

Diss. ETH No. 14816

**Phytochemical and Biological Investigations  
on a Turkish *Ajuga* species,  
*Ajuga salicifolia***

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

Presented by

PINAR AKBAY

B.Sc and M.Sc. in Pharmacy  
Hacettepe University, Turkey  
born April 23, 1973  
Turkey

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Otto Sticher, examiner  
Prof. Dr. Ihsan Çalış, co-examiner  
Prof. Dr. August Schubiger, co-examiner  
Dr. Jörg Heilmann, co-examiner

Zurich 2002

## SUMMARY

In the flora of Turkey, the genus *Ajuga* L., commonly named as bugle, is represented by 11 species some of which are traditionally used in wound healing, as diuretic, as well as against diarrhea and high fever. Three *Ajuga* species, *A. reptans*, *A. orientalis* and *A. salicifolia* were collected from Turkey and crude extracts were tested in in-house assays, for their antimicrobial (against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) and cytotoxic [against KB (HeLa) cells and brine shrimps] activities. The results of the preliminary biological screening displayed that any of the *Ajuga* species had a remarkable activity and the chemical screening of the prepared extracts showed that *A. salicifolia* was rich in compounds compared with the other two species. A computer based reference investigation revealed a limited number of reports on this plant. Hence, *A. salicifolia* was chosen for further phytochemical and biological investigation.

Air-dried and powdered aerial parts (1 kg) were extracted successively with PE, DCM, EtOAc, MeOH, and MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1). After a TLC control, the DCM and EtOAc extracts were combined. At the beginning, the isolation was guided by the results of KB (HeLa) cell inhibition assay. Due to small quantities and difficulties in isolation, the phytochemical investigations went on with random isolation. The fractionation of the DCM/EtOAc and MeOH extracts by means of various chromatographic methods (VLC, CC, MPLC and HPLC) led to the isolation of 18 compounds, 10 of which were new to the literature. Structures of the isolates were established by extensive use of 1D- and 2D-NMR (COSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC) experiments. Additional information was gathered by mass spectrometry (FAB-, ESI- and HR-MALDI-MS), UV spectroscopy, physical ( $[\alpha]_D$ ) and chemical (acid hydrolysis) methods. The relative stereochemistry was determined from the results of 2D ROESY or NOESY experiments.

The majority (nine) of the isolated compounds were new coprostigmastan-type sterols, showing a high structure variability. Ajugasaliciosides A (**10**) and B (**11**) were novel sterol glycosides, displaying three epoxidations on the coprostigmast-7-en skeleton, which enabled the presence of three additional (five, six and eight membered) ring systems. The other new sterols, ajugasalicigenin (**17**) and ajugasaliciosides C-H (**12-16** and **18**) exhibited only one epoxidation between C-22 and C-25 on the coprostigmastan

skeleton. Ajugasaliciosides E (15) and G (16) consisted of an acetyl function on the tetrahydrofuran ring. Ajugasalicigenin (17) and ajugasalicioside F (18) exhibited free hydroxy methylene groups at position 21 and 27. Ajugasaliciosides C (12), D (13) and H (14) were the coprostigmast-7-en di-, tri- and tetraglycosides, respectively.

The other secondary metabolites isolated from the aerial parts of *A. salicifolia* were ionone [3 $\beta$ -hydroxy-7,8-dihydro-4-oxo- $\beta$ -ionol-9-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (1) and corchoionoside C (2)], iridoid [8-*O*-acetylmioporoside (3), ajugol (4), harpagide (5) and 8-*O*-acetylharpagide (6)] and phenylethanoid [lavandulifolioside (9), leonosides A (8) and B (7)] glycosides. Compounds 1 and 2 were the first ionone glycosides occurring in *Ajuga* species, compound (1) was new to the literature. Except the ubiquitous compounds harpagide (5) and 8-*O*-acetylharpagide (6), the isolated iridoid and phenylethanoids were new for *A. salicifolia*. Furthermore, this is the first report of 8-*O*-acetylmioporoside from the family, Lamiaceae.

All the isolated compounds were tested in in-house assays. None of the compounds displayed antimicrobial activity. However, some of the sterol derivatives showed significant cytotoxic activity. The cytotoxicity of ajugasalicigenin (17) against KB cells was remarkable, with an  $IC_{50}$  value of 1.9  $\mu$ M. Its corresponding 3-*O*- $\beta$ -glucoside (18) exhibited weaker activity against KB cells. Ajugasaliciosides A-D (10-13) showed significant to moderate activity against Jurkat T cells ( $IC_{50}$  values  $\leq$  10  $\mu$ M). Ajugasalicioside C (12) was the most active against Jurkat T cells ( $IC_{50}$  = 3  $\mu$ M), followed by the novel compound ajugasalicioside A (10,  $IC_{50}$  = 6  $\mu$ M). An additional glucose unit led to a weaker cytotoxicity against Jurkat T cells, as observed for ajugasalicioside B (11,  $IC_{50}$  = 10  $\mu$ M) and D (13,  $IC_{50}$  = 8  $\mu$ M).

Ajugasalicioside A induced cell-cell contacts in Jurkat T cell populations similar to phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Cell-cell interactions have been observed in cellular cytotoxicity and cell differentiation. To follow up this effect, the possible modulation of ajugasalicioside A on PMA-induced mRNA profiles in Jurkat T cells with reverse transcription real time PCR (RT-rt-PCR) was measured. No effect was observed on mRNA levels of PMA-induced chemokine (IL-2, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) or house-keeping genes, but a significant up-regulation of cyclin D1 mRNA expression was observed. This was a possible indication that ajugasalicioside A may stimulate differentiation processes. Since it has been shown that cyclin D1 can be co-activated by

the transcription factor NF- $\kappa$ B, the mRNA levels of NF- $\kappa$ B subunits p65 and I- $\kappa$ B $\alpha$  after 20 h incubation were also investigated. Ajugasalicioside A weakly inhibited PMA-induced p65 mRNA levels in a concentration-dependent manner but did not influence I- $\kappa$ B $\alpha$ . These results suggested a NF- $\kappa$ B independent induction of cyclin D1 by ajugasalicioside A and they might provide a basis for a potential therapeutic use of the novel structural features of this compound.

This is the first detailed phytochemical study on *Ajuga salicifolia* which shows that this plant accumulates a high variety of coprostigmastan type sterols as well as ionone, iridoid and phenylethanoid glycosides. With this study, coprostigmastan type sterols are reported for the first time from the plant kingdom. The cytotoxicity of the coprostigmastan-type sterols needs to be further investigated to focus on the biochemical nature of the cytotoxicity of these compounds and to determine their activity in *in-vivo* models.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Gattung *Ajuga* L., allgemein bekannt als Günsel, umfasst in der Flora der Türkei elf Spezies, wovon einige aufgrund ihrer harntreibenden Wirkung, bei der Wundheilung, gegen hohes Fieber und bei Durchfall angewendet werden. Die drei *Ajuga*-Spezies *A. reptans*, *A. orientalis* und *A. salicifolia* wurden in der Türkei gesammelt und die Rohextrakte biologischen Tests unterzogen, namentlich Tests bezüglich ihrer antimikrobiellen (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) und zytotoxischen Wirkung (gegen KB (HeLa) Zellen und brine shrimps). Im ersten biologischen Screening wies keine der untersuchten *Ajuga*-Spezies eine ausserordentliche Aktivität auf. Das chemische Screening der Extrakte zeigte, dass *A. salicifolia* im Vergleich zu den anderen zwei Spezies eine grössere Anzahl von Substanzen enthielt. Eine computergestützte Literatursuche ergab nur wenige Zitate bezüglich dieser Pflanze. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde *A. salicifolia* für die weiteren phytochemischen und biologischen Untersuchungen ausgewählt.

Die luftgetrockneten und pulverisierten oberirdischen Teile (1kg) wurden nacheinander mit PE, DCM, MeOH, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1) extrahiert. Nach einer Kontrolle mittels DC wurden die DCM und EtOAc Extrakte vereinigt. Zu Beginn wurde eine bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung durchgeführt. Aufgrund kleiner Mengen und Schwierigkeiten in der Isolierung wurde im weiteren Verlauf der phytochemischen Untersuchungen auf die Ueberprüfung durch biologische Tests verzichtet. Die Auftrennung der DCM/EtOAc und MeOH Extrakte führte unter Verwendung verschiedener chromatographischer Methoden (VLC, CC, MPLC, HPLC) zur Isolierung von 18 Substanzen, wovon 10 bislang nicht in der Literatur beschrieben sind. Die Strukturaufklärung der isolierten Substanzen erfolgte durch den extensiven Einsatz von 1D- und 2D-NMR (COSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC) Experimenten. Zusätzliche Informationen wurden mittels Massenspektrometrie (FAB-, ESI- und HR-MALDI-MS), UV-Spektroskopie sowie physikalischer ( $[\alpha]_D$ ) und chemischer (Säure-Hydrolyse) Methoden erhalten. Die relative Stereochemie wurde durch 2D ROESY oder NOESY Experimente bestimmt.

Bei den meisten der isolierten Substanzen (neun) handelt es sich um Sterole vom Koprostigmanan-Typ, die eine grosse strukturelle Variabilität aufweisen. Ajugasalici-

oside A (10) und B (11) stellen neuartige Sterolglykoside dar, die drei Epoxidierungen im Koprostigmast-7-en Grundgerüst aufweisen, welche die Entstehung der drei zusätzlichen Ringsysteme (mit fünf, sechs und acht Atomen) ermöglichen. Die anderen neuen Sterole Ajugasalicigenin (17) und Ajugasaliciosid C-H (12-16 und 18) zeigen nur eine Epoxidierung zwischen C-22 und C-25 im Koprostigmastan-Grundgerüst. Ajugasaliciosid E (15) und G (16) weisen eine Acetylfunktion am Tetrahydrofuranring auf. Ajugasalicigenin (17) und Ajugasaliciosid F (18) tragen freie Hydroxymethylen-Gruppen an C-21 und C-27. Die Ajugasalicoside C (12), D (13) und H (14) erwiesen sich als Koprostigmast-7-en-di-, tri- und tetraglykoside.

Als weitere Sekundärmetabolite wurden Glykoside von Iononen [ $3\beta$ -Hydroxy-7,8-dihydro-4-oxo- $\beta$ -ionol-9-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (1) und Corchoionosid C (2)], Iridoiden [8-*O*-Acetylmioporosid (3), Ajugol (4), Harpagid (5) und 8-*O*-Acetylharpagid (6)] und Phenylethanoiden [Lavandulifoliosid (9), Leonoside A (8) and B (7)] isoliert. Die Substanzen 1 und 2 sind die ersten Iononglykoside, die in der Gattung *Ajuga* gefunden wurden. Substanz 1 wurde dabei zum ersten Mal in der Literatur beschrieben. Abgesehen von den ubiquitären Substanzen Harpagid (5) and 8-*O*-Acetylharpagid (6), wurden die isolierten Iridoide und Phenylethanoide zum ersten Mal in *A. salicifolia* gefunden. Ausserdem wird hier zum ersten Mal über das vorkommen von 8-*O*-Acetylmioporosid in der Familie der Lamiaceae berichtet.

Alle isolierten Substanzen wurden den verfügbaren biologischen Testsystemen unterzogen. Keine der Substanzen wies eine antimikrobielle Aktivität auf. Einige Sterolderivate zeigten eine signifikante zytotoxische Aktivität. Die Zytotoxizität von Ajugasalicigenin (17) gegen KB Zellen war beachtenswert ( $IC_{50} = 1.9 \mu\text{M}$ ). Die entsprechenden 3-*O*- $\beta$ -Glucoside wiesen eine schwächere Aktivität gegen KB Zellen auf. Die Ajugasalicioside A-D (10-13) zeigten eine signifikante bis mittelmässige Aktivität gegen Jurkat T Zellen ( $IC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ ). Ajugasaliciosid C (12) war die aktivste Substanz gegen Jurkat T Zellen ( $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$ ), gefolgt von der neuen Substanz Ajugasaliciosid A (10,  $IC_{50} = 6 \mu\text{M}$ ). Eine zusätzliche Glukose-Einheit ist verbunden mit einer schwächeren Zytotoxizität gegen Jurkat T Zellen, wie es bei den Ajugasaliciosiden B (11,  $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) and D (13,  $IC_{50} = 8 \mu\text{M}$ ) beobachtet wurde.

Ajugasaliciosid A verursachte Zell-Zell-Kontakte in Jurkat T Zell Populationen ähnlich wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Zell-Zell-Interaktionen werden

gewöhnlich bei zellulärer Zytotoxizität und Zelldifferenzierung beobachtet. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde die mögliche modulierende Aktivität von Ajugasaliciosid A, über PMA-induzierte mRNA-Profile in Jurkat T Zellen mittels 'reverse transcription real time PCR (RT-rt-PCR) gemessen. Die mRNA-Niveaus der PMA-induzierten Chemokine (IL-2, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) oder der 'house-keeping genes' wurden nicht beeinflusst, aber es gab eine signifikante Hochregulation der Cyclin D1 mRNA-Expression. Das könnte ein mögliches Zeichen dafür sein, dass Ajugasaliciosid A Differenzierungsprozesse beeinflusst. Es wurde in der Literatur gezeigt, dass Cyclin D1 durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B co-aktiviert werden kann, deshalb wurden die mRNA-Niveaus der NF- $\kappa$ B Untereinheiten p65 und I- $\kappa$ B $\alpha$  nach 24 h Inkubation untersucht. Ajugasaliciosid A zeigte konzentrationsabhängig eine schwache Inhibition des PMA-induzierten p65 mRNA-Niveaus, aber es beeinflusste I- $\kappa$ B $\alpha$  nicht. Die Resultate implizieren eine Induktion von Cyclin D1 durch Ajugasaliciosid A unabhängig von NF- $\kappa$ B. Diese Resultate könnten eine Basis für eine mögliche therapeutische Anwendung der neuartigen Struktureigenschaften von Ajugasaliciosid A bilden.

Dies ist die erste phytochemische und biologische Untersuchung über *A. salicifolia*. Es zeigte sich, dass diese Pflanze eine grosse Fülle verschiedenartigster Sterole vom Koprostigman-Typ sowie Ionon-, Iridoid- und Phenylethanoidglykoside enthält. Das Vorkommen von Sterole vom Koprostigman-Typ im Pflanzenreich wurde erstmalig beschrieben. Die Zytotoxizität der Sterole vom Koprostigman-Typ sollte noch weiter untersucht werden, um die biochemische Natur der Zytotoxizität der Substanzen aufzuklären und ihre Aktivität in *in-vivo*-Modellen zu bestimmen.