarsäure (2) eine Grundvoraussetzung für ihre antiandrogene Aktivität darstellen. Lediglich die Methyl-Gruppe in Position 6 ist verzichtbar. Für die Ester-Gruppe sind Ethyl- und Propyl-Rest optimal. Außerdem muss die Säure-Funktion verestert vorliegen, da die freie Säure 18 völlig unwirksam ist.

11. Rezeptorspezifität der Leitstrukturen

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zu der großen Familie der Steroidhormonrezeptoren. Die Rezeptoren dieser Familie verfügen über einen gemeinsamen modularen Aufbau (Kapitel 3.2., Theoretischer Teil). Zu den Steroidhormonrezeptoren gehören neben dem AR auch der Östradiolrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor (PR), der Glucocorticoidrezeptor (GR), der Mineralocorticoidrezeptor (MR), der Thyroidrezeptor (TR), der Vitamin D_3-Rezeptor (VDR3) und der Retinsäurerezeptor (RAR) [19,20].
Aufgrund des ähnlichen Aufbaus der Steroidhormonrezeptoren besteht die Möglichkeit, dass sowohl Agonisten als auch Antagonisten an einem dieser Rezeptoren auch an einen anderen Rezeptor der gleichen Familie binden können.
In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die beiden Leitstrukturen Atrarsäure (2) und NBBS (3) spezifisch den AR antagonisieren oder ob sie auch an andere Rezeptoren dieser Familie binden. Hierzu wurde die Rezeptorspezifität von 2 und 3 bestimmt.

11.1. Rezeptorspezifität von NBBS (3)

Die dem AR besonders nah verwandten Rezeptoren sind der Glucocorticoidrezeptor α (GRα) und die beiden Progesteronrezeptoren der A-Form (PRA) und der B-Form (PRB). Der Luciferase-Assay kann auch hier zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von NBBS (3) herangezogen werden. NBBS (3) wurde in drei Konzentrationen zusammen mit dem jeweils dem Rezeptor entsprechenden Hormon im Luciferase-Assay getestet. Zur Auswertung wurde die prozentuale Inhibition gegenüber einer Kontrolle berechnet, der nur reines Lösungsmittel zugesetzt wurde.

Außerdem wurde das Verhalten von NBBS (3) am weniger verwandten Thyroidhormonrezeptor β (TRβ) untersucht (Abb. 46, Abb. 47 und Abb. 48).

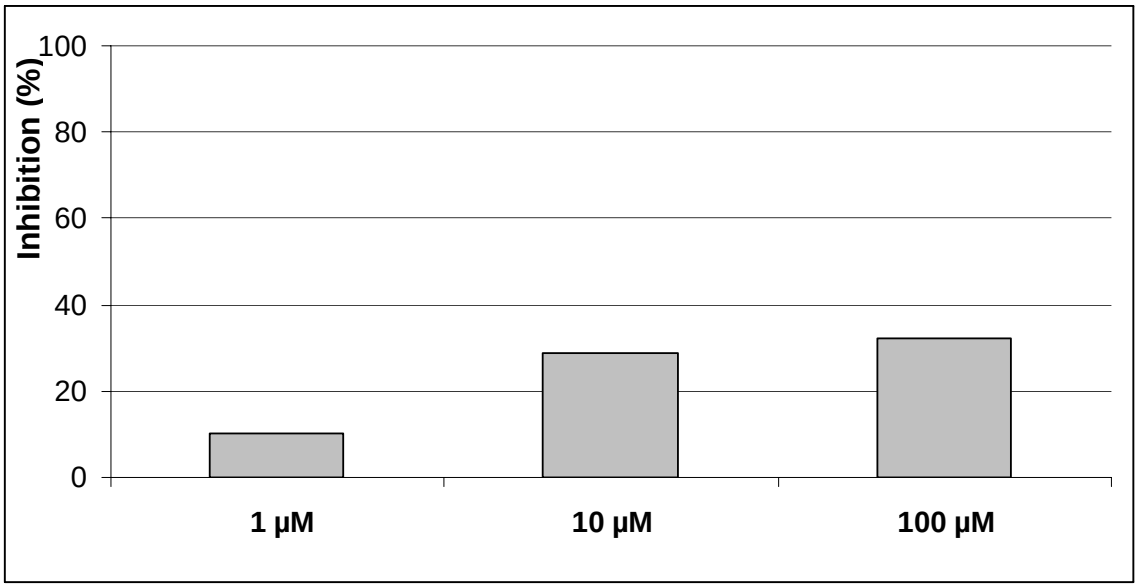


Abb. 46: Ergebnisse des Luciferase-Assays von NBBS (3) am Glucocorticoidrezeptor α.

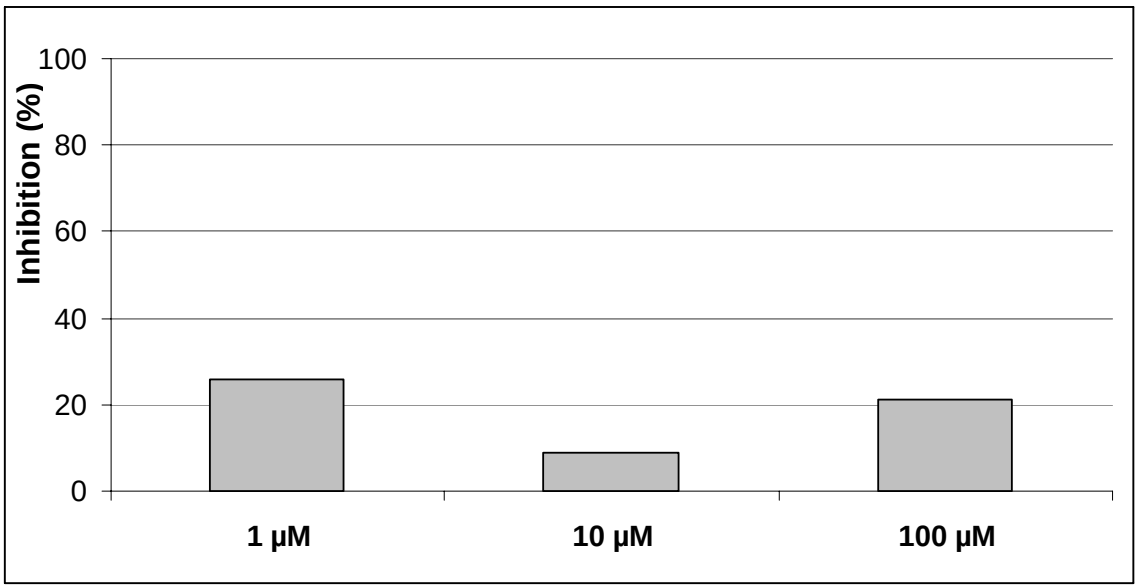


Abb. 47: Ergebnisse des Luciferase-Assays von NBBS (3) am Thyroidrezeptor β.

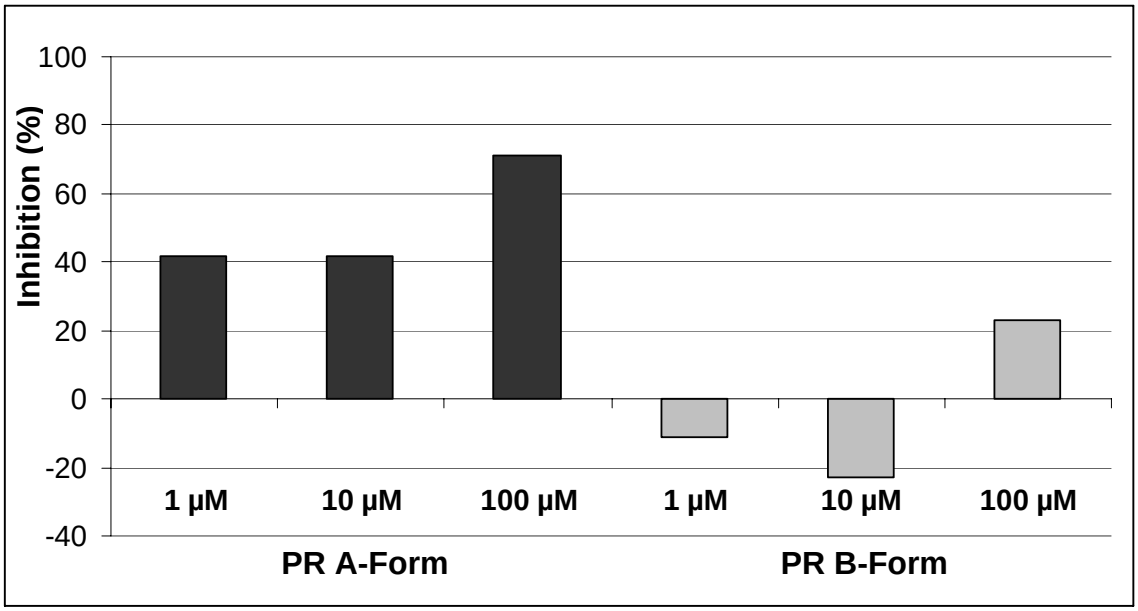


Abb. 48: Ergebnisse des Luciferase-Assays von NBBS (3) an den Progesteron-rezeptoren der A-Form und der B-Form.

Die Ergebnisse des Luciferase-Assays zeigen, dass NBBS (3) weder am Glucocorticoid-rezeptor α noch am Thyroidrezeptor β einen signifikanten Effekt ausübt.

Allerdings zeigt 3 am Progesteronrezeptor A eine starke antagonistische Aktivität bei einer Konzentration von 100 µM, während die PR B-Form wiederum nicht signifikant von 3 beeinflusst wird.

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse eine hohe Rezeptorspezifität von NBBS (3) am Androgenrezeptor und eine geringere Affinität zu dem Progesteronrezeptor A.

11.2. Rezeptorspezifität von Atrarsäure (2)

Die Rezeptorspezifität sollte nun auch für Atrarsäure (2) untersucht werden. Hierzu wurde 2 in zwei Konzentrationen zusammen mit dem entsprechenden Hormon im Assay getestet (Abb. 49).

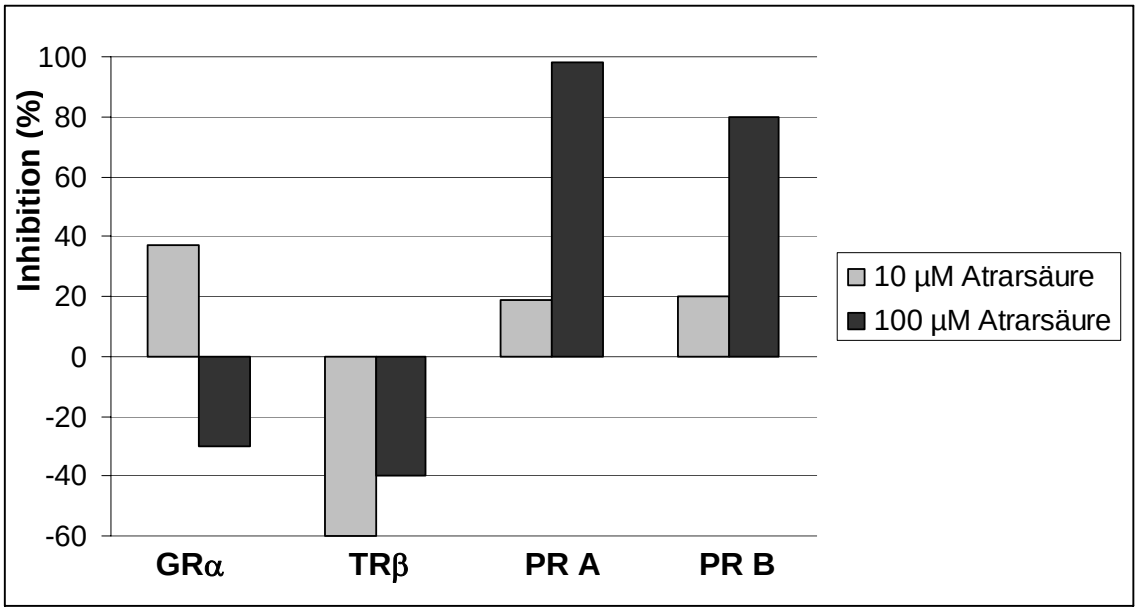


Abb. 49: Ergebnisse des Luciferase-Assays von Atrarsäure (2) am Glucocorticoid-rezeptor α (GRα), Thyroidrezeptor β (TRβ) und den beiden Progesteronrezeptoren der A-Form (PR A) und der B-Form (PR B).

Die Ergebnisse zeigen, dass Atrarsäure (2) keinen signifikanten Effekt am Glucocorticoidrezeptor α ausübt. Am Thyroidrezeptor β zeigt 2 eine agonistische Wirkung. Erstaunlicherweise ist der Effekt bei der höheren Konzentration von 100 µM weniger ausgeprägt als bei 10 µM, so dass dieser Effekt ebenfalls als nicht signifikant einzustufen ist.

2 zeigt an den Progesteronrezeptoren der A-Form und der B-Form eine signifikante antagonistische Wirkung, allerdings ist die Präferenz zu den Progesteronrezeptoren nicht so stark wie zum Androgenrezeptor. Bei einer Konzentration von 10 µM zeigte 2 am Androgenrezeptor eine Inhibition der Androgen induzierten Luciferase-Aktivität von 92% (Kapitel 8.6., Theoretischer Teil). An den Progesteronrezeptoren sind die antagonistischen Effekte erst bei 100 µM deutlich ausgeprägt.

12. Wachstumshemmung von Prostatakrebszellen durch Atrarsäure (2), NBBS (3) und 2-Hydroxyflutamid

Das Wachstum von Prostatakrebszellen wird im Anfangsstadium des Karzinoms von den Androgenen reguliert. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die Leitsubstanzen Atrarsäure (2) und NBBS (3) aufgrund ihrer antiandrogenen Eigenschaften tatsächlich in der Lage sind, das Wachstum von Prostatakrebszellen zu hemmen. Zu diesem Zweck wurden Prostatakrebszellen der Linie LNCaP mit 2, 3 und dem Antiandrogen 2-Hydroxyflutamid behandelt. Als Medium diente fetales Kälberserum (FCS), welches natürliche Androgene enthält (Abb. 50).

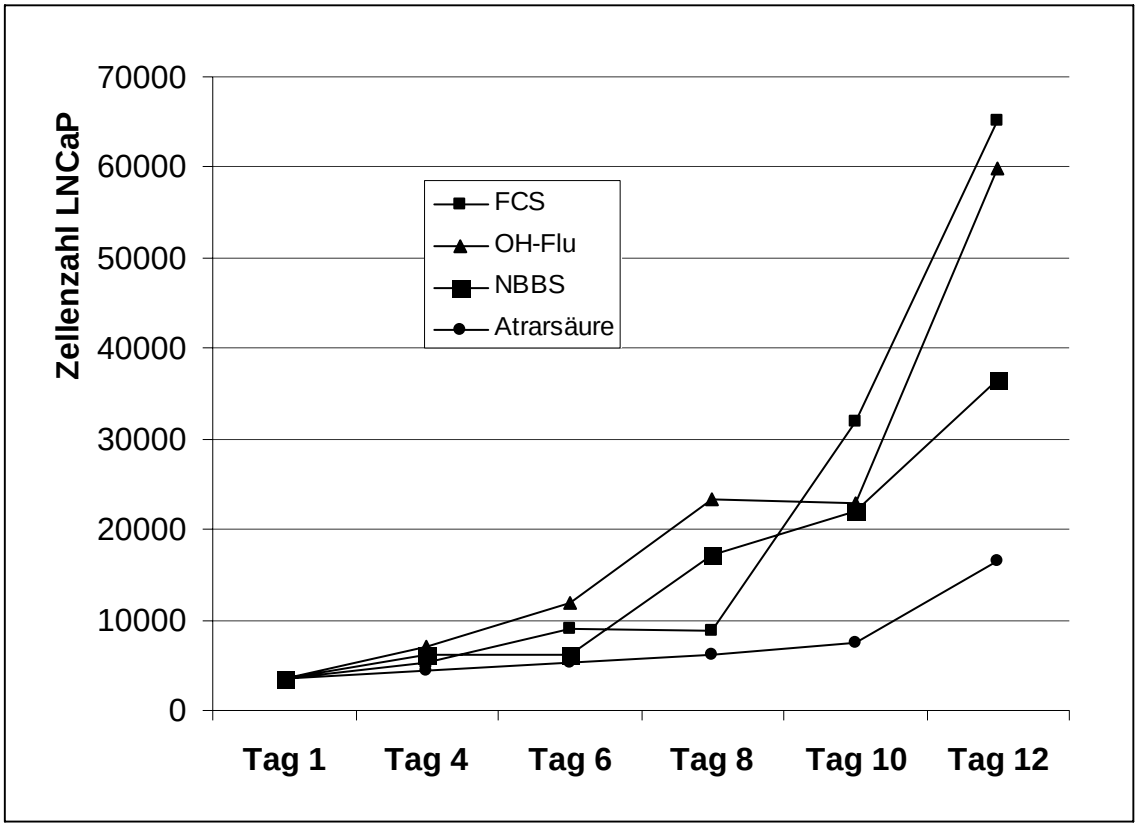


Abb. 50: Wachstumshemmung von humanen Prostatakrebszellen durch Atrarsäure (2) und NBBS (3) im direkten Vergleich mit dem Antiandrogen 2-Hydroxyflutamid (OH-Flu). FCS = Fetales Kälberserum; Blindwert ohne Zugabe eines Hemmstoffes.

Aus Abbildung 50 geht eindeutig hervor, dass sowohl Atrarsäure (2) als auch NBBS (3) in der Lage sind, das Wachstum der Prostatakrebszellen der Linie LNCaP im Vergleich zur Blindprobe zu hemmen. Bei 2 ist dieser Effekt am stärksten ausgeprägt, die Anzahl an Zellen betrug nur noch ein Viertel von dem Wert der Blindprobe am 12. Tag. 3 reduzierte die Zahl an LNCaP-Zellen auf 56% des Blindwertes an Tag 12.

Die Behandlung der LNCaP-Zellen mit 2-Hydroxyflutamid offenbarte keine signifikante Wachstumshemmung über den gesamten Zeitraum. Dies könnte daran liegen, dass LNCaP-Zellen eine Punktmutation in der Ligandenbindedomäne des Androgenrezeptors aufweisen, die die antiandrogene Wirkung von 2-Hydroxyflutamid verhindert [156].

Diese Ergebnisse zeigen also, dass die beiden Leitstrukturen Atrarsäure (2) und NBBS (3) das Wachstum von Prostatakrebszellen selbst mit mutiertem Androgenrezeptor deutlich hemmen können. Somit sind die beiden Substanzen besonders interessant für die Therapie des Prostatakarzinoms im fortgeschrittenen Stadium, wenn die Zellen mutieren und eine Therapieresistenz gegenüber herkömmlichen Antiandrogenen wie 2-Hydroxyflutamid eintritt. Dieses kann im fortgeschrittenen Stadium sogar agonistisch am AR wirken.

13. Zusammenfassung und Ausblick

Das Prostatakarzinom stellt die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern über 40 Jahren dar. Prostatakrebs führt in vielen Fällen zum Tode des Patienten, da nach einer gewissen Zeit der Behandlung eine Therapieresistenz gegenüber den herkömmlichen antiandrogen wirksamen Medikamenten eintritt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Auffindung von neuen nichtsteroidalen Antiandrogenen zur Behandlung des Prostatakarzinoms. Der Manifestierung eines Prostatakarzinoms geht häufig eine gutartige Vergrößerung der Prostata, eine benigne Prostatahyperplasie (BPH), voraus. Zur Behandlung der BPH sind zahlreiche Phytopharmaka auf dem deutschen und ausländischen Markt zugelassen. In dieser Arbeit wurden zunächst drei Pflanzen, die man traditionell zur Behandlung der mit dem Prostatakarzinom eng verknüpften BPH einsetzt, auf ihre antiandrogene Wirkung untersucht. Die antiandrogene Aktivität der Pflanzenextrakte konnte mittels eines Androgenrezeptor abhängigen Genexpressionsassays (Luciferase-Assay) von unserem Kooperationspartner am Genetischen Institut Gießen getestet werden. Von den drei untersuchten Pflanzen Sägepalme (Serenoa repens), Arzneikürbis (Cucurbita pepo) und afrikanischer Pflaumenbaum (Pygeum africanum) erwies sich letztere als äußerst wirksam und aus diesem Grund wurden selektive Extrakte aus der Rinde von Pygeum africanum hergestellt, die dann abermals dem Test auf antiandrogene Wirkung zugeführt wurden.

Der selektive Dichlormethanextrakt aus Pygeum africanum offenbarte eine besonders hohe antiandrogene Aktivität. Dieser wurde einer wirkungsorientierten Fraktionierung unterzogen, wobei eine präparative Gradientenextrographie als Vorfraktionierung auf Kieselgel diente. Die erhaltenen Fraktionen wurden abermals auf ihre antiandrogene

Wirkung untersucht. Die Aktivität beschränkte sich auf drei der gewonnenen 35 Extrographiefraktionen. Aus diesen wirksamen Fraktionen gelang schließlich die Isolierung von Benzoesäure (1), Atrarsäure (2) und *N*-Butylbenzolsulfonamid (NBBS, 3), die in dieser Arbeit ausführlich analytisch charakterisiert wurden.

Von den isolierten Verbindungen erwiesen sich Atrarsäure (2) und NBBS (3) als stark antiandrogen, weshalb sie als Leitstrukturen ausgewählt wurden. Diese wurden so lange organisch-präparativ abgewandelt, bis ein Optimum der Wirkstärke erreicht war. Dabei wurden nur einfache Synthesen in Betracht gezogen. Es konnten in dieser Arbeit vierzehn Sulfonamide und sechs Varianten der Atrarsäure (2) hergestellt werden. Diese Varianten wurden zusammen mit sieben weiteren mit Atrarsäure (2) strukturverwandten Referenzsubstanzen auf ihre antiandrogene Aktivität getestet, um erste Hinweise für Struktur-Wirkungsbeziehungen zu gewinnen.

Aus der Reihe der Sulfonamide konnte *N*-Butyl-4-nitro-3-trifluormethylbenzol-sulfonamid (16) als wirksamste Verbindung ausgewählt werden, die im Luciferase-Assay bei einer Konzentration von 1 µM eine Inhibition der Androgen induzierten Luciferase-Aktivität von 75% zeigte.

Bei den Strukturvarianten der Atrarsäure (2) konnte die Wirkstärke durch Umesterung von 2 zu seinem Ethyl- (19) und Propyl-Ester (20) ebenso deutlich gesteigert werden.

Die beiden Leitstrukuren Atrarsäure (2) und NBBS (3) wurden außerdem auf ihre Rezeptorspezifität hin untersucht. Hierzu bestimmte man die Affinität der Leitstrukturen zu anderen Steroidhormonrezeptoren. NBBS (3) zeigte hier bei sehr hoher Affinität zum Androgenrezeptor nur eine geringe Affinität zum Progesteronrezeptor A und keine Bindungsaffinität zu den anderen Steroidhormonrezeptoren, so dass diese Substanz als äußerst selektiv einzustufen ist. Atrarsäure (2) besitzt neben der hohen Bindungsaffinität

zum Androgenrezeptor bei höheren Konzentrationen auch eine geringe Präferenz zu den Progesteronrezeptoren A und B.

Darüber hinaus konnte eine Wachstumshemmung von Prostatakrebszellen der Linie LNCaP durch die beiden Leitstrukturen nachgewiesen werden. Sowohl Atrarsäure (2) als auch NBBS (3) sind in der Lage, das Wachstum der Krebszellen deutlich stärker zu hemmen als das herkömmlich zur Behandlung des Prostatakarzinoms eingesetzte 2-Hydroxyflutamid.

In dieser Arbeit konnten neue nichtsteroidale Antiandrogene natürlichen und synthetischen Ursprungs gefunden werden, die besonders für die Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms interessant sind. Im fortgeschrittenen Stadium tritt durch Mutation der Ligandenbindedomäne des Androgenrezeptors eine Therapieresistenz gegenüber herkömmlichen Arzneistoffen wie beispielsweise 2-Hydroxyflutamid ein, Atrarsäure (2) und NBBS (3) sind dann dennoch wirksam. Sie besitzen also einen anderen Wirkungsmechanismus.

Es wäre aufgrund der unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms äußerst interessant und lohnenswert, die Leitstrukturen und die optimierten Wirkstoffe im Xenograft-Modell zu testen. Besonders viel ist von der Atrarsäure (2) zu erhoffen, da sie als niedermolekualer Naturstoff mit erwartungsgemäß geringem toxischem Potential ein ideales Krebstherapeutikum verkörpern könnte.

Experimenteller Teil

1. Allgemeine Methoden und Materialien

1.1. Chromatographie

1.1.1. HPLC-Geräte

Analytische HPLC:

Pumpen:	Waters MSDS 600 E
	Waters MSDS 600
	Waters LC Module I plus
Controller:	Waters 600 E
	Waters 600
Detektoren:	Photodiodenarraydetektor Waters 991
	Photodiodenarraydetektor Waters 996
	ELSD Sedere Sedex 55
Injektionsventil:	Rheodyne 7125 (20 und 300 µl Dosierschleife)
Datenverarbeitung:	NEC Powermate 386/25 mit Waters 991 Software
	Waters MilleniumTM Chromatography Manager Version 2.15
Schreiber:	Graphikplotter Waters 5200

Präparative HPLC:

Pumpe:	Waters Prep LC 4000 System
Controller:	Waters 4000
Detektor:	Photodiodenarraydetektor Waters 990

Injektionsventil: Rheodyne 7010 (5 ml Dosierschleife)

Fraktionssammler: Gilson Abimed 201

Datenverarbeitung: NEC APC IV

Schreiber: Graphikplotter Waters 990

1.1.2. Übersicht über die verwendeten analytischen HPLC-Methoden

<table>
<tr><th>Nr.</th><th>Stationäre Phase</th><th>Mobile Phase</th><th>Fluss</th><th>Detektion</th></tr>
<tr><td>A1</td><td>Macherey – Nagel
Kieselgel Si 60,
15-25 µm in einer
Edelstahlkartusche
250 x 10 mm
Probenzone:
ca. 1 cm
Trennbett:
ca. 23 cm</td><td>A: n-Hexan / 0,1% TFA
B: Dichlormethan / 0,1% TFA
C: Methanol / 0,1% TFA
D: Wasser / 0,1% TFA
Gradient:
<table>
<tr><th>Zeit [min]</th><th>A [%]</th><th>B [%]</th><th>C [%]</th><th>D [%]</th></tr>
<tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>50</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>350</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>500</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>700</td><td>0</td><td>80</td><td>20</td><td>0</td></tr>
<tr><td>750</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>800</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr>
<tr><td>880</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr>
</table></td><td>1,0
ml/min</td><td>PDA:
λ = 245 nm
ELSD:
P = 2,2 bar,
T = 50°C</td></tr>
</table>

<table>
<tr><th>Nr.</th><th>Stationäre Phase</th><th>Mobile Phase</th><th>Fluss</th><th>Detektion</th></tr>
<tr><td>A2</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 4,6 mm</td><td>A: Acetonitril / 0,1% TFA
B: Wasser / 0,1% TFA
<table><tr><td>Zeit [min]</td><td>A [%]</td><td>B [%]</td></tr><tr><td>0</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>80</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>120</td><td>100</td><td>0</td></tr></table></td><td>1,3
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220, 254, 280 nm
ELSD:
P = 2,2 bar,
T = 50°C</td></tr>
<tr><td>A3</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 4,6 mm</td><td>A: Acetonitril / 0,1% TFA
B: Wasser / 0,1% TFA
Isokratisch: 50% A, 50% B</td><td>1,3
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
<tr><td>A4</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 4,6 mm</td><td>A: Methanol
B: Wasser / 0,1% TFA
Isokratisch: 72% A, 28% B</td><td>1,3
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
<tr><td>A5</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 4,6 mm</td><td>A: Methanol
B: Wasser / 0,1% TFA
Isokratisch: 70% A, 30% B</td><td>1,3
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
</table>

<table>
<tr><th>Nr.</th><th>Stationäre Phase</th><th>Mobile Phase</th><th>Fluss</th><th>Detektion</th></tr>
<tr><td>A6</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 4,6 mm</td><td>A: Methanol
B: Wasser / 0,1% TFA
Isokratisch: 75% A, 25% B</td><td>1,3
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
<tr><td>A7</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 4,6 mm</td><td>A: Methanol
B: Wasser / 0,1% TFA
<table><tr><th>Zeit [min]</th><th>A [%]</th><th>B [%]</th></tr><tr><td>0</td><td>75</td><td>25</td></tr><tr><td>20</td><td>75</td><td>25</td></tr><tr><td>25</td><td>100</td><td>0</td></tr></table></td><td>1,3
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
<tr><td>A8</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 4,6 mm</td><td>A: Methanol
B: Wasser / 0,1% TFA
Isokratisch: 60% A, 40% B</td><td>1,3
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
</table>

1.1.3. Übersicht über die verwendeten präparativen HPLC-Methoden

<table>
<tr><th>Nr.</th><th>Stationäre Phase</th><th>Mobile Phase</th><th>Fluss</th><th>Detektion</th></tr>
<tr><td>B1</td><td>Macherey – Nagel
Kieselgel Si 60, 15-25 µm in Prepbar®-Edelstahlkartusche (Merck)
400 x 100 mm
Probenzone:
ca. 1 cm
Trennbett:
ca. 35 cm</td><td>A: n-Hexan / 0,1% TFA
B: Dichlormethan / 0,1% TFA
C: Methanol / 0,1% TFA
D: Wasser / 0,1% TFA
Gradient:
<table>
<tr><th>Zeit [min]</th><th>A [%]</th><th>B [%]</th><th>C [%]</th><th>D [%]</th></tr>
<tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>50</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>350</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>500</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>700</td><td>0</td><td>80</td><td>20</td><td>0</td></tr>
<tr><td>750</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>800</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>850</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr>
<tr><td>885</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr>
</table></td><td>120,0
ml/min</td><td>PDA:
λ = 245 nm</td></tr>
</table>

<table>
<tr><th>Nr.</th><th>Stationäre Phase</th><th>Mobile Phase</th><th>Fluss</th><th>Detektion</th></tr>
<tr><td>B2</td><td>Macherey – Nagel
Kieselgel Si 60, 15-25 µm in Prepbar®-Edelstahlkartusche (Merck)
400 x 100 mm
Probenzone:
ca. 1 cm
Trennbett:
ca. 35 cm</td><td>A: n-Hexan / 0,1% TFA
B: Dichlormethan / 0,1% TFA
C: Methanol / 0,1% TFA
D: Wasser / 0,1% TFA
Gradient:
<table><tr><th>Zeit [min]</th><th>A [%]</th><th>B [%]</th><th>C [%]</th><th>D [%]</th></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>50</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>350</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>500</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>520</td><td>0</td><td>90</td><td>10</td><td>0</td></tr><tr><td>620</td><td>0</td><td>80</td><td>20</td><td>0</td></tr><tr><td>650</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>750</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr></table></td><td>120,0
ml/min</td><td>PDA:
λ = 245 nm</td></tr>
<tr><td>B3</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 21 mm</td><td>A: Acetonitril / 0,1% TFA
B: Wasser / 0,1% TFA
<table><tr><th>Zeit [min]</th><th>A [%]</th><th>B [%]</th></tr><tr><td>0</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>40</td><td>80</td><td>20</td></tr><tr><td>45</td><td>100</td><td>0</td></tr></table></td><td>22,0
ml/min</td><td>PDA:
λ = 210 nm</td></tr>
</table>

<table>
<tr><th>Nr.</th><th>Stationäre Phase</th><th>Mobile Phase</th><th>Fluss</th><th>Detektion</th></tr>
<tr><td>B4</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 21 mm</td><td>A: Acetonitril / 0,1% TFA
B: Wasser / 0,1% TFA
Isokratisch: 50% A, 50% B</td><td>22,0
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
<tr><td>B5</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 21 mm</td><td>A: Methanol
B: Wasser / 0,1% TFA
Isokratisch: 72% A, 28% B</td><td>22,0
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
<tr><td>B6</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 21 mm</td><td>A: Methanol
B: Wasser / 0,1% TFA
Isokratisch: 70% A, 30% B</td><td>22,0
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
<tr><td>B7</td><td>Macherey – Nagel
Nucleosil®
100-5-C-18HD,
5 µm, 250 x 21 mm</td><td>A: Methanol
B: Wasser / 0,1% TFA
<table><tr><th>Zeit [min]</th><th>A [%]</th><th>B [%]</th></tr><tr><td>0</td><td>75</td><td>25</td></tr><tr><td>20</td><td>75</td><td>25</td></tr><tr><td>25</td><td>100</td><td>0</td></tr></table></td><td>22,0
ml/min</td><td>PDA:
λ = 220 nm</td></tr>
</table>

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase	Fluss	Detektion
B8	Macherey – Nagel Nucleosil® 100-5-C-18HD, 5 µm, 250 x 21 mm	A: Acetonitril / 0,1% TFA B: Wasser / 0,1% TFA Isokratisch: 50% A, 50% B	22,0 ml/min	PDA: λ = 220 nm
B9	Macherey – Nagel Nucleosil® 100-5-C-18HD, 5 µm, 250 x 21 mm	A: Methanol B: Wasser / 0,1% TFA Isokratisch: 60% A, 40% B	22,0 ml/min	PDA: λ = 220 nm

1.1.4. Verwendete Lösungsmittel

Für analytische HPLC-Trennungen wurden Lösungsmittel der Firma Merck mit LiChrosolv®-Qualität verwendet. Präparative Trennungen wurden mit Lösungsmitteln der Qualität Prepsolv® von Merck durchgeführt. Die bei den extrographischen Trennungen eingesetzten Elutionsmittel *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol hatten die Qualität „reinst“ und waren über eine 80 cm lange Sattelfüllkörperkolonne destilliert.

Wasser für die HPLC wurde über eine mit demineralisiertem Wasser gespeiste Reinstwasseranlage Serapur PRO 90 C der Firma Seral mit Bakterien-Membranfilter Supor® DCF™ CHS92DE 0,2 µm Porenweite (Fa. Gelman Sciences) gewonnen. Die Leitfähigkeit des Wassers lag bei Entnahme unter 2 µS/cm.

1.2. Spektroskopie

1.2.1. NMR-Spektren

Die Aufnahmen der Kernresonanzspektren erfolgten mit dem Spektrometer JEOL® Eclipse+ 500 (^{1}H = 500 MHz). Die Werte der chemischen Verschiebung sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die δ-Skala. Die Kalibrierung erfolgte auf das Lösungsmittelsignal.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

s = Singulett	d = Dublett	t = Triplett
q = Quartett	m = Multiplett	br = breites Signal

Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit dem Programm Delta V 4.1 der Firma Jeol. Die Abschätzung der chemischen Verschiebung (^{13}C-Daten) der gemessenen Spektren erfolgte anhand einer Datenbank über das Internet (*http://www.nmrshift.db.org*).

Die Kopplungskonstanten sind in Hertz angegeben und wie folgt gekennzeichnet:

^{1}J = direkte Kopplung, ^{2}J = geminale Kopplung, ^{3}J = vicinale Kopplung

Nachfolgend sind die Abkürzungen der zum Einsatz gekommenen NMR-Experimente aufgelistet:

^{1}H-NMR	vollständig gekoppeltes ^{1}H-Kernresonanzspektrum
^{13}C-NMR	breitbandentkoppeltes ^{13}C-Kernresonanzspektrum
COSY	**Co**rrelation **S**pectroscop**y**
HMQC	**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence
HMBC	**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation

1.2.2. Massenspektrometrische Feinbestimmungen

ESI-Spektren:

ESI-Spektren wurden mit einem doppelfokussierenden (EBE-Geometrie) Autospec-Massenspektrometer der Firma Micromass aufgenommen.

EI-Spektren:

Die EI-Messungen erfolgten mit einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer VG 7070 H der Firma Vacuum Generators bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV.

Hochaufgelöste Massenspektren:

Zur Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren diente das Massenspektrometer Autospec der Firma Micromass (HR-EI-MS), die Ionisierungsenergie betrug 70 eV.

LC-MS-Messungen:

LC-MS-Messungen wurden mit einem Quadrupol-Particle-Beam-Massenspektrometer MD 800 der Firma Fisoms durchgeführt, das mit einem Waters LC Module I Plus mit variablem und integriertem Autosampler gekoppelt wurde. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software MassLab Version 1.3. Bei LC-EI-MS-Messungen wurde eine Ionisierungsenergie von 70 eV verwendet.

Bei den Massenspektren sind die intensitätsstärksten sowie charakteristische Fragmentionen angegeben. In Klammern stehen die Intensitäten der Peaks in Prozent bezogen auf den Basispeak.

1.2.3. Elektronenspektren

Die Aufnahmen der UV-Spektren erfolgten mit dem UV-VIS-Photometer UV-2101 PC der Firma Shimadzu sowie den Photodiodenarraysystemen 991 und 996 von Waters im jeweiligen HPLC-Fließmittel. Die Photodiodenarrayspektren wurden mit einer Auflösung von 1 nm aufgenommen.

1.2.4. Infrarotspektren

Die IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Typ 510P von Nicolet aufgenommen. Die Lage der charakteristischen Absorptionsbanden ist in cm^{-1} angegeben. Alle Proben wurden als KBr-Pressling in einer Konzentration von ca. 1% (m/m) vermessen.

1.2.5. Schmelztemperaturen

Die Schmelztemperaturen der Feststoffe wurden mit einem Heitztischmikroskop HM-LUX von Leitz ermittelt und sind unkorrigiert in °C wiedergegeben.

1.3. Chemikalien für die Synthesen

Die eingesetzten Chemikalien wie Edukte und Lösungsmittel für die Synthesen wurden von den Firmen Aldrich, Lancaster, Merck, Fluorochem, ABCR und Acros Organics bezogen und hatten p.a. Qualität.

1.4. Zellkulturen und Assays

Die pharmakologischen in vitro-Untersuchungen wurden am Genetischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Aria Baniahmad von Maria Papaioannou durchgeführt.

1.4.1. Chemikalien und Hormone

Dexamethason, Progesteron, 3,5,3´-Triiodothyronin (T3) und Dihydrotestosteron wurden von Sigma bezogen und Methyltrienolon (R1881) von Perkin Elmer. Alle getesteten Substanzen wurden in Ethanol und/oder Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, mit Ausnahme von T3, welches in 50 mM NaOH gelöst wurde. Die Substanzen wurden dem Kulturmedium in einer Menge hinzugegeben, dass die finale Konzentration von Ethanol und/oder DMSO 0,1% nicht überschritt. Zu jedem Test wurde eine Kontrolle durchgeführt, bei welcher dem Kulturmedium nur 0,1% Ethanol und/oder DMSO zugeführt wurde.

1.4.2. Zellkultur und Reporter-Assay

Die humanen Prostatakrebszellen der Linie LNCaP wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert, unter Hinzugabe von 10% (V/V) fetalem Kälberserum (FCS; Invitrogen), Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100 IU/ml) (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen) und 1 mM Natriumpyruvat (Sigma). Affennieren-CV1 Zellen ohne endogenen funktionellen AR, GR, PR und TR wurden aus **D**ulbecco´s **m**odifiziertem **E**agle´s **M**edium (DMEM) gewonnen, unter Hinzugabe von 10% (V/V) fetalem

Kälberserum, Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100 IU/ml) bei 37°C und 5% CO_2.

Das Plasmid pMMTV-luc (MMTV = **M**ouse **m**ammary **t**umor **v**irus = Mäuse Mammakarzinom Virus) enthält das Luciferase-Reportergen und das Androgen responsive Element (ARE) und ist in [106] beschrieben.

Der Expressionsvektor für den humanen AR, pSG-hAR ist in [104] charakterisiert. Das Plasmid (DR4)2-tk-luc wird in [157] beschrieben, das Plasmid für den humanen GR ist in [158] geschildert. Das Plasmid für den humanen TRβ ist schließlich in [159] charakterisiert. Die humanen PR1- und PR2-Expressionsvektoren wurden freundlicherweise von Pierre Chambon (Strassburg) bereitgestellt.

Für die Transfektionen wurden die CV1-Zellen in 6-Well-Platten (Nunc) zu $1{,}2 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät. Die Inkubation erfolgte in DMEM mit 10% (V/V) „dextran-coated charcoal stripped serum“ [105]. Nach sechs Stunden erfolgte die Transfektion mit $Ca_3(PO_4)_2$ [104]. Die DNA-Mischung für Transfektionen bestand aus 1 µg des entsprechenden Luciferase-Reporter-Konstrukts, 0,2 µg des Expressionsvektors des entsprechenden Steroidrezeptors und 0,2 µg des **C**yto**m**egalie**v**irus (CMV)-gelenkten β-Galactosidase Expressionsvektors als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz. Nach 14 Stunden wurde das Medium ausgewechselt, mit und ohne Zugabe der entsprechenden Hormone und den Testsubstanzen. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und es folgte der Assay für die Luciferase- und die β-Galactosidase-Aktivität.

Alle Transfektions-Assays wurden in doppelter Ausführung durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt.

1.4.3. Wachstumshemmung

Für die Zellwachstum-Assays wurden LNCaP-Zellen in 24-Well-Platten (Nunc) zu $5x10^3$ Zellen pro Well ausgesät. Als Medium diente RPMI-1640 Medium mit 5% FCS. Am zweiten Tag wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und mit Ethanol/DMSO oder den entsprechenden Testsubstanzen in Ethanol und/oder DMSO behandelt. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt und die Substanzen frisch hinzugegeben. Die Zellen wurden mit Trypsin lysiert und mit einer Zell-Zählkammer (Double Neubauer) jeden zweiten Tag ausgezählt.

2. Extraktherstellung

2.1. Selektive Extrakte aus Pygeum

Ansatz I:

Als Pflanzenmaterial für die Herstellung der Pygeum-Extrakte diente die pulverisierte Rinde von Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. der Firma Euromed in Barcelona, Spanien (Charge: 8438, Gebinde: 1/02, Analysennummer: 020796).

Etwa 3 kg dieser pulverisierten Rindendroge wurden durch ein Haushaltsmetallsieb mit der Maschenweite 1 mm gesiebt. 1,726 kg des Siebdurchgangs wurden in Portionen zu jeweils 300 g mit 1 l *n*-Hexan in einen 4-l-Rundkolben gegeben und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel KG, Typ T45, 10000 U/min) unter Eiskühlung und Abdunklung des Ansatzes weiter zerkleinert.

Das so erhaltene Homogenisat wurde in ein beidseitig mit Stahlfritten (Rückhaltevermögen 2 µm) verschlossene Edelstahlkartusche (Prepbar® von Merck,

400 x 100 mm, Volumen ca. 3,15 l) gefüllt und von unten nach oben mit Elutionsmitteln steigender Polarität mittels einer HPLC-Pumpe erschöpfend extrahiert. Die Elutionsmittel Methanol, Methanol-Wasser und Wasser wurden von oben nach unten durch die Säule gepumpt. Der Fluss lag bei maximal 10,0 ml/min. Die resultierenden selektiven Extrakte wurden unter vermindertem Druck bei 30°C zur Trockne eingeengt.

Der auf diese Weise erhaltene selektive Dichlormethanextrakt erhielt die Bezeichnung X1 (vgl. Kapitel 9.1., Theoretischer Teil).

Elutionsmittel	**Durchflussvolumen [l]**	**Ausbeute [g]**	**Ausbeute [% der eingesetzten Drogenmenge]**
n-Hexan	25	4,80	0,28
Dichlormethan	26	11,03	0,64
Methanol	23	116,81	6,77
Methanol/Wasser (50/50)	29	49,40	2,86
Wasser	12,5	7,00	0,41
Gesamt	115,5	189,04	10,96

Ansatz II:

3,108 kg der gesiebten Rindendroge von Pygeum africanum wurden in Portionen zu jeweils 300 g mit 1 l *n*-Hexan in einen 4-l-Rundkolben gegeben und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel KG, Typ T45, 10000 U/min) unter Eiskühlung und Abdunklung des Ansatzes weiter zerkleinert. Das resultierende Homogenisat wurde in ein beidseitig mit Stahlfritten (2 µm) verschlossenes Stahlrohr (bestehend aus zwei

miteinander verbundenen Prepbar-Edelstahlkartuschen der Firma Merck mit den jeweiligen Abmessungen 400 x 100 mm, Gesamtvolumen ca. 6,3 l; verbleibender Hohlraum wurde mit einem Teflonklotz ausgefüllt) gefüllt und von unten nach oben mit Elutionsmitteln steigender Polarität mittels einer HPLC-Pumpe erschöpfend extrahiert (maximaler Fluss 10,0 ml/min). Die so erhaltenen selektiven Extrakte aus *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol wurden unter vermindertem Druck bei 30°C zur Trockne eingeengt.

Der auf diese Weise erhaltene selektive Dichlormethanextrakt erhielt die Bezeichnung X2 (vgl. Kapitel 9.1., Theoretischer Teil).

Elutionsmittel	**Durchflussvolumen [l]**	**Ausbeute [g]**	**Ausbeute [% der eingesetzten Drogenmenge]**
n-Hexan	20,4	6,50	0,29
Dichlormethan	47,6	28,94	0,93
Methanol	21,3	200,40	6,45
Gesamt	89,3	235,84	7,67

Ansatz III:

340 g der gesiebten Rindendroge von Pygeum africanum wurden mit 1,3 l *n*-Hexan in einen 4-l-Rundkolben gegeben und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel KG, Typ T45, 10000 U/min) unter Eiskühlung und Abdunklung des Ansatzes weiter zerkleinert. Das erhaltene Homogenisat wurde über einen Büchner-Trichter mit einem Papierfilter (Maschenweite 4 – 7 µm) filtriert. Nach wiederholter Extraktion der Droge mit weiteren 1,4 l *n*-Hexan in zwei Portionen wurde abermals filtriert und die Hexanextrakte vereinigt. Der Drogenrückstand wurde dann mit 2 l Dichlormethan 60

Min. gerührt und anschließend erfolgte die Filtration (Büchner-Trichter, Papierfilter 4 – 7 µm). Dieser Vorgang wurde mit weiteren 1,7 l Dichlormethan in drei Portionen wiederholt und die resultierenden Extrakte vereinigt. Die so erhaltenen selektiven Extrakte aus *n*-Hexan und Dichlormethan wurden unter vermindertem Druck bei 30°C zur Trockne eingeengt.

Der auf diese Weise erhaltene selektive Dichlormethanextrakt erhielt die Bezeichnung X3 (vgl. Kapitel 9.1., Theoretischer Teil).

Elutionsmittel	**Durchflussvolumen [l]**	**Ausbeute [g]**	**Ausbeute [% der eingesetzten Drogenmenge]**
n-Hexan	2,7	0,531	0,16
Dichlormethan	3,7	0,898	0,26

Chloroformextrakt (nicht selektiv):

11,66 g der gesiebten Rindendroge von Pygeum africanum wurden mit 150 ml Chloroform in einen 500 ml-Rundkolben gegeben und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel KG, Typ T45, 10000 U/min) weiter zerkleinert. Nach Filtration (Faltenfilter aus Papier, 4 – 7 µm) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 30°C am Rotavapor entfernt (Ausbeute: 61 mg).

2.2. Ethanolischer Gesamtextrakt aus Pygeum

300 g der gesiebten Rindendroge von Pygeum africanum wurden mit 1 l absolutem Ethanol in einen 4-l-Rundkolben gegeben und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel KG, Typ T45, 10000 U/min) unter Eiskühlung und Abdunklung des Ansatzes weiter zerkleinert. Nach Filtration (Glasfaserfilter, Maschenweite 0,7 µm)

wurde der Vorgang viermal mit je 1 l Ethanol wiederholt. Die Extrakte wurden vereinigt und unter vermindertem Druck bei 30°C zur Trockne eingeengt.

Elutionsmittel	Durchflussvolumen [l]	Ausbeute [g]	Ausbeute [% der eingesetzten Drogenmenge]
Ethanol	5,0	16	5,33

2.3. Extrakt aus Serenoa repens

34,264 g eines Fluidextraktes (40%) aus Sägepalmfrüchten der Firma Caelo wurden unter vermindertem Druck bei 30°C zur Trockne eingeengt (Extract. Sabalae serrulat. Fluid. (40%) 1:2, Art. G108C, Ch.B. 91553437). Die Ausbeute betrug 3,09 g.

2.4. Extrakt aus Cucurbita pepo

15 g Kürbissamen wurden mit einer handelsüblichen elektrischen Kaffeemühle (Tchibo – Aroma Garant, Nr. 46351) gemahlen und in 500 ml absolutem Ethanol mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel KG, Typ T45, 10000 U/min) unter Eiskühlung und Abdunklung des Ansatzes weiter zerkleinert. Nach Filtration (Glasfaserfilter, Maschenweite 0,7 µm) wurde der Extrakt unter vermindertem Druck bei 30°C zur Trockne eingeengt. Die Ausbeute betrug 7,00 g.

2.5. Luciferase-Assay der Extrakte

Extrakt	**Konzen-tration [µg/ml]**	**RLU** Ohne Hormon	**RLU** Mit Hormon	**RLU_0** Blindwert	**Inhibition [%]**
PA Hex	300	232	12317	11909	-3
PA Hex	600	230	9276	11909	22
PA DM	300	295	13533	11909	-14
PA DM	600	76	2497	11909	79
PA Me	600	11671	169933	246014	31
PA Me-H_2O	600	10161	167323	246014	32
PA H_2O	600	13310	255457	246014	-4
PA Et	300	272	11136	11909	6
PA Et	600	183	5418	11909	55
Sab	300	212	20847	11909	-75
Sab	600	167	7450	11909	37
Kür	300	1041	73544	119639	39
Kür	600	2717	153707	119639	-28

PA = Pygeum africanum; Hex = Hexan; DM = Dichlormethan; Me = Methanol; H_2O = Wasser; Et = Ethanol; Sab = Sabalfrüchte; Kür = Kürbissamen

RLU = relative light units = Einheit der gemessenen Lichtemission; Mittelwert

$Inhibition_x$ (%) = 100 x ($RLU_0 - RLU_x / RLU_0$)

3. Gradientenextrographie des selektiven Dichlormethanextraktes

Zur Durchführung der Gradientenextrographie fanden die selektiven Dichlormethanextrakte aus Pygeum africanum X1 und X2 Verwendung. Die Herstellung der Extrakte ist in Kapitel 2.1. des Experimentellen Teils unter Ansatz I und Ansatz II beschrieben.

3.1. Analytische Entwicklung einer geeigneten extrographischen Methode

500 mg des selektiven Dichlormethanextraktes wurden in 40 ml Dichlormethan gelöst. Die klare Lösung wurde dann mit 2,5 g Kieselgel (Merck Si60, 0,063 – 0,200 mm) versetzt und unter permanentem Drehen des Kolbens im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde das Dichlormethan langsam unter vermindertem Druck und bei 30°C am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück blieb ein trockenes, rieselfähiges Material, bei welchem der Extrakt im Verhältnis 1:5 zum Kieselgel aufgezogen war.

Für die analytische Entwicklung der Gradientenextrographie wurden jeweils 100 mg des aufgezogenen Extraktes in eine Edelstahlkartusche (250 x 10 mm) überführt. Es schloß sich das Trennbett aus reinem Kieselgel (Macherey – Nagel Si60, 15 – 25 µm) an. Das reine Kieselgel wurde schichtweise durch Anpressen mit einem geeigneten Stampfwerkzeug verdichtet.

Vor Beginn der Chromatographie wurde die Säule entgegen der Flussrichtung mit *n*-Hexan (0,1% TFA) geflutet, bis keine Luftblasen mehr aus der offenen Säule austraten.

Nach mehrmaliger Durchführung der hier beschriebenen Extrographie mit unterschiedlichen Gradienten wurde ein optimierter Gradient (Methode **A1**, Kapitel

1.1.3., Experimenteller Teil) ermittelt, der bei den präparativen Gradienten-extrographien angewendet wurde.

3.2. Präparative Durchführung der Gradientenextrographie

Zum Aufziehen des Extraktes wurden 8,8 g des selektiven Dichlormethanextraktes X1 in 2 l Dichlormethan gelöst und auf 25 g Kieselgel (Merck Si60, 0,063 – 0,200 mm) aufgezogen (Extrographie 1 = **E1**, Methode **B1**, Kapitel 1.1.3., Theoretischer Teil).

Für die Extrogrphie 2 (**E2**) wurden 21,6 g des selektiven Dichlormethanextraktes X2 in 8 l Dichlormethan gelöst und auf 108 g Kieselgel aufgezogen (Methode **B2**, Kapitel 1.1.3., Theoretischer Teil).

Der aufgezogene Extrakt wurde in eine modifizierte Edelstahlkartusche (Merck Prepbar® 400 x 100 mm) mit variablem Säulenkopf gegeben, die zuvor mit feinem Kieselgel (Macherey – Nagel Si60, 15 – 25 µm) befüllt worden war. Am oberen und am unteren Ende der Säule wurden Stahlfritten und Glasfaserfilter (0,7 µm) eingelassen, um das Austreten von Feinanteilen des Kieselgels zu verhindern.

Das Befüllen der Säule erfolgte in Analogie zu den analytischen Ansätzen mit einem geeigneten Stampfwerkzeug. Zusätzlich wurde am unteren Ausgang der Kartusche mit einer 4-Kammer-Membranpumpe ein Unterdruck angelegt, um eine homogene Kieselgelpackung zu erhalten und das Austreten von fein homogenisiertem Kieselgel zu vermeiden.

Die Säule wurde bis etwa 3 cm unter ihren Rand befüllt, dann folgte eine schmale Schicht aus feinem Seesand. Der variable Säulenkopf wurde eingesetzt, verschlossen und seine Eintauchtiefe auf etwa 5 cm justiert.

Die Säule wurde vor Beginn der Extrographie entgegen der späteren Flussrichtung mit *n*-Hexan (0,1% TFA) geflutet, bis keine Luftblasen mehr aus der offenen Säule austraten. Das dabei aufgefangene Eluat wurde mit Fraktion F01 vereinigt.

Die Flussrate wurde innerhalb von 15 Minuten langsam auf den Endwert 120 ml/min gesteigert.

Das Fraktionierungsschema der präparativen Extrographie **E1** ist in Abb. 11, Kapitel 7.1.2. des Theoretischen Teils dargestellt.

Fraktionierungsschema der Extrographie **E2**:

Fraktion	**Zeit(Min)**	**Masse(mg)**	**Fraktion**	**Zeit(Min)**	**Masse(mg)**
G01	0-132	2	G14	442-465	238
G02	133-163	16	G15	466-482	32
G03	164-197	43	G16	483-500	18
G04	198-244	57	G17	501-510	110
G05	245-257	32	G18	511-552	4270
G06	258-278	86	G19	553-560	3710
G07	279-286	59	G20	561-566	3090
G08	287-306	62	G21	567-585	3450
G09	307-329	70	G22	586-607	1920
G10	330-345	75	G23	608-631	2650
G11	346-386	409	G24	632-652	300
G12	387-430	191	G25	653-750	710
G13	431-441	188			

3.3. Luciferase-Assay der Extrographiefraktionen

Fraktion von E1	**Konzen-tration [µg/ml]**	**RLU** Ohne Hormon	**RLU** Mit Hormon	**RLU_0** Blindwert	**Inhibition [%]**
F02	30	1272	56624*	25276	-124
F03	30	2238	54800*	25276	-116
F04	30	2460	64284*	25276	-154
F05	30	2591	44549	25276	-76
F06	30	16249	228121	339255	33
F06	60	18392	144344	339255	57
F07	30	12909	133768	339255	61
F07	60	14502	44866	339255	87
F08	30	12624	153797	339255	55
F08	60	10932	98546	339255	71
F09	30	7247	255059	339255	25
F09	60	6797	205630	339255	39
F10	30	1358	27463	25276	-9
F11	30	1311	30963	25276	-22
F12	30	1226	32803*	25276	30
F13	60	1851	20531	29491*	30
F14	60	2536	20998	29491*	29
F15	60	3666	32169	29491*	-9
F16	60	1205	12256	29491*	58

Fraktion von E1	**Konzen-tration [µg/ml]**	**RLU** Ohne Hormon	**RLU** Mit Hormon	**RLU_0** Blindwert	**Inhibition [%]**
F17	60	1218	27405	29491*	7
F18	60	767	17860*	29491*	39
F19	60	846	23684	29491*	20
F20	60	745	22367	29491*	24
F21	60	618	31412	29491*	-7
F22	60	666	25221	29491*	14
F23	60	461	31300	29491*	-6
F24	60	491	25537	29491*	13
F25	60	661	28377	29491*	4
F26	60	587	26789	29491*	9
F27+28	60	546	26869	29491*	9
F29	60	580	29167	29491*	1
F30	60	518	25547	29491*	13
F31	60	767	30150	29491*	-2
F32	60	532	14697*	29491*	50
F34	60	908	19707	29491*	33

RLU = relative light units = Einheit der gemessenen Lichtemission; Mittelwert

$Inhibition_x$ (%) = 100 x ($RLU_0 – RLU_x$ / RLU_0)

* = relative Standardabweichung > 20%

4. Isolierung von Substanzen aus den Extrographiefraktionen

Benzoesäure (1) sublimierte beim Abrotieren des Lösungsmittels aus Fraktion F12 und resublimierte am oberen Kolbenrand in der typischen Kristallform. Außerdem wurde 1 aus Fraktion F08 der Extrographie **E1** mit Methode **B3** isoliert (24 mg).

Atrarsäure (2) wurde aus der Fraktionen F08 der Extrographie **E1** isoliert (Methode **B3**, 4 mg) und außerdem aus den Fraktionen G8, G9 und G10 der Extrographie **E2** (Methode **B3**, 6 mg).

NBBS (3) konnte ebenso aus F08 (Methode **B3**, 10 mg) und G8, G9 und G10 (Methode **B3**, 15 mg) isoliert werden.

Zur Durchführung der präparativen Trennungen (Methode **B3**) wurden die Fraktionen in einer Konzentration von 10 mg/ml in dem Lösungsmittelgemisch der chromatographischen Anfangsbedingungen gelöst (20% Acetonitril, 80% Wasser), über HPLC-Filter (0,45 µm) filtriert und in Mengen zu jeweils 4-5 ml getrennt.

Eine detaillierte Charakterisierung der Verbindungen befindet sich in Kapitel 5 des Theoretischen Teils.

4.1. Luciferase-Assay der isolierten und synthetisierten Substanzen

Substanz	**Konzen-tration**	**RLU** Ohne Hormon	**RLU** Mit Hormon	**RLU_0** Blindwert	**Inhibition [%]**
P5 = 1	30 µg/ml	2924	121078	85993	-41
P3	30 µg/ml	2685	105937	85993	-23
P7	30 µg/ml	1958	88331	85993	-3
P9 = 2	30 µg/ml	2036	36088	85993	58
P10 = 3	30 µg/ml	2002	13118	85993	85
β-Sitosterol	10^{-5} M	1454	66085	85993	23
Ursolsäure	10^{-5} M	1220	73406	85993	15
Oleanolsäure	10^{-5} M	1094	41774	23145	-80
Ferulasäure	10^{-5} M	1204	39813	23145	-72
2	10^{-4} M	1234	1234	16963	92
2	10^{-5} M	546	1518	16963	91
2	10^{-6} M	546	9870	16963	42
2	10^{-7} M	806	15682	16963	7
2	10^{-8} M	688	16394	16963	4
4	10^{-5} M	2683	69848	89250	15
5	10^{-5} M	1434	52179	89250	37
6	10^{-5} M	533	31729	31729	40*
7	10^{-5} M	912	9501	92076	82*
8	10^{-6} M	6762	382685	414655	7

Substanz	**Konzen-tration**	**RLU** Ohne Hormon	**RLU** Mit Hormon	**RLU_0** Blindwert	**Inhibition [%]**
9	10^{-5} M	104	9010	31523	91*
10	10^{-5} M	746	27761	31523	63*
11	10^{-5} M	489	25587	31523	47*
12	10^{-5} M	569	38898	31523	31*
13	10^{-5} M	722	35732	31523	50*
14	10^{-6} M	1448	49224	92076	39*
15	10^{-6} M	1229	34645	92076	50*
16	10^{-6} M	1519	22666	92076	73*
17	10^{-6} M	1549	84241	92076	3*
18	10^{-6} M	759	20090	22403	10
19	10^{-6} M	11542	140428	435846	70*
20	10^{-6} M	12144	127867	435846	73*
21	10^{-6} M	686	22385	92016	41*
22	10^{-6} M	13699	262713	435846	52*
23	10^{-6} M	11929	484743	414655	8*
24	10^{-6} M	12401	482617	435846	3*
25	10^{-6} M	939	19440	22403	13
26	10^{-6} M	939	28509	22403	-27
27	10^{-6} M	1337	28690	22403	-28
28	10^{-6} M	1156	33279	22403	-48

Substanz	**Konzen-tration**	**RLU** Ohne Hormon	**RLU** Mit Hormon	**RLU_0** Blindwert	**Inhibition [%]**
29	10^{-6} M	1155	15682	22403	30
30	10^{-6} M	1734	23921	22403	-6

RLU = relative light units = Einheit der gemessenen Lichtemission; Mittelwert

$Inhibition_x$ (%) = 100 x (RLU_0 – RLU_x / RLU_0)

Inhibition*: hier Inhibition berechnet über die Hormoninduktion:

Hormoninduktion = $RLU_{mitHormon}$ / $RLU_{ohneHormon}$

$Inhibition_x$* (%) = 100 x ($Hormoninduktion_0$ - $Hormoninduktion_x$ / $Hormoninduktion_0$)

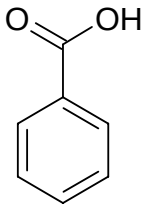
4.2. Test auf synergistische Effekte der beiden Leitstrukturen

Substanz	**Konzen-tration**	**RLU** Ohne Hormon	**RLU** Mit Hormon	**RLU_0** Blindwert	**Inhibition [%]**
2	10 µM	< 500	2460	41667	94
2	1 µM	< 500	12249	41667	70
3	10 µM	< 500	13002	41667	70
3	1 µM	< 500	23042	41667	45
2 + 3	10 + 10 µM	< 500	2410	41667	94
2 + 3	10 + 1 µM	< 500	1958	41667	95
2 + 3	1 + 10 µM	< 500	9287	41667	78
2 + 3	1 + 1 µM	< 500	20131	41667	52

5. Synthesen und Substanzenverzeichnis

Die Namensgebung der Verbindungen erfolgte nach den IUPAC-Regeln in Übereinstimmung mit ACD/I-Lab im internet unter *http://ilab.acdlabs.com.*

5.1. Benzoesäure (1)



$C_7H_6O_2$ (MG = 122,04)

Identifiziert in: Selektiver Dichlormethanextrakt aus der Rinde von Pygeum africanum

Farblose Kristalle

Schmelzpunkt (°C): 122

UV (MeOH) λ_{max} nm: 226, 262

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3400, 3100, 1700, 710

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

12,08 (1H, *s*, COOH)

8,09 (2H, *d*, ^{3}J = 6,5 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,60 (1H, *t*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-4-H)

7,46 (2H, *t*, ^{3}J = 7,3 Hz, C-3-H und C-5-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

171,9 (C-7)

133,8 (C-4)

130,2 (C-2 und C-6)

129,3 (C-1)

128,5 (C-3 und C-5)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

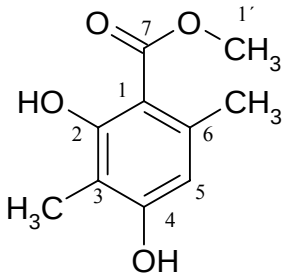
122 $[M]^+$ (100), 105 (89), 77 (62), 51 (8), 50 (29)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 122,0368 für $[M^+]$

Gefunden: 122,0363

5.2. Atrarsäure (2)



$C_{10}H_{12}O_4$ (MG = 196,07) **IUPAC**: Methyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat

Identifiziert in: Selektiver Dichlormethanextrakt aus der Rinde von Pygeum africanum

Farblose Kristalle

Schmelzpunkt (°C): 143

UV (MeOH) λ_{max} nm: 217, 245, 307

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3400, 3040, 1650, 1310, 1270, 800

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

11,98 (1H, *s*, C-2-OH)

6,14 (1H, *s*, C-5-H)

5,03 (1H, *s*, C-4-OH)

3,85 (3H, *s*, C-1´-H)

2,39 (3H, *s*, C-6-Me)

2,03 (3H, *s*, C-3-Me)

^{13}C-NMR (gated decoupling, 125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

172,6 (*s*, C-7)	108,5 (*s*, C-3)
163,2 (*s*, C-2)	105,2 (*s*, C-1)
158,1 (*s*, C-4)	51,8 (*q*, C-1´)
140,1 (*s*, C-6)	24,6 (*q*, C-6-Me)
110,5 (*d*, C-5)	7,6 (*q*, C-3-Me)

HMBC (x 500 MHz, y 125 MHz, $CDCl_3$):

H-5 zu C-1 und C-3

7-OMe zu C-7

C-3-Me zu C-2, C-3 und C-4

C-6-Me zu C-1, C-5 und C-6

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

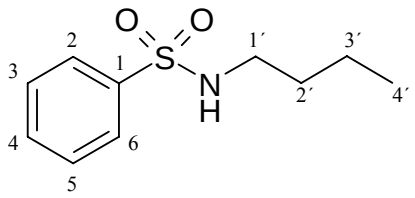
196 $[M]^+$ (60), 164 (100), 136 (87)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 196,0736 für $[M^+]$

Gefunden: 196,0735

5.3. NBBS (3)



$C_{10}H_{15}NO_2S$ (MG = 213,08) **IUPAC**: *N*-Butylbenzolsulfonamid

Identifiziert in: Selektiver Dichlormethanextrakt aus der Rinde von Pygeum africanum

Farbloses Öl

Synthese:

Zu 14,626 g Butylamin (0,2 mol) werden unter Rühren 17,620 g Benzolsulfonsäurechlorid (0,1 mol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 20 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (2 x 20 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 21,213 g (99%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 220, 262

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3300, 2960, 2940, 1450, 1320, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,85 (2H, *d*, ^{3}J = 7,4 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,57 (1H, *t*, ^{3}J = 7,6 Hz, C-4-H)

7,49 (2H, *t*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-3-H und C-5-H)

5,08 (1H, *t* bzw. *s*, ^{3}J = 5,8 Hz, N-H)

2,95 (2H, *q* bzw. *t*, ^{3}J = 5,8 Hz, C-1´-H)

1,42 (2H, *m*, ^{3}J = 7,3 Hz C-2´-H)

1,26 (2H, *m*, ^{3}J = 7,3 Hz , C-3´-H)

0,82 (3H, *t*, ^{3}J = 7,4 Hz, C-4´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

140,0 (C-1)	42,9 (C-1´)
132,6 (C-4)	31,6 (C-2´)
129,1 (C-3 und C-5)	19,7 (C-3´)
127,0 (C-2 und C-6)	13,5 (C-4´)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

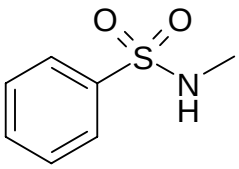
213 $[M]^+$ (11), 170 (100), 141 (80), 77 (45)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 213,0824 für $[M^+]$

Gefunden: 213,0824

5.4. Methylbenzolsulfonamid (4)



$C_7H_9NO_2S$ (MG = 171,04) **IUPAC**: *N*-Methylbenzolsulfonamid

Farbloses Öl

Synthese:

Zu 31,06 g einer wässrigen Lösung (40%) von Methylamin (0,4 mol) werden unter Rühren 17,662 g Benzolsulfonsäurechlorid (0,1 mol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 20 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (2 x 20 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 15,940 g (93%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 220, 265

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3300, 3070, 2980, 1450, 1320, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,80 (2H, *d*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,51 (1H, *t*, ^{3}J = 6,5 Hz, C-4-H)

7,45 (2H, *t*, ^{3}J = 6,5 Hz, C-3-H und C-5-H)

4,87 (1H, *s*, N-H)

2,57 (3H, *s*, C-1´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

138,8 (C-1) 29,3 (C-1´)

132,7 (C-4)

129,1 (C-3 und C-5)

127,2 (C-2 und C-6)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

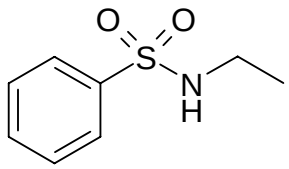
171 $[M]^+$ (81), 141 (52), 77 (100)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 171,0354 für $[M^+]$

Gefunden: 171,0338

5.5. Ethylbenzolsulfonamid (5)



$C_8H_{11}NO_2S$ (MG = 185,05) **IUPAC**: *N*-Ethylbenzolsulfonamid

Farblose Kristalle

Synthese:

Zu 25,76 g einer wässrigen Lösung (70%) von Ethylamin (0,4 mol) werden unter Rühren 17,662 g Benzolsulfonsäurechlorid (0,1 mol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 20 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (2 x 20 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 17,373 g (94%)

Schmelzpunkt (°C): 51

UV (MeOH) λ_{max} nm: 220, 264

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3300, 2980, 2940, 1450, 1320, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,81 (2H, *d*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,51 (1H, *t*, ^{3}J = 6,2 Hz, C-4-H)

7,45 (2H, *t*, ^{3}J = 6,9 Hz, C-3-H und C-5-H)

4,43 (1H, *s*, N-H)

2,95 (2H, *q*, ^{3}J = 6,0 Hz, C-1´-H)

1,04 (3H, *t*, ^{3}J = 5,5 Hz, C-2´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

140,0 (C-1)

132,5 (C-4)

129,0 (C-3 und C-5)

127,0 (C-2 und C-6)

38,2 (C-1´)

15,0 (C-2´)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

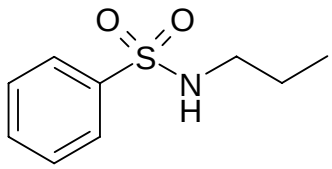
185 $[M]^+$ (67), 170 (100), 141 (87), 77 (55)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 185,0511 für $[M^+]$

Gefunden: 185,0512

5.6. Propylbenzolsulfonamid (6)



$C_9H_{13}NO_2S$ (MG = 199,07) **IUPAC**: *N*-Propylbenzolsulfonamid

Gelbes Öl

Synthese:

Zu 11,822 g Propylamin (0,2 mol) werden unter Rühren 8,831 g Benzolsulfonsäurechlorid (0,05 mol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 20 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (2 x 20 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 9,517 g (96%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 220, 265

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3290, 2970, 2940, 1450, 1320, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,81 (2H, *d*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,50 (1H, *t*, ^{3}J = 3,3 Hz, C-4-H)

7,45 (2H, *t*, ^{3}J = 3,0 Hz, C-3-H und C-5-H)

4,81 (1H, *s*, N-H)

2,84 (2H, *q*, ^{3}J = 4,0 Hz, C-1´-H)

1,42 (2H, *m*, ^{3}J = 7,5 Hz , C-2´-H)

0,78 (3H, *t*, ^{3}J = 4,5 Hz , C-3´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

140,1 (C-1)

132,5 (C-4)

129,1 (C-3 und C-5)

127,0 (C-2 und C-6)

45,0 (C-1´)

23,0 (C-2´)

11,0 (C-3´)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

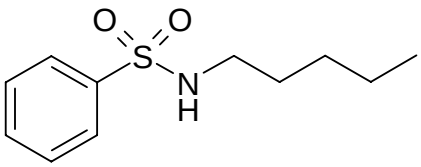
199 $[M]^+$ (39), 170 (100), 141 (84), 77 (51)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 199,0667 für $[M^+]$

Gefunden: 199,0666

5.7. Pentylbenzolsulfonamid (7)



$C_{11}H_{17}NO_2S$ (MG = 227,10) **IUPAC**: *N*-Pentylbenzolsulfonamid

Hellbraunes Öl

Synthese:

Zu 1,744 g Pentylamin (0,02 mol) werden unter Rühren 1,766 g Benzolsulfonsäurechlorid (0,01 mol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 10 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (3 x 5 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 2,193 g (96%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 216, 264

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3290, 2960, 2930, 1450, 1330, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,80 (2H, *d*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,51 (1H, *t*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-4-H)

7,45 (2H, *t*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-3-H und C-5-H)

4,32 (1H, *s*, N-H)

2,89 (2H, *q*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-1´-H)

1,39 (2H, *m*, ^{3}J = 6,1 Hz , C-2´-H)

1,18 (2H, *m*, ^{3}J = 3,0 Hz , C-3´-H)

1,17 (2H, *m*, ^{3}J = 3,0 Hz , C-4´-H)

0,77 (3H, *t*, ^{3}J = 7,0 Hz , C-5´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

142,1 (C-1)	44,0 (C-1´)	14,2 (C-5´)
133,5 (C-4)	30,3 (C-2´)	
130,1 (C-3 und C-5)	29,8 (C-3´)	
127,9 (C-2 und C-6)	23,2 (C-4´)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

227 $[M]^+$ (81), 170 (100), 141 (82), 77 (48)

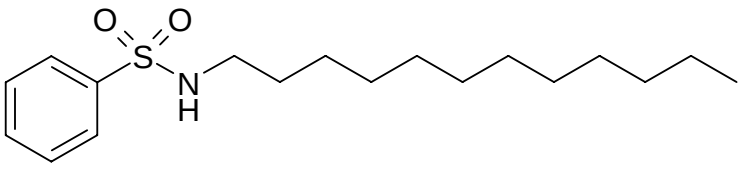
Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 227,0976 für $[M^+]$

Gefunden: 227,0980

Literatur: [160]

5.8. Laurylbenzolsulfonamid (8)



$C_{18}H_{31}NO_2S$ (MG = 325,21) **IUPAC**: *N*-Dodecylbenzolsulfonamid

Farblose Kristalle

Synthese:

Zu 370 mg Dodecylamin (2 mmol) in 10 ml Dichlormethan werden unter Rühren 177 mg Benzolsulfonsäurechlorid (1 mmol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 10 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (3 x 5 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 323 mg (99%)

Schmelzpunkt (°C): 59-61

UV (MeOH) λ_{max} nm: 221, 265

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3280, 2850, 1470, 1330, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,86 (2H, *d*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,49 (1H, *t*, ^{3}J = 6,9 Hz, C-4-H)

7,44 (2H, *t*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-3-H und C-5-H)

5,61 (1H, *t*, ^{3}J = 6,0 Hz, N-H)

2,86 (2H, *q*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-1´-H)

1,39 (2H, *m*, ^{3}J = 7,1 Hz , C-2´-H)

1,19 (18H, *m*, C-3´-H bis C-11´-H)

0,82 (3H, *t*, ^{3}J = 6,8 Hz , C-12´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

139,9 (C-1)	43,0 (C-1´)	13,9 (C-12´)
132,4 (C-4)	31,7 (C-2´)	
128,7 (C-3 und C-5)	29,2 (8C, *m*, C-3´ bis C-10´)	
126,8 (C-2 und C-6)	22,5 (C-11´)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

325 $[M]^+$ (9), 184 (88), 170 (100), 158 (58), 141 (64), 77 (21)

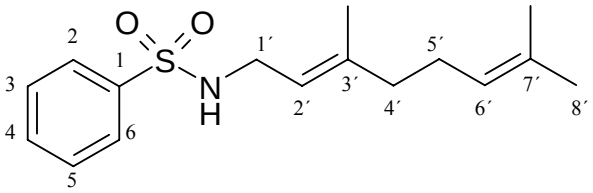
Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 325,2076 für $[M^+]$

Gefunden: 325,2080

Literatur: [160]

5.9. Geranylbenzolsulfonamid (9)



$C_{16}H_{23}NO_2S$ (MG = 293,14)

IUPAC: *N*-[(2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-yl]benzolsulfonamid

Bräunliches Öl

Synthese:

Zu 307 mg Geranylamin (2 mmol) werden unter Rühren 177 mg Benzolsulfonsäurechlorid (1 mmol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 10 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit 0,1 mM Salzsäure gewaschen (3 x 5 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 281 mg (96%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 205, 221, 264

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3280, 2900, 1450, 1330, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,82 (2H, *d*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,51 (1H, *t*, ^{3}J = 6,4 Hz, C-4-H)

7,45 (2H, *t*, ^{3}J = 7,6 Hz, C-3-H und C-5-H)

4,95 (2H, *m*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-2´-H und C-6´-H)

4,31 (1H, *t*, ^{3}J = 6,0 Hz, N-H)

3,52 (2H, *q*, ^{3}J = 6,5 Hz, C-1´-H)

1,90 (2H, *q*, ^{3}J = 8,0 Hz , C-5´-H)

1,84 (2H, *t*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-4´-H)

1,60 (3H, *s*, C-3´-Me)

1,50 (3H, *s*, C-7´-Me)

1,46 (3H, *s*, C-8´)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

141,3 (C-3´)	127,1 (C-2 und C-6)	26,2 (C-8´)
140,1 (C-1)	123,6 (C-2´)	25,6 (C-7´-Me)
132,6 (C-7´)	118,5 (C-6´)	17,7 (C-5´)
131,9 (C-4)	41,0 (C-1´)	16,2 (C-3´-Me)
129,0 (C-3 und C-5)	39,3 (C-4´)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

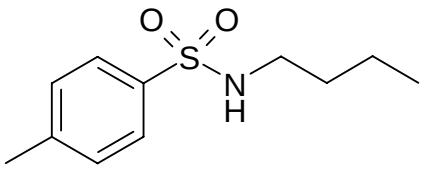
293 $[M]^+$ (47), 210 (72), 170 (100), 152 (83), 141 (80), 77 (46)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 293,1450 für $[M^+]$

Gefunden: 293,1413

5.10. Butyltoluolsulfonamid (10)



$C_{11}H_{17}NO_2S$ (MG = 227,10) **IUPAC**: *N*-Butyl-4-methylbenzolsulfonamid

Farbloses Öl

Synthese:

Zu 1,463 g Butylamin (0,02 mol) werden unter Rühren und Erwärmen 1,908 g Toluolsulfonsäurechlorid (0,01 mol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 10 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (3 x 5 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 2,071 g (91%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 226, 263

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3290, 2960, 1600, 1330, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,67 (2H, *d*, ^{3}J = 8,5 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,24 (2H, *d*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-3-H und C-5-H)

4,34 (1H, *t*, ^{3}J = 5,5 Hz, N-H)

2,87 (2H, *q*, ^{3}J = 6,5 Hz, C-1´-H)

2,36 (3H, *s*, C-4-Me)

1,36 (2H, *m*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-2´-H)

1,21 (2H, *m*, ^{3}J = 8,0 Hz C-3´-H)

0,78 (3H, *t*, ^{3}J = 7,5 Hz , C-4´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

142,2 (C-4)	42,9 (C-1´)	13,5 (C-4´)
137,0 (C-1)	31,5 (C-2´)	
129,6 (C-3 und C-5)	21,5 (C-4-Me)	
127,1 (C-2 und C-6)	19,6 (C-3´)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

227 $[M]^+$ (42), 184 (100), 155 (90), 91 (49)

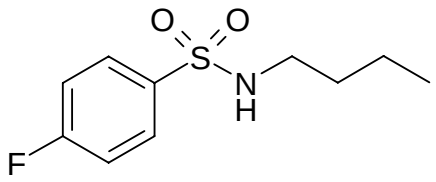
Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 227,0980 für $[M^+]$

Gefunden: 227,0986

Literatur: [161]

5.11. Butyl-4-fluorbenzolsulfonamid (11)



$C_{10}H_{14}NO_2SF$ (MG = 231,07) **IUPAC**: *N*-Butyl-4-fluorbenzolsulfonamid

Hellbrauner Feststoff

Synthese:

Zu 0,732 g Butylamin (0,01 mol) werden unter Rühren und Erwärmen 0,973 g 4-Fluorbenzolsulfonsäurechlorid (0,005 mol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 10 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (2 x 5 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 1,081 g (93%)

Schmelzpunkt (°C): 33

UV (MeOH) λ_{max} nm: 221, 260

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 1600, 1500, 1330, 1150

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,81 (2H, *dd*, ^{4}J (H,F) = 5,0 Hz, ^{3}J (H,H) = 8,3 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,13 (2H, *t*, ^{3}J (H,F) = ^{3}J (H,H) = 8,3 Hz, C-3-H und C-5-H)

4,26 (1H, *s*, N-H)

2,89 (2H, *t*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-1´-H)

1,36 (2H, *m*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-2´-H)

1,22 (2H, *m*, ^{3}J = 7,5 Hz C-3´-H)

0,79 (3H, *t*, ^{3}J = 7,5 Hz , C-4´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

164,0 (C-4)	42,9 (C-1´)
136,1 (C-1)	31,5 (C-2´)
129,7 (C-2 und C-6)	19,7 (C-3´)
116,2 (C-3 und C-5)	13,4 (C-4´)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

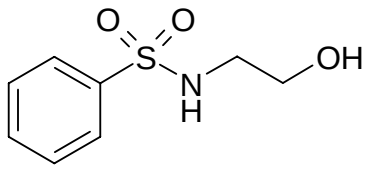
231 $[M]^+$ (20), 188 (100), 159 (86), 95 (44)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 231,0729 für $[M^+]$

Gefunden: 231,0736

5.12. Hydroxyethylbenzolsulfonamid (12)



$C_8H_{11}NO_3S$ (MG = 201,05) **IUPAC**: *N*-(2-Hydroxyethyl)benzolsulfonamid

Gelbliches Öl

Synthese:

8,831 g Benzolsulfonsäurechlorid (0,05 mol) und 6,720 g Ethanolamin (0,11 mol) werden 5 Stunden in 30 ml *ortho*-Xylol bei 144°C refluxiert. Nach dem Abkühlen setzt sich eine viskose Flüssigkeit am Boden ab, die mittels Scheidetrichter abgetrennt wird. Die viskose Flüssigkeit wird in 40 ml NaOH (10%) gelöst. Anschließend wird das Produkt mit konzentrierter Salzsäure ausgefällt und im Scheidetrichter abgetrennt. Das Produkt wird mit 50 ml Aceton versetzt und es wird filtriert (0,2 µm). Das Aceton wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 2,739 g (27%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 221, 265

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3290, 1450, 1320, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,81 (2H, *d*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,51 (1H, *t*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-4-H)

7,46 (2H, t, ^{3}J = 7,5 Hz, C-3-H und C-5-H)

5,26 (1H, *s*, N-H)

3,64 (2H, *t*, ^{3}J = 5,0 Hz, C-2´-H)

3,03 (2H, *q*, ^{3}J = 5,0 Hz, C-1´-H)

2,31 (1H, *s*, O-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

140,6 (C-1)

132,2 (C-4)

129,0 (C-3 und C-5)

126,3 (C-2 und C-6)

59,8 (C-2´)

45,0 (C-1´)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

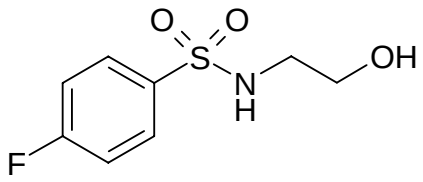
201 $[M]^+$ (4), 170 (100), 141 (84), 77 (52)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 201,0460 für $[M^+]$

Gefunden: 201,0460

5.13. 4-Fluorhydroxyethylbenzolsulfonamid (13)



$C_8H_{10}NO_3SF$ (MG = 219,04) **IUPAC**: 4-Fluor-*N*-(2-hydroxyethyl)benzolsulfonamid

Weißes Pulver

Synthese:

9,731 g 4-Fluorbenzolsulfonsäurechlorid (0,05 mol) und 6,720 g Ethanolamin (0,11 mol) werden 5 Stunden in 30 ml *ortho*-Xylol bei 144°C refluxiert. Nach dem Abkühlen setzt sich eine viskose Flüssigkeit am Boden ab, die mittels Scheidetrichter abgetrennt wird. Die viskose Flüssigkeit wird in 40 ml NaOH (10%) gelöst. Anschließend wird das Produkt mit konzentrierter Salzsäure ausgefällt und abfiltriert (0,7 µm). Das Produkt wird mit Wasser gewaschen (3 x 5 ml).

Ausbeute: 3,656 g (33%)

Schmelzpunkt (°C): 77

UV (MeOH) λ_{max} nm: 220, 270

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3430, 1590, 1320, 1150

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7,81 (2H, *dd*, ^{4}J (H,F) = 5,2 Hz, ^{3}J (H,H) = 8,3 Hz, C-2-H und C-6-H)

7,13 (2H, *t*, ^{3}J (H,F) = ^{3}J (H,H) = 8,3 Hz, C-3-H und C-5-H)

5,03 (1H, *s*, N-H)

3,66 (2H, *t*, ^{3}J = 6,2 Hz, C-2´-H)

3,05 (2H, *t*, ^{3}J = 4,2 Hz, C-1´-H)

1,96 (1H, *s*, O-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

164,1 (C-4)

135,8 (C-1)

129,9 (C-2 und C-6)

116,4 (C-3 und C-5)

61,2 (C-2´)

45,1 (C-1´)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

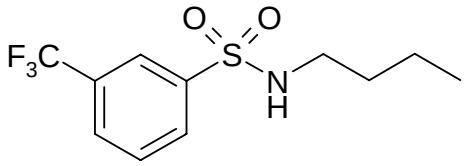
219 $[M]^+$ (5), 188 (100), 159 (91), 95 (56)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 219,0365 für $[M^+]$

Gefunden: 219,0367

5.14. Butyl-3-trifluormethylbenzolsulfonamid (14)



$C_{11}H_{14}NO_2SF_3$ (MG = 281,07)

IUPAC: *N*-Butyl-3-(trifluormethyl)benzolsulfonamid

Farbloses Öl

Synthese:

Zu 585 mg Butylamin (8 mmol) werden unter Rühren 978 mg 3-Trifluormethyl-benzolsulfonsäurechlorid (4 mmol) hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 20 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (3 x 5 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 1,112 g (99%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 205, 220, 265

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3290, 2960, 2940, 1610, 1330, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

8,07 (1H, *s*, C-2-H)

7,99 (1H, *d*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-4-H)

7,77 (1H, *d*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-6-H)

7,62 (1H, *t*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-5-H)

2,93 (2H, *t*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-1´-H)

1,38 (2H, *m*, ^{3}J = 7,3 Hz C-2´-H)

1,24 (2H, *m*, ^{3}J = 7,3 Hz , C-3´-H)

0,79 (3H, *t*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-4´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

140,4 (C-1)	128,2 (C-5)	30,5 (C-2´)
130,6 (*q*, ^{2}J (C,F) = 33 Hz, C-3)	123,1 (C-4)	18,7 (C-3´)
129,2 (C-2)	122,1 (*q*, ^{2}J (C,F) = 220 Hz, CF_3)	
128,9 (C-6)	42,0 (C-1´)	12,5 (C-4´)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

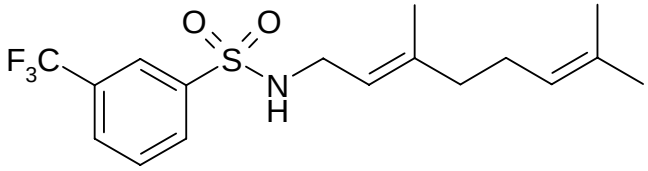
281 $[M]^+$ (8), 238 (100), 209 (84), 145 (58)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 281,0697 für $[M^+]$

Gefunden: 281,0705

5.15. Geranyl-3-trifluormethylbenzolsulfonamid (15)



$C_{17}H_{22}NO_2SF_3$ (MG = 361,13)

IUPAC: *N*-[(2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-yl]-3-(trifluormethyl)benzolsulfonamid

Hellbraunes Öl

Synthese:

Zu 919 mg Geranylamin (6 mmol) in 40 ml Dichlormethan werden unter Rühren 1,233 g 3-Trifluormethylbenzolsulfonsäurechlorid (5 mmol) hinzugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wird das überschüssige Amin mit Salzsäure (0,1mM) ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Das Dichlormethan wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und man erhält das Produkt.

Ausbeute: 1,770 g (98%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 205, 220, 265

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3290, 2970, 2930, 1440, 1330, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

8,07 (1H, *s*, C-2-H)

8,00 (1H, *d*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-4-H)

7,77 (1H, *d*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-6-H)

7,61 (1H, *t*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-5-H)

4,95 (2H, *m*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-2´-H und C-6´-H)

4,44 (1H, *t*, ^{3}J = 6,0 Hz, N-H)

3,57 (2H, *q*, ^{3}J = 6,5 Hz, C-1´-H)

1,89 (2H, *q*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-5´-H)

1,83 (2H, *t*, ^{3}J = 8,0 Hz, C-4´-H)

1,59 (3H, *s*, C-3´-Me)

1,49 (3H, *s*, C-7´-Me)

1,48 (3H, *s*, C-8´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

141,7 (C-3´)	129,8 (C-6)	41,1 (C-1´)	16,2 (C-3´-Me)
141,6 (C-1)	129,2 (C-5)	39,3 (C-4´)	
131,9 (C-3)	124,2 (C-2´)	26,1 (C-8´)	
131,6 (C-7´)	123,5 (C-4)	25,6 (C-7´-Me)	
130,3 (C-2)	118,1 (C-6´)	17,6 (C-5´)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

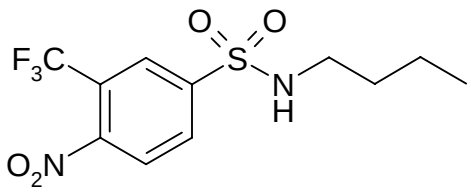
361 $[M]^+$ (39), 238 (100), 209 (67), 152 (75), 145 (58)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 361,1323 für $[M^+]$

Gefunden: 361,1333

5.16. Butyl-4-nitro-3-trifluormethylbenzolsulfonamid (16)



$C_{11}H_{13}N_2O_4SF_3$ (MG = 326,05)

IUPAC: *N*-Butyl-4-nitro-3-(trifluormethyl)benzolsulfonamid

Weißes Pulver

Synthese:

Zu 146 mg Butylamin (2 mmol) werden unter Rühren 290 mg 4-Nitro-3-trifluormethylbenzolsulfonsäurechlorid (1 mmol) in 10 ml Dichlormethan hinzugetropft. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes werden 20 ml Wasser hinzugegeben und das Reaktionsprodukt mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (3 x 5 ml) und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Ausbeute: 323 mg (99%)

Schmelzpunkt (°C): 99

UV (MeOH) λ_{max} nm: 205, 250

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3280, 2960, 1550, 1430, 1310, 1160, 1150

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

8,28 (1H, *s*, C-2-H)

8,19 (1H, *d*, ^{3}J = 8,3 Hz, C-5-H)

7,98 (1H, *d*, ^{3}J = 8,3 Hz, C-6-H)

4,62 (1H, *s*, N-H)

3,03 (2H, *q*, ^{3}J = 6,3 Hz, C-1´-H)

1,49 (2H, *m*, ^{3}J = 7,3 Hz C-2´-H)

1,31 (2H, *m*, ^{3}J = 7,3 Hz , C-3´-H)

0,87 (3H, *t*, ^{3}J = 7,3 Hz, C-4´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

149,9 (C-4)	126,8 (C-5)	31,7 (C-2´)
144,9 (C-1)	125,0 (C-3)	19,6 (C-3´)
131,8 (C-2)	123,5 (*q*, ^{2}J (C,F) = 188 Hz, CF_3)	
126,9 (C-6)	43,2 (C-1´)	13,4 (C-4´)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

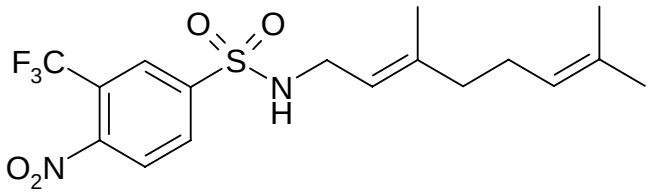
326 $[M]^+$ (14), 285 (22), 283 (100), 254 (82), 190 (53), 55 (17)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 326,0548 für $[M^+]$

Gefunden: 326,0553

5.17. Geranyl-4-nitro-3-trifluormethylbenzolsulfonamid (17)



$C_{17}H_{21}N_2O_4SF_3$ (MG = 406,12)

IUPAC: *N*-[(2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-yl]-4-nitro-3-(trifluormethyl)-benzolsulfonamid

Gelbliches Öl

Synthese:

Zu 307 mg Geranylamin (2 mmol) werden unter Rühren 290 mg 4-Nitro-3-trifluormethylbenzolsulfonsäurechlorid (1 mmol) in 20 ml Dichlormethan hinzugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wird das überschüssige Amin mit Salzsäure (0,1 mM) ausgeschüttelt (3 x 10 ml). Das Dichlormethan wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und man erhält das Produkt.

Ausbeute: 386 mg (95%)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 205, 250

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3300, 2920, 1610, 1430, 1160

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

8,23 (1H, *s*, C-2-H)

8,14 (1H, *d*, ^{3}J = 8,5 Hz, C-5-H)

7,92 (1H, *d*, ^{3}J = 8,5 Hz, C-6-H)

4,97 (2H, *m*, C-2´-H und C-6´-H)

4,48 (1H, *t*, ^{3}J = 5,8 Hz, N-H)

3,63 (2H, *q*, ^{3}J = 5,8 Hz, C-1´-H)

1,88 (2H, *q*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-5´-H)

1,85 (2H, *t*, ^{3}J = 7,5 Hz, C-4´-H)

1,61 (3H, *s*, C-3´-Me)

1,53 (3H, *s*, C-7´-Me) 1,50 (3H, *s*, C-8´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

149,9 (C-4)	131,8 (C-7´)	123,3 (C-2´)	26,1 (C-8´)
145,2 (C-1)	127,0 (C-6)	117,7 (C-6´)	25,6 (C-7´-Me)
142,4 (C-3´)	126,9 (C-5)	41,2 (C-1´)	17,6 (C-5´)
132,1 (C-2)	124,7 (C-3)	39,3 (C-4´)	16,2 (C-3´-Me)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

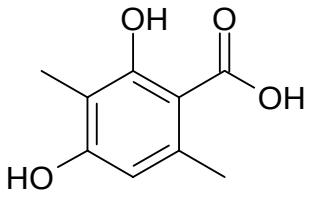
406 $[M]^+$ (77), 363 (55), 152 (96), 136 (51), 123 (100), 99 (99)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 406,1174 für $[M^+]$

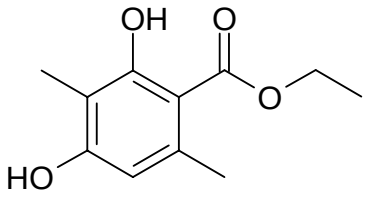
Gefunden: 406,1175

5.18. 2,4-Dihydroxy-3,6-dimethylbenzoesäure (18)



Referenzsubstanz bezogen von Merck

5.19. Ethylatratat (19)



$C_{11}H_{14}O_4$ (MG = 210,09) **IUPAC**: Ethyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat

Weißes Pulver

Synthese:

392 mg Atrarsäure (2) (2 mmol) werden mit 118 mg Kaliumhydroxid (2,1 mmol) in 10 ml Ethanol über Nacht gerührt und dann neutralisiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Lösungsmittelgemisch der chromatographischen Anfangsbedingungen gelöst. Anschließend erfolgt die Isolierung des Reaktionsproduktes per präparativer HPLC (Methode **B4**, Retentionszeit 13 Min).

Ausbeute: 42 mg (10%)

Schmelzpunkt (°C): 127

UV (MeOH) λ_{max} nm: 217, 265, 308

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3450, 3100, 1620, 1310, 1280, 800

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

12,05 (1H, *s*, C-2-OH)

6,14 (1H, *s*, C-5-H)

5,02 (1H, *s*, C-4-OH)

4,32 (2H, *q*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-1´-H)

2,41 (3H, *s*, C-6-Me)

2,03 (3H, *s*, C-3-Me)

1,34 (3H, *t*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-2´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

172,1 (C-7)	110,5 (C-5)	24,6 (C-6-Me)
163,2 (C-2)	108,5 (C-3)	14,2 (C-2´)
157,9 (C-4)	105,4 (C-1)	7,6 (C-3-Me)
140,2 (C-6)	61,2 (C-1´)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

210 $[M]^+$ (50), 164 (100), 136 (60)

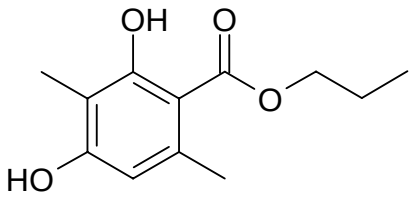
Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 210,0892 für $[M^+]$

Gefunden: 210,0889

Literatur: [162]

5.20. Propylatratat (20)



$C_{12}H_{16}O_4$ (MG = 224,10) **IUPAC**: Propyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat

Weißes Pulver

Synthese:

392 mg Atrarsäure (2) (2 mmol) werden mit 118 mg Kaliumhydroxid (2,1 mmol) in 10 ml Propanol über Nacht gerührt und dann neutralisiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Lösungsmittelgemisch der chromatographischen Anfangsbedingungen gelöst. Anschließend erfolgt die Isolierung des Reaktionsproduktes per präparativer HPLC (Methode **B5**, Retentionszeit 10 Min).

Ausbeute: 31 mg (7%)

Schmelzpunkt (°C): 134

UV (MeOH) λ_{max} nm: 217, 262, 307

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3450, 3000, 1650, 1310, 1200, 800

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

12,09 (1H, *s*, C-2-OH)

6,14 (1H, *s*, C-5-H)

5,02 (1H, *s*, C-4-OH)

4,23 (2H, *t*, ^{3}J = 6,7 Hz, C-1´-H)

2,41 (3H, *s*, C-6-Me)

2,04 (3H, *s*, C-3-Me)

1,73 (2H, *m*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-2´-H)

0,97 (3H, *t*, ^{3}J = 7,2 Hz, C-3´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

173,3 (C-7)	110,5 (C-5)	24,2 (C-6-Me)
163,2 (C-2)	108,5 (C-3)	22,0 (C-2´)
157,9 (C-4)	105,4 (C-1)	10,8 (C-3´)
140,1 (C-6)	67,0 (C-1´)	7,6 (C-3-Me)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

224 $[M]^+$ (31), 164 (100), 136 (44)

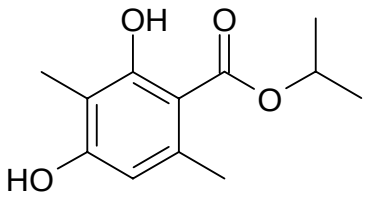
Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 224,1049 für $[M^+]$

Gefunden: 224,1051

Literatur: [163]

5.21. Isopropylatratat (21)



$C_{12}H_{16}O_4$ (MG = 224,10) **IUPAC**: Isopropyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat

Weißes Pulver

Synthese:

392 mg Atrarsäure (2) (2 mmol) werden mit 118 mg Kaliumhydroxid (2,1 mmol) in 10 ml Isopropanol über Nacht gerührt und dann neutralisiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in dem Lösungsmittelgemisch der chromatographischen Anfangsbedingungen gelöst. Anschließend erfolgt die Isolierung des Reaktionsproduktes per präparativer HPLC (Methode **B6**, Retentionszeit 12 Min)

Ausbeute: 38 mg (8%)

Schmelzpunkt (°C): 90

UV (MeOH) λ_{max} nm: 217, 265, 300

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3400, 3000, 1650, 1310, 1200, 800

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

12,11 (1H, *s*, C-2-OH)

6,13 (1H, *s*, C-5-H)

5,22 (1H, *m*, ^{3}J = 6,3 Hz, C-1´-H)

2,40 (3H, *s*, C-6-Me)

2,03 (3H, *s*, C-3-Me)

1,31 (6H, *d*, ^{3}J = 6,2 Hz, C-1´-Me)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

171,6 (C-7)	108,5 (C-3)	7,6 (C-3-Me)
163,2 (C-2)	105,7 (C-1)	
157,8 (C-4)	69,2 (C-1´)	
140,1 (C-6)	24,3 (C-6-Me)	
110,4 (C-5)	22,0 (C-1´-Me)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

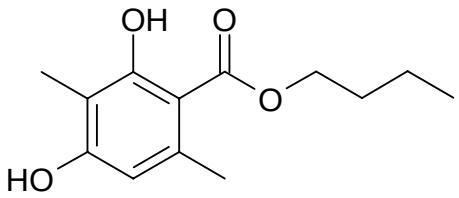
224 $[M]^+$ (35), 164 (100), 136 (39)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 224,1049 für $[M^+]$

Gefunden: 224,1051

5.22. Butylatratat (22)



$C_{13}H_{18}O_4$ (MG = 238,12) **IUPAC**: Butyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat

Weißes Pulver

Synthese:

392 mg Atrarsäure (2) (2 mmol) werden mit 118 mg Kaliumhydroxid (2,1 mmol) in 10 ml Butanol über Nacht gerührt und dann neutralisiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Lösungsmittelgemisch der chromatographischen Anfangsbedingungen gelöst. Anschließend erfolgt die Isolierung des Reaktionsproduktes per präparativer HPLC (Methode **B7**, Retentionszeit 13 Min).

Ausbeute: 51 mg (11%)

Schmelzpunkt (°C): 117

UV (MeOH) λ_{max} nm: 217, 265, 308

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3440, 3000, 1700, 1310, 1200, 800

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

12,09 (1H, *s*, C-2-OH)

6,20 (1H, *s*, C-5-H)

4,97 (1H, *s*, C-4-OH)

4,32 (2H, *t*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-1´-H)

2,41 (3H, *s*, C-6-Me)

2,04 (3H, *s*, C-3-Me)

1,69 (2H, *m*, ^{3}J = 7,3 Hz, C-2´-H)

1,42 (2H, *m*, ^{3}J = 7,3 Hz, C-3´-H)

0,90 (3H, *t*, ^{3}J = 7,3 Hz, C-4´-H)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

167,9 (C-7)	108,6 (C-3)	19,3 (C-3´)
163,1 (C-2)	105,5 (C-1)	13,5 (C-4´)
157,8 (C-4)	66,3 (C-1´)	7,5 (C-3-Me)
140,1 (C-6)	24,1 (C-6-Me)	
110,5 (C-5)	30,5 (C-2´)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

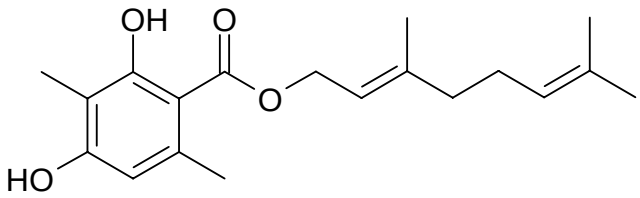
238 $[M]^+$ (31), 164 (100), 136 (30)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 238,1226 für $[M^+]$

Gefunden: 238,1226

5.23. Geranylatratat (23)



$C_{19}H_{26}O_4$ (MG = 318,18)

IUPAC: (2*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-yl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat

Gelbliches Pulver

Synthese:

392 mg Atrarsäure (2) (2 mmol) werden mit 118 mg Kaliumhydroxid (2,1 mmol) in 10 ml Geraniol über Nacht gerührt und dann neutralisiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in dem Lösungsmittelgemisch der chromatographischen Anfangsbedingungen gelöst. Anschließend erfolgt die Isolierung des Reaktionsproduktes per präparativer HPLC (Methode **B8**, Retentionszeit 27 Min).

Ausbeute: 44 mg (7%)

Schmelzpunkt (°C): 140

UV (ACN) λ_{max} nm: 220, 270, 310

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3410, 2930, 1640, 1440, 1270

^{1}H-NMR (500 MHz, MeOH-*d4*), δ (ppm):

6,20 (1H, *s*, C-5-H)

2,45 (3H, *s*, C-6-Me)

5,34 (1H, *t*, ^{3}J = 6,7 Hz, C-2´-H)

5,10 (1H, *t*, ^{3}J = 6,7 Hz, C-6´-H)

4,07 (2H, *d*, ^{3}J = 6,5 Hz, C-1´-H)

2,10 (2H, *q*, ^{3}J = 8,3 Hz, C-5´-H)

2,01 (2H, *t*, ^{3}J = 8,3 Hz, C-4´-H)

1,99 (3H, *s*, C-3 Me) 1,65 (3H, *s*, C-3´-Me)

1,64 (3H, *s*, C-7´-Me) 1,59 (3H, *s*, C-8´)

^{13}C-NMR (125 MHz, MeOH-*d4*), δ (ppm):

175,6 (C-7)	132,4 (C-7´)	104,9 (C-1)	24,3 (C-6-Me)
164,8 (C-2)	125,1 (C-2´)	59,4 (C-1´)	17,7 (C-5´)
161,3 (C-4)	124,9 (C-6´)	40,7 (C-4´)	16,2 (C-3´-Me)
141,5 (C-3´)	111,3 (C-5)	27,5 (C-8´)	7,9 (C-3-Me)
139,4 (C-6)	109,7 (C-3)	25,8 (C-7´-Me)	

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

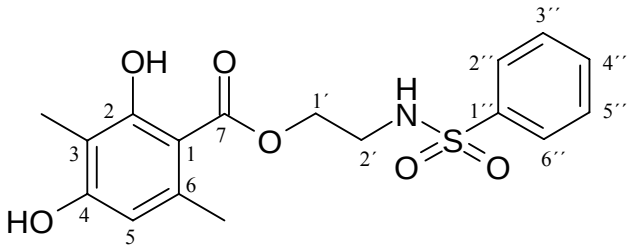
318 $[M]^{+}$ (24), 164 (100), 136 (38)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 318,1834 für $[M^{+}]$

Gefunden: 318,1829

5.24. Hybrid aus 2 und 3 (24)



$C_{17}H_{19}O_6NS$ (MG = 365,09)

IUPAC: 2-[(Phenylsulfonyl)amino]ethyl-2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoat

Gelbliches Pulver

Synthese:

1,822 g 2,4-Dihydroxy-3,6-dimethylbenzoesäure (18) (0,01 mol) und 3,522 g *N*-(2-Hydroxyethyl)benzolsulfonamid (12) werden in 30 ml Toluol unter Zugabe von 0,05 g Schwefelsäure konz. 5 Stunden refluxiert. Nach Neutralisieren wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in dem Lösungsmittelgemisch der chromatographischen Anfangsbedingungen gelöst. Anschließend erfolgt die Isolierung des Reaktionsproduktes per präparativer HPLC (Methode **B9**, Retentionszeit 14 Min).

Ausbeute: 30 mg (4%)

Schmelzpunkt (°C): 151

UV (MeOH) λ_{max} nm: 220, 270, 305

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3450, 3310, 2930, 1640, 1310, 1280, 1160, 1100

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

11,69 (1H, *s*, C-2-OH)

7,79 (2H, *d*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-2´´-H und C-6´´-H)

7,48 (1H, *t*, ^{3}J = 7,0 Hz, C-4´´-H)

7,41 (2H, t, ^{3}J = 7,0 Hz, C-3´´-H und C-5´´-H)

6,13 (1H, *s*, C-5-H)

5,05 (1H, *s*, C-4-OH)

4,68 (1H, *s*, N-H)

4,31 (2H, *t*, ^{3}J = 5,5 Hz, C-1´-H)

3,32 (2H, *t*, ^{3}J = 5,5 Hz, C-2´-H)

2,31 (3H, *s*, C-6-Me)

2,03 (3H, *s*, C-3-Me)

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

167,0 (C-7)	133,6 (C-4´´)	104,2 (C-1)
163,0 (C-2)	130,2 (C-3´´ und C-5´´)	64,5 (C-1´)
153,1 (C-4)	127,8 (C-2´´ und C-6´´)	43,0 (C-2´)
142,0 (C-6)	111,6 (C-5)	24,6 (C-6-Me)
141,4 (C-1´´)	109,9 (C-3)	7,5 (C-3-Me)

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. int.):

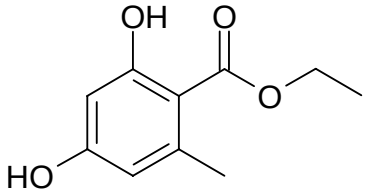
365 $[M]^+$ (23), 170 (26), 164 (100), 141 (26), 136 (24), 77 (27)

Massenfeinbestimmung (HR-EI-MS):

Berechnet: 365,0933 für $[M^+]$

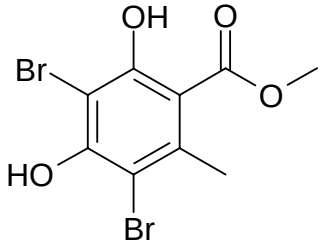
Gefunden: 365,0933

5.25. Ethyl-2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoat (25)



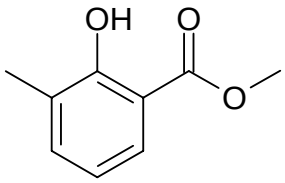
Referenzsubstanz bezogen von Aldrich

5.26. Methyl-3,5-dibrom-2,4-dihydroxybenzoat (26)



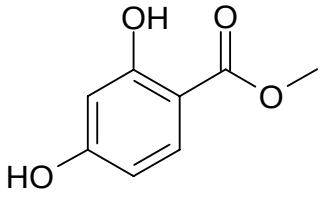
Referenzsubstanz bezogen von Lancaster

5.27. Methyl-2-hydroxy-3-methylbenzoat (27)



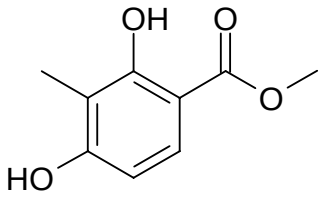
Referenzsubstanz bezogen von Alfa Aesar

5.28. Methyl-2,4-dihydroxybenzoat (28)



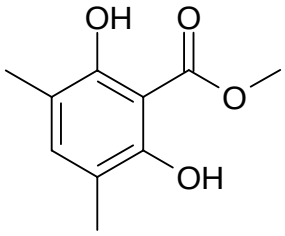
Referenzsubstanz bezogen von Alfa Aesar

5.29. Methyl-2,4-dihydroxy-3-methylbenzoat (29)



Referenzsubstanz bezogen von Alfa Aesar

5.30. Methyl-2,6-dihydroxy-3,5-dimethylbenzoat (30)



Referenzsubstanz bezogen von Aldrich

5.31. Dünnschichtchromatographie der Sulfonamide

Das Fortschreiten der Synthese der Sulfonamide wurde per Dünnschichtchromatographie verfolgt (Methode **DC1**).

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen erfolgten mit DC-Alufolien (5 x 10 cm, 0,20 mm Kieselgel 60 UV_{254}) von Macherey – Nagel über eine Trennstrecke von 8,0 cm. Als Fließmittel diente Dichlormethan mit einem Zusatz von 0,1% TFA.

Literatur- und Quellenverzeichnis

[1] Oprea, T.I., Davis, A.M., Teague, S.J. and Leeson, P.D.: Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective. J. Chem. Comput. Sci. 41, 1308-1315 (2001)

[2] Zeeck, A., Bach, G. and Terlau, H.: Das medizinische Potential von Naturstoffen. Internist 42, 1422-1427 (2001)

[3] Newman, D.J., Cragg, G.M. and Snader, K.M.: Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod. 66, 1022-1037 (2003)

[4] Cordell, G.A.: Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. Phytochemistry 55, 463-480 (2000)

[5] Müller-Kuhrt, L.: Putting nature back into drug discovery. Nat. Biotechnol. 21, 602 (2003)

[6] Henkel, T., Brunne, R.M., Müller, H. and Reichel, F.: Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. Angew. Chem. Int. Ed. 38, 643-647 (1999)

[7] Wess, G., Urmann, M. und Sickenberger, B.: Medizinische Chemie: Herausforderungen und Chancen. Angew. Chem. 113, 3443-3453 (2001)

[8] Cordell, G.A.: Changing strategies in natural products chemistry. Phytochemistry 40, 1585-1612 (1995)

[9] Tietze, L.F., Bell, H.P. and Chandrasekhar, S.: Natural product hybrids as new leads for drug discovery. Angew. Chem. Int. Ed. 42, 3996-4028 (2003)

[10] Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Freeney, P.J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Delivery Rev. 23, 3-25 (1997)

[11] Bindseil, K.U., Jakupovic, J., Wolf, D., Lavayre, J., Leboul, J. and van der Pyl, D.: Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. Drug Discov. Today 16, 840-847 (2001)

[12] Folkers, G., Pliska, V. und Birringer, M.: Arzneistoffentwicklung im Wandel. Dtsch. Apoth. Ztg. 10, 52-56 (2003)

[13] Ishani, A., MacDonald, R., Nelson, D., Rutks, I. and Wilt, T.J.: Pygeum africanum for the treatment of patients with benign prostatic hyperplasia: a systematic review and quantitative meta-analysis. Am. J. Med. 109, 654-664 (2000)

[14] Burger, A. und Wachter, H.: Hunnius – Pharmazeutisches Wörterbuch. 8. Auflage, Walter de Gruyter Berlin, 673-674 (2001)

[15] Santos, A.F., Huang, H. and Tindall, D.J.: The androgen receptor: a potential target for therapy of prostate cancer. Steroids 69, 79-85 (2004)

[16] Andersson, S., Berman, D.M., Jenkins, E.P. and Russell, D.W.: Deletion of steroid 5 α-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. Nature 354, 159-161 (1991)

[17] Iehlé, C., Radvanyi, F., de Medina, S.G.D., Ouafik, L., Gérard, H., Chopin, D., Raynaud, J.P. and Martin, P.M.: Differences in steroid 5 α-reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 68, 189-195 (1999)

[18] Thompson, I.M., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Lucia, M.S., Miller, G.J., Ford, L.G., Lieber, M.M., Cespedes, D., Atkins, J.N., Lippman, S.M., Carli, S.M., Ryan, A., Szczepanek, C.M., Crowley, J.J. and Coltman, C.A.: The influence of Finasteride on the development of prostate cancer. N. Engl. J. Med. 3, 215-224 (2003)

[19] Evans, R.M.: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240, 889-895 (1988)

[20] Truss, M. and Beato, M.: Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. Endocr. Rev. 14, 459-479 (1993)

[21] Chatterjee, Bandana: The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. Mol. Cell. Biochem. 253, 89-101 (2003)

[22] Taplin, M.E. and Balk, S.T.: Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. J. Cell. Biochem. 91, 483-490 (2004)

[23] Roy, A.K., Lavrovsky, Y., Song, C.S., Chen, S., Jung, M.H., Velu, N.K., Bi, B.Y. and Chatterjee, B.: Regulation of androgen action. Vitam. Horm. 55, 309-352 (1999)

[24] Heinlein, C.A. and Chang, C.: Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. Endocr. Rev. 23, 175-200 (2002)

[25] Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V., French, F.S. and Wilson, E.M.: Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. J. Biol. Chem. 266, 510-518 (1991)

[26] Jenster, G., Trapman, J. and Brinkmann, A.O.: Nuclear import of the human androgen receptor. Biochem. J. 293, 761-768 (1993)

[27] Zhou, Z.X., Wong, C.I., Sar, M. and Wilson, E.M.: The androgen receptor: an overview. Recent Progr. Horm. Res. 49, 249-274 (1994)

[28] Brzozowoski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engelstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. and Carlquist, M.: Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature 389, 753-758 (1997)

[29] Bourguet, W., Germai, P. and Gronemeyer, H.: Nuclear receptor ligand binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. Trends Pharmacol. Sci. 21, 381-388 (2000)

[30] Matias, P.M., Donner, P., Coelho, R., Thomaz, M., Peixoto, C., Macedo, S., Otto, N., Joschko, S., Scholz, P., Wegg, A., Basler, S., Schafer, M., Egner U. and Carrondo, M.A.: Structural evidence for ligand specifity in the binding domain of the human androgen receptor. J. Biol. Chem. 275, 26164-26171 (2000)

[31] Veldscholte, J., Berrevoets, C.A., Zegers, N.D., van der Kwast, T.H., Grootegoed, J.A. and Mulder, E.: Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock-protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. Biochemistry 31, 7422-7430 (1992)

[32] Bohen, S.P. and Yamamoto, K.R.: Modulation of steroid receptor signal transduction by heat shock proteins. Cold Spring Harb. Mon. Ser. 26, 313-334 (1994)

[33] Prins, G.: Molecular biology of the androgen receptor. Mayo Clin. Proc. 75, 32-35 (2000)

[34] Reid, J., Betney, R., Watt, K. and McEwan, I.J.: The androgen receptor transactivation domain: the interplay between protein conformation and protein-protein interactions. Biochem. Soc. Trans. 31, 1042-1046 (2003)

[35] Goepel, M., Schulze, H. und Sökeland, J.: Die benigne Prostatahyperplasie. Dtsch. Arztebl. 97, 1677-1681 (2000)

[36] Oesterling, J.E.: Benign prostatic hyperplasia: A Review of its histogenesis and natural history. Prostate 29, 67-73 (1996)

[37] Roper, W.G.: The etiology of benign prostatic hypertrophy. Med. Hypotheses 50, 61-65 (1998)

[38] Shah, U.S. and Getzenberg, R. H.: Fingerprinting the diseased prostate: associations between BPH and prostate cancer. J. Cell. Biochem. 91, 161-169 (2004)

[39] Berthon, P., Waller, A.S., Villette, J.M., Loridon, L., Cussenot, O. and Maitland, N.J.: Androgens are not a direct requirement for the proliferation of human prostatic epithelium in vitro. Int. J. Canc. 73, 910-916 (1997)

[40] Wong, Y.C. and Wang, Y.Z.: Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. Int. Rev. Cytol. 199, 65-116 (1998)

[41] McClure, M.W.: An overview of holistic medicine and complementary and alternative medicine for the prevention and treatment of BPH, prostatitis, and prostate cancer. World J. Urol. 20, 273-284 (2002)

[42] Lowe, F.C.: Phytotherapy in the management of benign prostatic hyperplasia. Urology 58, 71-76 (2001)

[43] Gerber, G.S.: Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. Curr. Urol. Rep. 3, 285-291 (2002)

[44] Dreikorn, K.: Phytotherapeutic agents in the treatment of benign prostatic hyperplasia. Curr. Urol. Rep. 1, 103-109 (2000)

[46] Katz, A.E.: Flavonoid and botanical approaches to prostate health. J. Altern. Complement. Med. 8, 813-821 (2002)

[47] Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafoor, Asma, Samuels, A., Ward, E., Feuer, E. and Thun, M.J.: Cancer statistics, 2004. CA Cancer J. Clin. 54, 8-29 (2004)

[48] Bonkhoff, H. und Remberger, K.: Morphogenese der benignen Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms. Pathologe 19, 12-20 (1998)

[49] De Marzo, A.M., DeWeese, T.L., Platz, E.A., Meeker, A.K., Nakayama, M., Epstein, J.I., Isaacs, W.B. ang Nelson, W.G.: Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. J. Cell. Biochem. 91, 459-477 (2004)

[50] Gonzalgo, M.L. and Isaacs, W.B.: Molecular pathways to prostate cancer. J. Urol. 170, 2444-2452 (2003)

[51] So, A.I., Hurtado-Coll, A. and Gleave, M.E.: Androgens and prostate cancer. World J. Urol. 21, 325-337 (2003)

[52] Porkka, K.P. and Visakorpi, T.: Molecular mechanisms of prostate cancer. Eur. Urol. 45, 683-691 (2004)

[53] Ross, R.K., Bernstein, L., Pike, M.C., Henderson, B.E., Lobo, R.A., Stanczyk, F.Z. and Shimizu, H.: 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. Lancet 339, 887-889 (1992)

[54] Cunningham, J.M., Shan, A., Wick, M.J., McDonell, S.K., Schaid, D.J., Tester, D.J., Qian, J., Takahashi, S., Jenkins, R.B., Bostwick, D.G. and Thibodeau, S.N.: Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. Cancer Res. 56, 4475-4482 (1996)

[55] Sauter, G., Bubendorf, L., Moch, H., Gasser, T.H. and Mihatsch, M.J.: Zytogenetische Veränderungen des Prostatakarzinoms. Pathologe 19, 63-68 (1998)

[56] DeMarzo, A.M., Nelson, W.G., Isaacs, W.B. and Epstein, J.I.: Pathological and molecular aspects of prostate cancer. Lancet 361, 955-964 (2003)

[57] Noldus, J. und Huland, H.: Die operative Therapie des lokalisierten Prostatakarzinoms. Onkologie 26, 6-12 (2003)

[58] Cato, A.C.B., Shatkina, L., Nestl und A., Mink, S.: Warum scheitert die Antihormontherapie bei fortgeschrittenem Prostatakrebs? Nachrichten – Forschungszentrum Karlsruhe 34, 41-48 (2002)

[59] Huggins, C. and Hodges, C.V.: Studies on prostatic cancer: 1. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. Cancer Res. 1, 293-297 (1941)

[60] Huggins, C., Stephens, R.C. and Hodges, C.V.: Studies on prostatic cancer: 2. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. Arch. Surg. 43, 209-223 (1941)

[61] Altwein, J.E. und Mohandessi, B.: Maximale Androgenblockade. Urologe A 39, 27-35 (2000)

[62] Montironi, R., Scarpelli, M. and López Beltran, A.: Carcinoma of the prostate: inherited susceptibility, somatic gene defects and androgen receptors. Virchows Arch. 444, 503-508 (2004)

[63] Denmeade, S.R. and Isaacs, J.T.: Development of prostate cancer treatment: the good news. Prostate 58, 211-224 (2004)

[64] Rosenberg, J. and Small, E.J.: Prostate cancer update. Curr. Opin. Oncol. 15, 217-221 (2003)

[65] van der Poel, H.G.: Smart drugs in prostate cancer. Eur. Urol. 45, 1-17 (2004)

[66] Stewart, K.M.: The African cherry (Prunus africana): Can lessons be learned from an over-exploited medicinal tree? J. Ethnopharmacol. 89, 3-13 (2003)

[67] Bombardelli, E. and Morazzoni, P.: Prunus africana (Hook. f.) Kalkm. Fitoterapia 68, 205-218 (1997)

[68] Kalkman, C.: The old world species of Prunus subg. Laurocerasus including those formerly referred to Pygeum. Blumea 13, 1-174 (1965)

[69] Cunningham, A.B. and Mbenkum, F.T.: Sustainability of harvesting Prunus africana bark in Cameroon: a medicinal plant in international trade. People and Plants Working Paper 2. UNESCO, Paris (1993)

[70] Cunningham, A.B.: People, park and plant use: recommendations for multiple-use zones and development alternatives around Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. People and Plants Working Paper 4. UNESCO, Paris (1996)

[71] Cunningham, A.B., Ayuk, E., Franzel, S., Duguma, B. and Asanga, C.: An economic evaluation of medicinal tree cultivation. Prunus africana in Cameroon. People and Plants Working Paper 10. UNESCO, Paris (2002)

[72] Dawson, I., Were, J. and Lengkeek, A.: Conservation of Prunus africana, an over-exploited medicinal tree. Forest Genetic Resources 28 (2000)

[73] Debat, J. (Laboratoires du Docteur Debat): Prunus africana extract for treating prostate hypertrophy. Patent FR 6703 (1966)

[74] Debat, J. (Laboratoires du Docteur Debat): Extracts of Prunus africana and related species. Patent FR 1578711 (1969)

[75] Dreikorn, K., Berges, R., Pientka, L. und Jonas, U.: Phytotherapie bei BPH. Urologe A 41, 447-451 (2002)

[76] Buck, A.C.: Phytotherapy for the prostate. Br. J. Urol. 78, 325-336 (1996)

[77] Catalano, S., Ferretti, M., Marsili, A. and Morelli, I.: New constituents of Prunus africana bark extract. J. Nat. Prod. 47, 910 (1984)

[78] Fourneau, C., Hocquemiller, R. and Cavé, A.: Triterpenes from Prunus africana bark. Phytochemistry 42, 1387-1389 (1996)

[79] Longo, R. and Tira, S.: Constituents of Pygeum africanum bark. Planta Med. 42, 195-196 (1981)

[80] Hass, M.A., Deanne, M.N., Leonova, E., Levin, R.M. and Longhurst, P.A.: Identification of components of Prunus africana extract that inhibit lipid peroxidation. Phytomedicine 6, 379-388 (1999)

[81] Bassi, P., Artibani, W., DeLuca, V., Zattoni, F. and Lembo, A.: Standardized extract of Pygeum africanum in the treatment of benign prostatic hypertrophy. Minerva Urol. Nefrol. 39, 45-50 (1987)

[82] Breza, J., Dzurny, O., Borowka, A., Hanus, Z., Petrik, R., Blane, G. and Chadha-Boreham, H.: Efficacy and adaptability of Tadenan (Pygeum africanum extract) in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH): a multicenter trial in central Europe. Curr. Med. Res.Opin. 14, 127-139 (1998)

[83] Dreikorn, K., Richter, R. and Schonhofer, P.: Conservative, non-hormonal treatment of benign prostatic hyperplasia. Urologe A 29, 8-16 (1990)

[84] Hartmann, R.W., Mark, M. and Soldati, F.: Inhibition of 5 α-reductase and aromatase by PHL-00801 (Prostatonin®), a combination of PY102 (Pygeum africanum) and UR102 (Urtica dioica) extracts. Phytomedicine 3, 121-128 (1996)

[85] Mathé, G., Orbach-Arbouys, S., Bizi, E. and Court, S.: The so-called phyto-estrogenic action of Pygeum africanum extract. Biomed. Pharmacother. 49, 339-340 (1995)

[86] Mathé, G., Hallard, M., Bourut, C.H. and Chenu, E.: A Pygeum africanum extract with so-called phyto-estrogenic action markedly reduces the volume of true and large prostatic hypertrophy. Biomed. Pharmacother. 49, 341-343 (1995)

[87] Wilt, T., Ishani, A., Mac Donald, R., Rutks, I. and Stark, G.: Review: Pygeum africanum extracts improve symptoms and urodynamics in symptomatic benign prostatic hyperplasia. ACP J. Club 1, 61 (2002)

[88] Levin, R.M. and Das, A.K.: A scientific basis for the therapeutic effects of Pygeum africanum and Serenoa repens. Urol. Res. 28, 201-209 (2000)

[89] Dreikorn, K.: The role of phytotherapy in treating lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. World J. Urol. 19, 426-435 (2002)

[90] Shoskes, D.A.: Phytotherapy in chronic prostatitis. Urology 60 (Suppl. 6A), 35-37 (2002)

[91] Yoshimura, Y., Yamaguchi, O., Bellamy, F. and Constantinou, C.E.: Effect of Pygeum africanum Tadenan on micturition and prostate growth of the rat secondary to coadministered treatment and post-treatment with dihydrotestosterone. Urology 61, 474-478 (2003)

[92] Yablonsky, F., Nicolas, V., Riffaud, J.P. and Bellamy, F.: Antiproliferative effect of Pygeum africanum extract on rat prostatic fibroblasts. J. Urol. 157, 2381-2387 (1997)

[93] Choo, M.S., Bellamy, F. and Constantinou, C.E.: Functional evaluation of Tadenan on micturition and experimental prostate growth induced with exogenous dihydrotestosterone. Urology 55, 292-298 (2000)

[94] Levin, R.M., Riffaud, J.P., Bellamy, F., Rohrmann, D., Krasnopolsky, L. Haugaard, N., Zhao, Y. and Wein, A.J.: Effects of Tadenan pretreatment on bladder physiology and biochemistry following partial outlet obstruction. J. Urol. 156, 2084-2088 (1996)

[95] Andro, M.C. and Riffaud, J.P.: Pygeum africanum extract for the treatment of patients with benign prostatic hyperplasia: a review of 25 years of published experience. Curr. Ther. Res. 56, 796-817 (1995)

[96] Huie, C.W.: A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Anal. Bioanal. Chem. 373, 23-30 (2002)

[97] Starmans, D.A.J. and Nijhuis, H.H.: Extraction of secondary plant metabolites from plant material: a review. Trends Food Sci. Technol. 7, 191-197 (1996)

[98] Bach, D.: Placebokontrollierte Langzeittherapiestudie mit Kürbissamenextrakt bei BPH-bedingten Miktionsbeschwerden. Urologe B 5, 437-443 (2000)

[99] Wachsmuth, O.: Rauvolfia serpentina (L.) Bentham ex Kurz – Moderne Aspekte einer traditionellen Arzneipflanze. Dissertation, Marburg (2002)

[100] Heilpflanzen-Suchmaschine von HEXAL *http://www.heilpflanzen-such-maschine.de/saegepalme/saegepalme.shtml*

[101] Bombardelli, E. and Morazzoni, P: Serenoa repens (Bartram) J.K. Small. Fitoterapia 68, 99-113 (1997)

[102] Naturlexikon online *http://www.natur-lexikon.com/Texte/km/001/00009-kuerbis.html*

[103] Bombardelli, E. and Morazzoni, P: Cucurbita pepo (L.). Fitoterapia 68, 291-302 (1997)

[104] Dotzlaw, H., Moehren, U., Mink, S., Cato, A.C., Iniguez Lluhi, J.A. and Baniahmad, A.: The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. Mol. Endocrinol. 16, 661-673 (2002)

[105] Dotzlaw, H., Papaioannou, M., Moehren, U., Claessens, F. and Baniahmad, A.: Agonist-antagonist induced coactivator and corepressor interplay on the human androgen receptor. Mol. Cell. Endocrinol. 213, 79-85 (2003)

[106] Gast, A., Schneikert, J. and Cato, A.C.: N-terminal sequences of the human androgen receptor in DNA binding and transrepressing functions. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 65, 117-123 (1998)

[107] Albrecht, S. Brandl, H. und Adam, W.: Chemilumineszenz-Reaktionen – Anwendungen in der klinischen Chemie, Biochemie und Medizin. Chemie in unserer Zeit 24, 227-238 (1990)

[108] Brack, W. und Altenburger, R.: Effektorientierte Identifikation toxischer Verbindungen. Mitteilungsblatt der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie 8, 2 (2002)

[109] Halász, I.: Extrographische Trennung der Erdölfraktion diverser Herkunft. Erdöl und Kohle 32, 571 (1979)

[110] Bogdoll, B. und Halász, I.: Präparative Gruppentrennung komplexer Gemische. Erdöl und Kohle 34, 549-556 (1981)

[111] Ishikawa, T., Nishigaya, K., Takami, K., Uchikoshi, H., Chen, I.S. and Tsai, I.L.: Isolation of salicin derivatives from Homalium cochinchinensis and their antiviral activities. J. Nat. Prod. 67, 659-663 (2004)

[112] Fleischer, T.C.: A novel retrodihydrochalcone from the stem bark of Uvaria mocoli. Phytochemistry 47, 1387-1391 (1998)

[113] Coquoz, J.-L., Buchala, A. and Métraux, J.-P.: The Biosynthesis of Salicylic Acid in Potato Plants. Plant Physiol. 117, 1095-1101 (1998)

[114] Hertweck, C., Jarvis, A.P., Xiang, L., Moore, B.S. and Oldham, N.J.: A Mechanism of Benzoic Acid Biosynthesis in Plants and Bacteria that Mirrors Fatty Acid β-Oxidation. ChemBioChem 10, 784-786 (2001)

[115] Tremblay, G.C. and Qureshi, I.A.: The biochemistry and toxicology of benzoic acid metabolism and its relationship to the elimination of waste nitrogen. Pharmac. Ther. 60, 63-90 (1993)

[116] Brehm, L., Stoeckli-Evans, H. and Tabacchi, R.: The Crystal Structure of Methyl β-orcinol-carboxylate (= Methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate). Helv. Chim. Acta 66, 824-827 (1983)

[117] Rücker, G., Neugebauer, M. und Willems, G.G.: Instrumentelle pharmazeutische Analytik. 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 122 (1992)

[118] Gormann, R., Kaloga, M., Li, X.-C., Ferreira, D., Bergenthal, D. and Kolodziej, H.: Furanonaphthoquinones, atraric acid and a benzofuran from the stem barks of Newbouldia laevis. Phytochemistry 64, 583-587 (2003)

[119] Cooke, R.G. and Down, J.G.: Colouring matters of Australian plants – XVI. Minor constituents of Dianella revoluta and Stypandra grandis. Aust. J. Chem. 24, 1257-1265 (1971)

[120] Lee, S.-S., Chang, S.-M. and Chen, C.-H.: Chemical Constituents from Alseodaphne andersonii. J. Nat. Prod. 64, 1548-1551 (2001)

[121] Nagumo, S., Ishizawa, S., Nagai, M. and Inoue, T.: Studies on the Constituents of Aceraceae Plants. XIII. Diarylheptanoids and Other Phenolics from Acer nikoense. Chem. Pharm. Bull. 44, 1086-1089 (1996)

[122] Cordell, G.A., Chang, P.T.O., Fong, H.H.S. and Farnsworth, N.R.: Xylosmacin, a new phenolic glucoside ester from Xylosma velutina (Flacourtiaceae). Lloydia 40, 340-343 (1977)

[123] Mulholland, D.A., Iourine, S.E., Taylor, D.A.H. and Dean, F.M.: Coumarins from Ekebergia pterophylla. Phytochemistry 47, 1641-1644 (1998)

[124] Bourgeois, G., Suire, C. and Vivas, N.: Atraric acid, a marker for epiphytic lichens in the wood used in cooperage: Identification and quantification by GC/MS/(MS). Analusis 27, 281-283 (1999)

[125] De Angelis, F., Ceci, R., Quaresima, R., Reale, S. and Di Tullio, A.: Investigation by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry of secondary metabolites in lichens deposited on stone monuments. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 526-531 (2003)

[126] Marante, F.J.T., Castellano, A.G., Rosas, F.E., Aguiar, J.Q. and Barrera, J.B.: Identification and quantititation of allelochemicals from the lichen Lethariella canariensis: phytotoxicity and antioxidative activity. J. Chem. Ecol. 29, 2049-2071 (2003)

[127] Teuscher, E.: Biogene Arzneimittel. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 180-183 (1997)

[128] Bardón, A., Bovi Mitre, G., Kamiya, N., Toyota, M. and Asakawa, Y.: Eremophilanolides and other constituents from the Argentine liverwort Frullania brasiliensis. Phytochemistry 59, 205-213 (2002)

[129] Asakawa, Y., Toyota, M., von Konrat, M. and Braggins, J.E.: Volatile components of selected species of the liverword genera Frullania and Schusterella (Frullaniaceae) from New Zealand, Australia and South America: a chemosystematic approach. Phytochemistry 62, 439-452 (2003)

[130] Rapior, S., Breheret, S., Talou, T. and Bessière, J.M.: Volatile flavor constituents of fresh Marasmius alliaceus (garlic Marasmius). J. Agric. Food Chem. 45, 820-825 (1997)

[131] Kumar, S. and Müller, K.: Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. J. Nat. Prod. 62, 821-823 (1999)

[132] Hirsenkorn, R.(Consortium für elektrochemische Industrie GmbH): Verfahren zur Herstellung von β-Resorcylsäurederivaten. Patent DE 4008223 A1 (1990)

[133] Schoessler, W. (Bayer AG): N-Alkylbenzenesulfonamides containing heat stabilizers for use as plasticizers. Patent EP 285946 (1988)

[134] Havens, M.R. and Lovin, J.R. (W.R. GRACE & CO.): Thermoplastic polymer composition containing an antistatic agent. Patent EP 264269 (1988)

[135] Sammet, U., Wazlawik, K., Schoebel, M. and Bald, G. (Rehau AG & Co): Heat-shrinkable polyamide compositions. Patent DE 10134139 A1 (2003)

[136] Kuehle, E., Schmitt, H.G., Brandes, W and Reinecke, P. (Bayer A.G.): Preperation of N-sulfenylbenzenesulfonamides as fungicides. Patent DE 3531362 A1 (1987)

[137] Huppert, N., Wuertele, M. and Hahn, H.H.: Determination of the plasticizer N-butylbenzenesulfonamide and the pharmaceutical Ibuprofen in wastewater using solid phase microextraction (SPME). Fresenius J. Anal. Chem. 362, 529-536 (1998)

[138] Jahr, D. and Roscher, E.: Contamination of drinking water via carbon dioxide enrichment devices - analytical study by on-line SPE-GC/MS. Dtsch. Lebensmitt. Rundsch. 96, 403-410 (2000)

[139] Toftegaards, C.L., Moore, C. and Bradley, A.J.: Chemical characterization of urinary pheromones in brown Antechinus, Antechinus stuartii. J. Chem. Ecol. 25, 527-535 (1999)

[140] Hankemeier, T., Steketee, P.C., Vreuls, J.J. and Brinkman, U.A.T.: At-line SPE-GC-MS of micropollutants in water using the PrepStation. Fresenius J. Anal. Chem. 364, 106-112 (1999)

[141] Pedersen, J.A., Yeager, M.A. and Suffet, I.H.: Xenobiotic organic compounds in runoff from fields irrigated with treated wastewater. J. Agric. Food Chem. 51, 1360-1372 (2003)

[142] Oros, D.R., Jarman, W.M., Lowe, T. David, N., Lowe, S. and Davis, J.A.: Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco Estuary. Mar. Pollut. Bull. 46, 1102-1110 (2003)

[143] Soliman, M.A., Pedersen, J.A. and Suffet, I.H.: Rapid gas chromatography – mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. J. Chromatogr. A 1029, 223-237 (2004)

[144] Poliakova, O.V., Lebedev, A.T. and Hänninen, O.: Organic pollutants in snow of urban and rural Russia and Finland. Toxicol. Environ. Chem. 75, 181-194 (2000)

[145] Strong, M.J. and Garruto, R.M.: Potentiation in the neurotoxic induction of experimental chronic neurodegerative disorders: N-Butylbenzenesulfonamide and aluminium chloride. Neurotoxicology 12, 415-426 (1991)

[146] Duffield, P., Bourne, D., Tan, K., Garruto, R.M. and Duncan, M.W.: Analysis of the neurotoxic plasticizer N-Butylbenzenesulfonamide by gas chromatography combined with accurate mass selected ion monitoring. J. Anal. Toxicol. 18, 361-368 (1994)

[147] Kim, K.K., Kang, J.G., Moon, S.S. and Kang, K.Y.: Isolation and identification of antifungal N-Butylbenzensulfonamide produced by Pseudomonas sp. AB2. J. Antibiot. 53, 131-136 (2000)

[148] Saganuma, M.; Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, E. and Fujiki.: Synergistic effects of (-)-Epigallocatechin Gallate with (-)-Epicatechin, Sulindac, or Tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. Cancer Res. 59, 44-47 (1999)

[149] Medical Dictionary online *http://www.online-medical-dictionary.org*

[150] WWF United Kingdom *http://www.wwf.org.UK/filelibrary/pdf/pafricana.pdf*

[151] Roth, H.J. und Fenner, H.: Arzneistoffe – Struktur – Bioreaktivität – Wirkungsbezogene Eigenschaften. 3. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 44-48, 118, 269 (2000)

[152] Becker, H, Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E., Faust, J., Fischer, M., Gentz, F, Gewald, K., Gluch, R., Mayer, R., Müller, K., Pavel, D., Schmidt, H., Schollberg, K., Schwetlick, K., Seiler, E. und Zeppenfeld, G.: Organikum – Organisch – chemisches Grundpraktikum. 15. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, 498, 686-687 (1976)

[153] Hajipour A.R., Mallakpour S.E., Najafi A.R. and Mazlumi GH.: An efficient and novel method for the synthesis of arylsulfonamides and sulfonic acid esters under solvent-free conditions. Sulfur Lett. 24, 137-145 (2000)

[154] Kretow, A.E. and Tikhonova, G.V.: N-Arylsulfonamid derivatives of monoethanolamine. Zh. Obs. Khim. 29, 412-415 (1959)

[155] Mutschler, E.: Arzneimittelwirkungen. 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 75 (1997)

[156] Culig, Z., Hoffmann, J., Erdel, M., Eder, I.E., Hobisch, A., Hittmair, A., Bartsch, G., Utermann, G., Schneider, M.R., Parczyk, K. and Klocker, H.: Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. Br. J. Cancer. 81, 242-51 (1999)

[157] Leers, J., Steiner, C., Renkawitz, R. and Muller, M.: A thyroid hormone receptor-dependent glucocorticoid induction. Mol. Endocrinol. 8, 440-447 (1994)

[158] Schulz M., Eggert, M., Baniahmad, A., Dostert, A., Heinzel, T. and Renkawitz, R.: RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N-terminus and by corepressor binding. J. Biol. Chem. 277, 26238-26243 (2002)

[159] Baniahmad, A., Tsai, S.Y., O`Malley, B.W. and Tsai, M.J.: Related Kindred S thyroid hormone receptor is an active and constitutive silencer and a repressor for thyroid hormone and retinoic acid responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 10633-10637 (1992)

[160] Takematsu, T., Konnai, M. and Omokawa, H.: Benzensulfonamide derivatives. Ger. Offen. DE 2744137 (1978)

[161] White, E.H., Charles, P., Ribi, M.A. and Ryan, T.J.: Deamination via nitrogen derivatives of sulfonic acids: N-alkyl-N-nitroso-4-toluenesulfonamides, N-alkyl-N-nitro-4-toluenesulfonamides, and N-alkyl-N´-(4-toluenesulfonyloxy)diimide N-oxides. J. Org. Chem. 46, 552-558 (1981)

[162] Kawahara, N., Nozawa, K., Nakajima, S., Udagawa, S. and Kawai, K.: Studies on fungal products. XVI. New metabolites related to 3-methylorsellinate from Aspergillus silvaticus. Chem. Pharm. Bull. 36, 398-400 (1988)

[163] Kumar, S. and Müller, K.: Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCaT cell growth. 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid. Eur. J. Med. Chem. 34, 1035-1042 (1999)

Lebenslauf

10.05.1977	Geboren in Fulda
1983-1987	Besuch der Grundschule in Neuhof
1987-1992	Besuch der Marienschule in Fulda (Gymnasium)
1992-1996	Besuch des Freiherr-vom-Stein-Gymnasiums in Fulda
06/1996	Abitur
10/1996-10/2000	Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
03/1997	Famulatur in der Coesterschen Apotheke in Neuhof
09/1997	Famulatur in der Krankenhausapotheke des Städtischen Klinikums in Fulda
08/1998	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/2000	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2000-04/2001	Pharmazie-Praktikum bei Lilly Forschung GmbH in Hamburg
05/2001-10/2001	Pharmazie-Praktikum in der Fleming-Apotheke in Hamburg
12/2001	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Approbation als Apothekerin
04/2002	Beginn der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter Betreuung von Herrn Prof. Matusch
04/2002-07/2002	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Philipps-Universität Marburg
08/2002-04/2005	Wissenschaftliche Angestellte an der Philipps-Universität Marburg, Betreuung des Praktikums „Instrumentelle Analytik“