



Doctoral Thesis

Phytochemical and biological investigations of Turkish Leonurus species, emphasizing on the diterpenoids of *Leonurus persicus*

Author(s):

Tasdemir, Deniz

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001850941> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 12368

**PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF
TURKISH *LEONURUS* SPECIES, EMPHASIZING ON THE
DITERPENOIDS OF *LEONURUS PERSICUS***

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

DENİZ TASDEMİR

B.Sc. and M.Sc. in Pharmacy
Hacettepe University, Turkey
born August 25, 1965
Kars, Turkey

accepted on recommendation of

Prof. Dr. Otto Sticher, examiner
Prof. Dr. İhsan Çalis, co-examiner

Zurich 1997

SUMMARY

The genus *Leonurus* (Lamiaceae), commonly known as motherwort, is represented by five species in Turkish flora; *L. cardiaca*, *L. glaucescens*, *L. marrubiastrum*, *L. persicus* and *L. quinquelobatus*. Their use in traditional medicine in Turkey as well as Eastern and Western Europe, the scarcity of the phytochemical literature and some taxonomical problems suggested the necessity of focusing on this small genus. Hence, *Leonurus persicus*, on which no chemical study was existing so far, was chosen for further phytochemical investigations. Besides *L. persicus*, the other four Turkish *Leonurus* plants were also collected and screened in in-house bioassays, namely antimicrobial, molluscicidal (*Biomphalaria glabrata*), brine shrimp (*Artemia salina*) and tumor cell toxicity (KB- and Caco-2-cells) test systems, but none of the extracts demonstrated significant bioactivity.

The shadow-dried plant material was extracted with solvents of increasing polarity, i.e. petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and methanol-water mixtures (5:1 and 1:1), respectively. Fractionation and isolation process was carried out from petroleum ether and dichloromethane extracts, using a combination of both normal- and reversed-phase VLC and HPLC. Some isolates were purified by recrystallization. Separation of these extracts yielded 34 compounds. Most of the isolates were diterpenoids, 29 of which are of labdane and 2 of 8,9-*seco*-labdane skeleton, and 26 of these metabolites were new to the literature: leopersin A, 8-deacetoxyleopersin A, leopersin B, 15-*epi*-leopersin B, leopersin C, 15-*epi*-leopersin C, leopersin D-E, leopersin F, 7-*epi*-leopersin F, leopersin G-I, leopersin J, 15-*epi*-leopersin J, leopersin K-N, leopersin O, 15-*epi*-leopersin O, leopersin P, leopersin Q, 15-*epi*-leopersin Q, 4 β -hydroxymethylpregaleopsin and 4 β -hydroxymethylgaleopsin. Two ubiquitous phytosterols, β -sitosterol and stigmasterol, as well as a known flavone, genkwanin, were also obtained and characterized.

Structures of the isolates were established by spectroscopic and chemical means, including HREIMS, DCIMS, UV, IR, optical rotation and a variety of 1D and 2D NMR spectroscopy. Their regio- and relative stereochemistry were determined from the results of 2D NOESY or ROESY spectra or by a 1D NOE difference experiment. Absolute stereochemistry of 4 β -hydroxymethylpregaleopsin, isolated as its *p*-bromobenzoic acid derivative, was solved by single-crystal X-ray analysis. 10 of the new labdane diterpenes were isolated as inseparable epimeric mixtures (1:1) of two hemiacetals, and their structures were established on this basis. The

position of isomerism (C-15) was confirmed by readily oxidation of the mixture to its C-15 γ -lactone derivative.

Of the known metabolites of diterpenoid class, pregaleopsin, ballotenol and 13-hydroxyballonigrinolide were isolated from the genus *Leonurus* for the first time. This is only the second report of pregaleopsin from the nature. Its furanoid derivative galeopsin, and (-)-leosibiricin, optical antipode of (+)-leosibiricin previously obtained from other *Leonurus* species, were also reisolated from this genus. Complete NMR assignments of all known diterpenoids, which were lacking or wrong in the literature, were made using extensive 2D NMR studies. Moreover, the stereochemical position of (-)-leosibiricin at C-8 and at C-13 was determined by means of a 2D NOESY experiment. In ballotenol, the relative stereochemistry previously assigned to C-8 was revised on the basis of 2D ROESY spectroscopy coupled with the results of X-ray crystallography.

Supporting the results of the preliminary biological screening, none of the isolates showed notable biological activity in in-house bioassays, but a random screening to find other bioactive potential of the diterpenoids is currently being performed.

This is the first detailed phytochemical study on *Leonurus persicus* which showed this plant to accumulate a great variety and abundance of labdane type of diterpenoids. The obtained results coupled with the previous phytochemical literature indicate that these metabolites are characteristic for the genus. Since the taxonomy of the genus *Leonurus* is very complex, this ongoing project may assist chemotaxonomical classification of this genus and also the determination of biosynthetic origin of such labdane metabolites.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Gattung *Leonurus* (Lamiaceae), allgemein bekannt als Herzgespann oder Mutterwurz, umfasst in der Flora der Türkei die folgenden fünf Spezies: *L. cardiaca*, *L. glaucescens*, *L. marrubiastrum*, *L. persicus* und *L. quinquelobatus*. Deren Anwendung in der traditionellen Medizin, sowohl der Türkei als auch in Ost- und Westeuropa, die Existenz nur weniger phytochemischer Daten, sowie taxonomische Schwierigkeiten waren die Gründe, um sich auf diese kleine Pflanzengattung zu konzentrieren. Es wurde *Leonurus persicus* für die weitere phytochemische Untersuchung ausgewählt, da dazu bisher keinerlei chemische Studien vorgelegen haben. Neben *Leonurus persicus* wurden auch die anderen vier türkischen *Leonurus*-Pflanzen gesammelt und verfügbaren biologischen Testsystemen unterzogen, namentlich Tests bezüglich der antimikrobiellen und molluskiziden (*Biomphalaria glabrata*) Wirkung, sowie auf Toxizität gegen Brine shrimp (*Artemia salina*) und Tumorzellen (KB- und Caco-2-Zellen), jedoch zeigte keiner der getesteten Extrakte eine signifikante Bioaktivität.

Das zuvor im Schatten getrocknete Pflanzenmaterial wurde jeweils mit Lösungsmitteln zunehmender Polarität extrahiert, d.h. Petrolether, Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol und Methanol-Wasser Gemischen (5:1 und 1:1). Die weitere Fraktionierung und Isolierung erfolgte, ausgehend vom Petrolether- und Dichlormethan-Extrakt, unter Verwendung von Normalphasen- und Umkehrphasen-VLC und HPLC. Einige Isolate wurden durch Umkristallisation gereinigt. Die Auftrennung der Extrakte lieferte 34 Substanzen. Bei den meisten handelt es sich um Diterpenoide, wobei sich 29 von einem Labdan-Grundgerüst und zwei von einem 8,9-*seco*-Labdan-Gerüst ableiten. 26 dieser Metaboliten wurden zum ersten Mal beschrieben: Leopersin A, 8-Deacetoxyleopersin A, Leopersin B, 15-*epi*-Leopersin B, Leopersin C, 15-*epi*-Leopersin C, Leopersin D-E, Leopersin F, 7-*epi*-Leopersin F, Leopersin G-I, Leopersin J, 15-*epi*-Leopersin J, Leopersin K-N, Leopersin O, 15-*epi*-Leopersin O, Leopersin P, Leopersin Q, 15-*epi*-Leopersin Q, 4 β -Hydroxymethylpregaleopsin und 4 β -Hydroxymethylgaleopsin. Ebenso wurden zwei ubiquitäre Phytosterole, β -Sitosterol und Stigmasterol, sowie ein bekanntes Flavon, Genkwanin, isoliert und charakterisiert.

Die Strukturaufklärung der isolierten Substanzen erfolgte mittels spektroskopischer und chemischer Methoden, einschliesslich HREIMS, DCIMS, UV, IR, optischer Drehung und verschiedener 1D und 2D NMR. Die Regio- und relative Stereochemie wurden mit Hilfe von 2D NOESY- oder ROESY-Spektren oder mit Hilfe eines 1D NOE Differenz-Experiments geklärt. Die absolute Stereochemie von 4 β -Hydroxymethylpregaleopsin, isoliert als entsprechendes *p*-

Bromobenzoessäure-Derivat, wurde durch Einkristall-Röntgenstrukturanalyse ermittelt. 10 der neu isolierten Labdan-Derivate wurden als untrennbare epimere Gemische (1:1) von zwei Hemiacetalen isoliert. Auf dieser Basis erfolgte die Struktur-Bestimmung. Die Position der Isomerie (C-15) wurde durch leichte Oxidation des Gemisches zum entsprechenden C-15 γ -Lacton bestätigt.

Von den bekannten Metaboliten der Diterpen-Klasse wurden Pregaleopsin, Ballotenol und 13-Hydroxyballonigrinolid zum ersten Mal aus der Gattung *Leonurus* isoliert. Dies ist der zweite Bericht über die Isolierung von Pregaleopsin aus der Natur. Das entsprechende Furanoid-Derivat Galeopsin, sowie (-)-Leosibiricin, der optische Antipode von (+)-Leosibiricin, zuvor isoliert aus anderen *Leonurus* Arten, wurden ebenfalls erneut aus dieser Gattung isoliert. Eine vollständige Zuordnung der NMR-Daten aller bekannten Diterpenoide, welche in der Literatur fehlten oder falsch waren, wurden unter Anwendung von umfassenden 2D-Experimenten gemacht. Ferner wurde die stereochemische Position von (-)-Leosibiricin an C-8 und C-13 durch ein 2D NOESY-Experiment bestimmt. Die früher zugeordnete relative Stereochemie an C-8 von Ballotenol wurde auf der Basis von 2D ROESY-Experimenten, kombiniert mit den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse, revidiert.

In Übereinstimmung mit den Resultaten des biologischen Screenings zeigte keine der isolierten Substanzen eine signifikante Aktivität in den in-Haus-Biotests. Zur Zeit wird ein breites Screening zum Auffinden anderer bioaktiver Potentiale der Diterpenoide durchgeführt.

Dies ist die erste detaillierte phytochemische Untersuchung über *L. persicus*, die aufzeigte, dass diese Pflanze eine grosse Varietät und Menge an Labdan-Diterpenoiden akkumuliert. Die vorliegenden Resultate, zusammen mit der bisher bekannten phytochemischen Literatur, weisen darauf hin, dass die Metaboliten charakteristisch für diese Gattung sind. Da die Taxonomie der Gattung *Leonurus* sehr komplex ist, kann dieses laufende Projekt zur chemotaxonomischen Klassifizierung dieser Gattung, sowie zur Bestimmung des biosynthetischen Ursprungs solcher Labdan-Metabolite beitragen.