



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Bioaktive Inhaltsstoffe der Gattung *Curcuma* L.“

Verfasserin

Sigrid Steins

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt.

Studienblatt:

A 438

Studienrichtung lt.

Studienblatt:

Biologie

Betreuerin

Ao. Univ.-Prof. Dr. Karin Valant-Vetschera

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Systematik und Morphologie	3
2.1. Systematik der Zingiberales	3
2.2. Systematik der Zingiberaceae	4
2.3. Systematik der Gattung <i>Curcuma</i>	5
2.4. Morphologie der Gattung <i>Curcuma</i>	5
3. Stoffklassen	7
3.1. Stoffklasse der Curcuminoide	7
3.2.1. Biosynthese der Curcuminoide	8
3.2.2. Biologische Wirkung von Curcuminoiden	11
3.2. Stoffklasse der Terpenoide	12
3.2.1. Biosynthese der Terpenoide	13
3.2.2. Biologische Wirkung von Terpenoiden	16
4. Material und Methoden	17
4.1. Pflanzenmaterial	17
4.2. Testorganismus <i>C. sphaerospermum</i>	17
4.3. Phytochemische Methoden	18
4.3.1. Extraktion	18
4.3.2. Chromatographie	18
4.3.2.1. Trockensäule mit Kieselgel (0,2 – 0,5 mm)	18
4.3.2.2. Trockensäule mit Kieselgel (40 – 60 nm)	18
4.3.2.3. Analytische Dünnschichtchromatographie	20
4.3.2.4. Sephadex ® LH-20 Säule	20
4.3.2.5. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	20
4.4. Spektroskopie	20
4.4.1. NMR-Spektroskopie	20
4.5. Bioassays	21
4.5.1 Kultivierung von <i>C. sphaerospermum</i>	21
4.5.2. Infektionsversuche mit <i>C. sphaerospermum</i>	22
4.5.2.1. Infektion von <i>C. longa</i> mit <i>C. sphaerospermum</i>	22
4.5.2.2. Extraktion bei Infektionsversuch	22

4.5.2.3. Analyse mit HPLC und Peakflächenberechnung.....	23
4.5.2.4. Konzentrationsabhängige Bioautographie auf DC-Platten.....	23
5. Ergebnisse und Diskussion	24
5.1. Phytochemische Charakterisierung.....	24
5.1.1. Gruppe 1.....	27
5.1.2. Gruppe 2.....	29
5.1.3. Gruppe 3.....	31
5.1.4. Gruppe 4.....	33
5.2. Bioaktivität unpolarer Substanzen.....	35
6. Literaturverzeichnis	40
7. Anhang	45
7.1. Spektraldatenkatalog.....	45
7.2. Tabellenverzeichnis.....	54
7.3. Abbildungsverzeichnis.....	55
7.4. Danksagung.....	56
7.5. Zusammenfassung.....	58
7.6. Abstract.....	59
7.7. Curriculum Vitae.....	60

1. Einleitung

Die Gattung *Curcuma* L. zählt zur Familie der Zingiberaceae und umfasst etwa 70 bis 80 Arten. Der Name „Curcuma“ wurde erstmals durch Linnaeus in seinem Werk *Species Plantarum* erwähnt und leitet sich vermutlich vom arabischen Wort „Kurkum“ ab, welches „gelb“ bedeutet (Islam, 2004). Die verschiedenen Arten der Gattung *Curcuma* sind in den Tropen und Subtropen anzutreffen. Sie kommen von Meeresniveau bis in Höhen von 1500 Metern vor und bevorzugen lockeren Boden mit Drainagekapazität (Rema & Madan, 2001). Das Verbreitungsareal erstreckt sich von Indien über Thailand, Malaysia und Indochina bis hin zu Indonesien und Nord-Australien (Apavatjirut et al., 1999). Ursprünglich stammt die Gattung *Curcuma* aus dem indomalaysischem Raum (Purseglove, 1968), verbreitete sich durch den Menschen auch in China (Ridley, 1912) und gelangte im 13. Jahrhundert nach Westafrika sowie im 17. Jahrhundert nach Ostafrika (Burkill, 1966). In Zentral- und Südamerika wurde die Gattung vermutlich durch die Spanier eingeführt (Islam, 2004). Durch ihre große Bedeutung in Medizin und Kosmetik sowie in den Bereichen der Färberei und Kulinarik werden Arten der Gattung *Curcuma* heute in großen Mengen kultiviert.

Curcuma alismatifolia Gagnepain und *Curcuma roscoeana* Wallich werden aufgrund ihrer Beliebtheit als Zierpflanzen vor allem in Thailand gezüchtet und von dort aus hauptsächlich nach Japan und Europa exportiert. *Curcuma parviflora* Wallich und *Curcuma zedoaria* Christmann werden unter anderem neben zahlreichen anderen Arten als Nahrungsmittel verwendet. Letztere findet überdies Anwendung in der Parfumindustrie (Sirirugsa, 1999). Die bekannteste Art in der Gattung *Curcuma* ist *Curcuma longa* L. Sie wurde bereits im indischen Ayurveda – der ältesten überlieferten Heilkunst - als Medizinalpflanze erwähnt (Sasikumar, 2005). Auch in der chinesischen Medizin wurde die Pflanze bereits vor mehreren tausenden von Jahren gegen eine Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt (Larsen & Larsen, 2006). Die Inhaltsstoffe von *C. longa* werden unter anderem als entzündungshemmend, antioxidativ, antifungal und antikanzerogen beschrieben (Araujo & Leon, 2001; Sharma et. al., 2005). Erwähnenswert sind auch die beiden Arten *C. sattayasaii* A. Chaveerach & R. Sudmoon und *C. zedoaroides* A. Chaveerach & T. Tanee, welche seit geraumer Zeit von thailändischen Naturheilern zur Behandlung von Kobra-Bissen eingesetzt werden (Chaveerach et. al., 2008).

Phytochemisch zeichnet sich die Gattung *Curcuma* vor allem durch das Vorkommen von Curcuminoiden und Sesquiterpenen aus. Chemisch gesehen handelt es sich bei Curcuminoiden um Diarylheptanoide, deren intensive gelbe Färbung auf ein System von

konjungierten Doppelbindungen zurückzuführen ist. Sesquiterpene werden der Stoffklasse der Terpenoide zugeordnet. Sie gelten als die zahlenmäßig größte Klasse unter den Terpenen und werden durch ein C₁₅-Grundgerüst charakterisiert, welches sich wiederum aus drei C₅-Isopreneinheiten zusammensetzt.

2. Systematik und Morphologie

2.1. Systematik der Zingiberales

Die Gattung *Curcuma* L. gehört zur Familie der Zingiberaceae, welche wiederum die größte in der Ordnung der Zingiberales ist. Ihr gehören über 2000 verschiedene Arten an, welche in 8 Familien und 92 Gattungen (Abb. 1) gegliedert werden (Kress et al., 2001). Aufgrund der verschiedenen Anzahl an fertilen Staubblättern kann diese Ordnung in zwei morphologische Gruppen unterteilt werden (Abb. 2.): Mitglieder der „Bananenfamilie“ zeichnen sich durch fünf fertile Staubblätter aus. Zu ihnen zählen 4 Familien: Heliconiaceae, Lowiaceae, Strelitziaceae und Musaceae. Arten, die den Familien der Cannaceae, Costaceae, Marantaceae oder den Zingiberaceae, angehören weisen hingegen nur ein fertiles Staubblatt auf. Diese gelten als Mitglieder der „Ingwerfamilie“ (Kress, 1990).

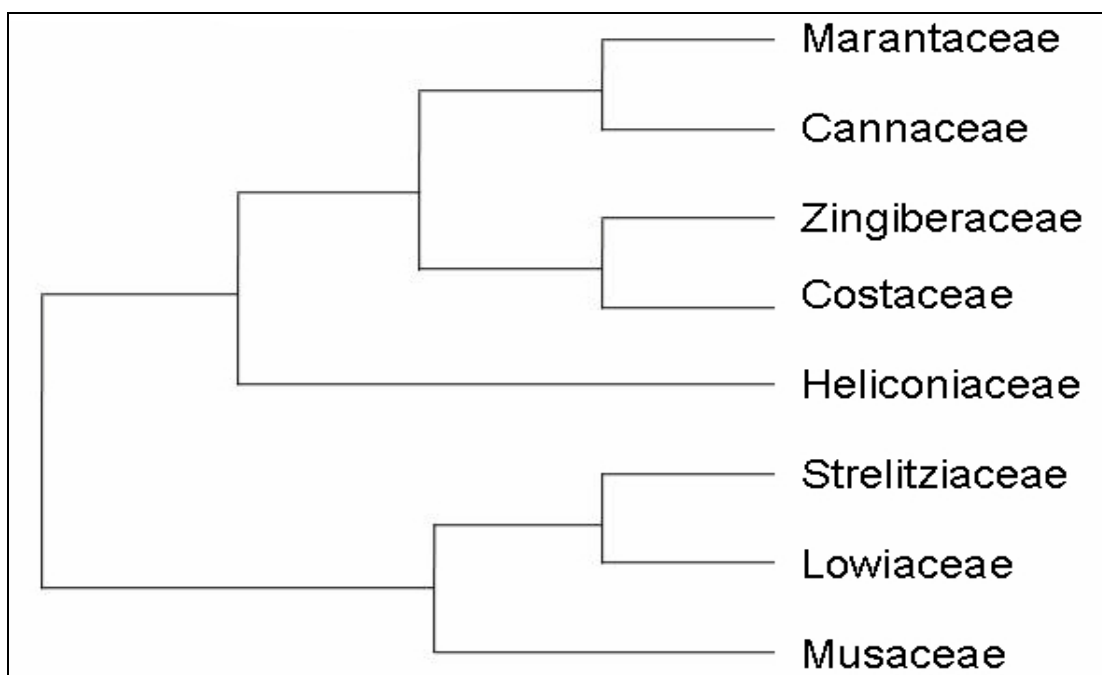


Abb. 1. Stammbaum der Zingiberales (nach Kress et al., 2001, verändert)

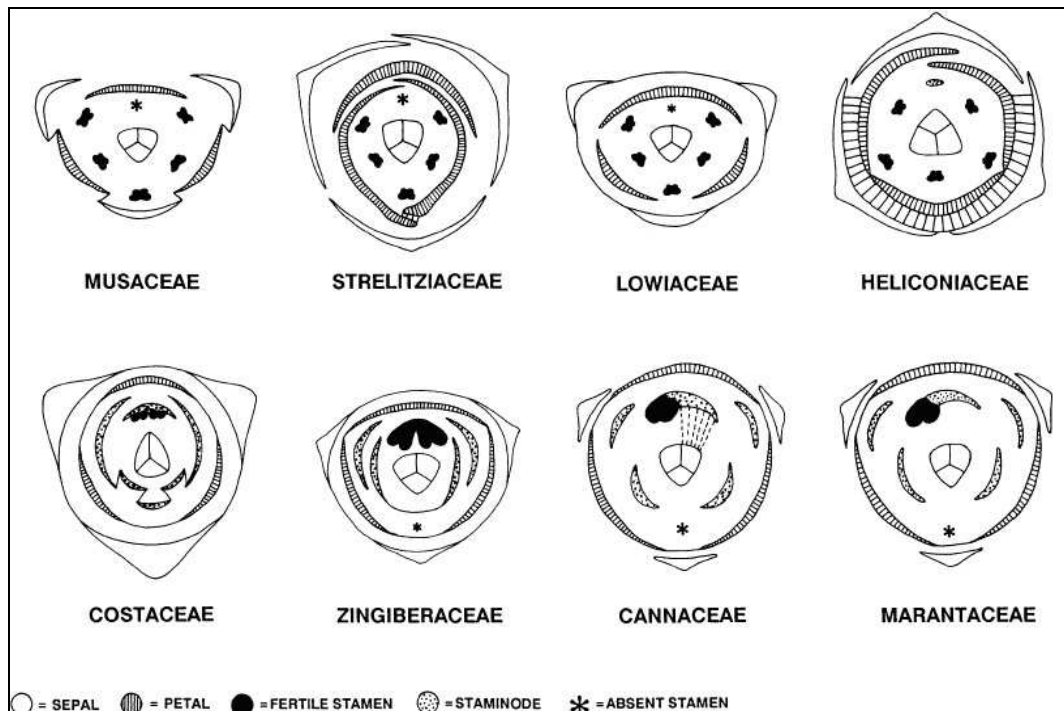


Abb. 2. Blütendiagramme der acht Familien der Zingiberales (Kress, 1990)

2.2. Systematik der Zingiberaceae

Die größte Familie innerhalb der Zingiberales ist die Familie der Zingiberaceae mit über 1200 Arten (Kress, 1990). Die Arten dieser pantropisch verbreiteten Pflanzenfamilie (Kress et al. 2001) sind ausdauernd und rhizombildend. Ihre distichen Blätter (Siriruga, 1999), können zum Teil Scheinstämme von beträchtlichen Ausmaßen hervorbringen (Bresinsky et al., 1998). Die zygomorphen Blüten (Abb. 3) tragen drei Staubblätter, wovon jedoch nur eines fertil (Kress, 1990) und die übrigen zu einem staminodialen Labellum verwachsen (Bresinsky et al., 1998) sind.

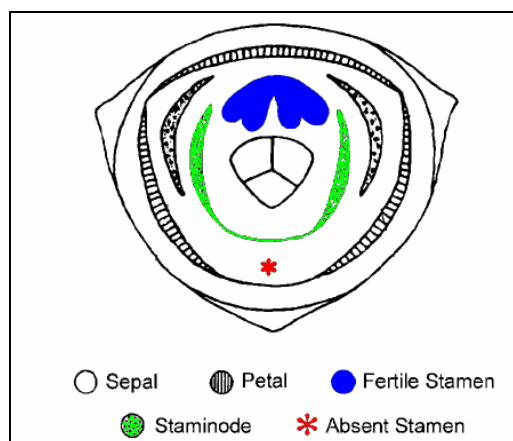


Abb. 3. Blütendiagramm (nach Kress et al., 2002, verändert)

Phylogenetische Studien durch Kress et al. (2002) führten zur heute gebräuchlichen taxonomischen Klassifikation der Familie der Zingiberaceae (Abb. 4), wonach sie in vier Unterfamilien und sechs Tribus eingeteilt wird.

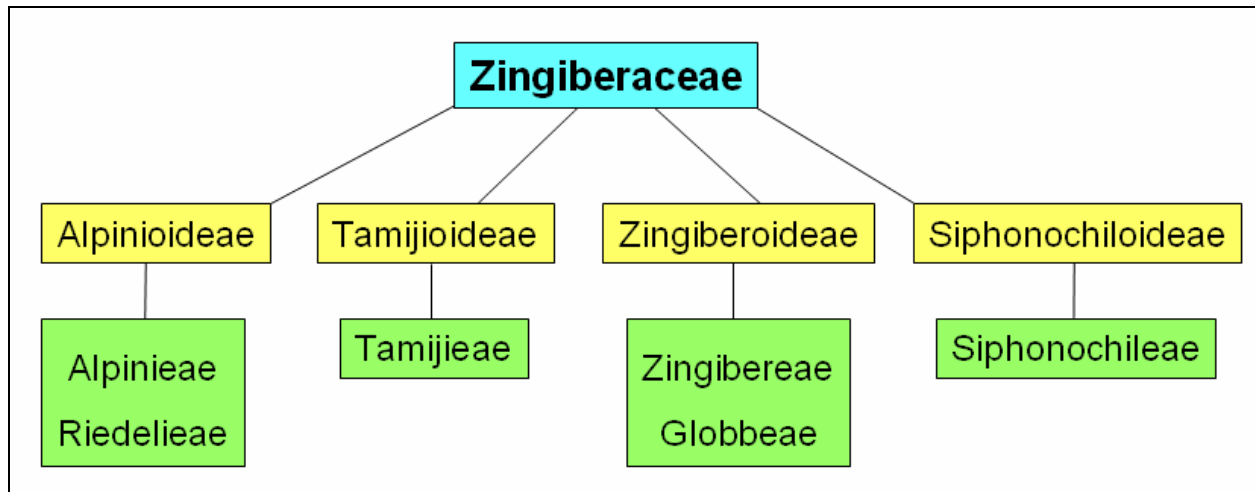


Abb. 4. Taxonomische Klassifikation der Zingiberaceae (nach Kress et al. 2002)

2.3. Systematik der Gattung *Curcuma* L.

Die Gattung *Curcuma* wird dem Tribus der Zingibereae, Unterfamilie Zingiberoideae (Kress et al., 2002) zugeordnet. Versuche der gattungsinernen Klassifikation von *Curcuma* L. basierten in der Vergangenheit häufig auf morphologischen Merkmalen. Baker (1893) unterteilte die Gattung aufgrund der Position der Infloreszenz und der Tragblätter in drei Sektionen: *Hitcheniopsis*, *Exantha* und *Mesantha*. Schumann (1904) gliederte die Gattung aufgrund von Tragblättern und Antherenmerkmalen in zwei Untergattungen: *Eucurcuma* und *Hitcheniopsis*. Die Spezies der Untergattung *Eucurcuma* wurden wiederum aufgrund der Position der Infloreszenzen die Sektionen *Exantha* und *Mesantha* zugeordnet. Valetton (1918) unterteilte die Gattung anhand verschiedener Merkmale der Laubblätter in zwei Untergattungen: *Eucurcuma* und *Paracurcuma*. Diese Klassifikation wurde auch von Velayudhan et al. (1999) vorgeschlagen, wonach die Untergattung *Eucurcuma* in drei Sektionen unterteilt wird: *Tuberosa*, *Nontuberosa* und *Stolonifera*. Aufgrund molekularsystematischer Arbeit erscheint die Gattung *Curcuma* paraphyletisch (Kress et al., 2002; Ngamriabsakul et al., 2004). Damit ist die mehrheitlich verwendete Gliederung in *Eucurcuma* und *Paracurcuma* auch in Frage gestellt.

2.4. Morphologie der Gattung *Curcuma* L.

Spezies der Gattung *Curcuma* bilden spitz zulaufende, elliptisch geformte Laubblätter aus, deren Blattscheiden sich zu einem Scheinstamm formieren. Je nach Art können diese

Pflanzen Wuchshöhen zwischen 50 und 200 cm erreichen (Islam, 2004). Die fleischigen Rhizome von *Curcuma* sind zumeist stark verzweigt, aromatisch riechend und durch das Vorkommen von Curcuminoiden typisch gelb-orange gefärbt. Der Blütenstand befindet sich entweder terminal oder lateral an der Blattachse. Die terminalen Hochblätter bilden eine sterile, oft auffällig gefärbte Struktur (Coma), deren Farbgebung sich stets von der der fertilen Blüten unterscheidet. Die Blütezeit von *Curcuma* erstreckt sich von April bis Oktober, wobei die Bildung der Infloreszenz bei manchen früh-blühenden Arten (April bis Mai) vor Erscheinen der Laubblätter stattfindet (Apavatjirut et al., 1999).

3. Stoffklassen

3.1. Stoffklasse der Curcuminoiden

Unter dem Begriff Curcuminoiden werden zahlreiche Diarylheptanoide zusammengefasst. Es handelt sich dabei um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die unter anderem in den Rhizomen verschiedener Spezies der Gattung *Curcuma* vorkommen. Die drei Hauptinhaltsstoffe von *Curcuma* unterscheiden sich nur in der Anzahl ihrer Methoxygruppen (Abb. 5): Curcumin, Bisdemethoxycurcumin und Demethoxycurcumin. Mengenmäßig bildet üblicherweise Curcumin den größten Anteil, die beiden anderen Komponenten sind zumeist in geringeren Konzentrationen vorhanden.

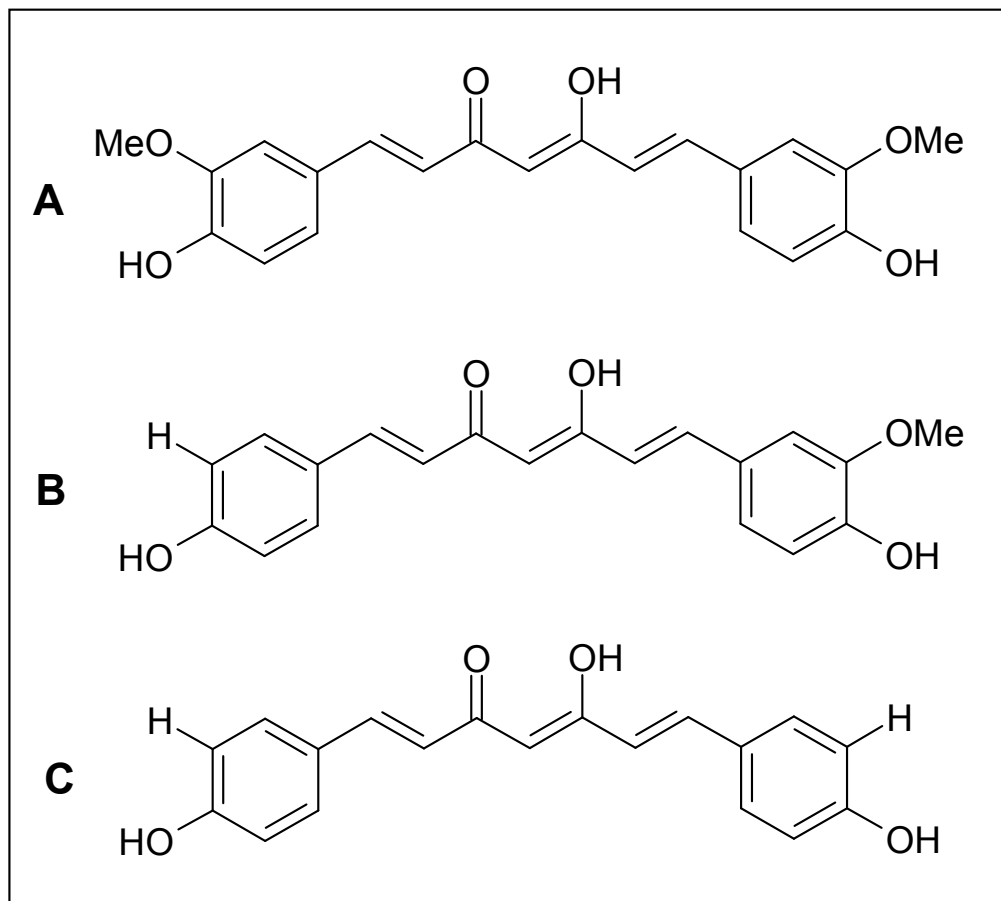


Abb. 5. Chemische Struktur der Curcuminoiden (nach Höhle et al., 2006, verändert).

A – Curcumin, **B** – Demethoxycurcumin, **C** – Bisdemethoxycurcumin

Chemisch gesehen handelt es sich bei Curcuminoiden um Diarylheptanoide, deren gelb-orange Farbe auf ein System von konjugierten Doppelbindungen zurückzuführen ist. Der aliphatische Teil weist ein Diketostrukturelement auf, woraus sich eine Keto-Enol-

Tautomerisierung (Abb. 6) ergibt (Höhle et al., 2006). In Lösung tritt ausschließlich die Enol-Form auf.

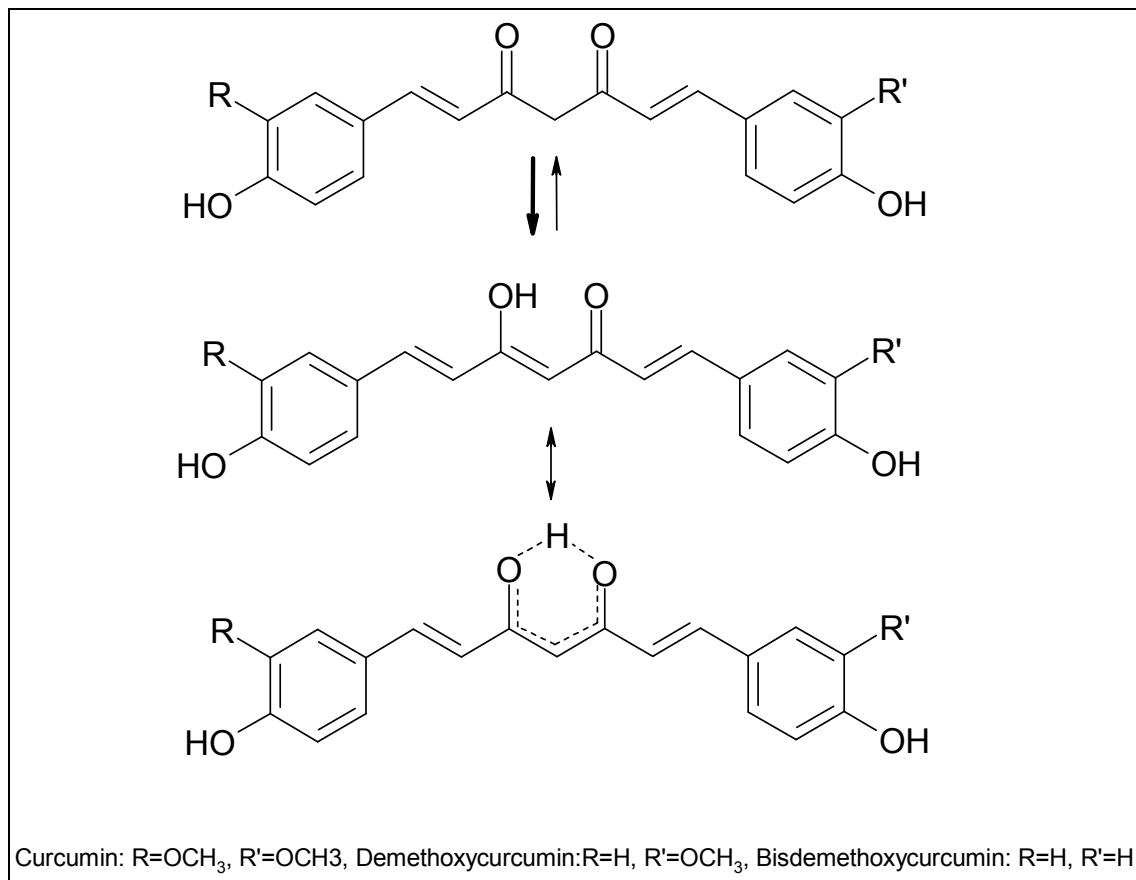


Abb. 6. Keto-Enol Tautomerisierung (nach Höhle et al., 2006)

3.1.2. Biosynthese der Curcuminoiden

In-vitro durchgeführte Studien von Ramirez-Ahumada et al (2006) und Katsuyama et al. (2009), die auf Enzymassays beruhen, zeigten dass die Ausgangssubstanz zur Biosynthese von Curcuminoiden die Aminosäure Phenylalanin bildet (Abb. 7). Diese wird unter Beteiligung Polyketidsynthasen zu *p*-Coumaroyl-CoA und in weiterer Folge in Feruloyl-CoA umgewandelt (Ramirez-Ahumada et al., 2006). Anschließend katalysiert das Enzym Diketid-CoA-Synthase die Bildung von *p*-Cumaroyldiketid-CoA aus *p*-Coumaroyl-CoA und Malonyl-CoA. Auch die Bildung von Feruloyldiketid-CoA aus Feruloyl-CoA und Malonyl-CoA wird von diesem Enzym katalysiert. Diese zwei Substanzen werden dann in weiterer Folge durch drei verschiedene Typ III-Polyketid-Synthasen (Curcuminsynthase 1, 2 und 3) mit verschiedener Substratspezifität in Curcuminoiden umgewandelt. Curcuminsynthase 1 und 2 bevorzugen hierbei Feruloyl-CoA, das anschließend unter Kondensation mit Feruloyldiketid-CoA oder *p*-Cumaroyldiketid-CoA zu Curcumin oder Demethoxycurcumin verwandelt wird. Die Curcuminsynthase 3 hingegen akzeptiert sowohl

Feruloyl-CoA als auch *p*-Coumaroyl-CoA und bildet in weiterer Folge Curcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin (Katsuyama et al., 2009). Nach Ramirez-Ahumada et al. (2006) kann das entstandene Bisdemethoxycurcumin durch Hydroxylierung und das Enzym O-Methyltransferase in Demethoxycurcumin und Curcumin umgewandelt werden.

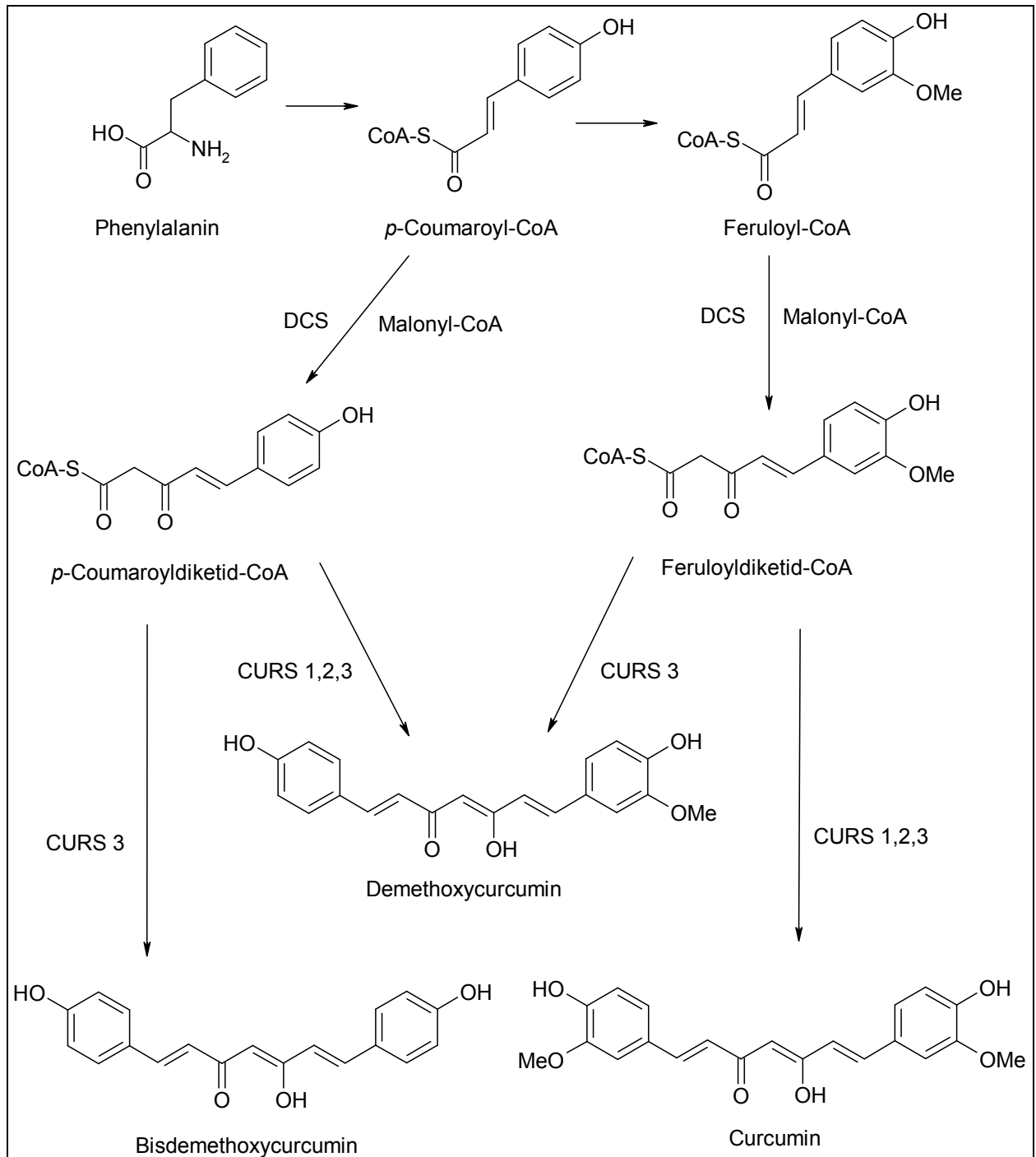


Abb. 7. Biosyntheseweg der Curcuminoide (nach Katsuyama et al., 2009, verändert)

Experimente von Kita et al. (2008) die auf ^{13}C -Markierung von Vorläufersubstanzen der Curcuminoiden beruhen (Abb.8.), zeigen Abweichungen von den Ergebnissen der Studien von Ramirez et al. (2006) und Katsuyama et al. (2009). Die Basis dieses Biosyntheseweges bildet zwar die Aminosäure Phenylalanin, welche jedoch durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) zu Zimtsäure umgewandelt wird. In einem Zwischenschritt der Biosynthese erfolgt unter Beteiligung von zwei Molekülen Zimtsäure und Malonyl-CoA die Synthese von Bisdeshydroxybisdemethoxycurcumin (BDHBDMC). Anschließende Hydroxylierung hat die Entstehung von Bisdemethoxycurcumin zur Folge, woraus durch Anlagerung einer Methoxygruppe schließlich Demethoxycurcumin entsteht. Erfolgt nun eine weitere Methoxylierung, bildet sich Curcumin (Kita et al., 2008).

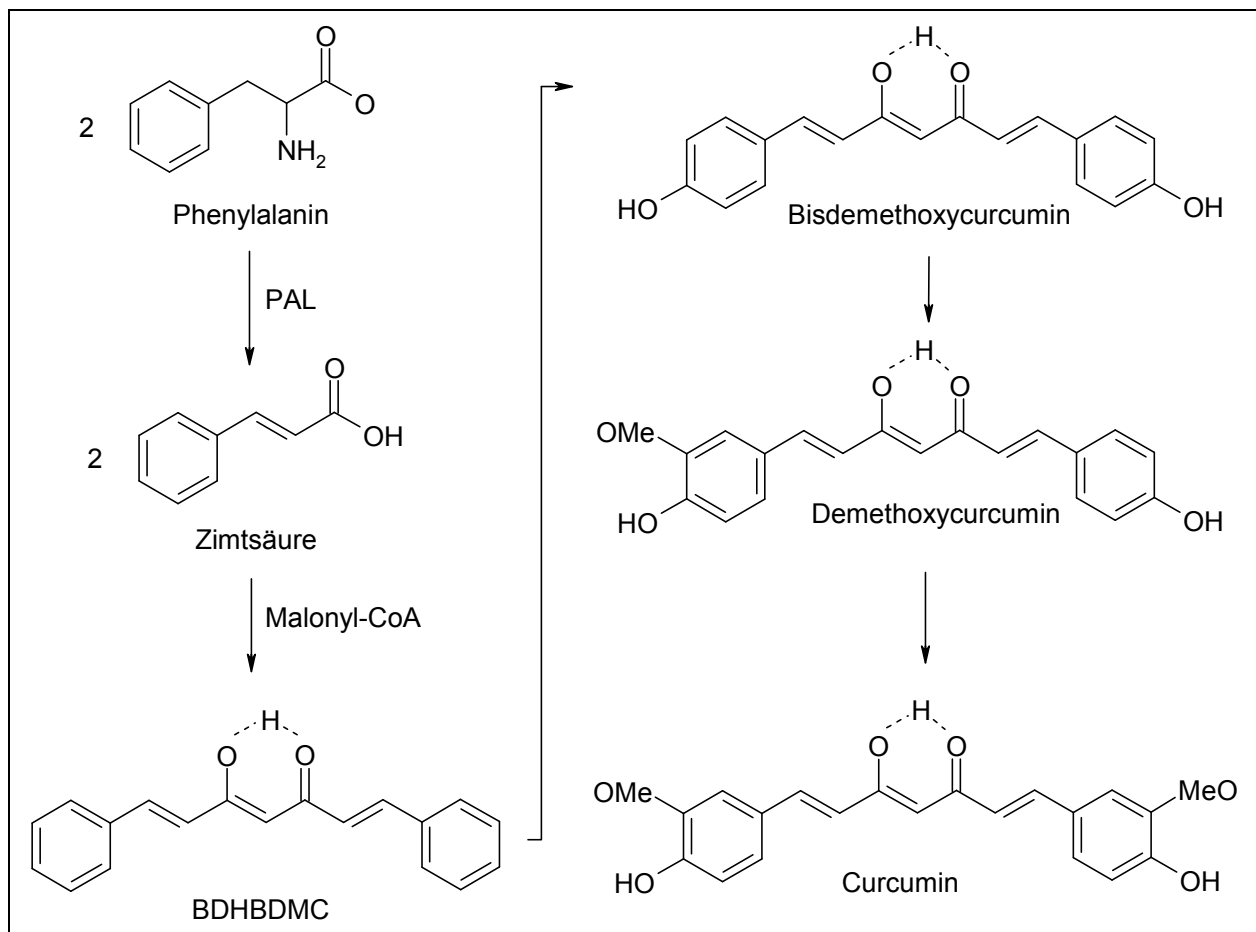


Abb. 8. Biosynthese basierend auf ^{13}C -Markierung von Vorläufersubstanzen von Curcuminoiden (nach Kita et al., 2008).

Laut Kita et al. (2008) existiert u.a. noch ein weiterer Biosyntheseweg, wenngleich dieser etwas seltener in Erscheinung tritt. Ausgehend von einer Hydroxylierung von Zimtsäure bildet sich *p*-Cumarsäure. Durch Anlagerung einer Methoxygruppe am

Benzolring bildet sich Ferulasäure. Zwei dieser entstandenen Moleküle verbinden sich schließlich unter Einfluss von Malonyl-CoA zu Curcumin (Abb. 9.).

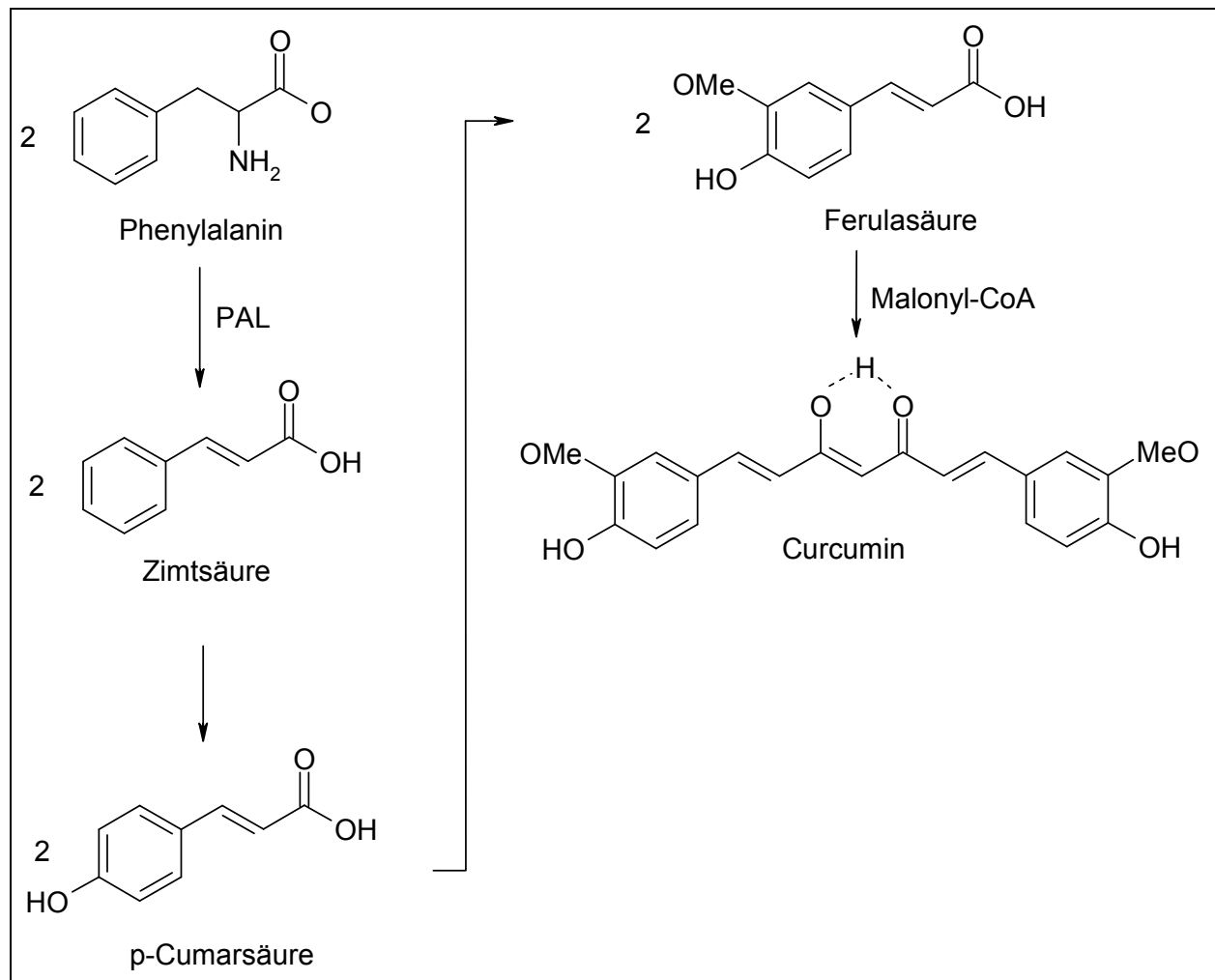


Abb. 9. Biosyntheseweg von Curcumin über *p*-Cumarsäure und Ferulasäure (nach Kita et al., 2008).

3.1.3. Biologische Wirkung von Curcuminoiden

Arten der Gattung *Curcuma* wurden bereits vor tausenden von Jahren in der traditionellen chinesischen und indischen Heilkunst (Ayurveda) zur Heilung einer Vielzahl von Krankheiten verwendet (Larsen & Larsen, 2006). Die Anwendungsbereiche erstrecken sich über weite Gebiete der Medizin: So wird *Curcuma* beispielsweise zur Linderung von Husten und Rheuma sowie zur Behandlung von Schwellungen, Verstauchungen und Entzündungen eingesetzt (Ammon et al., 1992). Weiters werden Inhaltsstoffen dieser Pflanze antikanzerogene Eigenschaften (Rao et al. 1995), sowie antivirale (Chattopadhyay et al., 2004) und antibakterielle (Haukvik et al., 2009) Effekte zugeschrieben.

Die antioxidative Wirkung von Curcuminoiden beruht auf dem Vorhandensein der Diketo-Struktur und der phenolischen Hydroxygruppen (Hoehle et al., 2006). Diese Eigenschaft wird zusätzlich durch das System an konjugierten Doppelbindungen verstärkt welches die Bildung relativ stabiler, freier Radikale begünstigt. Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit und schnellen Metabolisierung von Curcumin (Anand et al., 2007) wird die antioxidative Wirkung eher dessen Metaboliten zugeschrieben (Hoehle et al., 2006). Hydrogenierte Metabolite wie Tetrahydrocurcumin und Hexahydrocurcumin erwiesen sich aktiver als Curcumin und dessen natürliche Methoxy-Derivate Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin (Somporn et al., 2007).

Studien bezüglich der antiinflammatorischen Wirkung von Curcuminoiden zeigten, dass diese zur Hemmung der Stickoxid-Synthase befähigt sind, welche bei Entzündungsprozessen aktiviert wird. Curcumin wies in diesem Zusammenhang eine höhere Aktivität auf als seine Metabolite Tetrahydrocurcumin, Hexahydrocurcumin und Octahydrocurcumin (Pan et al., 2000). Darüberhinaus kann die entzündungshemmende Wirkung von Curcuminoiden durch ihren Einfluss auf am Entzündungsprozess beteiligten Enzymen und Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Curcumin hemmt die Aktivierung des Nuclear Factor κ B (Plummer et al., 1999) welcher im Zellkern unter anderem die Entstehung von Cyclooxygenase-2 bewirkt. Dieses Enzym ist an der Prostgalandin-Biosynthese beteiligt, wodurch sich seine Inhibierung in der Hemmung von Entzündungsprozessen manifestiert. Nach Goel et al. (2001) geht die Unterdrückung der Cyclooxygenase-2 Expression auch mit der Wachstumshemmung von humanen Darmkrebszellen einher.

3.2. Stoffklasse der Terpenoide

Terpenoide sind Substanzen, die durch Verknüpfung von C-5 Isopreneinheiten (Abb.10.) entstehen. Diese Stoffklasse gilt als sehr heterogen und ist mit circa 25.000 bekannten Verbindungen (Zwenger & Basu, 2008) eine der größten innerhalb der Gruppe pflanzlicher Sekundärmetabolite. Die Einteilung der Terpenoide erfolgt nach Anzahl der vorhandenen Isopreneinheiten: So werden Verbindungen mit zwei Isopreneinheiten den Monoterpenen zugeordnet, jene mit drei hingegen den so genannten Sesquiterpenen. Diterpene bestehen demnach aus vier solcher Einheiten, Tetraterpene aus acht Isopreneinheiten. Alle dieser Stoffklasse zugehörigen Verbindungen, die sich aus mehr als acht Isopreneinheiten zusammensetzen, werden unter dem Begriff „Polyterpene“ zusammengefasst (Sitte et al., 1998).

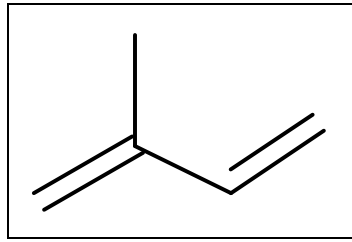


Abb. 10. Isopren

3.2.1. Biosynthese der Terpenoide

Die Biosynthese von Terpenoiden kann über zwei verschiedene Wege erfolgen (Abb. 11.). Nach Schwarz (1994) können der Mevalonatweg, der überwiegend im Cytoplasma abläuft und der Desoxyxyluloseweg, welcher in den Plastiden stattfindet, in höheren Pflanzen simultan auftreten. Da Metabolite zwischen diesen beiden Zellkompartimenten ausgetauscht werden können, kommt es häufig zu einem sogenannten „Crosstalk“. Die räumliche Trennung dieser beiden Biosynthesewege ist also keinesfalls absolut (Eisenreich et. al, 2001). Aus Mevalonat wird zunächst unter Verbrauch von ATP und mit Hilfe der Enzyme Mevalonat-Kinase, Phosphomevalonat-Kinase und Mevalonat-5-diphosphat-Decarboxylase Isopentylidiphosphat (IPP) erzeugt, welches jedoch durch eine Isomerase in Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) umgewandelt werden kann (Abb. 11). Im Desoxyxyluloseweg hingegen wird IPP durch das Enzym Desoxyxylulose-Synthase aus 1-Desoxyxylulose-5-Phosphat und unter Verbrauch von NADPH und ATP synthetisiert (Schwarz, 1994).

Nach Synthese von IPP und DMAPP erfolgt anschließend die Kopf-Schwanz-Addition der beiden Isomere (Abb. 12.), woraus Geranylpyrophosphat (GPP) entsteht, welches die Ausgangssubstanz zur Synthese von Monoterpenen ist. Wird nun ein weiteres Molekül IPP angefügt so kommt es zur Entstehung von Farnesylpyrophosphat (FPP) die Ausgangssubstanz zur Biosynthese von Sesquiterpenen. Die Grundlage für die Synthese von Diterpenen, Tetraterpenen und Polyterpenen bildet die Substanz Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), welche durch die Addition eines Moleküls IPP an FPP entsteht (Gershenzon & Croteau, 1993). Die Katalyse von intramolekularen Cyklisierungen die beispielsweise bei der Synthese von Tri- und Tetraterpenen wichtig sind, erfolgt durch sogenannten Cyklasen (Gershenzon & Croteau, 1993). Die Polymerisationsreaktionen werden durch Prenyltransferasen katalysiert.

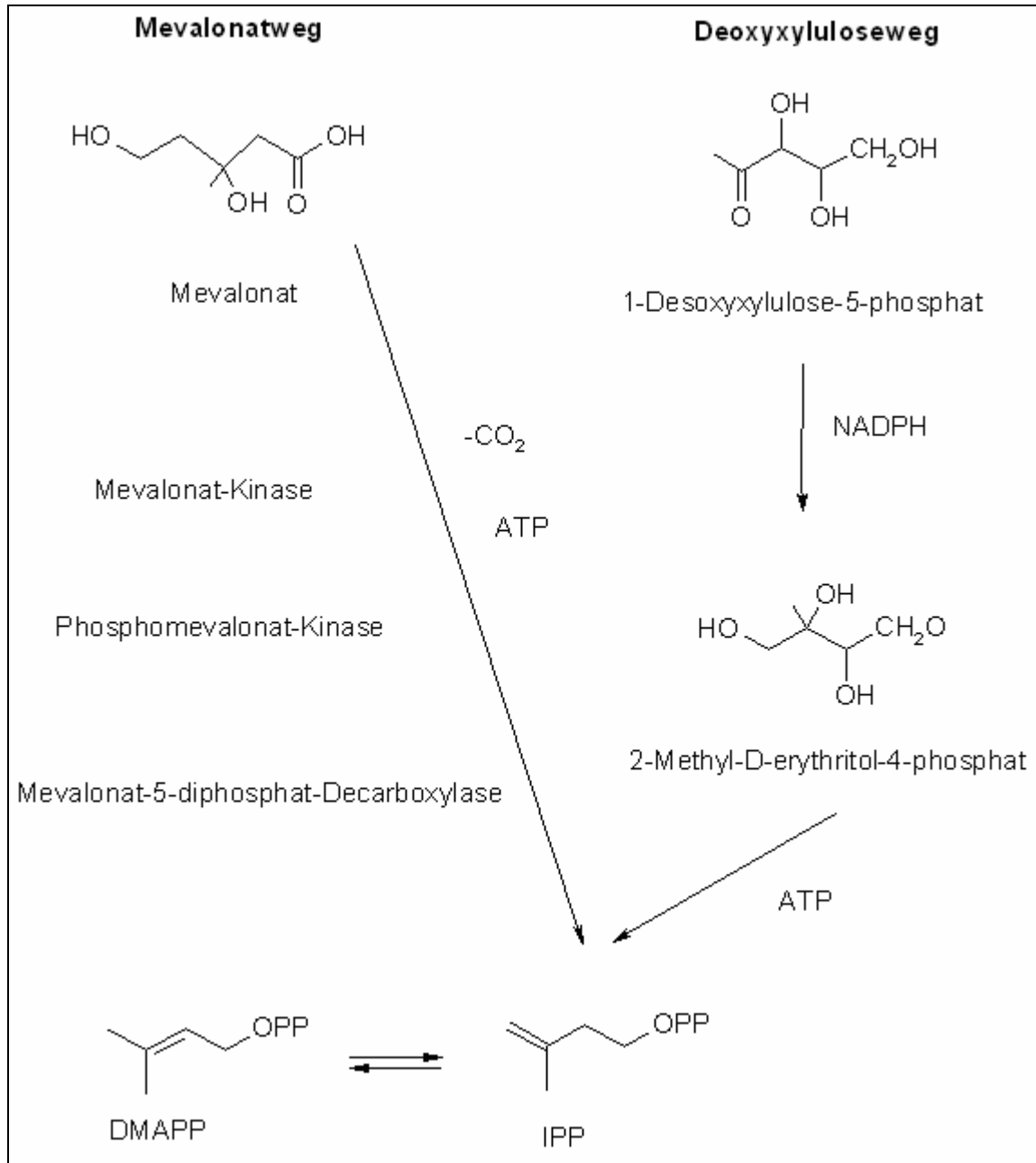


Abb. 11. Syntheseweg von Isopentenyl diphosphat.

IPP - Isopentenyl diphosphat, **DMAPP** - Dimethylallyl diphosphat (nach Schwarz, 1994)

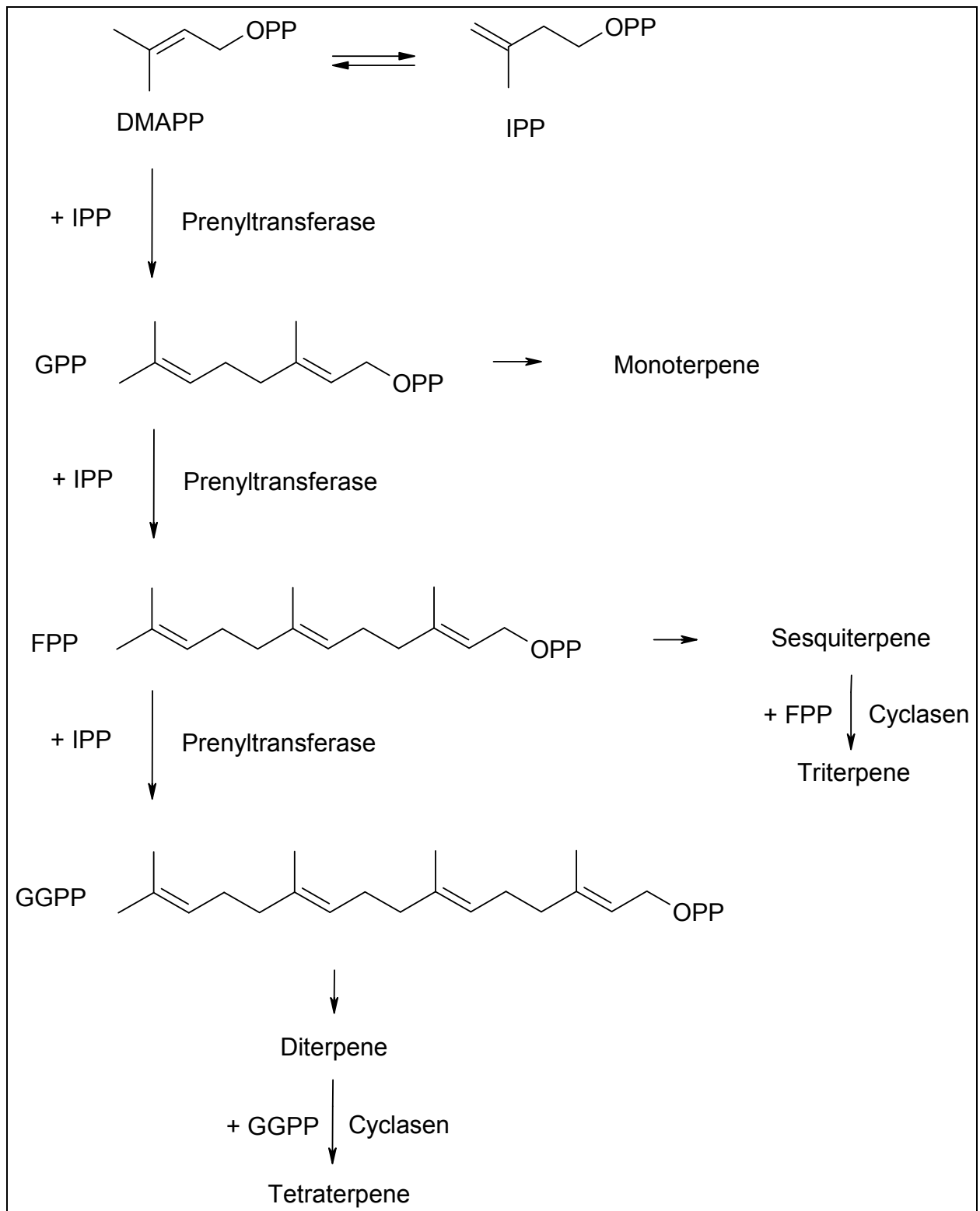


Abb. 12. Biosynthese verschiedener Terpenoide nach Gershenzon & Croteau (1993).

3.2.2. Biologische Wirkung von Terpenoiden

Terpenoide weisen ein sehr breitgefächertes Wirkungsspektrum auf, wodurch sich ihre vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten in Teilbereichen von Medizin, Biologie und Kosmetik erklären. Monoterpene sind aufgrund ihres niedrigen Siedepunktes stark flüchtig und stellen gemeinsam mit Sesquiterpenen somit oft den Hauptbestandteil von ätherischen Ölen dar (Munk, 2001). Sie gelten als die typischen Geruchs- und Aromastoffe der Pflanzen und werden zudem häufig in der Parfüm- und Kosmetikindustrie eingesetzt. Erwähnenswert ist überdies ihre Wirkung gegen bakterielle Krankheitserreger wie beispielsweise *Salmonella typhimurium* und *Staphylococcus aureus* (Burt, 2004). Eine der wichtigsten Gruppen unter den Terpenen sind die Sesquiterpenlactone. Sie zeigen oft insektizide (Roth et al., 1998) und antifungale (Barrero et al., 2000) Wirkung. Ihre antiinflammatorische Wirkung wird unter anderem auf die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zurückgeführt, der bei Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle spielt (Siedle, 2003). Manche Sesquiterpenlactone wirken jedoch häufig toxisch oder allergen (Munk, 2001; Siedle, 2003).

Diterpene kommen in Pflanzen unter anderem in Harzen vor (Demetzos & Dimas, 2001). Sie spielen auch eine wichtige Rolle als Gibberelline (Munk, 2001). Manche Diterpene wirken stark zytostatisch (Munk, 2001) oder hemmen Enzyme, die an der Karzinogenese beteiligt sind (Cavin et al., 2002) wodurch sie eine große Rolle in der Onkologie spielen. Zudem werden einigen Diterpenen antifungale, antibakterielle (Becerra et al., 2002) sowie insektizide Wirkung zugeschrieben (De Omena et al., 2006). Triterpene liegen in der Natur überwiegend in tetra- und pentazyklischer Form vor (Munk, 2001). Einige erweisen sich als antiviral, antibakteriell sowie entzündungshemmend und zeigen überdies Wirkung gegen Malaria und Krebszellen (Cichewicz & Kouzi, 2004). Tetrazyklische Triterpene bilden die Ausgangssubstanzen zur Synthese von pflanzlichen Steroiden. Die in wässrigen Medien stark schäumenden Triterpensaponine entstehen durch Veresterung von pentazyklischen Triterpenen mit Zuckern und agieren in Pflanzen häufig als Fraßgift (Munk, 2001). Eine der wichtigsten Gruppen unter den Tetraterpenen sind die Carotinoide. Diese spielen einerseits eine wichtige Rolle bei der Photosynthese, fungieren aber auch als photoprotektive Pigmente und weisen antioxidative Wirkung auf (Krinsky, 1994). Polyterpene werden von vielen Pflanzenarten in Form von Naturkautschuk produziert, welcher durch Vulkanisation zu Gummi verarbeitet wird (Munk, 2001).

4. Material und Methoden

4.1. Pflanzenmaterial

Im Zuge dieser Arbeit wurden Rhizome verschiedener Arten der Gattung *Curcuma* untersucht. Das Pflanzenmaterial wurde größtenteils im Jahre 2006 beziehungsweise 2010 auf thailändischen Märkten gekauft und anschließend im Botanischen Garten der Universität Wien kultiviert. Die für die Infektionsversuche verwendeten Rhizome von *C. longa* wurden vom Naschmarkt in Wien bezogen und stammen ursprünglich ebenfalls aus Thailand (Tab. 1.).

Tab.1. Herkünfte der im Zuge dieser Arbeit analysierten Individuen

Art	Herbarnummer	Herkunft
<i>Curcuma sp.</i>	ZIN 060001	Bangkok Chatuchak Market, Thailand
<i>Curcuma sp.</i>	ZIN 060004	Bangkok Chatuchak Market, Thailand
<i>Curcuma longa</i>	NM	Naschmarkt Wien, Österreich
<i>Curcuma longa</i>	ZIN 070007	Trang Market, Thailand
<i>Curcuma sp.</i>	ZIN 060011	Bangkok Chatuchak Market, Thailand
<i>Curcuma sp.</i>	ZIN 060016	Bangkok Chatuchak Market, Thailand
<i>Curcuma sp.</i>	ZIN 060002	Bangkok Chatuchak Market, Thailand
<i>Curcuma sp.</i>	ZIN 060005	Bangkok Chatuchak Market, Thailand
<i>Curcuma sp.</i>	ZIN 060006	Bangkok Chatuchak Market, Thailand
<i>Curcuma sp.</i>	ZIN 10001	Nan Market, Thailand

4.2. Testorganismus *Cladosporium sphaerospermum* Penz

Die Gattung *Cladosporium sp.* zählt zur Familie der mitosporischen Davidiellaceae und wurde erstmals 1816 durch Link beschrieben. Viele Arten dieser Gattung sind weltweit verbreitet und weisen oft eine grosse ökologische Amplitude auf (Zalar et al, 2007). Man findet sie auf alternden oder toten Blättern sowie in der Luft und im Boden (Benesch et al., 2010). Manche Arten wie beispielsweise *C. sphaerospermum* - die von Penzig 1882 auf Zitrusblättern entdeckt und erstmals beschrieben wurde - können auch in stark salzhaltigen Gewässern vorkommen (Zalar et al, 2007). Durch Melanin-Einlagerungen wirkt das dickwandige Myzel von *C. sphaerospermum* olivfarben. Die Konidien stehen zumeist terminal, sind von fast sphärischer Form und weisen eine warzige Oberfläche auf (Zalar et al, 2007). *C. sphaerospermum* gilt zwar nicht als Produzent von Mycotoxinen (Davis et al,

1975), kann jedoch beim Menschen Allergien und Atemwegserkrankungen hervorrufen (Yano et al., 2003). Der im Zuge dieser Arbeit für Bioassays verwendete Pilz wurde von Günther Krauss in Wien aus der Luft isoliert. Die Identifikation erfolgte am Institut für Botanik der Universität Wien durch Alexander Urban und Caroline Rebernik mit Hilfe von ITS Sequenzen (Raninger, 2009).

4.3. Phytochemische Methoden

4.3.1. Extraktion

Die zerkleinerten, frischen Rhizome wurden zunächst mit Methanol überschichtet und drei Tage lang bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Vor dem Abfiltrieren wurde der Extrakt für 20 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt, um eine noch effizientere Extraktion zu gewährleisten. Anschließend wurde das noch methanolhaltige Filtrat bis zum völligen Verdampfen des Lösungsmittels am Rotavapor bei 30°C eingeeengt. Der Rückstand wurde dann mit Chloroform und destilliertem Wasser 3 Mal ausgeschüttelt. Die entstandenen Phasen wurden abermals bei 30°C abrotiert und zur Lagerung bei -20°C in Braunglasfläschchen überführt.

4.3.2. Chromatographie

4.3.2.1. Trockensäule mit Kieselgel (0,2 - 0,5 mm)

Die durch Ausschütteln erhaltenen Chloroformphasen wurden zunächst nach Polarität mittels Säulenchromatographie aufgetrennt. Zu Beginn wurde eine Glassäule von 20 mm Durchmesser und 70 cm Länge mit 60 g Kieselgel 60 (Korngröße 0,2 – 0,5 mm, Firma Merck) befüllt. Das aufgefangene Eluat wurde in 50 mL Fraktionen geschnitten (Tab. 2.) und anschließend am Rotavapor bei 30°C eingeeengt. Die Einstellung der Konzentration erfolgte auf 2 mg/mL. Die durch HPLC und Dünnschichtchromatographie zur weiteren Verwendung ausgewählten Fraktionen wurden anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

4.3.2.2. Trockensäule mit Kieselgel (40 – 60 µm)

Zur Säulenchromatographie mit feinem Kieselgel wurde eine Glassäule von 20 mm Durchmesser mit 30 g Kieselgel 60 (Korngröße 0,04 – 0,063 mm) befüllt. Die Elution erfolgte mit je 50 mL Lösungsmittelgemisch (Tab. 3.). Das Eluat wurde in diesem Falle in 10 mL Fraktionen geschnitten und diese mittels Rotavapor bei 30°C eingeeengt. Die Einstellung der Konzentration erfolgte auf 2 mg/mL. Die durch HPLC und Dünnschichtchromatographie

zur weiteren Verwendung ausgewählten Fraktionen wurden anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

Tab. 2. Lösungsmittelzusammensetzung der Trockensäule mit Kieselgel (0,2 – 0,5 mm)

Petrolether [mL]	Ethylacetat [mL]	Methanol [mL]
60	40	
50	50	
40	60	
30	70	
20	80	
10	90	
	100	
	90	10
	75	25
	50	50
	30	70
		100

Tab. 3. Lösungsmittelzusammensetzung der Trockensäule mit feinem Kieselgel (40 – 60 µm)

Petrolether [mL]	Ethylacetat [mL]	Methanol [mL]
85	15	
80	20	
70	30	
50	50	
30	70	
	100	
	90	10
	50	50
		100

4.3.2.3. Analytische Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Analysen wurden auf Kieselgelplatten (ALUGRAM SIL G/UV254; 0,20 mm Kieselgel 60 Machery-Nagel GmbH & CO. KG) durchgeführt. Die Detektion von Inhaltsstoffen mit Chromophoren erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm. Verbindungen mit Eigenfluoreszenz wurden ebenfalls unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm untersucht. Der Nachweis von Substanzen ohne chromophore Gruppen erfolgte durch Besprühen der DC-Platten mit Anisaldehyd (85 mL Methanol; 10 mL Eisessig; 8 mL Schwefelsäure; 0,5 mL Anisaldehyd) und anschließender Erwärmung mit der Heißluftpistole.

4.3.2.4. Sephadex ® LH-20 Säule

Zur Auftrennung von Stoffgemischen nach Molekülgröße wurde eine Glassäule mit in Aceton p.a. gequollenem Sephadex ® LH-20 befüllt. Nach Auftragen der Probe wurde mit Aceton p.a. eluiert. Das dadurch erhaltene Eluat wurde in 5mL Fraktionen geschnitten und bei 30°C am Rotavapor eingengt.

4.3.2.5. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde an einem Gerät der Agilent 1100 Serie mit UV-Diodenarraydetektor durchgeführt. Als stationäre Phase wurde die Säule Agilent ® Hypersil BDS-C18 4,6x250 mm verwendet. Die mobile Phase setzte sich aus einem Gemisch aus wässrigem Puffer (o-Phosphorsäure 0,015 mol und Tetrabutylammoniumhydroxid 0,0015 mol, pH=3; nach Reisch et al. 1990, verändert) und Methanol zusammen. Als Einspritzvolumen wurden je 10 µL gewählt. Die Durchflussrate wurde auf 1 mL pro Minute eingestellt.

4.4. Spektroskopie

4.4.1. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden in deuteriertem Chloroform an einem AM-400 WB und WM 250 FT-Spektrometer von Bruker aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch das Institut für organische Chemie der Universität Wien.

4.5. Bioassays

4.5.1. Kultivierung von *C. sphaerospermum*

Zur Sporengewinnung aus *C. sphaerospermum* wurden drei etwa 2 mm x 2 mm große Myzelstückchen auf Malzextraktagar-Platten positioniert und drei bis vier Tage bei Dunkelheit inkubiert. Nach anschließender Mikroskopie des Pilzes erfolgte die Gewinnung der Sporen. Hierzu wurden die MEA-Platten (Tab. 4.), die das sporulierende Myzel trugen, mit 5 mL 0,9%iger Kochsalzlösung (Tab. 6.) überschichtet. Nach sanftem Abtragen der Kolonien mittels Drigalski-Spatel wurde die Sporensuspension über Glaswolle filtriert, um eventuell mit abgetragene, vegetative Teile des Pilzes zu entfernen. Nach Zentrifugation und Abdekantieren des Überstandes wurde der sporenenhaltende Rückstand in 2%iger Malzboullion-Lösung (Tab. 5.) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C in einem Cryomedium (Tab. 7.) aufbewahrt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Medien wurden vor Einsatz bei 121°C und 1,4 bar 20 Minuten lang autoklaviert.

Tab. 4. Zusammensetzung des MEA-Mediums

Malzextraktagar	Bestandteile	Menge	Hersteller
	Aqua dest.	500 mL	
	Malzextrakt	10 g	AppliChem GmbH
	Glucose-Monohydrat	10 g	Loba Feinchemie
	Pepton	0,5 g	Merck
	Agar	10 g	Merck
	Sterilisation bei 121°C, 20 Minuten, 1,4 bar		

Tab. 5. Zusammensetzung der Malzboullion-Lösung

Malzboullion-Lösung	Bestandteile	Menge	Hersteller
	Aqua dest.	500 mL	
	Malzextrakt	10 g	AppliChem GmbH
	Sterilisation bei 121°C, 20 Minuten, 1,4 bar		

Tab. 6. Zusammensetzung der Kochsalzlösung

NaCl-Lösung	Bestandteile	Menge	Hersteller
	Aqua dest.	500 mL	
	NaCl p.a.	4,5 g	Merck
	Sterilisation bei 121°C, 20 Minuten, 1,4 bar		

Tab. 7. Zusammensetzung des Cryomediums

Cryomedium	Bestandteile	Menge	Hersteller
	Aqua dest.	500 mL	
	Saccharose	70 g	
	Pepton	5 g	Merck
	Sterilisation bei 121°C, 20 Minuten, 1,4 bar		

4.5.2. Infektionsversuche mit *C. sphaerospermum*

4.5.2.1. Infektion von *C. longa* mit *C. sphaerospermum*

Die am Naschmarkt in Wien erworbenen Rhizome von *C. longa* wurden zunächst der Länge nach halbiert und anschließend mit Sporenlösung bestrichen. Die so infizierten Rhizomstücke wurden dann in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss insgesamt 39 Tage lang gelagert. Als Kontrolle wurde ein nicht mit *C. sphaerospermum* infiziertes Rhizomstück verwendet. Im Laufe der 39 Tage andauernden Lagerung wurden nach 4, 7, 11, 17, 24, und 39 Tagen Proben der infizierten Rhizomstücke zur weiteren Bearbeitung entnommen.

4.5.2.2. Extraktion bei Infektionsversuchen

Infizierte Rhizomstücke wurden nach den oben genannten Zeitspannen mit einer Pinzette aus der feuchten Kammer entnommen, in einen Mörser gelegt und anschließend unter Zugabe von flüssigem Stickstoff, Seesand und Methanol zerkleinert. Das entstandene Gemisch wurde dann mit Methanol überschichtet und drei Tage lang bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Der entstandene Extrakt wurde anschließend abfiltriert und am Rotavapor bei 30°C eingengt. Nach dem Ausschütteln wurden die erhaltenen

Petroletherphasen am Rotavapor eingeeengt und zur weiteren Lagerung bei -20 °C auf eine Konzentration von 25 mg/mL bzw. 0,5 mg/mL eingestellt.

4.5.2.3. Analyse durch HPLC und Peakflächenberechnung

Die durch die Infektionsversuche erhaltenen Petroletherphasen wurden zunächst durch HPLC (unter in 4.3.5. angegebenen Bedingungen) und Vergleich von UV-Spektren auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Von den so identifizierten Inhaltsstoffen wurde anschließend die Peakfläche errechnet um Informationen über eventuelle Konzentrationsänderungen aufgrund der Pilzinfektion zu erhalten. Aus den erhaltenen Werten wurden einer verständlicheren Darstellung wegen im Programm Excel Histogramme angefertigt.

4.5.2.4. Konzentrationsabhängige Bioautographie auf DC-Platten

Um die durch vorhergegangene Infektionsversuche entstandenen Petroletherphasen auf antifungale Wirkung zu testen wurden diese zunächst in unterschiedlichen Mengen (250 µg, 125 µg, 62,5 µg und 31,25 µg) punktförmig auf DC-Platten aufgetragen. Nach Applikation von Sporensuspension und dreitägiger Inkubation unter Lichtausschluss konnte das Ausmaß der entstandenen Hemmhöfe bestimmt werden. Als Referenzstoff wurde Juglon verwendet.

5. Ergebnisse und Diskussion

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden 10 verschiedene Individuen der Gattung *Curcuma*, von denen nur zwei eindeutig als *Curcuma longa* bestimmt werden konnten, hinsichtlich der Stoffausstattung ihrer Rhizome vergleichend analysiert. Die für ihre Bioaktivität bekannten Inhaltsstoffe wie z.B. Curcuminoide und Sesquiterpene sind unpolar, weshalb die aus den Methanolextrakten abgetrennten CHCl_3 Phasen genauer untersucht wurden. Die Analyse erfolgte sowohl durch Dünnschichtchromatographie als auch durch HPLC. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Kapitel 5.1. genauer dargestellt. Darüber hinaus wurde ein Infektionsversuch mit Petroetherphasen einer Herkunft von *C. longa* durchgeführt, um eventuelle Einflüsse auf die Konzentration der in diesen Phasen gelösten Stoffe sowie ihre mögliche antifungale Wirkung in entsprechenden Bioassays nachzuweisen. Zu den Ergebnissen dazu wird auf Kapitel 5.2. verwiesen.

5. 1. Phytochemische Charakterisierung

In allen untersuchten Herkünften konnten sowohl dünn-schichtchromatographisch als auch durch HPLC-Vergleiche die Hauptinhaltsstoffe aus den Stoffklassen der Curcuminoide sowie Terpenoide nachgewiesen werden (Tab. 8.). Dabei erwies sich der DC-Vergleich als deutlich weniger informativ, jedoch sehr nützlich für eine erste Übersicht (Abb. 13.). Durch co-chromatographische Analyse mit bekannten Reinstoffen wie z.B. α -Turmeron, Dihydrocurcumin und Curcumin konnte deren Vorkommen auch in den Rhizomen der untersuchten Individuen nachgewiesen werden. Zudem konnten zwei Reinstoffe (ST3 und C3) aus den Individuen ZIN 060006 und ZIN 010001 isoliert werden. Bei der Substanz ST3 handelt es sich um das Sesquiterpen Curcumendiol, bei C3 um das Diarylheptanoid Bisdemethoxycurcumin. Im Zuge dieser Arbeit wurden auch Inhaltsstoffe detektiert, die aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit oder geringen Quantität weder isoliert noch identifiziert werden konnten. Hierzu zählen beispielsweise die Verbindungen ST2 und DT1 die vermutlich der Stoffklasse der Terpenoide zugeordnet werden können. Das UV-Spektrum der Substanz ST2 ähnelt jenem von Zerumbon, aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten kann aber davon ausgegangen werden dass es sich hierbei um ein Zerumbonderivat handelt. Das UV-Spektrum der Substanz DT1 weist sehr große Ähnlichkeiten mit jenem von (E)-8(17),(12)-labdadiene15,16-dial auf. Aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten im HPLC-Chromatogramm und den verschiedenen R_f -Werten auf der DC-Platte kann ausgeschlossen werden dass es sich um idente Substanzen handelt (Abb. 13.). Der Vergleich der UV-Spektren und die Literaturrecherche bezüglich Untersuchungen von Hexanphasen von *C. longa* (Roth et al., 1998) legen

dennoch nahe dass es sich bei dem Inhaltsstoff DT1 um ein Diterpen vom Labdan-Typ handeln dürfte, wenngleich das Vorkommen dieser Substanzgruppe in der Gattung *Curcuma* als eher selten beschrieben wird (Abas et al., 2005). Neben den bereits besprochenen Inhaltsstoffen wurden noch vier weitere Substanzen detektiert, deren UV-Spektren und Retentionszeiten keinen Aufschluss über die Zuordnung zu bekannten Stoffklassen zulassen. Weiterführende Informationen (wie Retentionszeiten, UV-Spektren, IUPAC-Namen, ect.) über die in dieser Arbeit detektierten Verbindungen sind dem Spektraldatenkatalog im Anhang zu entnehmen.

Die in der DC bereits erkennbare chemische Differenzierung der untersuchten Herkünfte wurde durch vergleichende Auswertung der HPLC-Profile (siehe Abb. 14. bis Abb. 17) wesentlich untermauert. Die aufgrund fehlender Infloreszenzen unbestimmbaren Herkünfte ZIN 06001 und ZIN 06004 zeigten weitest gehende chemische Übereinstimmung mit *C. longa* (ZIN 070007 und *C. longa* NM. in Tab. 8.), was somit eine Zuordnung zu dieser Art erlaubt. Dieses Ergebnis unterstreicht die Wertigkeit phytochemischer Stoffausstattung als chemische Merkmale innerhalb *Curcuma*. Aufgrund der Differenzierung der Stoffprofile ließen sich insgesamt vier Gruppen erkennen (Tab. 8.), welche in den nachfolgenden Kapiteln gesondert diskutiert werden.

Tab. 8. Auswertung der HPLC-Profile untersuchter Individuen.

Gruppe	Herbarnr.	Curcuminoide			Terpene				Unbekannte Verbindungen				
		C1	C2	C3	ST1	ST2	ST3	DT1	X1	X2	X3	X4	X5
1	ZIN 070007	o	o		o			o					
	<i>C. longa</i> NM	o	o		o			o					
	ZIN 060001	o	o		o			o					
	ZIN 060004	o	o		o			o					
2	ZIN 060011	o	o			o			o				
	ZIN 060016	o	o			o			o				o
3	ZIN 060002									o	o		
	ZIN 060005	o								o	o		
4	ZIN 010001			o									
	ZIN 060006						o					o	

Legende: Details zu den Herbarnummern in Tab. 1.

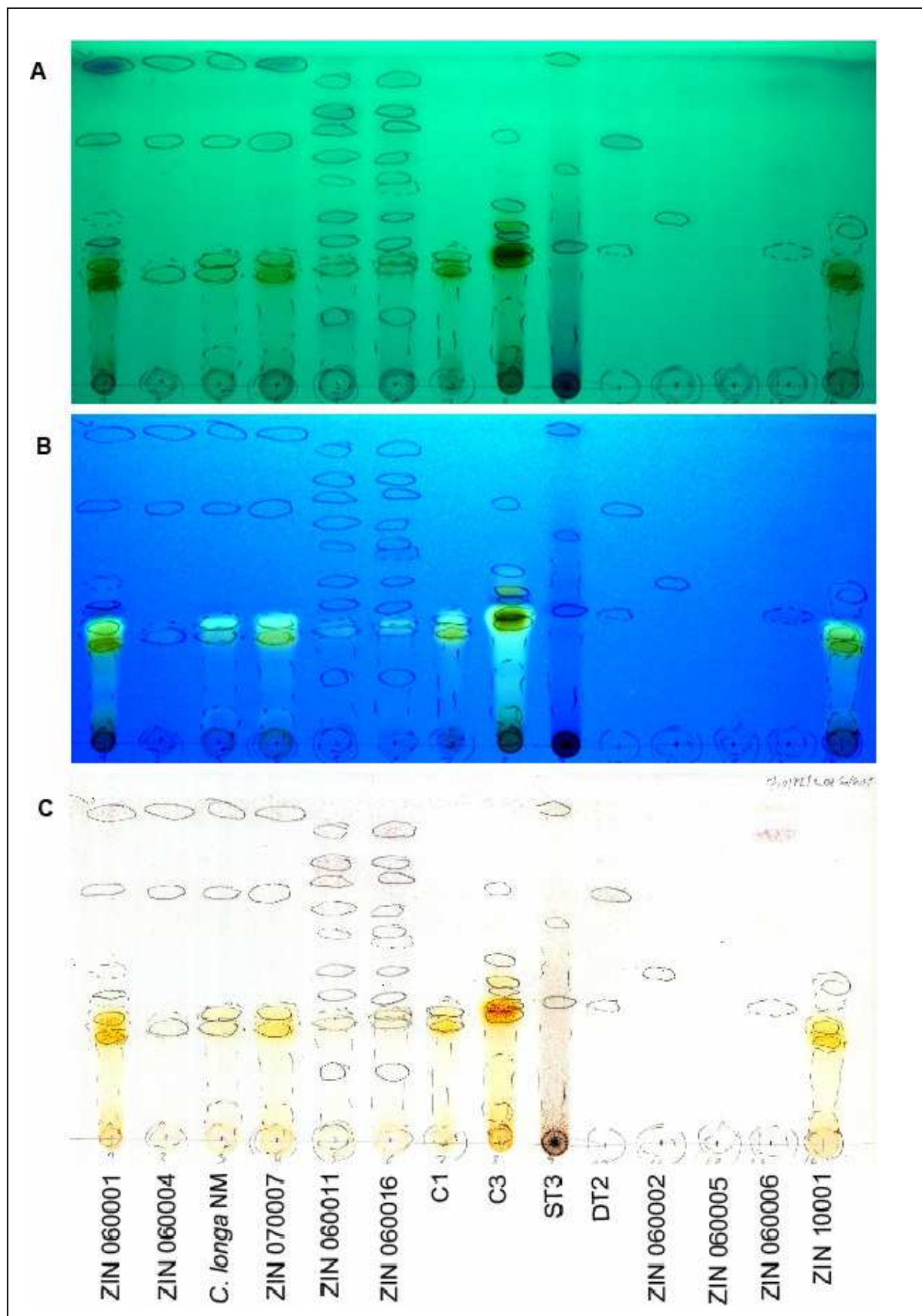


Abb. 13. Dünnschichtchromatographische Analyse der verschiedenen Herkunft und einiger Reinstoffe. **C1** – Curcumin. **C3** - Bisdemethoxycurcumin. **ST3** - Curcumendiol. **DT2** - (E)-8(17),(12)-labdadiene15,16-dial. **A** – 254 nm, **B** – 366 nm und **C** nach Detektion mit Anisaldehyd. Laufmittel: Et₂O/PE/MeOH 60/40/5

5.1.1. Gruppe 1

Die CHCl_3 -Extrakte der Individuen ZIN 060001, ZIN 060004, *C. longa* NM und ZIN 070007 zeigen bereits bei der dünnschichtchromatographischen Analyse deutliche Übereinstimmungen in ihrer Stoffausstattung (Abb. 19.). Diese Daten decken sich größtenteils mit jenen der HPLC-Analyse (Abb. 14.). Der Anteil an Curcumin (C1) in den aufgrund fehlender Infloreszenzen unbestimmten Arten ZIN 060001 und ZIN 060004 erscheint auf der DC-Platte etwas geringer als bei den beiden anderen untersuchten Rhizomen (Abb. 19). Ihre HPLC-Chromatogramme weisen sehr große Ähnlichkeiten mit denen der eindeutig als *C. longa* identifizierten Individuen ZIN 070007 und *C. longa* Naschmarkt auf (Abb. 14.). Ausgehend von den weitgehenden Übereinstimmungen in der Stoffausstattung, die durch die durchgeführten vergleichenden Analysen deutlich wurden, konnten ZIN 060001 und ZIN 060004 eindeutig der Art *C. longa* zugeordnet werden (Tab. 5.).

Nach Xian-Guo et al. (1998) sind Curcuminoide und Sesquiterpene die Hauptinhaltsstoffe der Art *C. longa*. Diese Erkenntnis deckt sich gut mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit: Die Extrakte aller Individuen die eindeutig der Art *C. longa* zugeordnet werden konnten (ZIN 060001, ZIN 060004, ZIN 070007 und *C. longa* NM) enthielten allesamt Curcumin (C1), ar-Turmeron (ST1) und die Substanz DT1 (Abb. 19.). Durch Co-Chromatographie und Vergleich von UV-Spektren wurde das Auftreten von Dihydrocurcumin (C2) in allen vier Individuen bestätigt (Abb. 19., Tab.5.). Laut Govindarajan (1980) kommen in Curcuma-Extrakten neben der Hauptkomponente Curcumin auch Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin vor. Das simultane Vorliegen dieser drei Verbindungen konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden was möglicherweise an einer für diese Stoffe zu geringen Trennkraft der angewandten HPLC-Methode liegt. Eventuell könnte eine Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung nach dem Vorbild von Jayaprakasha et al. (2002) eine adäquate Trennleistung ermöglichen.

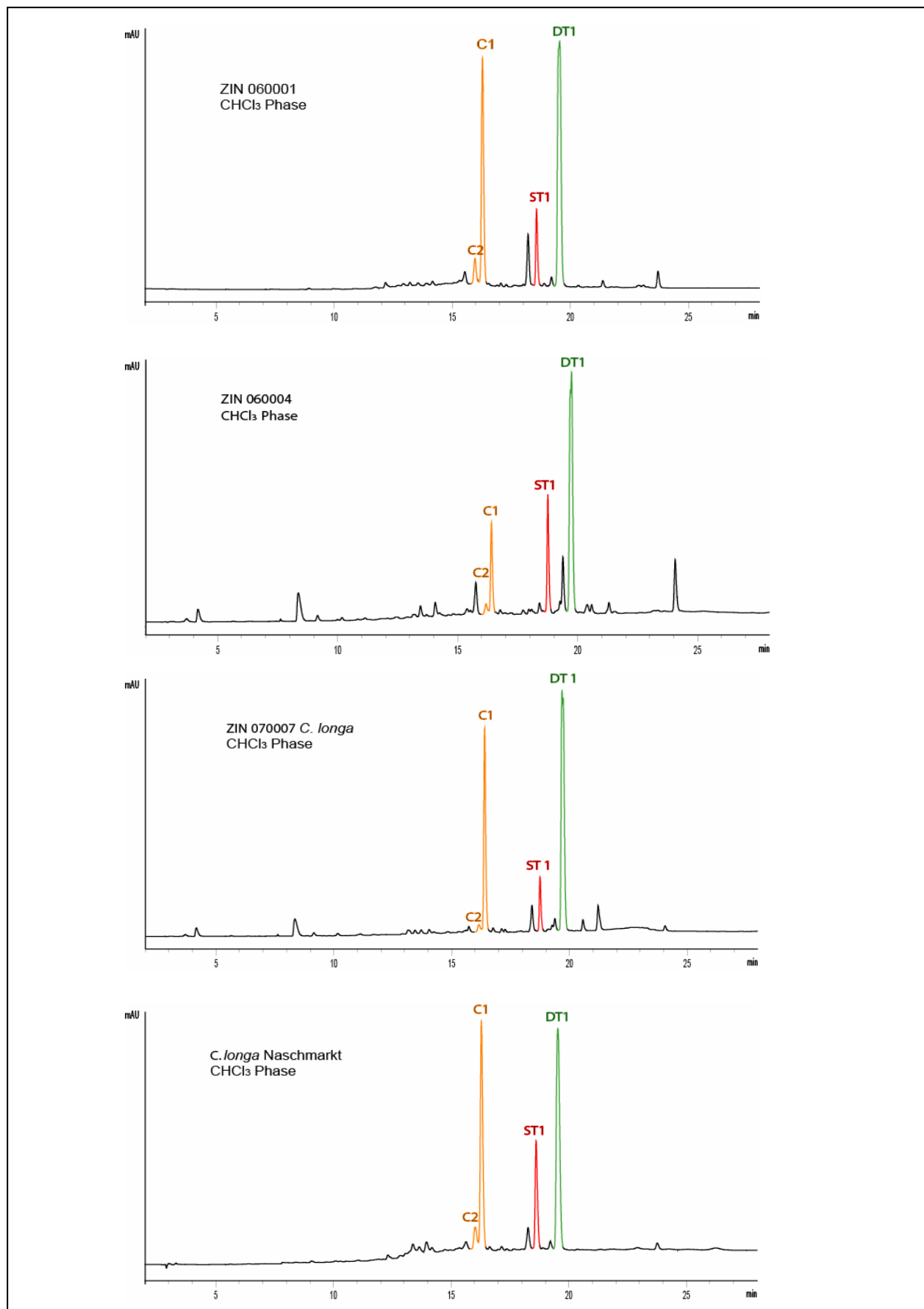


Abb. 14. GRUPPE 1. HPLC-Profile der CHCl_3 -Phasen verschiedener Individuen.

C1 - Curcumin. **C2** - Dihydrocurcumin. **ST1** – ar-Turmeron. **DT1** – unbekanntes Diterpen. Die Detektion von Curcuminoiden erfolgte bei der HPLC-Analyse bei 400 nm, jene der Stoffe **ST1** und **DT1** bei 230 nm.

5.1.2. Gruppe 2

Zwischen den Individuen ZIN 060011 und ZIN 060016, die aufgrund fehlender Infloreszenzen nicht bestimmt werden konnten, wurden durch die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie viele Ähnlichkeiten im Inhaltsstoffmuster deutlich (Abb. 19), die anschließend auch bei der HPLC-Analyse detektiert werden konnten (Abb. 15). Dies betrifft zunächst das Vorkommen der Substanz ST2 bei der es sich vermutlich um ein Sesquiterpen handelt, dessen UV-Spektrum Ähnlichkeit mit dem von Zerumbon aufweist. Die unterschiedlichen Retentionszeiten dieser beiden Stoffe könnten darauf hin deuten dass ST2 ein Zerumbonderivat ist. Auch Curcumin (C1) und Dihydrocurcumin (C2) konnten in den CHCl_3 -Phasen beider Herkünfte nachgewiesen werden. Beide Arten der Gruppe 2 weisen zudem die Substanz X1 auf, welche jedoch aufgrund zu geringer Quantität nicht isoliert werden konnte (Abb. 15.). Das Individuum ZIN 060016 enthält als Hauptinhaltsstoff die Substanz X5, die aber aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit nicht isoliert und identifiziert werden konnte. Im Gegensatz zu den Arten der Gruppe 1 konnten bei ZIN 060011 und ZIN 060016 weder ar-Turmeron noch die Substanz DT1 detektiert werden (Vgl. Abb. 14). Die vergleichende Analyse durch DC und HPLC lässt darauf schließen, dass es sich auch hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um zwei Individuen der gleichen Art handelt.

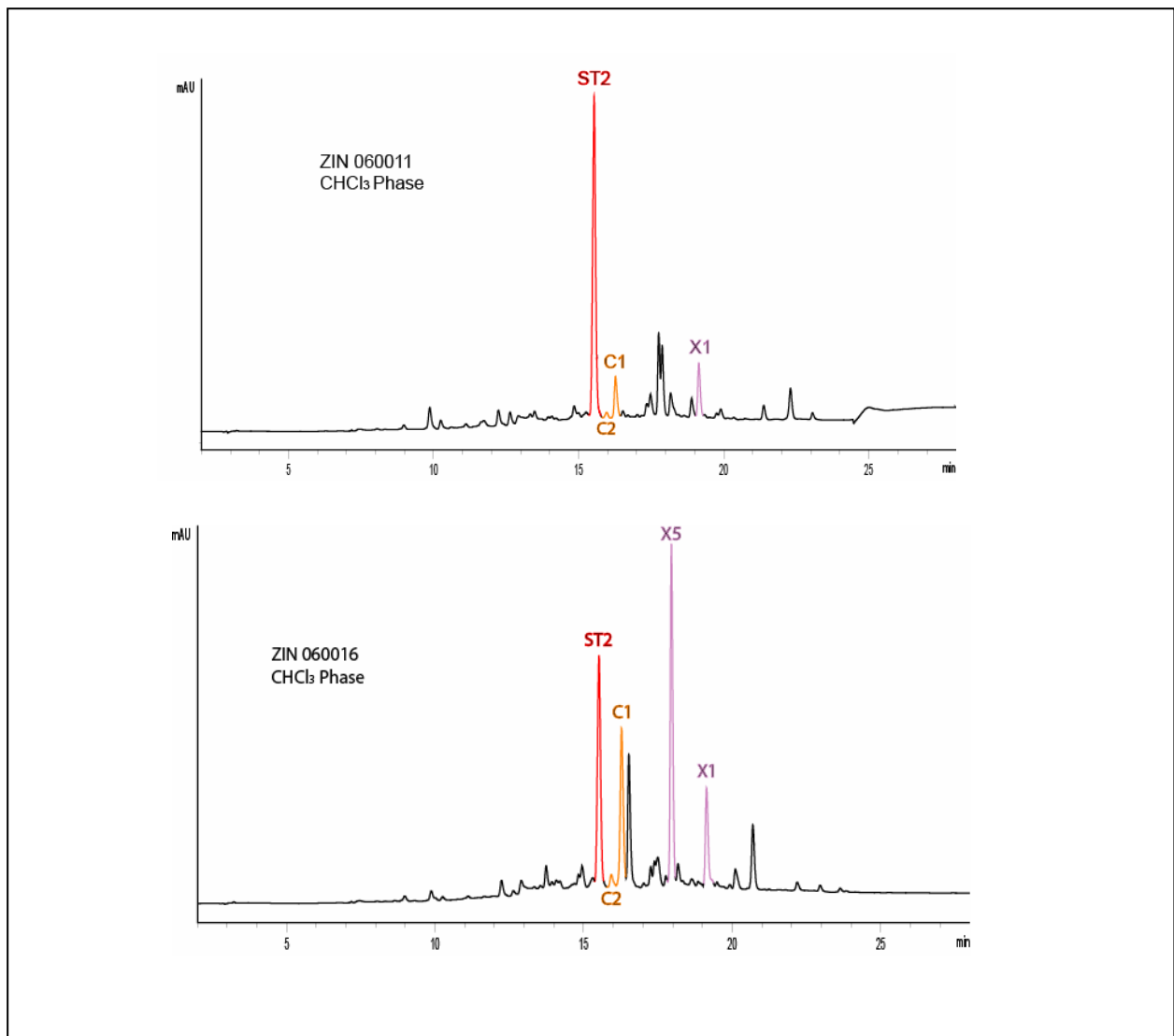


Abb. 15. GRUPPE 2.

HPLC-Profile der CHCl₃-Phasen von ZIN 060011 und ZIN 060016 im Vergleich. **C1** - Curcumin. **C2** – Dihydrocurcumin. **ST2** - nicht identifizierte Substanz, vermutlich ein Sesquiterpen. **X1**, **X5** – unbekannte Substanzen. Die Detektion von Curcuminoiden erfolgte bei der HPLC-Analyse bei 400 nm, jene der Stoffe **ST2**, **X1** und **X5** bei 230 nm.

5.1.3. Gruppe 3

Auch die beiden Individuen ZIN 060002 und ZIN 060005 konnten wegen fehlender Blüten nicht exakt bestimmt werden. Beide Herkünfte zeichnen sich jedoch durch einen geringen bis nicht nachweisbaren Gehalt an Curcuminoiden aus (Abb. 19). Die dünnschichtchromatographische Analyse der Arten ZIN 060002 und ZIN 060005 führte selbst nach mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Stoffmengen zu keinem deutlichen Ergebnis. Der CHCl_3 -Extrakt von ZIN 060005 wies bei keiner der aufgetragenen Konzentrationen detektierbare Fluoreszenzlöschungen auf. Auch das Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd zog keinerlei Reaktion nach sich. Das Gleiche war auch bei dem Individuum ZIN 060002 zu beobachten. Erst nach Auftragen von 40 μl (80 μg) CHCl_3 -Extrakt konnte ein einziger Substanzfleck detektiert werden (Abb. 19).

Die anschließend durchgeführte HPLC-Analyse zeigte dass die CHCl_3 -Phase der Probe ZIN 060005 zwar Curcumin (C1) enthält, jedoch nur in sehr geringen Mengen. In ZIN 060002 konnte es hingegen gar nicht detektiert werden (Abb. 16.). Das Dihydrocurcumin (C2) wurde in keiner der beiden Proben nachgewiesen. Beide CHCl_3 -Phasen enthielten jedoch die Substanzen X2 und X3 (Abb. 16.). Die Profile der Herkünfte ZIN 060002 und ZIN 060005 weichen sowohl unter DC als auch unter HPLC-Detektion deutlich von allen anderen Individuen die in vorliegender Arbeit untersucht wurden ab. Die dominierende Substanz X2 konnte aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit nicht identifiziert werden. Auch der Versuch mittels Dünnschichtchromatographie nähere Informationen zu erhalten scheiterte vermutlich aus selbigem Grund. Curcumin (C1) konnte - wenn auch nur in sehr geringer Menge - im Rhizom des Individuums ZIN 060005 eindeutig detektiert werden. Andere Curcuminoiden wie beispielsweise Demethoxycurcumin oder Dihydrocurcumin traten in keiner der beiden Proben auf. Die Substanz X3 wurde zwar mittels HPLC in beiden Herkünften nachgewiesen (Abb. 16.), konnte aber aufgrund der geringen Quantität weder genauer identifiziert werden, noch mittels Dünnschichtchromatographie detektiert werden. Zwar konnten die beiden Individuen aufgrund fehlender Infloreszenzen nicht eindeutig bestimmt werden, dennoch ist es trotz der geringen Menge an vorkommenden Curcuminoiden nicht auszuschließen, dass auch sie der Gattung *Curcuma* zugeordnet werden können. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an verschiedenen *Curcuma*-Arten durch Zhang et. al (2008) ergaben dass Curcumin, Bisdemethoxycurcumin und Demethoxycurcumin vor allem in *Curcuma longa* vorkommen. In anderen Arten wie beispielsweise *Curcuma kwangsiensis* Lee & Liang und *Curcuma wenyujin* Chen & Ling

konnten im Zuge der Studie von Zhang et. al (2008) wenn überhaupt nur sehr geringe Spuren von Curcuminoiden detektiert werden.

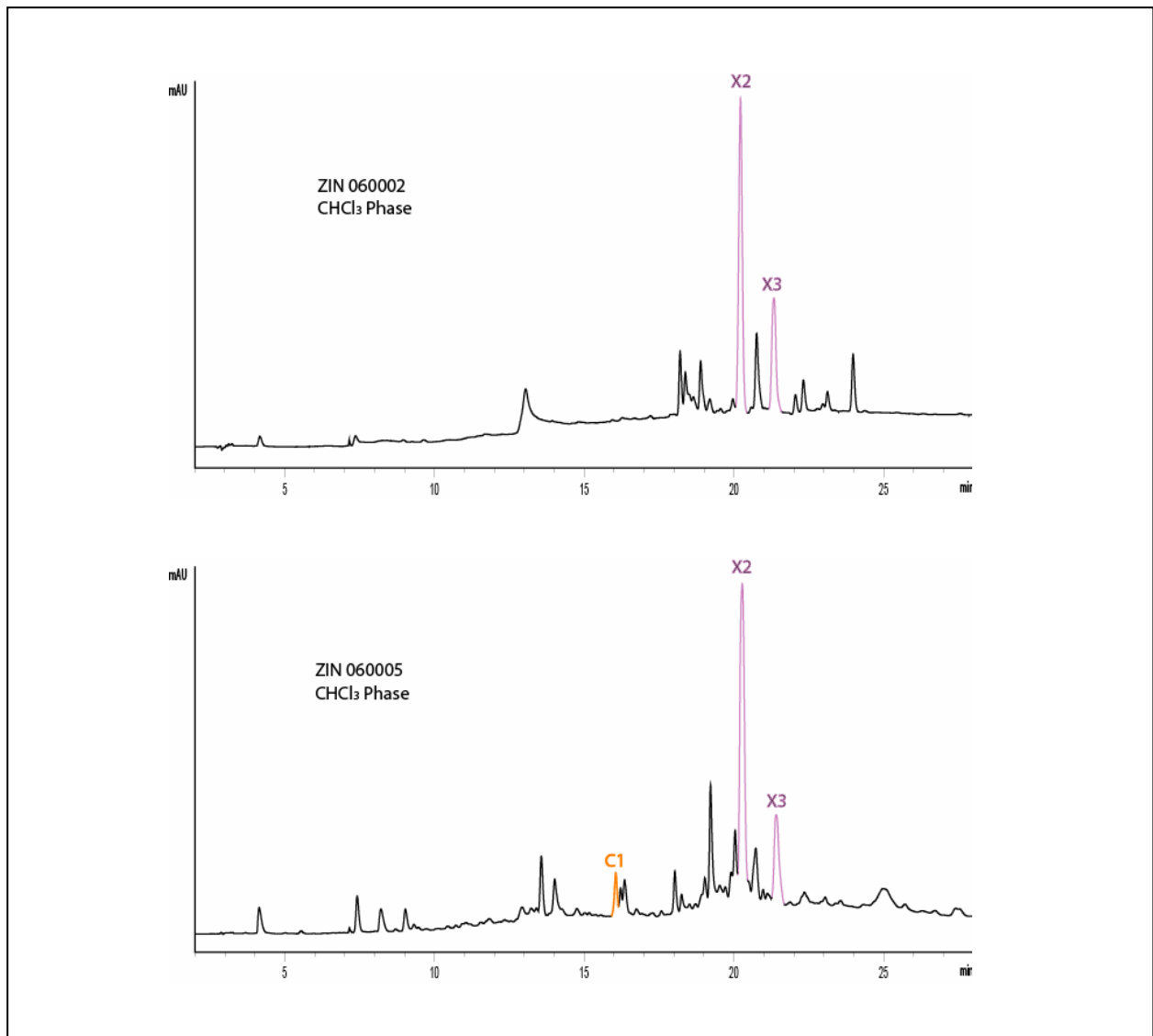


Abb. 16. GRUPPE 3.

HPLC-Profile der CHCl₃-Phasen von ZIN 060002 und ZIN 060005 im Vergleich. **C1** - Curcumin. **X2, X3** – nicht identifizierbare Substanzen. Die Detektion von Curcuminoiden erfolgte bei der HPLC-Analyse bei 400 nm, jene der Stoffe **X2** und **X3** bei 230 nm.

5.1.4. Gruppe 4

Die Individuen ZIN 060006 und ZIN 10001 zeigen auch bei dünnschichtchromatographischen Analyse keinerlei Ähnlichkeiten mit jenen die in den vorhergehenden Gruppen erwähnt wurden. Die aus den Rhizomen isolierten Stoffe ST3 beziehungsweise C3 konnten durch Vergleich mit den CHCl_3 -Extrakten auf der DC-Platte nachgewiesen werden (Abb. 19.). Andere Inhaltsstoffe wie beispielsweise α -Turmeron oder die nicht näher identifizierte Substanz ST2 die in den Gruppen 1-3 vorkamen, konnten hier nicht detektiert werden.

Auch die HPLC-Analyse zeigte dass sich die Stoffausstattung von ZIN 060006 und ZIN 10001 deutlich von denen der vorherigen Gruppen unterscheidet. Die Strukturaufklärung anhand spektroskopischer Methoden ergab, dass Bisdemethoxycurcumin (C3) das dominierende Curcuminoid in der CHCl_3 -Phase der Probe ZIN 10001 ist. Andere Inhaltsstoffe, wie beispielsweise α -Turmeron (ST1) oder die Substanzen ST2 und Dihydrocurcumin (C2), die in den Gruppen 1-3 nachgewiesen werden konnten, wurden hier nicht detektiert. Aus der CHCl_3 -Phase von ZIN 060006, welche als Hauptsubstanz den nicht näher identifizierbaren Stoff X4 enthält, konnte Curcumendiol (ST3) isoliert werden. Das Ergebnis der Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie kam zu dem Schluss dass es sich hierbei um ein Sesquiterpen Guaian-Typ handelt (Lou et. al, 2009). Die Hauptsubstanz X4 ist zwar mittels HPLC nachweisbar, durch Dünnschichtchromatographie und Detektion mit UV-Licht oder Anisaldehyd jedoch nicht. Auch Versuche diese Substanz zu isolieren scheiterten trotz dem Vorliegen relativ großer Mengen. Dies könnte daraufhin deuten dass es sich hier um einen Inhaltsstoff mit sehr hoher Flüchtigkeit handelt.

Im Rhizom des Individuums ZIN 10001 konnte neben der Substanz Curcumin (C1) auch relativ große Mengen an Bisdemethoxycurcumin (C3) detektiert und isoliert werden. Nach Tayyem et. al (2006) bilden Curcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin die Hauptbestandteile im Rhizom von *Curcuma* Arten, wenngleich ihre Zusammensetzung variieren kann (Katsuyama et. al, 2009). Die im Falle von ZIN 10001 hohe Konzentration an Bisdemethoxycurcumin könnte sich demnach aus der überwiegenden Expression der Curcuminsynthase 3 erklären. Ein weiterer Grund könnte die geringe Expression des Enzyms O-Methyltransferase sein, welches Bisdemethoxycurcumin in Demethoxycurcumin und Curcumin transformiert. Zugleich ist dieses Enzym auch bei der Umwandlung von *p*-Coumaroyl-CoA in Feruloyl-CoA beteiligt.

Während die Curcuminsynthesen 1 und 2 hauptsächlich die Formation von Curcumin und Demethoxycurcumin katalysieren, produzieren Curcucuminsynthase 3 bei Vorhandensein von Malonyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA vor allem Curcumin und Bisdemethoxycurcumin (Katsuyama et. al, 2009).

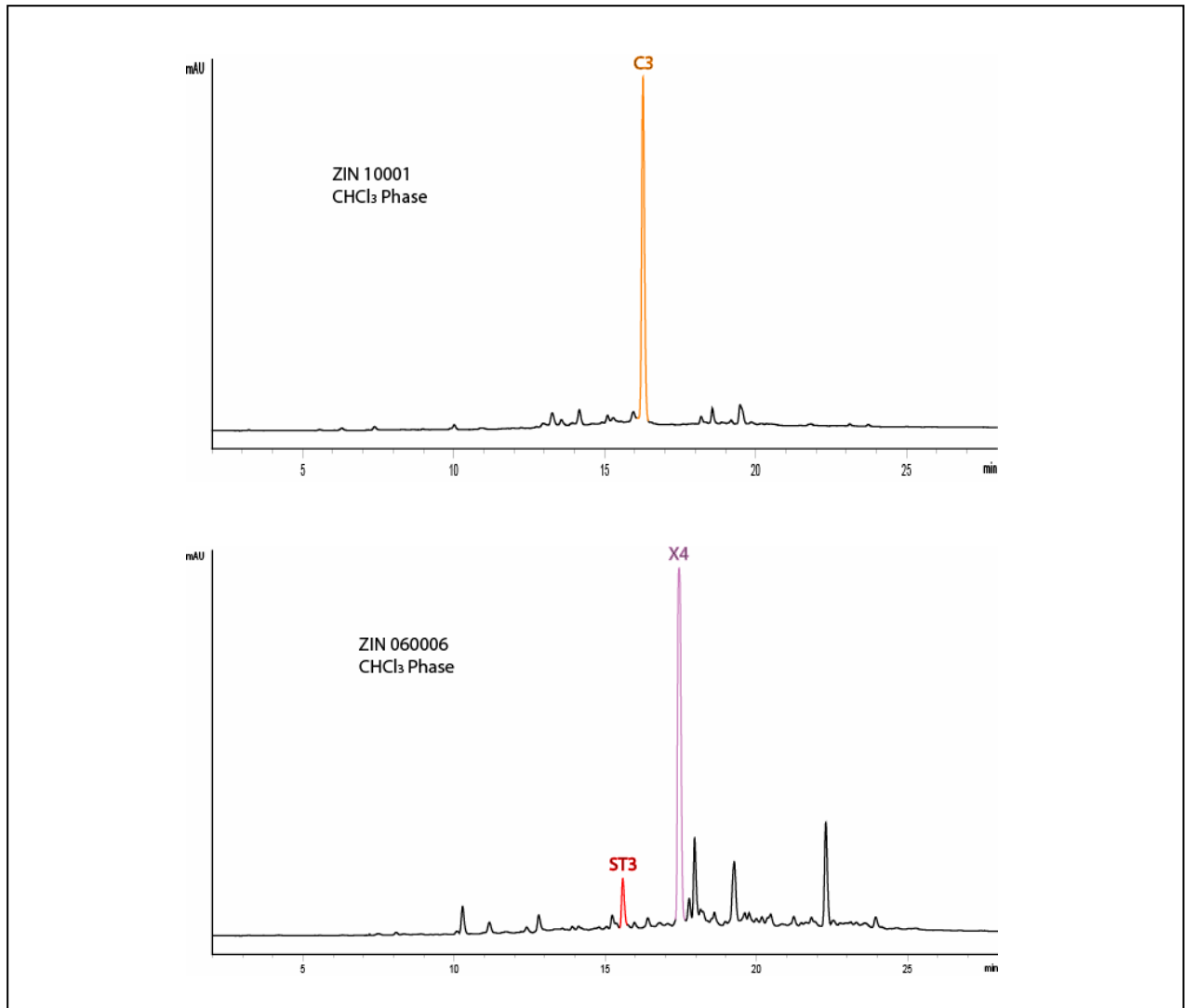


Abb. 17. GRUPPE 4. HPLC-Profile der Individuen ZIN 10001 und ZIN 060006.

C3 - Bisdemethoxycurcumin. **ST3** - Curcumendiol. **X4** - nicht identifizierte Substanz. Die Detektion von **C3** erfolgte bei der HPLC-Analyse bei 400 nm, jene der Stoffe **ST3** und **X4** bei 230 nm.

5.2. Bioaktivität unpolarer Substanzen

Nachdem das antifungale Potential von CHCl_3 -Phasen ausgewählter Curcuma-Individuen bereits durch Adriane Raninger (2009) untersucht wurde, war es Ziel vorliegender Arbeit die Auswirkung einer Pilzinfektion durch *C. sphaerospermum* auf die Konzentration unpolarer Stoffe von *C. longa* zu erhalten. In Anlehnung an die von Pacher et al. (2001) durchgeführten Versuche an Glycosmis, wurden die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Petroletherphasen (0,5 mg/ml) zunächst durch HPLC analysiert. Die aus den Chromatogrammen errechneten Peakflächen der Substanzen ar-Turmeron und DT1 wurden aufgrund der besseren Übersicht als Histogrammen dargestellt. (Abb. 18.).

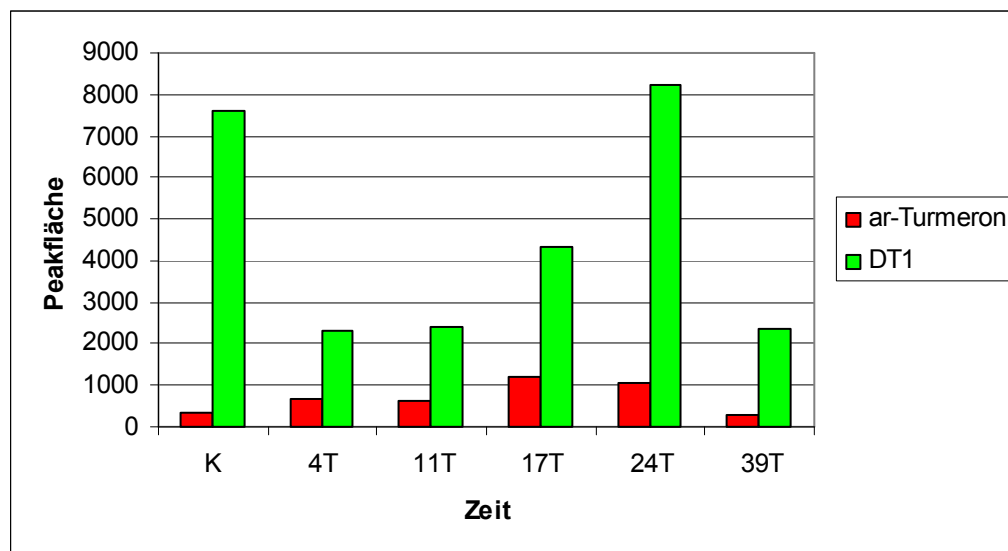


Abb. 18. Konzentrationsänderungen von ar-Turmeron und der Substanz DT1 im Versuchsverlauf

Die Menge der Substanz DT1 in der nicht infizierten Kontrolle ist sehr hoch, wohingegen ar-Turmeron in relativ geringem Ausmaß vorhanden ist. Überraschenderweise ging die Menge an DT1 vier Tage nach der Infektion stark zurück, konträr dazu stieg jene des ar-Turmerons. Zwischen Tag vier und Tag elf der Infektion konnten keine deutlichen Änderungen der Konzentrationen festgestellt werden. Siebzehn Tage nach Infektion zeigte sich jedoch ein starkes Ansteigen beider Stoffe, die sich im Falle von DT1 bis zum Tag 24 fortsetzte. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein leichter Rückgang an ar-Turmeron. Am Tag 39 war die Menge beider Stoffe hingegen sehr stark gesunken: der des ar-Turmerons lag unter jenem, der in der nicht infizierten Kontrolle gemessen wurde. Die Menge an DT1 ging hingegen auf ähnliche Werte zurück wie sie bereits an Tag 4 und 11 gemessen wurden (Abb.18.). In den Petroletherphasen die zur Ermittlung des antifungalen Potentials von *C.*

longa im Zuge dieser Arbeit herangezogen wurden, konnten zwei dominierende Inhaltsstoffe detektiert werden: ar-Turmeron (ST1) und DT1.

In Anlehnung an die von Engelmeier (2002) durchgeführten Biotests wurde anschließend eine Bioautographie mit *C. sphaerospermum* durchgeführt (Abb. 19.), um Aufschluss über eventuell veränderte antifungale Wirkungen, die mit der anteilmäßigen Änderung von ar-Turmeron und DT1 in den verschiedenen Proben einhergehen könnten, zu ermitteln. Hierzu wurden alle Petroletherphasen, die im Versuchsverlauf zwischen Tag 4 und Tag 39 entstanden waren, in Mengen von 250 µg bis 31,25 µg auf eine DC-Platte aufgetragen und dann mit Sporen von *C. sphaerospermum* besprüht. Als Negativkontrolle diente der Reinstoff Juglon der in Mengen von 25 µg bis 3,125 µg eingesetzt wurde. Auch Petrolether und Aceton wurden auf ihre antifungale Wirkung getestet, um Hemmhöfe aufgrund von Lösungsmittelleffekten, auszuschließen zu können. Selbst bei niedrigen Verdünnungen der PE-Phasen (31,25 µg) sind Hemmhöfe detektierbar wenngleich ihre Größe geringer ist als jene der hochkonzentrierten (250 µg). In der Kontrolle lässt sich eine schrittweise Abnahme der Hemmhofgröße erkennen. Die antifungale Wirkung des Stoffgemisches aus ar-Turmeron und der Substanz DT1 ist bei einer Menge von 250 µg relativ hoch wohingegen sie bei 125 µg und 62,5 µg absinkt und schließlich bei 31,25 µg als gering eingestuft werden kann. Das Gleiche trifft auf jene Petroletherphasen zu, die im Versuchsverlauf an Tag 4, 24 und 39 hergestellt wurden. Auch die Proben von Tag 11 und 17 zeigen bei einer aufgetragenen Stoffmenge von 250 µg die größten Effekte, jedoch können im Bereich zwischen 125 µg und 31,25 µg keine deutlichen Unterschiede in der Hemmhofgröße festgestellt werden (Abb. 19.).

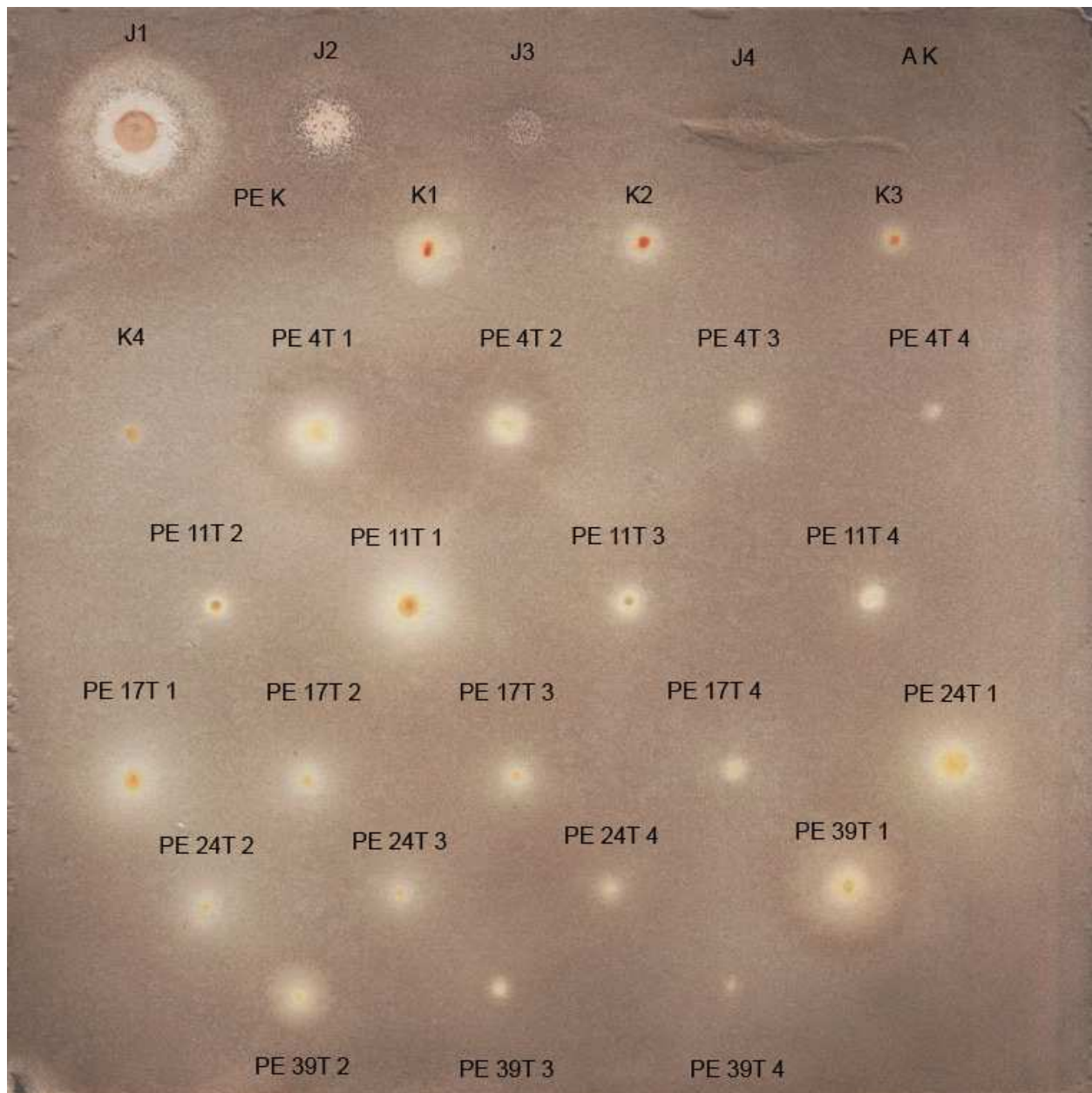


Abb. 19. Bioautographie mit Petroletherphasen unterschiedlicher Konzentration die während des Infektionsversuches mit *C. longa* gewonnen wurden. Die detaillierte Beschreibung der hier verwendeten Abkürzungen, aufgetragenen Stoffmengen und die ermittelten Größen der entstandenen Hemmhöfe sind Tab. 9. zu entnehmen.

Tab. 9. Übersicht über Hemmhofgröße und Diffusion der aus dem Infektionsversuch entstandenen Petroletherphasen bei verschiedenen aufgetragenen Stoffmengen.

Probe	Lösungsmittel	Tage nach Infektion	Stoffmenge in μg	$\varnothing$ Hemmhof in cm	Diffusion
J1	Juglon	-	25	1,25	sehr stark
J2	Juglon	-	12,5	0,7	mittel
J3	Juglon	-	6,25	0,5	gering
J4	Juglon	-	3,125	0,6	keine
A K	Aceton	-	n.a.	0	keine
PE K	PE	-	n.a.	0	keine
K1	PE	-	250	1,1	gering
K2	PE	-	125	0,6	gering
K3	PE	-	62,5	0,35	gering
K4	PE	-	31,25	0,25	gering
PE 4T 1	PE	4	250	0,85	mittel
PE 4T 2	PE	4	125	0,65	gering
PE 4T 3	PE	4	62,5	0,5	gering
PE 4T 4	PE	4	31,25	0,25	gering
PE 11T 1	PE	11	250	1,1	mittel
PE 11T 2	PE	11	125	0,4	gering
PE 11T 3	PE	11	62,5	0,45	gering
PE 11T 4	PE	11	31,25	0,4	gering
PE 17T 1	PE	17	250	0,8	mittel
PE 17T 2	PE	17	125	0,5	gering
PE 17T 3	PE	17	62,5	0,45	gering
PE 17T 4	PE	17	31,25	0,4	gering
PE 24T 1	PE	24	250	0,85	mittel
PE 24T 2	PE	24	125	0,45	mittel
PE 24T 3	PE	24	62,5	0,35	gering
PE 24T 4	PE	24	31,25	0,25	gering
PE 39T 1	PE	39	250	0,85	mittel
PE 39T 2	PE	39	125	0,65	mittel
PE 39T 3	PE	39	62,5	0,15	gering
PE 39T 4	PE	39	31,25	0,1	gering

Die im Zuge dieses Bioassays getesteten Petroletherphasen wiesen allesamt antifungale Aktivität auf (Abb. 20.), was sich gut mit Ergebnissen in der Literatur (Roth et. al, 1998; Kim et. al, 2003) deckt. Ein Teil des pilzhemmenden Potentials der getesteten Petrolether Phase ist eindeutig auf das in allen Proben detektierte Sesquiterpen-Keton ar-Turmeron zurückzuführen, welches nach einer Studie von Lee et al. (2003) bereits in geringen Mengen antifungale Aktivität zeigt. Das Vorkommen von Labdan-Diterpenen in der Familie der Zingiberaceae wurde bereits durch zahlreiche Studien bestätigt (Chimnoi et al., 2009; Sirat et al., 1994; Xu et al., 1996). Durch Firman et al. (1988) konnten Diterpene vom Labdan-Typ auch in *Curcuma heyneana* Valetton & Zijp nachgewiesen werden. Eine Untersuchung (Sirat & Meng, 2009), die sich mit der Zusammensetzung rhizomaler Öle dieser Art befasste, bewies die bioaktive Wirkung von Labdan-Diterpenen gegen den Pilz *Cladosporium cladosporoides* De Vries. Durch Roth et al. (1998) gelang zudem der Nachweis dieser Substanzgruppe in *C. longa*. Die Autoren bestätigten in dieser Studie die antifungale Aktivität von Labdan-Diterpenen gegen Pilze der Gattung *Candida* Berkhout.

Ein Zusammenhang zwischen antifungaler Wirkung und den anteilmäßigen Änderungen von ar-Turmeron und der Substanz DT1, die während des Versuches mit HPLC untersucht wurden, konnte nicht exakt festgestellt werden. Abweichungen finden sich in niedrigen Verdünnungen (32,25µg) der Petroletherphasen. Die Hemmhöfe der Proben von Tag 11, 17 und 24 sind im Vergleich zu allen anderen (K, 4T, 39T) ausgeprägter. Weiters zeigt die Petroletherphase von Tag 11 bei einer aufgetragenen Stoffmenge von 125µg im Gegensatz zu den restlichen Proben (K, 4T, 17T, 24T, 39T) gleicher Konzentration eine sehr geringe antifungale Wirkung (Abb. 20.). Die Größe der entstandenen Hemmhöfe scheint bei diesem Versuch hauptsächlich von der aufgetragenen Stoffmenge abzuhängen und nicht vom Verhältnis der Konzentration zwischen ar-Turmeron und der Substanz DT1. Weiterführende Bioassays unter Einsatz von verschiedenen Reinstoffgemischen der beiden Inhaltsstoffe könnten jedoch zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen.

6. Literaturverzeichnis

- ABAS F., LAJIS N.H., SHAARI K., ISRAF D.A., STANSLAS J., YUSUF U.K. 2005. A labdane diterpene glucoside from the rhizomes of *Curcuma mangga*. *J. Nat. Prod.* 68: 1090-1093.
- AMMON H. P. T., ANAZODO M. I., SAFAYHI H., DHAWAN B. N., SRIMAL R. C., 1992. Curcumin: a potent inhibitor of leukotriene B₄ formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). *Planta Med.*, 58, 26.
- ANAND P., KUNNUMAKKARA A.B., NEWMAN R.A., AGGARWAL B.B., 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 2007; 4:807–818.
- APAVATJRUT P., ANUNTALABHOCHAI S., SIRIRUGSA P., ALISI C., 1999. Molecular Markers in the Identification of Some Early Flowering *Curcuma* L. (Zingiberaceae) Species. *Annals of Botany* 84: 529-534.
- ARAUJO C.C., LEON L.L, 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol: 96:723–728.
- BAKER J.G., 1892. Scitamineae. In Hooker, J.D. (ed.) *Flora of British India*. Vol. 6, pp. 198-264. L. Reeve & Co., Ltd., London.
- BARRERO A.F., OLTRA J.E., ALVAREZ M., RASLAN D.S., SAUDE D.A., AKSSIRA M., 2000. New sources and anti fungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia* 2000;71:60-4
- BECERRA J., FLORES C., MENA J., AQUEVEQUE P., ALARCÓN J., BITTNER M., HERNÁNDEZ V., HOENEISEN M., RUIZ E., SILVA M. 2002. Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 47, pp. 151–157
- BENSCH K., GROENEWALD J.Z., DIJKSTERHUIS J. , STARINK-WILLEMSE M., ANDERSEN B., SUMMERELL B.A., SHIN H.-D., DUGAN F.M. , SCHROERS H.-J., BRAUN U. AND CROUS P.W., 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology* 67: 1–94.
- BRESINSKY A., EHRENDORFER F., SITTE P., ZIEGLER H., 1998. Strasburger – Lehrbuch der Botanik. Begründet von E. Strasburger. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, 1998 (34.Auflage), ISBN 3-4-25500-2, 1007 pp.
- BURKILL T.H. 1966. A dictionary of economic products of the Malay Peninsula. Kuala Lumpur: Ministry of Agriculture and Co-operatives.
- BURT S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. *Inter J Food Microbio.* 94:223 – 253.
- CAVIN C., HOLZHAEUSER D., SCHARF G. 2002. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.*, 40: 1155–1163.
- CHAPPELL, J., 1995. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* 107, 1-6.

CHATTOPADHYAY, I., BISWAS K., BANDYOPADHYAY U., BANERJEE R.K., 2004: Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Curr. Sci.*, 87, 44-52.

CHAVEERACH A., SUDMOON R., TANEE T., MOKKAMUL P., SATTAYASAI N., SATTAYASAI J., 2008. Two new species of *Curcuma* (Zingiberaceae) used as cobra-bite antidotes. *Journal of Systematics and Evolution* 46:80–88

CICHEWICZ, R. H.; KOUZI, S. A., 2004. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.*, 24, 90-114.

CHIMNOI N., SARASUK C., KHUNNAWUTMANOTHAM N., INTACHOTE P., SEANGSAI S., SAIMANEE B., PISUTJAROENPONG S., MAHIDOL C. AND TECHASAKUL S., 2009. Phytochemical reinvestigation of labdane-type diterpenes and their cytotoxicity from the rhizomes of *Hedychium coronarium*, *Phytochemistry Letters*, 2, 184-187.

DAVIS N.D., WAGNER R.E., DALBY D.K., MORGAN-JONES G., DIENERU.L., 1975. Toxigenic fungi in food. *Appl. Microbiol.*, 30, 159-161.

DEMETZOS C., DIMAS K., 2001. Labdane type diterpenes: chemistry and biological activity. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 25, pp. 235–292

DE OMENA M.C.; BENTO E.S.; DE PAULA J.E.; SANT'ANA A.E, 2006. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeiflorus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v.6, n.2, p.216-222.

ENGELMEIER D., 2002: Biotests with phytopathogenic microfungi for determination of antifungal activities from different natural compounds. Dissertation, Universität Wien.

EISENREICH W., ROHDICH F., BACHER A., 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Science* 6:78–84.

FERREIRA L.A.F., HENRIQUES O.B., ANDREONI A.A.S., VITAL G.R.F., CAMPOS M.M.C., HABERMEHI G.G., MORAES V.L.G., 1992. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon* 30: 1211-1218.

FIRMAN K., KINOSHITA T., ITAI A., SANKAWA U., 1988. Terpenoids from *Curcuma heyneana*. *Phytochemistry*, 27, 3887 - 3891.

JAYAPRAKASHA G.K., JAGANMOHAN RAO L., SAKARIAH K.K, 2002. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *J Agric Food Chem* 50:3668–72.

GERSHENZON J. & CROTEAU R.B. ,1993. Terpenoid biosynthesis: The basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In *Lipid Metabolism in Plants*, T.S. Moore, Jr., ed (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 339-388.

GOVINDARAJAN V.S, 1980. Tumeric – chemistry, technology and quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 12 (3), 199-301.

GOEL A, BOLAND C.R., CHAUHAN D.P., 2001. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 172: 111-118.

HAUKVIK T, BRUZELL E., KRISTENSEN S., TØNNESEN H.H., 2009. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Pharmazie, 64, 666–673.

HE, X. G.; LIN, L. Z.; LIAN, L. Z.; LINDENMAIER, M., 1998. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*). *Journal of Chromatography A*, 818, 127-132.

HOEHLE, S. I., PFEIFFER, E., SOLYOM, A. M., METZLER, M., 2006. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. J. Agric. Food Chem. 54, 756-764.

ISLAM A., 2004. Genetic diversity of the genus *Curcuma* in Bangladesh and further biotechnological approaches for in vitro regeneration and long-term conservation of *C. longa* germplasm. Dissertation, Universität Hannover

KATSUYAMA Y., KITA T., HORINOUCI S., 2009 b. Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb *Curcuma longa*. FEBS Lett 583:2799-2803.

KIM M., CHOI G., LEE H., 2003. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51, 1578–1581.

KITA T., IMAI S., SAWADA H., KUMAGAI H., SETO H., 2008. The Biosynthetic Pathway of Curcuminoid in Turmeric (*Curcuma longa*) as Revealed by ¹³C-Labeled Precursors. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 72, 1789–1798.

KRESS, W. J., PRINCE, L. M., WILLIAMS, K. J., 2002. The phylogeny and new classification of the Gingers (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. Amer. J. Bot. 89, 1682-1696.

KRESS, W. J., PRINCE, L. M., HAHN, W. J., ZIMMER, E. A., 2001. Unraveling the evolutionary radiation of the families of the Zingiberales using morphological and molecular evidence. Syst. Biol. 50, 926-944.

KRESS W. J., 1990. The phylogeny and classification of the Zingiberales. Annals of the Missouri Botanical Garden, Vol. 77, 4, 698-721.

KRINSKY N.I., 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66: 1003-1010.

LARSEN K., LARSEN S. S., 2006. Gingers of Thailand. Maerim, Chiang Mai, Thailand

LEE H.-S., CHOI K.-J., CHO K.-Y., AHN Y.-J., 2003. Fungicidal activity of ar-turmerone identified in *Curcuma longa* rhizome against six phytopathogenic fungi. Agric. Chem. Biotechnol. 46, 25–28.

LOU Y.; ZHAO F.; HE H.; PENG K.-F.; ZHOU X.-H.; QIU F. 2009. Guaiane-type sesquiterpenes from *Curcuma wenyujin* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Asian Natural Products Research*. 11, 737–747.

MUNK K., 2001: *Grundstudium Biologie: Botanik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- NGAMRIABSAKUL C., NEWMAN M.F., CRONK Q.C.B., 2004. The phylogeny of tribe Zingibereae (Zingiberaceae) based on ITS (nrDNA) and trnL-F (cpDNA) sequences. *Edinburgh Journal of Botany* 57: 39–61.
- PACHER T., BACHLER M., HOFER O., GREGER H. 2001: Stress induced carbazole phytoalexins in *Glycosmis* species. *Phytochemistry* 58, 129-135.
- PAN M. H, LIN-SHIAU S. Y., LIN J. K., 2000. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through downregulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochemical. Pharmacology* 60, 1665–1676.
- PLUMMER S.M., HOLLOWAY K.A., MANSON M.M., MUNKS R.J., KAPTEIN A., FARROW S., HOWELLS L., 1999. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*. 1999;18:6013–6020
- PURSEGLOVE J.W., 1974. *Tropical Crops: Monocotyledones*. London: Longman.
- RAMIREZ-AHUMADA, M. C., TIMMERMAN, B. N., 2006. Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry* 67, 2017-2029.
- RANINGER A., 2009. Antifungale Inhaltstoffe der Gattungen *Zingiber* und *Curcuma* (Zingiberaceae) und ihre chemosystematische Bedeutung. Diplomarbeit, Universität Wien.
- RAO C.V., RIVENSON A., SIMI B., REDDY B.S., 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res*, 55, 259–266.
- REISCH, J, PROBST, W., GRÖGER, D., 1990. Die Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Trennung und Bestimmung von Acridonalkaloiden. *Pharmazie*, 45, 500-502.
- REMA J, MADAN M.S., 2001. Tumeric. An Extension Pamphlet. Agricultural Technology Information Center. Indian Institut of Spice Research, pp: 8
- RIDLEY H.N., 1912. *Spices*. Macmillan and Co. Ltd., London.
- ROTH G.N., CHANDRA A., NAIR M.G., 1998. Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *J Nat Prod* 61:542-545.
- SASIKUMAR B., 2005. Genetic resources of *Curcuma*: diversity, characterization and utilization. *Plant Genetic Resources*, vol. 3, no. 2, p. 230-251.
- SCHUMANN K., 1904. Zingiberaceae, pp. 1-458. In Engler, A. (ed.) *Das Pflanzenreich*, Heft 20 (IV, 46), Leipzig.
- SCHWARZ, M.K., 1994. Terpen-Bioynthese in *Gingko biloba*: Eine überraschende Geschichte. Thesis Nr. 10951, ETH Zürich.
- SHARMA R.A., GESCHER A.J., STEWARD W.P., 2005. Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*, 41 (2005), 1995-1968.

SIEDLE B., 2003: Phytochemische und pharmakologisch-biologische Untersuchungen von traditionellen Heilpflanzen aus Costa Rica sowie von Sesquiterpenlactonen und Bindungs- und QSAR-Studien mit der Humanen Neutrophilen Elastase und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B als molekularen Target. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.

SIRAT H.M., MENG L.L., 2009. Chemical Components of the Rhizome Oil of *Curcuma heyena* Val. *Malaysian Journal of Science*. 28. 323 – 328

SIRAT H.M., MASRI D., RAHMAN A.A., 1994. The distribution of labdane diterpenes in the zingiberaceae of Malaysia. *Phytochemistry* 36, 600-701.

SIRIRUGSA P., 1999. Thai Zingiberaceae: Species diversity and their uses. Lecture presented at the International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conversation and Utilization. 23-27 November 1997, Phuket, Thailand.

SITTE, P., ZIEGLER, H., EHRENDORFER, F. & BRESINSKY, A., 1998. Strasburger. Lehrbuch der Botanik. 34. Auflage. - Gustav Fischer Verlag.

SOMPARN P., PHISALAPHONG C., NAKORNCHAI S., UNCHERN S., MORALES N.P., 2007. Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* 2007;30:74–78.

TAYYEM R.F., HEATH D.D., AL-DELAIFY W.K., ROCK C.L., 2006. Curcumin content of turmeric and curry powders. *Nutr. Cancer* 55, 126–131.

VALETON, T.H., 1918. New notes on the Zingiberaceae of Java and Malaya. *Bull. Jard. Buitenzorg Ser. II* 27, 1–163.

VELAYUDHAN K.C, MURALIDHARAN V.K, AMALRAJ V. A., GAUTAM P.L., MANDAL S., DINESH KUMAR, 1999. *Curcuma* Genetic Resources. Scientific Monograph No. 4. National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi -110 012.

XU H.-X., DONG H., SIM K.-Y., 1996. Labdan Diterpenes from *Alpinia zerumbet*. *Phytochemistry* 42, 149-151.

YANO, S., KOYABASHI, K. AND KATO, K., 2003. Intrabronchial lesion due to *Cladosporium sphaerospermum* in a healthy, non-asthmatic woman. *Mycoses*, 46:330–332. doi:10.1046/j.1439-0507.2003.00885.x

ZALAR, P., HOOG, G.S., SCHROERS, H.J., CROUS, P.W., GROENEWALD, J.Z., GUNDE-CIMERMAN, N., 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology* 58, 157-183.

ZHANG, J.S., GUAN, J., YANG, F.Q.; LIU, H.G., CHENG, X.J., LI, S.P., 2008. Qualitative and quantitative analysis of four species of *Curcuma* rhizomes using twice development thin layer chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 1024-1028.

ZWENGER, S. & BASU C., 2008. "Plant Terpenoids: Applications and Future Potentials". *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 3: 001-007.

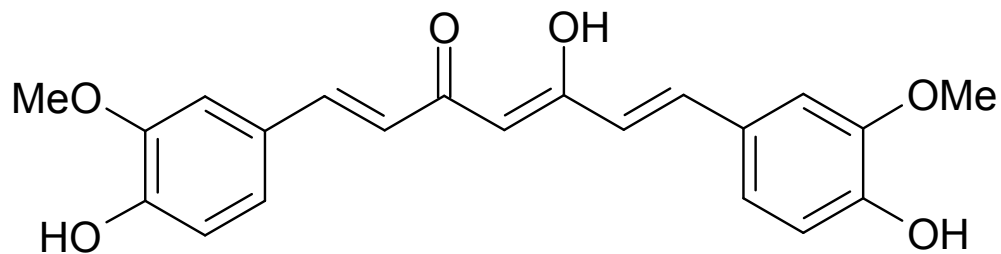
7. Anhang

7.1. Spektraldatenkatalog

Im Spektraldatenkatalog wurden alle relevanten Substanzen zusammengefasst die während vorliegender Arbeit isoliert oder durch Co-Chromatographie identifiziert werden konnten. In Tab. 10. sind jene Verbindungen angeführt, die aufgrund ihrer geringen Quantität oder hohen Flüchtigkeit nicht identifiziert werden konnten. Neben den Trivialnamen sind auch UIPAC-Namen, Strukturformeln und UV-Spektren angegeben. Auch weiterführende Informationen wie CAS-Nummern, Herkunft und Herbarnummern, Schmelzpunkte und Retentionszeiten sowie Molekulargewicht und Summenformeln angeführt. Des Weiteren wurden (falls detektierbar) Fluoreszenzlöschungen unter UV-Licht (254nm und 366nm) und Farbreaktionen nach Besprühen mit Anisaldehyd angeführt.

C1 Curcumin

(1*E*,6*E*)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione



Nachgewiesen in den Rhizomen von:

ZIN 060001

ZIN 060004

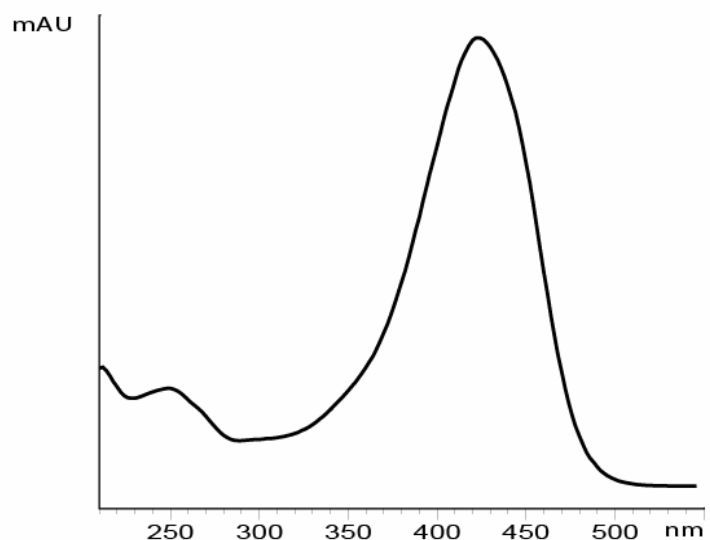
ZIN 070007

C. longa Naschmarkt

ZIN 060011

ZIN 060016

ZIN 060005



CAS Nummer: 458-37-7

Schmelzpunkt: 183°C

Molekulargewicht: 368,38g/mol

Summenformel : C₂₁H₂₀O₆

Retentionszeit: 16,3 min

Farbreaktion Anisaldehyd: gelb-braun

Farbreaktion UV_{366nm}: hellblau

Farbreaktion UV_{254nm}: gelb-grün

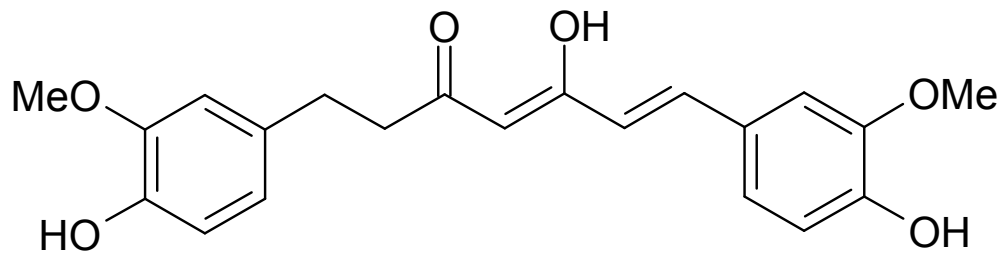
UV-VIS λ (MeOH/H₂O)

Maximum 1: 250 nm

Maximum 2: 424 nm

C2 Dihydrocurcumin

(4Z,6E)-5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,6-heptadien-3-one



Nachgewiesen in den Rhizomen von:

ZIN 060001

ZIN 060004

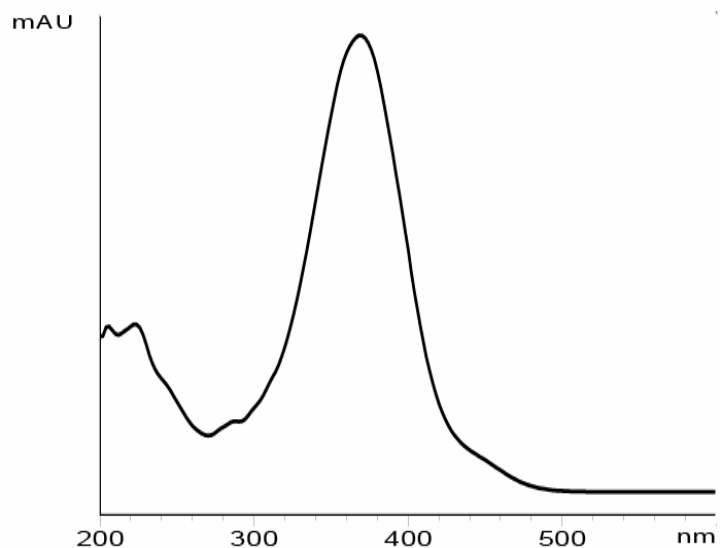
ZIN 070007

C. longa Naschmarkt

ZIN 060011

ZIN 060016

ZIN 10001



CAS Nummer: 76474-56-1

Schmelzpunkt:

Molekulargewicht: 370,41g/mol

Summenformel: C₂₁H₂₂O₆

Retentionszeit: 15,91

Farbreaktion Anisaldehyd: gelb-orange

Farbreaktion UV_{366nm}: gelb-weißlich

Farbreaktion UV_{254nm}: grünlich

UV-VIS λ (MeOH/H₂O)

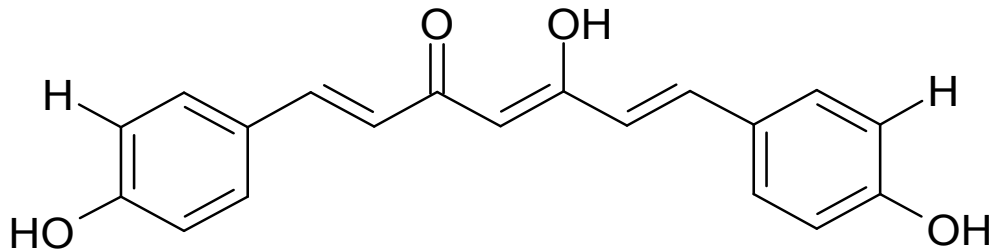
Max.1: 220 nm

Max.2: 286 nm

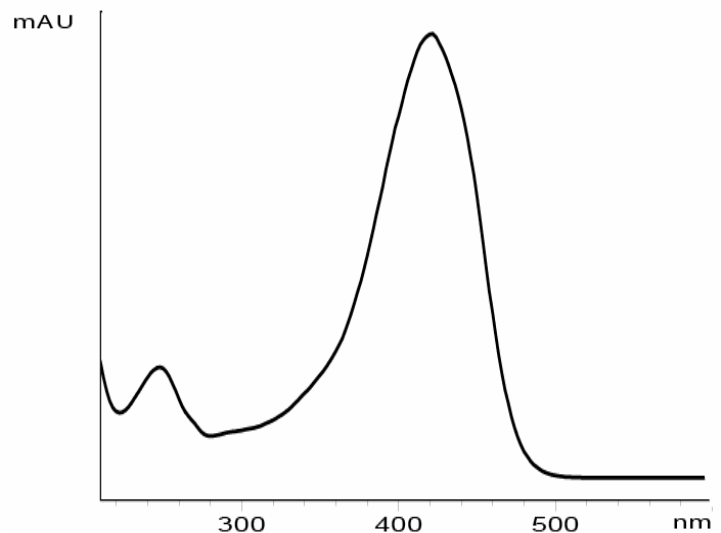
Max. 3: 368 nm

C3 Bisdemethoxycurcumin

(1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione



Isoliert aus dem Rhizom von
ZIN 10001



CAS Nummer: 24939-16-0

Schmelzpunkt: 222°C

Molekulargewicht: 308,34 g/mol

Summenformel: C₁₉H₁₆O₄

Retentionszeit: 16,3 min

Farbreaktion Anisaldehyd: orange

Farbreaktion UV_{366nm}: weißlich

Farbreaktion UV_{254nm}: dunkelgrün

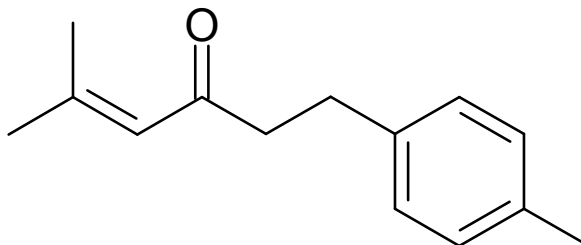
UV-VIS λ (MeOH/H₂O nm)

Maximum 1: 248 nm

Maximum 2: 422 nm

ST1 ar-Turmeron

(R)-2-Methyl-6-(4-methylphenyl)-2-heptene-4-one



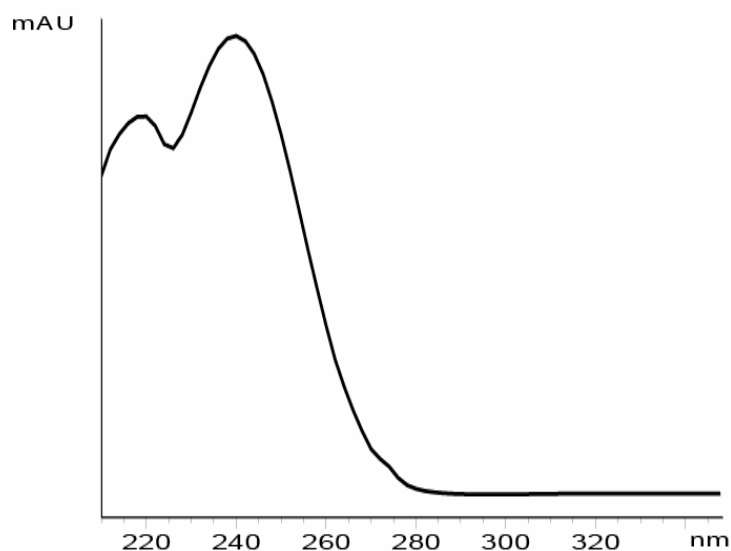
Nachgewiesen in den Rhizomen von:

ZIN 060001

ZIN 060004

ZIN 070007

C. longa Naschmarkt



CAS Nummer: 38142-58-4

Siedepunkt: 159°C

Molekulargewicht: 202,30 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₈O

Retentionszeit: 18,5 min

Farbreaktion Anisaldehyd: n.d.

Farbreaktion UV_{366nm}: n.d.

Farbreaktion UV_{254nm}: n.d.

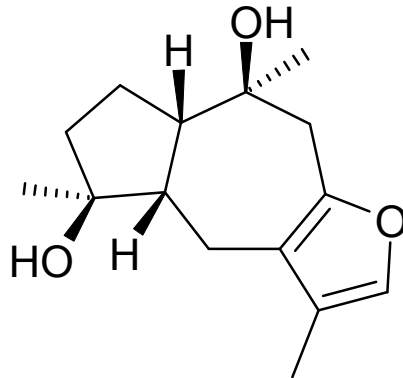
UV-VIS λ (MeOH/H₂O nm)

Maximum 1: 220 nm

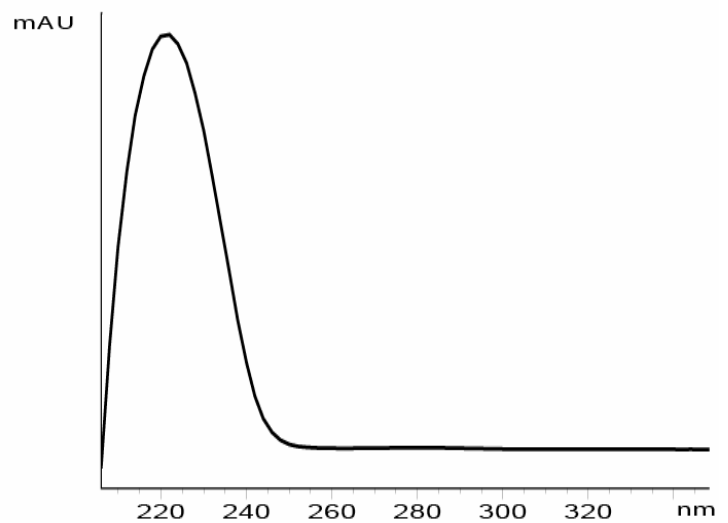
Maximum 2: 240 nm

ST3 Curcumendiol

(5S,5aS,8S,8aS)-1,5,8-trimethyl-4,5a,6,7,8a,9-hexahydroazuleno[6,7-b]furan-5,8-diol



Isoliert aus dem Rhizom von
ZIN 060006



CAS Nummer: k.A.

Schmelzpunkt: k.A.

Molekulargewicht: 250,34 g/mol

Summenformel: C₁₅H₂₂O₃

Retentionzeit: 15,5 min

Farbreaktion Anisaldehyd: violett

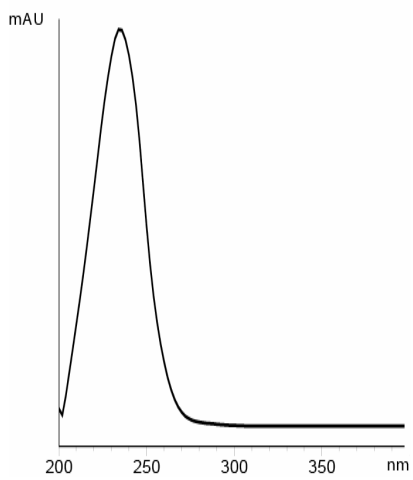
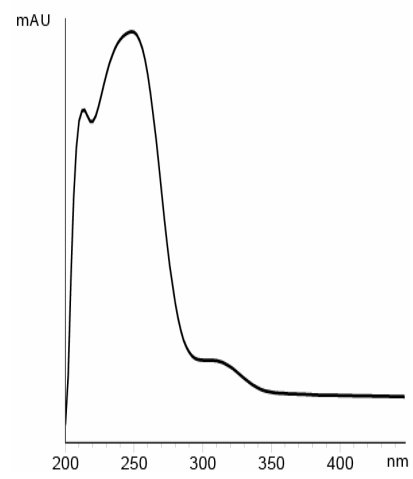
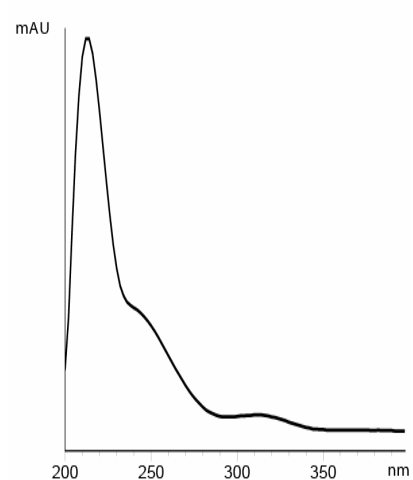
Farbreaktion UV_{366nm}: dunkelblau

Farbreaktion UV_{254nm}: dunkelblau

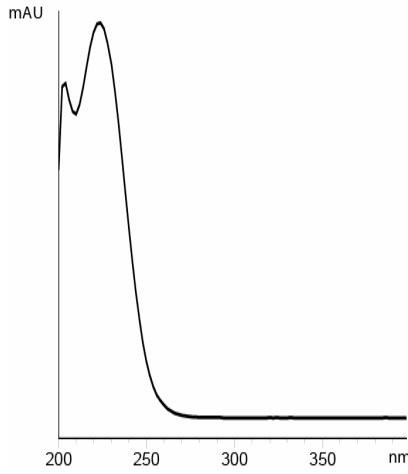
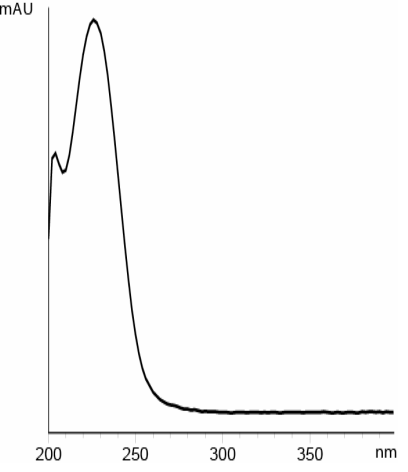
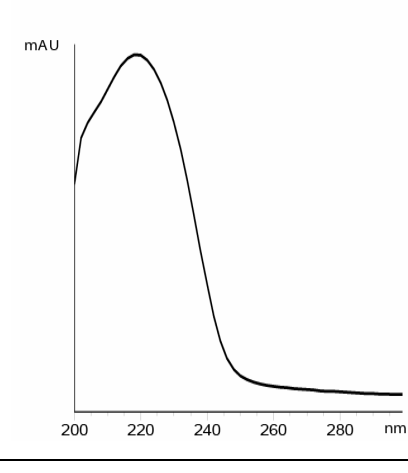
UV-VIS λ (MeOH/H₂O nm)

Maximum 1: 222nm

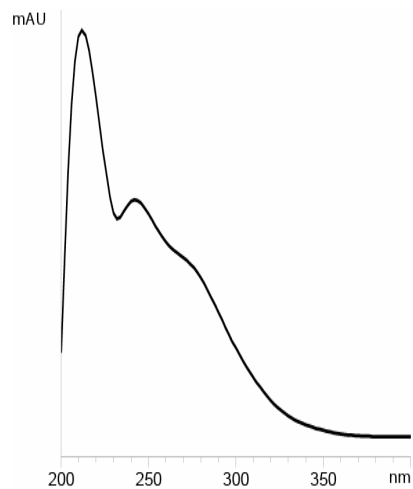
Tab. 10: UV-Spektren der nicht identifizierten Verbindungen

Substanz	Rt [min]	Individuen	UV-VIS λ (MeOH/H ₂ O nm)	UV-Spektrum
DT1	19,44	ZIN 060001 ZIN 060006 ZIN 070007 <i>C. longa</i> NM	Max. 1: 234 nm	
ST2	15,51	ZIN 060011 ZIN 060016	Max. 1: 214 nm Max. 2: 250 nm	
X1	19,15	ZIN 060011 ZIN 060016	Max. 1: 214 nm	

Tab. 10: UV-Spektren der nicht identifizierten Verbindungen

Substanz	Rt [min]	Individuen	UV-VIS λ (MeOH/H ₂ O nm)	UV-Spektrum
X2	20,17	ZIN 060002 ZIN 060005	Max. 1: 202 nm Max. 2: 224 nm	
X3	21,33	ZIN 060002 ZIN 060005	Max. 1: 204 nm Max.2 : 226 nm	
X4	17,39	ZIN 060006	Max. 1: 218 nm	

Tab. 10: UV-Spektren der nicht identifizierten Verbindungen

Substanz	Rt [min]	Individuen	UV-VIS λ (MeOH/H ₂ O nm)	UV-Spektrum
X5	17,95	ZIN 060016	Max. 1: 212 nm Max. 2: 242 nm	 The UV spectrum shows absorbance in mAU on the y-axis and wavelength in nm on the x-axis. The x-axis ranges from 200 to 350 nm with major ticks every 50 nm. The curve starts at approximately 200 nm, rises sharply to a first maximum at 212 nm, dips slightly to a local minimum at approximately 230 nm, rises to a second maximum at 242 nm, and then gradually decreases, leveling off around 350 nm.

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Herkünfte der im Zuge dieser Arbeit analysierten Individuen	17
Tab. 2. Lösungsmittelzusammensetzung der Trockensäule mit Kieselgel (0,2 – 0,5 mm)	19
Tab. 3. Lösungsmittelzusammensetzung der Trockensäule mit Kieselgel (40 – 60 µm)	19
Tab. 4. Zusammensetzung des MEA-Mediums	21
Tab. 5. Zusammensetzung der Malzboullion-Lösung.....	21
Tab. 6. Zusammensetzung der Kochsalzlösung	22
Tab. 7. Zusammensetzung des Cryomediums.....	22
Tab. 8. Auswertung der HPLC-Profile untersuchter Individuen.	26
Tab. 9. Übersicht über Hemmhofgröße und Diffusion der aus dem Infektionsversuch entstandenen Petroletherphasen bei verschiedenen aufgetragenen Stoffmengen	38
Tab. 10. UV-Spektren der nicht identifizierten Verbindungen.....	51

7.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Stammbaum der Zingiberales	3
Abb. 2. Blütendiagramme der acht Familien der Zingiberales	4
Abb. 3. Blütendiagramm.....	4
Abb. 4. Taxonomische Klassifikation der Zingiberaceae	5
Abb. 5. Chemische Struktur der Curcuminoiden	7
Abb. 6. Keto-Enol Tautomerisierung	8
Abb. 7. Biosyntheseweg der Curcuminoiden.....	9
Abb. 8. Biosynthese basierend auf C13-Markierung von Vorläufersubstanzen von Curcuminoiden.....	10
Abb. 9. Biosyntheseweg von Curcumin über <i>p</i> -Cumarsäure und Feruulsäure	11
Abb. 10. Isopren.....	13
Abb. 11. Syntheseweg von Isopentenylidiphosphat.....	14
Abb. 12. Biosynthese verschiedener Terpenoide nach Gershenzon & Croteau	15
Abb. 13. Dünnschichtchromatographische Analyse der verschiedenen Herkunft und einiger Reinstoffe	26
Abb. 14. HPLC-Profil der CHCl ₃ -Phasen verschiedener Individuen	28
Abb. 15. . HPLC-Profil der CHCl ₃ -Phasen von ZIN 060011 und ZIN 060016 im Vergleich	30
Abb. 16. HPLC-Profil der CHCl ₃ -Phasen von ZIN 060002 und ZIN 060005 im Vergleich	32
Abb. 17. HPLC-Profil der Individuen ZIN 10001 und ZIN 060006.	34
Abb. 18. Konzentrationsänderungen von <i>ar</i> -Turmeron und der Substanz DT1 im Versuchsverlauf	35
Abb. 19. Bioautographie mit Petroletherphasen unterschiedlicher Konzentration	37

7.4. Danksagung

An erste Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Karin Valant-Vetschera bedanken für die Betreuung dieser Diplomarbeit bedanken. Ihre Unterstützung bei Fragen und Problemen sowie die konstruktive Kritik trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein herzliches Dankeschön auch an Mag. Johann Schinnerl der mich stets geduldig und kompetent bei methodischen Problemen unterstützte und beriet. Seine Hilfsbereitschaft war sehr förderlich für die Entstehung dieser Arbeit.

Großen Dank schulde ich Mag. Adriane Raninger, die mir den richtigen Umgang mit dem Testorganismus *C. sphaerospermum* lehrte. Ihr Wissen und ihre Hilfe bei Fragestellungen bezüglich Bioassays trug wesentlich zur Umsetzung dieses Diplomarbeitsthemas bei.

Herzlichen Dank auch an Univ. Doz. Dr. Lothar Brecker und sein Team. Durch ihre Hilfe konnten Strukturen der im Zuge dieser Arbeit isolierten Reinstoffe aufgeklärt werden.

Besonderen Dank verdienen auch meine Kollegen Mag. Christine Scheffknecht, Mag. Birgit Gschweidl, Mag. Celine Zahradnik, Andreas Berger, Markus Hofbauer, Mag. Andrea Zraunig, Stefan Mikulicic, Christian Gilli, Mag. Sonja Leißner und Dr. Grace Djoufack für die zahlreichen Hilfestellungen, das angenehme Arbeitsklima und ihren Beistand bei kleinen und großen Problemen des Laboralltags. An dieser Stelle sei auch Mag. Tshering Doma Bhutia herzlichst gedankt. Ihre fröhliche und ruhige Art half mir stets, auch in schwierigen Situationen nicht aufzugeben. Zudem schafften die zahlreichen Gespräche über Tibet und Buddhismus immer einen wertvollen Ausgleich zum Alltag.

Großer Dank gebührt auch Mag. Bernhard Samminger. Ohne seine Hilfe und enorme Unterstützung im Fach „Allgemeine und Organische Chemie“ wäre mein Studium wohl bereits im 3. Semester beendet gewesen.

Weiters möchte ich Mag. Vera Aichhorn und Dipl. Ing. Daniel Aschauer für ihre Gastfreundschaft danken. Wann auch immer ich in Wien zu tun hatte nahmen sie mich herzlich auf und boten mir eine wunderbare Unterkunft.

Besonderer Dank gilt auch der Firma Siemens VAI Metals Technologies GmbH für die zahlreichen Praktika und die anschließende geringfügige Beschäftigung. Abgesehen vom finanziellen Aspekt, der mir so manche Exkursion ermöglichte, bot mir diese Arbeit einen extrem wichtigen Ausgleich zum Uni-Alltag. Großen Dank schulde ich insbesondere meiner Vorgesetzten Frau Ingrid Beyrl, die mir einen Einblick in kaufmännische Tätigkeiten und die Privatwirtschaft ermöglichte. Durch ihre bestimmte aber dennoch herzliche Art, motivierte sie mich stets, sorgfältig zu arbeiten. Diese im Laufe der Jahre durch sie erlernte Genauigkeit trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herzlichen Dank auch an meinen Freund Mag. Andreas Wiesinger, der mir den lang ersehnten Umzug nach Linz im Jahre 2011 ermöglichte. Ihm ist das ideale, ruhige Umfeld zu verdanken, das zur Fertigstellung dieser Diplomarbeit nötig war. Für seine Ermutigung und Unterstützung in guten wie in schwierigen Zeiten sei ihm von Herzen gedankt.

Abschließend möchte ich mich meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung danken, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Besonderer Dank gilt meinem Vater Dipl. Ing. Johannes Steins der mich Zeit seines Lebens immer dazu ermutigte, neue Herausforderungen anzunehmen und meine Ziele konsequent zu verfolgen. Er lehrte mich den richtigen Umgang mit Misserfolgen und motivierte mich stets, eigenständig und kritisch zu denken. Die Geschichten aus seiner Studienzeit in Leoben halfen mir, ein gutes Mittelmaß zwischen Studentenleben und Arbeit zu finden und so manchen Stolperstein im Studium zu umgehen. Ihm sei für alles mit einem herzlichen „Glück auf!“ gedankt.

7.5. Zusammenfassung

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde der unpolare Anteil der Stoffausstattung der Rhizome zehn verschiedener Individuen aus der Gattung *Curcuma* mit chromatographischen Methoden analysiert. Der Vergleich der HPLC-Chromatogramme der aus den Extrakten gewonnenen CHCl_3 -Phasen erlaubte die Einteilung in vier Gruppen. Zwei Individuen, die aufgrund fehlender Infloreszenzen nicht bestimmt wurden, konnten durch die vergleichende Analyse somit der Art *C. longa* zugeordnet werden. Die Hauptinhaltsstoffe der CHCl_3 -Phasen waren Curcuminoide und Sesqui – bzw. Diterpenoide. Die Strukturen von weiteren 4 Inhaltsstoffen konnten nicht näher bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Reinstoffe aus den Rhizomen der Herkünfte ZIN 010001 und ZIN 060006 isoliert und ihre Struktur bestimmt: Bisdemethoxycurcumin (C3) und das bisher unbekannte Sesquiterpen Curcumendiol (5S,5aS,8S,8aS)-1,5,8-trimethyl-4,5a,6,7,8a,9-hexahydroazuleno[6,7-b]furan-5,8-diol (ST3). Die Substanzen Curcumin (C1), Dihydrocurcumin (C2) und ar-Turmeron (ST1) wurden durch Co-chromatographie mit bekannten Testsubstanzen und den Vergleich von UV-Spektren identifiziert.

Parallel dazu wurde ein Bioassay mit einer Herkunft von *C. longa* durchgeführt. Hierzu wurden Rhizomstücke mit Sporen von *C. sphaerospermum* infiziert und in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss insgesamt 39 Tage gelagert. Nach den Tagen 4, 7, 11, 17, 24, und 39 wurden Proben der infizierten Rhizomstücke entnommen, mit Methanol extrahiert, und die aus dem Extrakt gewonnenen Petroletherphasen über HPLC analysiert. Die HPLC-Profile zeigten Konzentrationsänderungen der unpolaren Verbindungen ar-Turmeron und des unbekannten Diterpens DT1, was als eine Reaktion auf die Infektion interpretiert werden könnte. Anschließend wurde eine Bioautographie auf DC-Platten durchgeführt, um eine allfällige Korrelation zwischen dieser Konzentrationsänderung und dem Ausmaß der antifungalen Aktivität in einem Bioassay nachzuweisen. Alle Petroletherphasen, die während des 39-tägigen Versuchsverlaufes gewonnen wurden, zeigten auf der DC-Platte antifungale Wirkung gegen den Pilz *C. sphaerospermum*. Die Größe der bei diesem Infektionsversuch entstandenen Hemmhöfe scheint jedoch nur von der aufgetragenen Menge der Petroletherphasen abzuhängen, nicht aber von der Zusammensetzung dieser Phasen und den damit in Zusammenhang stehenden Konzentrationsänderungen von ar-Turmeron oder dem Diterpen DT1 im Laufe des Infektionsversuchs.

7.6. Abstract

In course of this diploma thesis, rhizomes of ten individuals belonging to the genus *Curcuma* were analysed for their composition of apolar compounds. Comparative HPLC-chromatography of the CHCl_3 -phase from methanolic rhizome extracts allowed for a classification into four groups. Two individuals, which could not be determined due to missing inflorescences, were identified as *C. longa* by this method. HPLC analysis showed that the main compounds in the CHCl_3 -phases of these individuals were curcuminoids, sesqui- and diterpenoids. The structures of 4 further compounds could not be determined. However, within the framework of this study, two compounds were isolated from the rhizomes of the individuals ZIN 010001 and ZIN 060006. They were identified as bisdemethoxycurcumin (C3) and the novel sesquiterpene curcumendiol (5S,5aS,8S,8aS)-1,5,8-trimethyl-4,5a,6,7,8a,9-hexahydroazuleno[6,7-b]furan-5,8-diol (ST3), respectively. The structures of curcumin (C1), dihydrocurcumin (C2) und ar-turmerone (ST1) were confirmed by co-chromatography (HPLC, TLC) and by comparison of their UV-spectra with authentic samples.

In order to detect the bioactive potential of the apolar substances ar-turmerone (ST1) and the diterpenoid DT1, bioautographical tests with petroleum ether phases obtained from a rhizome extract of one collection of *C. longa* were carried out. Rhizomes were cut into pieces, infected with spores of *C. sphaerospermum* and stored in a dark and humid environment for 39 days. After days 4, 7, 11, 17, 24 and 39, samples were taken and extracted with methanol. The petroleum ether phases separated from these extracts were then analysed by HPLC. The HPLC profiles showed changes in the concentrations of the apolar terpenoids ar-turmerone and the diterpene DT1 of yet unknown structure. These changes could be interpreted as a reaction towards the infection with *C. sphaerospermum*. A bioassay on TLC-plates was carried out in order to investigate a possible correlation between changes of concentrations and bioactivity. All of the petroleum ether phases from extracted rhizomes sampled during the infection experiment showed antifungal activity against *C. sphaerospermum*. However, no context was obvious between different concentrations of ar-turmerone (ST1) and DT1 in the petroleum ether phases and the inhibition of the fungal growth. The size of inhibition zones appearing on the TLC-plates seemed to be related rather to the quantity of the applied petroleum ether phases.

7.7. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Staatsbürgerschaft: Deutschland

Familienstand: ledig

Geburtsdatum: 30.11.1984

Werdegang

2011-dato	Geringfügige Beschäftigung als kaufmännische Angestellte bei Siemens VAI Metals Technologies GmbH, Linz
2009-dato	Diplomarbeit im Spezialfach Phytochemie Thema: „Bioaktive Inhaltsstoffe der Gattung <i>Curcuma</i> (Zingiberaceae)“
2008-2011	Ferialpraktika bei Siemens VAI Metals Technologies GmbH, Linz Abteilung Human Resources
2007	Inskription Studienzweig Botanik, Universität Wien
2006-2007	Call Center-Agent bei Fessel GfK Austria, Wien
2004-2007	Grundstudium Biologie, Universität Wien
2003-2004	Call Center-Agent bei IMAS International, Linz
2003-2004	Dialogica Europa-Akademie, Linz
1995-2003	Europagymnasium Linz Auhof, Matura am 5.Juni 2003
1991-1995	Volksschule 2, Gallneukirchen