



Doctoral Thesis

Phytochemical and biological investigations on *Hypericum papuanum*, emphasizing on structure elucidation of acylphloroglucinol derivatives by NMR spectroscopy

Author(s):

Winkelmann, Karin Patricia

Publication Date:

2001

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004179154> →

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. 14137

**PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATIONS
ON *HYPERICUM PAPUANUM*,
EMPHASIZING ON STRUCTURE ELUCIDATION OF
ACYLPHLOROGLUCINOL DERIVATIVES
BY NMR SPECTROSCOPY**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

KARIN PATRICIA WINKELMANN

Pharmacist (Eidg. dipl. Apothekerin)
ETH Zurich
born December 30, 1968
citizen of Affoltern am Albis (ZH)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Otto Sticher, examiner
Dr. Jörg Heilmann, co-examiner
Dr. Oliver Zerbe, co-examiner

Zurich 2001

SUMMARY

Based on ethnopharmacological data and a screening for antibacterial, antifungal, and cytotoxic activity of 38 traditional medicinal plants from Papua New Guinea (Quadri-Spinelli, 2000) *Hypericum papuanum* RIDLEY was chosen for further phytochemical and biological investigations.

In the Central Province of Papua New Guinea *H. papuanum* is known as a traditional medicinal plant. The leaves are reported to be used to treat sores. In the above mentioned screening a dichloromethane extract of *H. papuanum* (herb) showed antibacterial (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*) and cytotoxic (KB cells = human nasopharyngeal carcinoma cells) activity.

The air-dried and powdered aerial parts (2.22 kg) were extracted successively with PE, DCM, MeOH, MeOH:H₂O (7:3), and MeOH:H₂O (5:5). Bioactivity-guided fractionation of the petroleum ether extract by means of various chromatographic methods (VLC, HPLC, CC and HSCCC) led to the isolation of twenty new acylphloroglucinol derivatives. Structure elucidation was carried out by extensive use of 1D and 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY) experiments. Additional information was gathered by applying mass spectrometry (EI-, ESI-, FAB- or MALDI-MS). The relative stereochemistry was determined from the results of 2D NOESY spectra and molecular modeling.

The first isolates, ialibinones A-E (**1-5**), showed an unusual tricyclic ring system. In addition, it was possible to isolate the corresponding 1'-hydroxy-ialibinones A (**19**), B (**20**) and D (**21**) from a more polar VLC fraction of the petroleum ether extract.

The chemical structures of the papuaforins A (**6**), C (**8**), D (**9**), and E (**10**) are derivatives of the well known hyperforin. The unstable papuaforin B (**7**) isomerized to a mixture of papuaforin A and B, the only difference between the two compounds being the different formation of the 2,2-dimethyl-2H-pyran ring. The two bicyclic compounds hyperguinone A (**11**) and B (**12**) showed similar bicyclic structures like metabolites isolated from various *Clusia* species.

Hyperpapuanone (**13**) had a bicyclo[3.3.1]non-3-ene ring system and the bicyclic ring system of the enaimeones A, B and C (**16**, **17** and **18**) can be considered as a partial structure of the ialibinones. Finally, the most polar compounds furonewguinone A and B (**14** and **15**) of the petroleum ether extract showed a benzofuran skeleton.

Fractionation of the methanol extract by HSCCC and final separation and purification by HPLC (RP 18) led to the isolation of the known compounds hyperoside (**22**), guaijaverin (**23**), quercitrin (**24**), miquelianin (**26**), chlorogenic acid (**27**), and 3-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl-quinic acid (**28**). Additionally obtained was the previously unknown quercetin-3'-*O*- β -D-galactoside (**25**). All flavonoids share quercetin as common aglycone. The constitution of the known metabolites (flavonoids and quinic acid derivatives) were deduced from NMR spectroscopy and confirmed by comparison either with reference compounds or with reported data from authentic samples.

The isolated phloroglucinol derivatives have been tested for their antibacterial and cytotoxic activity. Most tested compounds showed an antibacterial and/or cytotoxic activity. In both assays hyperpauanone (**13**) showed the strongest effects.

Furthermore, the antioxidative activity of the acylphloroglucinols was evaluated. Up to now eleven phloroglucinol derivatives ialibinones A-E (**1/1a** - **5/5a**), enaimeones A, B, and C (**16/16a** - **18/18a**) as well as 1'-hydroxy-ialibinones A,B and D (**19/19a** - **21/21a**) have been tested. Ialibinone E (**5**) showed potent antioxidative activity and a relatively strong and dose dependent reduction of ROS production. Introduction of the α -orientated 1-methylvinyl side chain in ialibinone B (**2/2a**) and D (**4/4a**) decreased the activity. Surprisingly, the C-3 epimer of compound **2**, ialibinone A (**1**) showed a strong and dose-dependent increase of ROS production. The other compounds showed no activity. The results strongly suggest that activity of the ialibinones is due to specific activation or inhibition of enzymes and/or receptors involved in the signal transduction pathway of the oxidative burst.

This is the first phytochemical and biological study on *H. papuanum* which showed this plant to accumulate a great variety and abundance of acylphloroglucinol derivatives. The antibacterial activity of the phloroglucinols suggests that the aerial parts of this plant may have a beneficial effect on sores and therefore justifies their traditional use as a remedy for wounds.

ZUSAMMENFASSUNG

Basierend auf Daten ethnopharmakologischer Studien und auf einem Screening auf antibakterielle, antifungale und zytotoxische Aktivität von 38 traditionellen Medizinalpflanzen aus Papua Neu Guinea (Quadri-Spinelli, 2000), wurde *Hypericum papuanum* RIDLEY für weitergehende phytochemische und biologische Untersuchungen ausgewählt. In der "Central Province" von Papua Neu Guinea ist *H. papuanum* als traditionelle Medizinalpflanze bekannt. Die Blätter werden zur Behandlung von (entzündlichen) Wunden eingesetzt. Im obenerwähnten Screening zeigte ein Dichlormethanextrakt von *H. papuanum* (Kraut) antibakterielle (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*) und zytotoxische (KB Zellen = humane Nasopharynx-Krebszellen) Aktivität.

Die luftgetrockneten und pulverisierten oberirdischen Teile (2.22 kg) wurden nacheinander mit PE, DCM, MeOH, MeOH:H₂O (7:3), and MeOH:H₂O (5:5) extrahiert. Bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung des Petroletherextrakts mittels verschiedener chromatographischer Methoden (VLC, HPLC, CC und HSCCC) führte zur Isolierung von zwanzig neuen Acylphloroglucinolderivaten. Die Strukturen wurden durch den extensiven Einsatz von 1D und 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY) Experimenten aufgeklärt. Zusätzliche Informationen wurde durch Massenspektrometrie (EI-, ESI-, FAB- oder MALDI-MS) erhalten. Die relative Stereochemie wurde durch 2D NOESY Experimente und "Molecular Modeling" bestimmt.

Die ersten isolierten Substanzen, die fünf Ialibinone A-E (**1-5**), zeigten ein ungewöhnliches tricyclisches Ringsystem. Zusätzlich konnten aus einer polareren VLC-Fraktion des Petroletherextrakts die entsprechenden 1'-Hydroxy-ialibinone A (**19**), B (**20**) and D (**21**) isoliert werden. Die chemische Struktur der Papuaforine A (**6**), C (**8**), D (**9**) und E (**10**) ist vom wohlbekanntem Hyperforin abgeleitet. Das instabile Papuaforin B (**7**) isomerisierte zu einer Mischung von Papuaforin A und B, zwei Substanzen, die sich nur durch die andersartige Bildung des 2,2-dimethyl-2H-pyran-Ringes unterscheiden.

Die beiden bicyclischen Substanzen Hyperguinon A (**11**) und B (**12**) zeigen eine ähnliche Grundstruktur wie einige bicyclische Metaboliten, die aus verschiedenen *Clusia*-Arten isoliert worden sind. Hyperpapuanon (**13**) weist ein Bicyclo[3.3.1]non-3-ene-

Ringsystem auf und das bicyclische System der Enaimeone A, B und C (**16**, **17** und **18**) kann als Teilstruktur der Ialibinone betrachtet werden. Die polarsten Komponenten des Petroletherextrakts schlussendlich, Furoneuquinon A und B (**14** und **15**), haben ein Benzofuran-Grundgerüst.

Fraktionierung des Methanolextraktes durch HSCCC und anschliessende Trennung und Aufreinigung mittels HPLC (RP 18) führte zur Isolierung der bekannten Substanzen Hyperosid (**22**), Guajaverin (**23**), Quercitrin (**24**), Miquelianin (**26**), Chlorogensäure (**27**) und 3-*O*-(*E*)-*p*-Coumaroyl-Chinasäure (**28**). Zusätzlich wurde noch das bisher unbekannte Quercetin-3'-*O*- β -D-galactoside (**25**) isoliert. Alle isolierten Flavonoide haben Quercetin als Aglycon gemeinsam. Die Konstitution der bekannten Metaboliten (Flavonoide und Chinasäurederivate) wurde mittels NMR-Spektroskopie ermittelt und durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen oder Literaturwerten bestätigt.

Die isolierten Phloroglucinderivate sind auch auf ihre antibakterielle und zytotoxische Wirkung hin untersucht worden. Die meisten getesteten Substanzen zeigten eine antibakterielle und/oder zytotoxische Aktivität. In beiden Tests hat Hyperpapuanon (**13**) die stärksten Wirkungen gezeigt.

Im weiteren wurde die antioxidative Aktivität der Acylphloroglucine untersucht. Bis jetzt konnten elf Phloroglucinole getestet werden, die Ialibinone A-E (**1/1a** - **5/5a**), die Enaimeone A, B, und C (**16/16a** - **18/18a**) und die 1'-Hydroxy-ialibinone A, B und D (**19/19a** - **21/21a**). Ialibinon E (**5**) zeigte eine potente antioxidative Aktivität und eine relativ starke und dosisabhängige Reduktion der ROS Produktion. Einführung einer α positionierten 1-Methylvinyl-Seitenkette in Ialibinon B (**2/2a**) und D (**4/4a**) verminderte die Aktivität. Ueberraschenderweise zeigte das C-3 Epimer von Substanz **2**, Ialibinon A (**1**) eine starke, dosisabhängige Steigerung der ROS Produktion. Die erhaltenen Resultate lassen vermuten, dass die Aktivität der Ialibinone durch spezifische Aktivierung oder Inhibition von Enzymen und/oder Rezeptoren, die an der Signalübertragung im "oxidative burst" beteiligt sind, bewirkt wird.

Dies ist die erste phytochemische und biologische Untersuchung über *H. papuanum*. Sie zeigt, dass die Pflanze eine grosse Fülle verschiedenartigster Acylphloroglucinderivate akkumuliert. Die antibakterielle Aktivität der Phloroglucinole lässt darauf schliessen, dass die oberirdischen Teile dieser Pflanze einen heilenden Effekt

auf Wunden haben können. Der traditionelle Einsatz der Pflanze zur Wundheilung wird dadurch bestätigt.