

Isolierung von Artemisinin aus Einjährigem Beifuß (*Artemisia annua L.*)

Hinweis: Diese Arbeitsvorschrift wurde 2015 im Rahmen der Bachelorarbeit von Katrin Eckhardt erarbeitet. Interessenten, die diesen wegen seiner hohen Bioaktivität gefragten Naturstoff isolieren sollen, können die Datei dieser Bachelorarbeit auf Anfrage erhalten, um sich darin noch weiter zu informieren (z.B. historische Hintergründe, Bioaktivität, Spektren).

Hintergrund (Auszüge aus der Bachelorarbeit)

Zu Artemisinin (vgl. dazu auch z.B. wikipedia)

Malaria ist eine Krankheit, die den Menschen schon seit Beginn seiner Entwicklung begleitet. Die ersten Epidemien traten wahrscheinlich schon in der Jungsteinzeit auf, als die Menschen begannen sesshaft zu werden.^[1]

Malaria wird von einem einzelligen Parasiten verursacht, für den der Mensch nur einen Zwischenwirt im Lebenszyklus darstellt. Der eigentliche Endwirt, in dem auch die sexuelle Fortpflanzung stattfindet, sind weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles*, die in tropischen und subtropischen sowie gemäßigten Gebieten vorkommen.^[2]

Jährlich sterben weltweit laut Angaben der WHO über eine halbe Million Menschen an Malaria, knapp 200 Millionen infizieren sich mit der Krankheit.^[3]

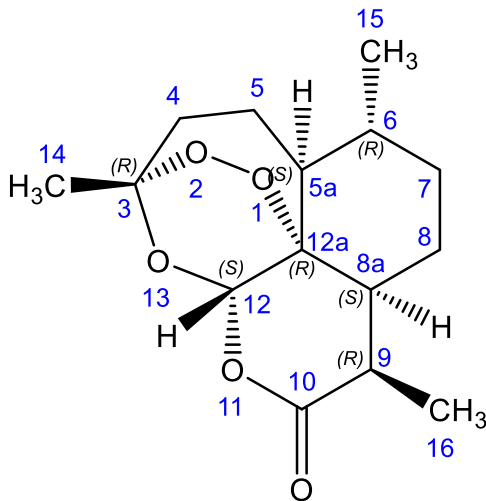
Erste Dokumentationen von Malariaerkrankungen finden sich schon in Schriften aus dem Alten Ägypten und China. Hierbei konnte das Genom von *Plasmodium* auch in den Knochen von Mumien nachgewiesen werden.^{[7]: [8]} In einer medizinischen Schrift aus China ist auch das erste Mal ein Medikament gegen Malaria beschrieben. In dem Buch Zhouhou Beiji Fang (Handbuch für Verschreibungen bei Notfällen) aus der Jin-Dynastie (265–420 n. Chr.) wird empfohlen, eine Handvoll Blätter des Einjährigen Beifußes (*qinghao*) in 2 L Wasser zu geben, auszupressen und den Saft zu trinken.^[9]

In Europa war Malaria zwar schon zu antiken Zeiten im Mittelmeerraum^[10] und im Mittelalter sogar bis nach Norddeutschland und England verbreitet,^[11] ein wirkungsvolles Medikament wurde allerdings erst im 17. Jahrhundert von Jesuiten in Peru entdeckt: die Rinde des gelben Chinarindenbaums (*Cinchona officinalis*) mit dem darin enthaltenen Wirkstoff Chinin. Chinin blieb lange Zeit das einzig verfügbare Mittel gegen Malaria, obwohl eine Behandlung mit gravierenden Nebenwirkungen verbunden ist. Erst in den 30er Jahren wurde an der Entwicklung eines besseren Wirkstoffs geforscht, was 1934 zur Entwicklung von Chloroquin führte. Der umfangreiche Einsatz zur Therapie von Malaria führte allerdings schon in den 50er Jahren zu Resistenzbildungen in *Plasmodium*, so dass wieder neue Wirkstoffe entwickelt werden mussten.^[12] Mittlerweile gibt eine ganze Reihe unterschiedlicher Substanzen, die an verschiedenen Stellen in den Lebenszyklus des Parasiten eingreifen.

Diese Situation veranschaulicht die potentiell große Bedeutung der synthetischen Wirkstoffe als einziges Mittel gegen Malaria und damit auch den Druck neue Wirkstoffe zu entwickeln, gegen die keine Resistenzen in *Plasmodium* vorliegen.

Ein großer Erfolg war somit 1971 die Wiederentdeckung von Artemisinin, des neusten und zugleich ältesten Wirkstoffs gegen Malaria. Im Rahmen eines Projekts der Volksrepublik China zur Untersuchung von Rezepturen aus der traditionellen chinesischen Medizin, isolierte die chinesische Pharmakologin Youyou Tu Artemisinin (*qinghaosu*) aus dem Einjährigen Beifuß. Die Struktur und Stereochemie konnten 1975 in Zusammenarbeit mit einer Gruppe von Wissenschaftlern des Instituts für Biophysik an der chinesischen Akademie der Wissenschaften durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Sie wurde 1977 in einem Paper in chinesischer Sprache veröffentlicht und im selben Jahr in die Datenbank des Chemical

Abstracts Service aufgenommen. Der weltweite Einsatz als Mittel gegen Malaria verzögerte sich allerdings, da die chinesische Regierung die Forschungsergebnisse sowie das Pflanzenmaterial zurückhielt und weltweite Veröffentlichungen verhinderte.^[9] 1981 fand das 4. Treffen der Scientific Working Group on the Chemotherapy of Malaria der WHO in Beijing statt. Dort präsentierte Y. Tu ihre Forschungsergebnisse der Weltöffentlichkeit, die 1982 anonym und erstmals auf Englisch frei zugänglich veröffentlicht wurden.^[18] Erst seit Beginn des 21. Jahrhunderts wird Artemisinin umfassend zur Bekämpfung von Malaria eingesetzt und von der WHO als Mittel der Wahl zur Behandlung von akuten Fällen empfohlen.^[19]



Struktur von Artemisinin mit Angabe der absoluten Konfiguration und Nummerierung

Summenformel: $C_{15}H_{22}O_5$

CAS-Nummer: 63968-64-9

Name (Scifinder ®): (3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,12*S*,12*aR*)-Octahydro- 3,6,9-trimethyl-3,12-epoxy-12*H*-pyrano[4,3-*j*]- 1,2-benzodioxepin-10(3*H*)-on

Molekulargewicht: 282,33 g mol⁻¹

Aussehen: farblose, feine nadelförmige Kristalle

Schmelzpunkt: 156-157°C^[50]

Löslichkeit: schlecht in Wasser, gut in Ethanol, Chloroform und Toluol^[51]

Spezifische Drehung: +61° bis +68° in Chloroform (Temperatur 17°C-25°C)^{[52]-[54]}, 75° bis 78° in Ethanol (Temperatur 20°C)^[55], 87,9° in Dioxan^[56]

Andere Bezeichnungen: Arteannuin, Qinghaosu, Artemef

Ausgangsmaterial

Blätter des Einjährigen Beifußes (*Artemisia annua* L.), getrocknet, zerkleinert (ca. 2 mm) von: anamed international

Schafweide 77

71364 Winnenden

500g kosteten 125 Euro im Januar 2015

Weitere Informationen zu dieser Pflanze finden Sie z.B. in wikipedia.

Arbeitsvorschrift

100 g der Blätter des Einjährigen Beifußes werden in einem 2 L-Kolben mit 700 mL 96%igem Ethanol versetzt. Sie werden für 15 min mithilfe eines Wasserbads unter Rückfluss gekocht. Der grasgrüne Extrakt wird über einen Büchnertrichter abgesaugt. Der Filterkuchen der Blätter wird mit 100 mL Ethanol gewaschen und dann ein weiteres Mal mit 700 mL Ethanol unter Rückfluss im Wasserbad 15 min gekocht. Nach Absaugen des zweiten grasgrünen Extrakts wird der Filterkuchen der Blätter wieder mit 100 mL Ethanol gewaschen.

Die vereinigten grasgrünen Rohextrakte werden in einem 2-Liter-Rundkolben im Wasserbad auf 50 °C erwärmt und zum Binden der Blattfarbstoffe mit 40 g pulverförmiger Aktivkohle versetzt. Nach Zugabe der Aktivkohle wird die schwarze Suspension 10 min mit einem großen Hantelrührer gerührt und dabei auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

Eine kleine Probe zeigt, ob eine vollständige Entfärbung des Extrakts stattgefunden hat. Hierfür wird mithilfe einer Pipette 1 mL des mit Aktivkohle versetzten Extrakts entnommen und durch einen kleinen Papierfilter filtriert. Ist die Lösung fast farblos (nicht mehr grün!) und klar, kann mit der Filtration des gesamten Extrakts begonnen werden. Ist dies nicht der Fall, wird weitere Minuten mit der Aktivkohle gerührt und die Probe wiederholt. Zur Filtration des gesamten Extrakts wird über einen Büchnertrichter abgesaugt (dazu mehrere Filterpapiere übereinander legen) und der Filterkuchen mit etwas Ethanol gewaschen. Das immer noch schwarze Filtrat wird ein weiteres Mal über einen Büchnertrichter abgesaugt und der Filterkuchen wieder mit etwas Ethanol gewaschen. Zur Entfernung der letzten feinen Aktivkohlepartikel im nun nur noch gräulichen Filtrat wird eine Glasfritte mindestens 1 cm hoch mit Kieselgur (= Celite) befüllt und das Filtrat darüber abgesaugt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Filtrat nicht direkt auf die Fritte gelangt, sondern vorher durch die Celite-Schicht läuft, die die Aktivkohle zurückhält.

Das erhaltene gelbliche, klare Filtrat wird am Rotationsverdampfer bei ca. 120 mbar auf ein Volumen von 200 mL eingeengt. Anschließend werden 220 mL Eiswasser zum eingeengten Extrakt gegeben. Es bilden sich ein weißer Niederschlag und eine weiße Trübung in der tiefgelben Lösung. Achtung! Diese Fällungen beinhalten auch das Artemisinin.

Man gibt das gesamte Gemisch in einen Scheidetrichter, fügt dann 150 ml dest. Diethylether dazu und extrahiert damit die organische Trübung in den Ether. Zur Trennung der Phasen ist außerdem eine Zugabe von mindestens 4 g NaCl notwendig um den Dichteunterschied zu vergrößern. Nach einigen Minuten kann die untere wässrige Phase von der nun gelblich gefärbten oberen Etherphase abgetrennt werden. Die wässrige Phase wird drei weitere Male mit 150 mL dest. Diethylether extrahiert und ist anschließend vollständig entfärbt. Auch das farblose Artemisinin ist nun im Ether gelöst.

Die vereinigten tiefgelben Etherextrakte werden in einem Rundkolben über 20 g wasserfreiem MgSO_4 für 10 min getrocknet (ab und zu Umschwenken). Das MgSO_4 wird dann gravitativ über einen Papierfilter abfiltriert. Der Ether wird unter nur leicht vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt (dabei VORSICHT!) und das zurückbleibende braune Öl 3 h an der Ölpumpe (0,1 mbar) getrocknet. Ein Trocknen über längere Zeit ist aber zu vermeiden, damit Artemisinin nicht selbst sublimiert.

Es werden 2,82 g braunes Öl als Rückstand erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 2,82% an noch unreinem Roh-Artemisinin bezogen auf die Masse der eingesetzten Beifußblätter.

Eine Auftrennung der Bestandteile des braunen Rückstands wird mithilfe einer Säulenchromatografie erreicht:

Säulendimension: $\varnothing = 35$ mm, Füllhöhe: 40 cm

Stationäre Phase: Kieselgel, Merck KGaA Darmstadt, 0,035-0,070 mm, 60 Å

Mobile Phase: Cyclohexan (destilliert)/ Ethylacetat (destilliert) 3:1, (v/v)

Fraktionsvolumen: 20 mL

Der braune Rückstand wird in 20 mL des Eluenten durch 10 minütiges Schwenken im Ultraschallbad gelöst. Dabei bildet sich ein brauner Niederschlag, der gravitativ über einen Papierfilter abfiltriert wird. Nach Auftragen der Probe auf die Säule und einem Durchfluss von 20 mL Eluent wird mit dem Sammeln von Fraktionen begonnen. Es werden 60 Fraktionen mit einem Volumen von 20 mL abgenommen. Mithilfe einer Dünnschichtchromatografie auf Kieselgelplatten können die Artemisinin enthaltenden Fraktionen erkannt werden. Artemisinin eluiert ungefähr zwischen Volumina von 500 mL und 1000 mL an Eluent. Für die Durchführung der Dünnschichtchromatografie wird der Eluent der Säulenchromatografie verwendet. Da Artemisinin keine UV-Aktivität aufweist, muss es auf der DC-Platte mit einer anderen Methode sichtbar gemacht werden. Durch Tauchen der Platte in das Seebach'sche Molybdätophosphorsäurereagenz und anschließendes Föhnen mit einem Heißluftgebläse (ca. 220 °C), können Artemisinin und andere in den Fraktionen enthaltene Substanzen auf der Platte als dunkelblaue Flecken sichtbar gemacht werden. Der R_f -Wert des Artemisinins beträgt bei diesem Eluenten 0,26.

Artemisinin wird durch diese erste Säulenchromatografie noch nicht sauber von anderen im Rohextrakt befindlichen Bestandteilen abgetrennt. Durch Vereinigen der Artemisinin enthaltenden Fraktionen und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer werden aber 497 mg Rohprodukt als farbloser Feststoff erhalten.

Eine Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch eine weitere Säulenchromatografie.

Säulendimension: $\varnothing = 25$ mm; Füllhöhe = 35 cm

Stationäre Phase: Kieselgel, Merck KGaA Darmstadt, 0,035-0,07 mm, 60 Å

Mobile Phase: Chloroform (destilliert)

Fraktionsvolumen: 10 mL

Das Rohprodukt wird in 2,5 mL Chloroform gelöst und auf die Säule aufgetragen. Dabei lösen sich wenige, sehr kleine, weiße Partikel nicht auf. Nach Elution von 3,5 mL wird mit dem Sammeln von Fraktionen begonnen. Reines Artemisinin eluiert ungefähr ab einem Volumen von 300 mL. In den ersten Fraktionen ist es rein zu finden, in späteren Fraktionen mit polareren Stoffen zusammen und bei einem Volumen von ungefähr 500 mL ist die Elution beendet. Mithilfe einer Dünnschichtchromatografie (Eluent: dest. Chloroform) können die Artemisinin enthaltenden Fraktionen charakterisiert und zusammengefasst werden. Der R_f -Wert von Artemisinin unterliegt bei Verwendung dieses Eluenten starken Schwankungen, die von der aufgetragenen Menge abhängen ($R_f = 0,22 - 0,31$). Für größere aufgetragene Mengen steigt der R_f -Wert und Artemisinin ist als ausgeprägter Schweif und nicht mehr als runder Fleck auf der DC-Platte zu sehen.

Auf diese Weise können 64,2 mg DC-reines Artemisinin und 143,2 mg noch verunreinigtes Artemisinin gewonnen werden.

Zur weiteren Aufreinigung wird eine Umkristallisation aus destilliertem *n*-Hexan durchgeführt. Die 143,2 mg noch verunreinigtes Artemisinin werden unter Erhitzen im Wasserbad in 20 mL *n*-Hexan gelöst und in einem verschlossenen Gefäß abkühlen gelassen. Schon nach wenigen Minuten bilden sich farblose, nadelförmige Kristalle. Nachdem die Lösung Raumtemperatur erreicht hat, wird sie über Nacht in den Kühlschrank (+4 °C) gestellt. Anschließend werden die feinen, farblosen Nadeln über einen kleinen Hirschtrichter mit passend zugeschnittenem Filterpapier abgesaugt, mit wenigen Tropfen kaltem *n*-Hexan gewaschen und an der Luft trocknen gelassen. Die Mutterlauge wird für eine weitere Reinigung aufgehoben. Aus dieser Umkristallisation werden weitere 64 mg reines Artemisinin erhalten.

Eine Schmelzpunktbestimmung ergibt für das reine Artemisinin ein Schmelzintervall von 153 °C – 155 °C, was mit Angaben in der Literatur übereinstimmt.^[57]

Um weiteres in der Mutterlauge verbliebenes Artemisinin zu gewinnen, kann das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mithilfe einer dritten Säulenchromatografie gereinigt werden. Es werden zunächst 91,3 mg an Rückstand aus der Mutterlauge erhalten, indem das Lösungsmittel komplett abrotiert wird.

Säulendimension: Ø = 25 mm; Füllhöhe: 20 cm

Stationäre Phase: Kieselgel, Merck KGaA Darmstadt, 0,035-0,07 mm, 60 Å

Mobile Phase: Chloroform (destilliert)

Fraktionsvolumen: 7 mL

Dieser Rückstand der Mutterlauge wird in 2,5 mL destilliertem Chloroform gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach Elution von 3,5 mL wird mit dem Sammeln der Fraktionen begonnen. Reines Artemisinin eluiert ab einem Volumen von ungefähr 20 mL, ab 27 mL ist es mit polareren Substanzen verunreinigt. Über diese Säulenchromatografie können 2,7 mg reines Artemisinin und 44,4 mg verunreinigtes Artemisinin gewonnen werden.

Der Rückstand der verunreinigten Fraktionen kann mithilfe einer zweiten Umkristallisation weiter gereinigt werden. Dafür wird er durch Erhitzen im Wasserbad in 5 mL destilliertem *n*-Hexan gelöst und die Lösung anschließend in einem geschlossenen Gefäß auskühlen gelassen. Auch hier fallen nach wenigen Minuten feine, farblose Nadeln aus. Nachdem sie auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird die Lösung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die farblosen Nadeln werden über einen kleinen Hirschtrichter mit passendem Filterpapier abgesaugt. Auf diese Weise werden weitere 18 mg reines Artemisinin gewonnen.

Gesamtausbeute Artemisinin: 148,9 mg (0,15% bezogen auf die eingesetzte Masse an Beifußblättern)

Die Inspiration für diese Vorschrift ging von [57] aus. Das Verfahren wurde überprüft und deutlich vereinfacht, wodurch sich die Ausbeute merklich erhöhte. In [57] ist eine Ausbeute von nur 0,044% bezogen auf die eingesetzte Masse an Beifußblättern angegeben.

Literatur (Nr. nach der Liste der Bachelorarbeit):

- [1] D. Joy, X. Feng, J. Mu, T. Furuya, K. Chotivanich, A. Krettli, M. Ho, A. Wang, N. White, E. Suh, P. Beerli, X.-z. Su, Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*, *Science*, **2003**, *300*, 318–321.
- [2] A. Kiszewski, A. Mellinger, A Global Index Representing The Stability Of Malaria Transmission, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **2004**, *70*, 486–498.
- [3] www.worldmaliaday.org/about/key-facts, zuletzt geprüft am 01.06.2015.
- [7] A. Nerlich, B. Schraut, S. Dittrich, T. Jelinek, A. Zink, *Plasmodium falciparum* in ancient Egypt, *Emerging infectious diseases*, **2008**, *14*, 1317–1319.
- [8] A. Lalremruata, M. Ball, R. Bianucci, B. Welte, A. Nerlich, Molecular identification of *falciparum* malaria and human tuberculosis co-infections in mummies from the Fayum depression (Lower Egypt), *PloS one*, **2013**, *8*, e60307.
- [9] Y. Tu, The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine, *Nat Med*, **2011**, *17*, 1217–1220.
- [10] R. Sallares, A. Bouwman, C. Anderung, The Spread of Malaria to Southern Europe in Antiquity: New Approaches to Old Problems, *Med. Hist.*, **2004**, *48*, 311–328.
- [11] G. Wefer, W. Berger, K. Behre, E. Jansen, Climatic Development and History of the North Atlantic Realm: Hanse Conference Report, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2002**.
- [18] Anonym, Chemical studies on qinghaosu (artemisinin). China Cooperative Research Group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials, *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan / sponsored by All-China Association of Traditional Chinese Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine*, **1982**, *2*, 3–8.
- [19] www.whqlibdoc.who.int/hq/2005/a87017_eng.pdf, zuletzt geprüft am 08.06.2015.
- [50] A. Lapkin, P. Plucinski, M. Cutler, Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin, *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 1653–1664.
- [57] R. Roth, N. Acton, The isolation of sesquiterpenes from *Artemisia annua*, *J. Chem. Educ.*, **1989**, *66*, 349.

Aufgaben:

Isolieren und reinigen Sie Artemisinin wie oben angegeben durch Extraktion und zwei Säulenchromatografien. Bestimmen Sie den Schmelzpunkt. Fertigen Sie bei Ihrer Arbeit DCs an, um die Reinheit zu kontrollieren. Lassen Sie von Ihrer isolierten Probe ein ¹H-NMR-Spektrum in CDCl₃ aufnehmen und vergleichen Sie es mit dem nachfolgend abgebildeten Spektrum aus der Bachelorarbeit von Katrin Eckhardt (2015). Außer diesem Spektrum finden Sie nachfolgend als Zitat daraus noch eine Zusammenstellung weiterer NMR-Spektren, die zeigt, wie man mit ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie die Struktur des Moleküls komplett erschließen kann.

Fertigen Sie ein Protokoll an, das sich an den Vorgaben für Syntheseprotokolle und der Vorschrift hier orientiert. Wichtig sind exakte Angaben, die ein Nacharbeiten ermöglichen würden. Geben Sie ggf. eine selbstkritische und kritische Bewertung des Ablaufs der Dinge. Bauen Sie Ihr NMR-Spektrum in Ihr Protokoll ein und bewerten Sie danach die Reinheit Ihrer Substanz. Vollziehen Sie die Zuordnung der Signale anhand des Literaturspektrums nach.

NMR-Spektroskopie

¹H-NMR Spektren

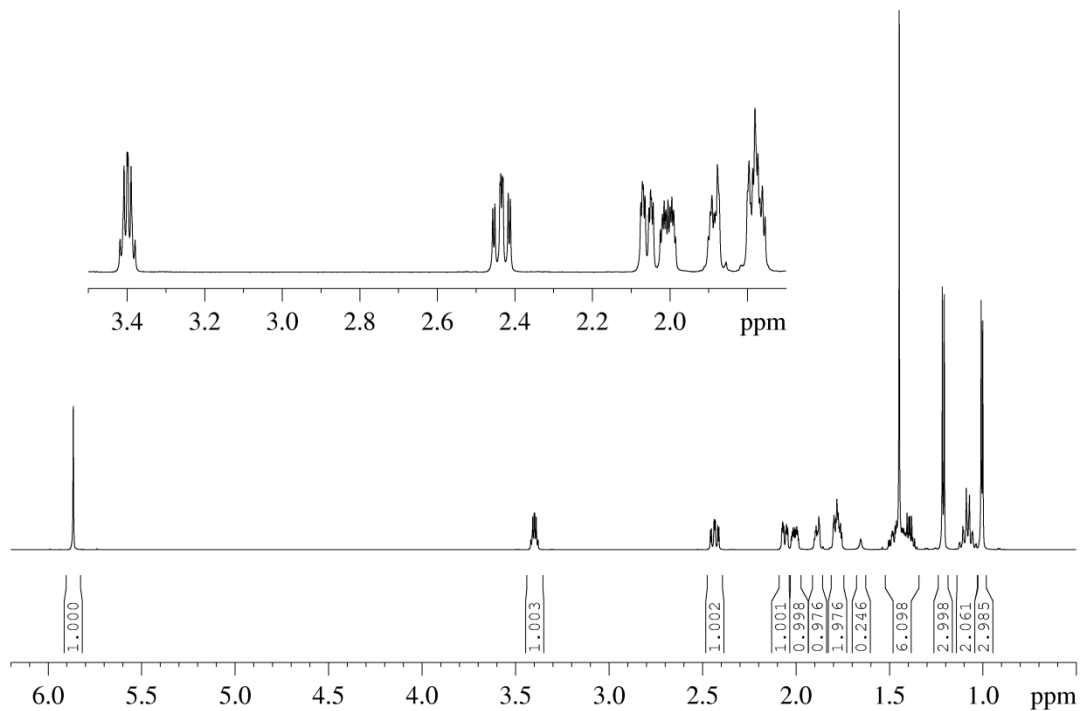


Abbildung 1: ¹H-NMR-Spektrum von Artemisinin in CDCl₃

Anhand der chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten können einige Signale direkt aus dem ¹H-NMR-Spektrum Protonen im Artemisininmolekül zugeordnet werden. Das Singulett bei 5,88 ppm mit Integral 1 lässt sich dem Proton an C-12 zuordnen, da bei der Position des Kohlenstoffs zwischen den zwei Sauerstoffatomen die größte Tieffeldverschiebung zu erwarten ist. Das Quintett bei 3,42 ppm (³J = 8,0 Hz) kann dem Proton an C-9 zugeordnet werden, da dieses als einziges in der Struktur eine Quintettaufspaltung erfährt. Im Bereich zwischen 1,0 und 1,5 ppm können ein Singulett und zwei Dubletts beobachtet werden, die aufgrund ihrer Multiplizitäten nur zu den Methylgruppen gehören können. Das Singulett bei 1,46 ppm gehört dabei zu H-14, die beiden Dubletts können anhand ihrer chemischen Verschiebung H-16 bei 1,23 ppm und H-15 bei 1,02 ppm zugeordnet werden. Das Singulett bei 1,56 ppm mit sehr geringer Intensität stammt von Wasser, was auf eine unvollständige Trocknung der Kristalle an der Ölpumpe zurückzuführen sein könnte. Eine weitere Zuordnung von Protonen und Signalen ist aus dem eindimensionalen ¹H-NMR-Spektrum nicht möglich.

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum

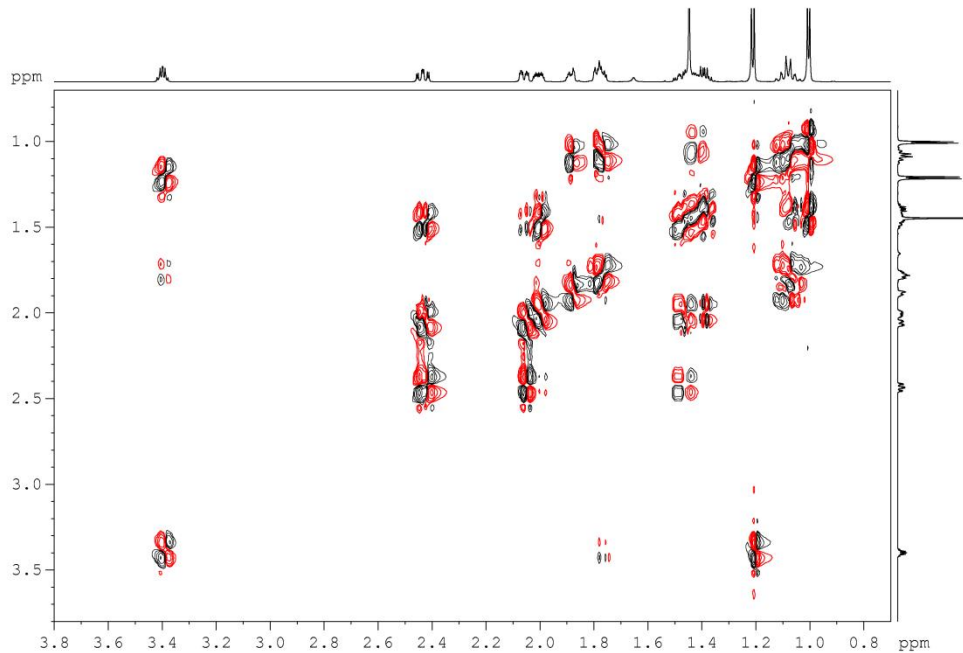


Abbildung 2: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Artemisinin.

Anhand des COSY-Spektrums können Kopplungen der Protonen über Bindungen untersucht werden. Die Kopplungen in den 2D-Spektren sind hier allerdings schwer einzelnen Protonen zuzuordnen, weil unter einem Multiplett oft mehrere an unterschiedliche Kohlenstoffatome gebundene Protonen liegen, sodass die Kreuzsignale überlagern.

Die Protonen der C-15 Methylgruppe können über eine Bindung mit dem Proton an C-6 koppeln, sodass einem der drei Protonen des Multipletts bei 1,43-1,46 ppm die Position an C-6 zugeordnet werden kann.

Im Spektrum ist eine Kopplung zwischen dem Proton an C-9 und dem Multiplett bei 1,76-1,81 ppm zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass das Multiplett unter anderem von H-8a verursacht wird.

Die Protonen der C-16 Methylgruppe koppeln mit dem Proton an C-9 im COSY-Spektrum, was die durch das eindimensionale Spektrum getroffene Zuordnung für das Proton an C-9 bestätigt.

Auch die Zuordnung des Singuletts bei 1,46 ppm zu den Protonen der C-14 Methylgruppe kann durch das COSY-Spektrum bekräftigt werden, da dieses Signal keine Kopplung zu anderen Protonen zeigt.

Eine Kopplung zwischen dem Signal des Protons von C-6 mit dem Signal bei 1,06-1,13 ppm kann unter der Voraussetzung, dass nicht das andere unter dem Multiplett bei 1,43-1,46 ppm liegende Proton koppelt, angenommen werden. Weiterhin sind starke Kopplungen der Signale 1,06-1,13 ppm, 1,76-1,81 ppm und 1,88-1,92 ppm untereinander zu sehen sowie eine Kopplung zwischen 1,76-1,81 ppm und dem Proton an C-9. Aufgrund der starken Kopplungen untereinander und zu den Protonen an C-9 und C-6 kann eine Bindung der Protonen an C-7 und C-8

vermutet werden. Eine genaue Aussage kann aus den ^1H -NMR-Spektren allerdings nicht gemacht werden.

Im COSY-Spektrum ist eine starke Kopplung der Protonen an 2,00-2,06 ppm und 2,45 ppm untereinander zu sehen und eine schwächere Kopplung der beiden zum Proton bei 2,09-2,10. Außerdem koppeln diese drei Signale stark mit dem Proton bei 1,46-1,50 ppm. Anhand dieser Kopplungen kann eine Bindung von 2,00-2,06 ppm und 2,45 ppm an C-4 und von 2,09-2,10 ppm und 1,46-1,50 ppm an C-5 vermutet werden. Eine Bestätigung könnte das aufgenommene HSQC-Spektrum geben.

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum

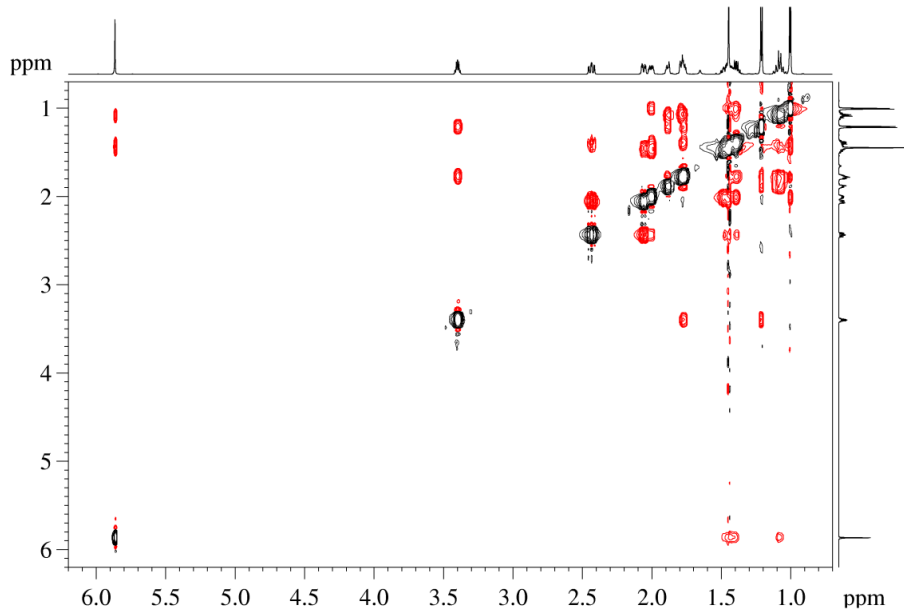


Abbildung 3: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum von Artemisinin.

Anhand des NOESY-Spektrums können Kopplungen von Protonen über den Raum nachvollzogen werden.

Protonen der C-15- und der C-16-Methylgruppe koppeln mit Protonen der Multipletts bei 1,76-1,81 ppm und 1,88-1,92 ppm. Dies bekräftigt die durch das COSY-Spektrum aufgestellte Vermutung der Bindung dieser Protonen an C-7 und C-8. Allerdings koppeln nur die Protonen des Signals bei 1,76-1,81 ppm mit Protonen des Signals bei 1,43-1,46 ppm, was unter anderem dem Proton an C-6 zugeordnet wurde. Zumindest ein Proton des Signals bei 1,76-1,81 ppm ist wahrscheinlich an C-7 gebunden.

Eine starke Kopplung kann auch zwischen Protonen des Multipletts bei 1,06-1,13 ppm und 1,76-1,81 ppm bzw. 1,88-1,92 ppm beobachtet werden. Trotz der zu 1,76-1,81 ppm und 1,88-1,92 ppm verschiedenen chemischen Verschiebung von 1,06-1,13 ppm sind diese Protonen wahrscheinlich auch an C-7 und C-8 gebunden.

Die beiden Multipletts bei 2,00-2,06 ppm und 2,09-2,10 ppm sowie das Signal bei 2,45 ppm koppeln untereinander stark und mit den Protonen an der C-14- und der C-15-Methylgruppe. Eine Kopplung mit den Protonen der C-16-Methylgruppe kann nicht beobachtet werden. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich um Protonen an C-4 und C-5 handelt.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Kopplungen im COSY- und NOESY-Spektrum von Artemisinin.

δ/ppm	Integral	Multiplizität/ J in Hz	Kopplungen im		Interpretation
			COSY	NOESY	
1,02	3H	d ($^3J_{\text{H,H}} = 8,0$)	1,43-1,46	1,43-1,46; 1,46; 1,46-1,50; 1,76-1,81; 2,00-2,06; 2,09-2,10; 5,88	C-15- H ₃
1,06-1,13	2H	m	1,02; 1,43-1,46; 1,76-1,81; 1,88-1,92;	1,43-1,46; 1,76-1,81; 1,88-1,92	C-7/8- H
1,23	3H	d ($^3J_{\text{H,H}} = 8,0$)	1,43-1,46; 3,42	1,76-1,81; 1,88-1,92; 3,42	C-16- H ₃
1,43-1,46	2H	m	1,02; 2,00-2,06	1,46; 1,76-1,81; 2,00-2,06; 2,09-2,10; 2,45; 5,88	C-6- H
1,46	3H	s	nicht auswertbar	1,02; 1,76-1,81; 2,00-2,06; 2,09-2,10; 2,45; 5,88	C-14- H ₃

δ/ppm	Integral	Multiplizität/ J in Hz	Kopplungen im		Interpretation
			COSY	NOESY	
1,46-1,50	1H	m	2,00-2,06; 2,45	2,00-2,06; 2,09-2,10; 2,45	
1,76-1,81	2H	m	1,06-1,13; 3,42	1,06-1,13; 1,23; 1,43-1,46; 1,88-1,92; 3,42	C-7/8-H
1,88-1,92	1H	m	1,06-1,13	1,06-1,13; 1,23; 1,76-1,81	C-7/8-H
2,00-2,06	1H	m	1,46; 2,45	1,10; 1,43-1,46; 1,46; 2,45;	C-4/5-H
2,09-2,10	1H	m	1,46	1,43-1,46; 1,46; 2,45	C-4/5-H
2,45	1H	td ($^3J_{\text{H,H}} = 14,5;$ 3,9)	1,46; 2,00-2,06; 2,09-2,10	1,46; 2,00-2,06; 2,09-2,10	C-4/5-H
3,42	1H	qi ($^3J_{\text{H,H}} = 8,0$)	1,23; 1,76-1,81	1,23; 1,76-1,81	C-9-H
5,88	1H	s	-	1,06-1,13; 1,46	C-12-H

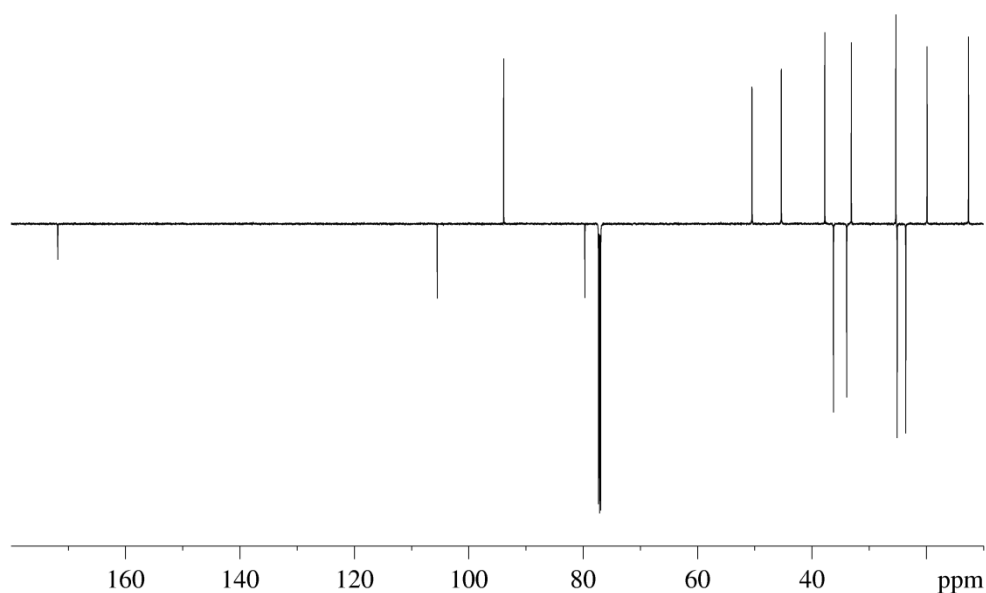
^{13}C -NMR Spektren**APT Spektrum**

Abbildung 4: ^{13}C -APT-Spektrum von Artemisinin.

Einige Signale im ^{13}C -APT-Spektrum können anhand ihrer chemischen Verschiebung direkt Kohlenstoffatomen zugeordnet werden. Das Signal bei 172,09 ppm gehört zum Carbonylkohlenstoff C-10, woraus geschlossen werden kann, dass es sich bei den nach unten zeigenden Signalen um Kohlenstoffe mit zwei oder gar keinen gebundenen Protonen handelt. Bei den Peaks zwischen 79 und 120 ppm handelt es sich um Kohlenstoffatome, die auch an Sauerstoffatome gebunden sind, die Peaks bis 60 ppm gehören zum aliphatischen Teil des Moleküls. Aufgrund der Differenzen in der chemischen Verschiebung kann vermutet werden, dass es sich bei dem Signal bei 105,41 ppm um C-3 handelt, das an zwei Sauerstoffatome gebunden ist und bei 79,52 ppm um 12a, welches nur ein Sauerstoffatom in direkter Nachbarschaft hat. Bei den Signalen mit kleinster chemischer Verschiebung handelt es sich wahrscheinlich um die Kohlenstoffatome der Methylgruppen. Eine weitere definitive Zuordnung kann anhand dieses Spektrums noch nicht getroffen werden, dazu werden zweidimensionale ^1H , ^{13}C -Spektren benötigt.

HSQC-Spektrum

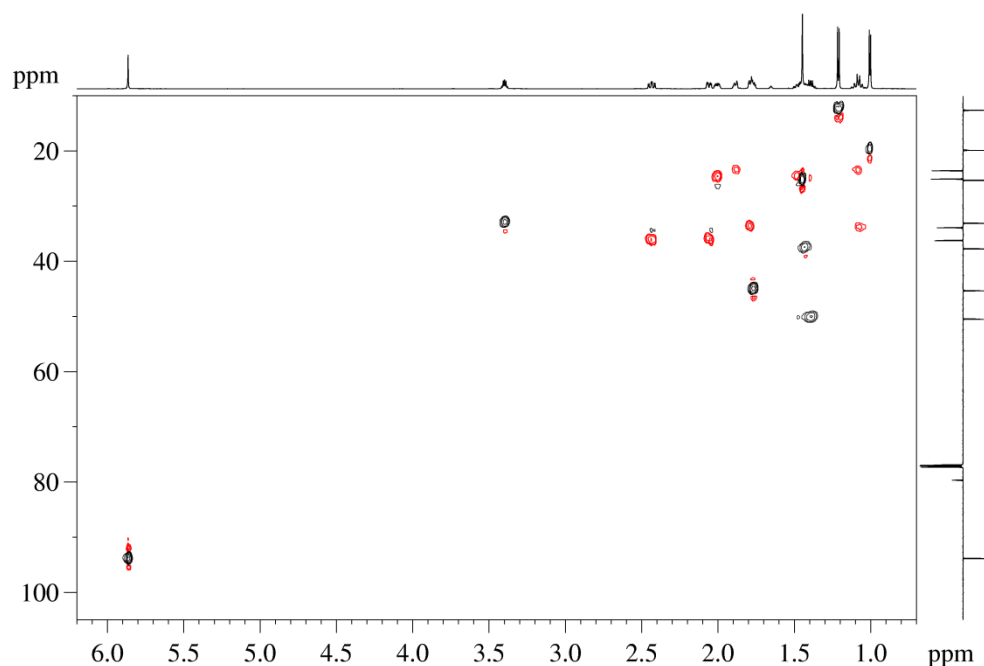


Abbildung 5: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von Artemisinin.

Das HSQC-Spektrum ermöglicht es zu ermitteln, welches Proton an welchen Kohlenstoff gebunden ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt. Für einige Signale des APT-Spektrums war keine eindeutige Zuordnung zu einem Proton möglich, da Multipletts im ^1H -Spektrum teilweise von Protonen, die an unterschiedliche Kohlenstoffatome gebunden sind, verursacht werden. Außerdem liegen einige Signale im APT-Spektrum so nah beieinander, dass keine eindeutige Auswertung der Kreuzsignale möglich ist. Im HSQC-Spektrum ist zu sehen, dass Protonen in einem Multipllett teilweise an unterschiedlichen Kohlenstoffatomen gebunden sind. Das Spektrum zeigt, dass die Protonen bei 2,09-2,10 ppm und 2,45 ppm an das gleiche Kohlenstoffatom bei 35,92 ppm gebunden sind. Ebenso sind 1,46-1,50 und 2,00-2,06 ppm an 24,87 ppm gebunden. Anhand der im COSY-Spektrum beobachteten Kopplungen und der höheren chemischen Verschiebung von 35,92 ppm gegenüber 24,87 ppm, können die Protonen bei 2,09-2,10 und 2,45 ppm C-4 und die Protonen bei 1,46-1,50 und 2,00-2,06 C-5 zugeordnet werden.

Auch die Protonen bei 1,06-1,13 und 1,88-1,92 ppm sind an den gleichen Kohlenstoff gebunden. Dies trifft ebenso auf die Protonen bei 1,06-1,13 und 1,76-1,81 ppm zu. Anhand der im COSY-Spektrum beobachteten Kopplung zwischen 1,76-1,81 ppm und dem Proton an C-6 können die beiden Protonen bei 1,06-1,13 und 1,76-1,81 ppm C-7 zugeordnet werden.

Das zweite unter dem Multipllett bei 1,76-1,81 ppm liegende Proton bindet an den Kohlenstoff bei 44,99 ppm. Aufgrund der im COSY-Spektrum beobachteten Kopplung zu H-9 kann vermutet werden, dass es sich um H-8a und C-8a handelt.

Die beiden unter dem Multipllett bei 1,43-1,46 ppm liegenden Protonen sind an zwei unterschiedliche Kohlenstoffatome bei 37,55 und 50,08 ppm gebunden. Aufgrund der im COSY-Spektrum beobachteten Kopplungen zu H-15 und H-5 war die Vermutung aufgestellt worden, dass es sich um H-5a und H-6 handelt. Aufgrund der höheren chemischen

Verschiebungen von 50,08 ppm könnte 50,08 ppm C-5a und 37,55 ppm C-6 zugeordnet werden.

Bei den Signalen bei 79,52, 105,41 und 172,09 ppm handelt es sich um quartäre Kohlenstoffatome, was die aus dem APT-Spektrum getroffenen Zuordnungen von C-12a, C-10 und C-3 bekräftigt.

HMBC-Spektrum

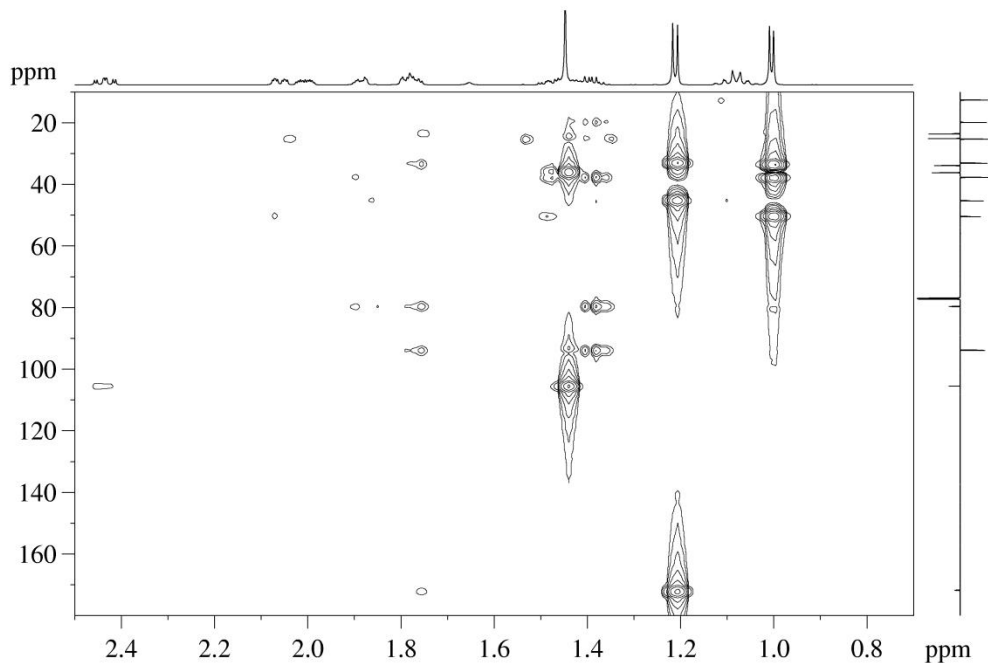


Abbildung 6: Ausschnitt des HMBC-Spektrums von Artemisinin zwischen 0,7 und 2,5 ppm.

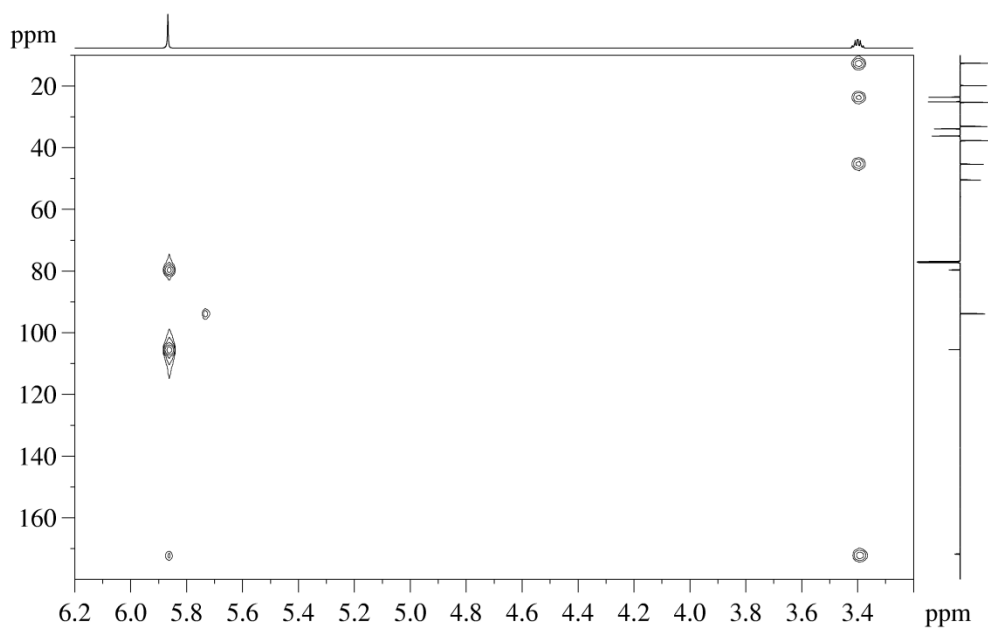


Abbildung 7: Ausschnitt des HMBC-Spektrums von Artemisinin zwischen 3,2 und 6,2 ppm.

Aufgrund der ähnlichen chemischen Verschiebung der Signale von C-5 und C-14 und den daraus resultierenden Überlagerungen der Kreuzsignale, sind diese schwer auswertbar.

Die Zuordnung von Signalen zu den Methylgruppen C-15 und C-16 kann durch das Spektrum bestätigt werden. Für C-16 ist eine Kopplung mit dem Proton H-9 zu beobachten, für C-15 eine Kopplung mit H-5a und H-6. Zusätzlich ist auch eine Kopplung von C-9 mit den H-16 zu beobachten.

Auch die mithilfe des HSQC-Spektrums getroffene Zuordnung von Signalen zu C-4 und C-5 wird durch eine Kopplung von C-4 mit den Protonen an C-5 und von C-5 mit den Protonen an C-4 bestätigt. C-4 koppelt außerdem noch mit H-14.

Ebenso wird die Zuordnung von Signalen zu C-7 und C-8 bestätigt. Für C-7 ist eine Kopplung mit H-15 zu beobachten und C-8 koppelt mit H-9 und H-8a. Auch die Kopplungen des Signals für C-8a bekräftigen dessen Zuordnung. Es koppelt mit H-9 und H-16.

Die Kopplungen der Protonen H-6 und H-5a sind schwer zu unterscheiden, da sie beide unter dem Multipllett bei 1,43-1,46 ppm liegen. Die Kopplungen der Kohlenstoffatome sind aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Verschiebung besser zu erkennen. C-5a koppelt mit H-4 und H-5 sowie mit H-15. Für C-6 sind Kopplungen zu H-8 und H-15 zu beobachten.

Das quartäre Kohlenstoffatom C-12a koppelt aufgrund seiner zentralen Lage im Molekül mit vielen Protonen. Es treten Kopplungen zu H-5a und H-6, H-8a und H-8 sowie zu H-12 auf.

Für C-12 können Kopplungen zu H-5a und H-6 sowie zu H-8a beobachtet werden.

Das Spektrum bestätigt auch die Zuordnung des quartären Kohlenstoff C-3 zum Signal bei 105,41 ppm, da zwischen diesem Signal und dem Proton an C-12 eine Kopplung zu beobachten ist. Es koppelt außerdem mit H-14 und H-4.

Auch die Position von C-10 wird durch Kopplungen zu H-16, H-9, H-8a und H-12 bestätigt.

Tabelle 2: Korrelationen im HSQC- und HMBC-Spektrum.

δ in ppm	Art	Korrelationen im		Interpretation
		HSQC	HMBC	
012,59	CH ₃	1,23	² J: 3,42	C-16
019,86	CH ₃	1,02	² J: 1,43-1,46	C-15
023,42	CH ₂	1,06-1,13; 1,88-1,92	³ J: 3,42; ² J: 1,76-1,81	C-8
024,87	CH ₂	1,46-1,50; 2,00-2,06	nicht auswertbar	C-5
25,22	CH ₃	1,46	nicht auswertbar	C-14
032,91	CH	3,42	² J: 1,23	C-9
033,62	CH ₂	1,06-1,13; 1,76-1,81	³ J: 1,02	C-7
035,92	CH ₂	2,09-2,10; 2,45	³ J: 1,46; ² J: 1,46-1,50	C-4
037,55	CH	1,43-1,46	³ J: 1,88-1,92; ² J: 1,02	C-6
044,99	CH	1,76-1,81	³ J: 1,23; ² J: 3,42	C-8a
050,08	CH	1,43-1,46	³ J: 2,09-2,10; ² J: 1,46-1,50; ³ J: 1,02	C5a
079,52	C _q	-	^{2/3} J: 1,43-1,46; ² J: 1,76-1,81; ³ J: 1,88-1,92 ² J: 5,88	C-12a
093,73	CH	5,88	^{3/4} J: 1,43-1,46; ³ J: 1,76-1,81	C-12
105,41	C _q	-	³ J: 5,88; ² J: 1,46; ² J: 2,45	C-3
172,09	C _q	-	³ J: 1,23; ² J: 3,42; ⁴ J: 1,76-1,81; ³ J: 5,88	C-10

Tabelle 3 fasst die anhand der Spektren getroffenen Zuordnungen von Signalen zu Atomen im Artemisinin zusammen.

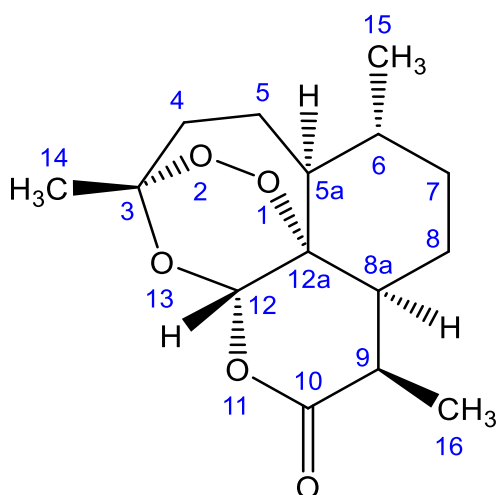


Tabelle 3: Anhand der aufgenommenen Spektren getroffene Zuordnungen im Molekül.

$\delta^{13}\text{C}$ -NMR-Signale in ppm	Kohlenstofftyp	Zuordnung	$\delta^1\text{H}$ -NMR-Signale in ppm, J in Hz	Belege (HMBC Korrelationen von Protonen und C-Atomen)	Belege (NOE Korrelation von Protonen und Protonen)	^{13}C -NMR Signale Vorhersage mittels Chem/BioDraw
12,59	CH ₃	C-16	1,23 $J_{9,16} = 8,0$	H-9	H-8; H-8a; H-9	13,1
19,86	CH ₃	C-15	1,02 $J_{6,15} = 8,0$	H-5a; H-6	H-4; H-5; H-5a; H-6; H-7 H-14; H-12	19,1
23,42	CH ₂	C-8	1,06-1,13; 1,88-1,92	H-9; H-8a	H-5a; H-6; H-7; H-8a; H-16	22,1
24,87	CH ₂	C-5	1,46-1,50; 2,00-2,06	nicht auswertbar	H-4; H-5a; H-6; H-14; H-15	24,5
25,22	CH ₃	C-14	1,43-1,46	nicht auswertbar	H-4; H-5; H-7; H-8a; H-12; H-15;	25,7
32,91	CH	C-9	3,42 $J_{9,16} = 8,0$	H-16	H-8a; H-16	33,5

δ ^{13}C -NMR-Signale in ppm	Kohlenstoff-typ	Zuordnung	δ ^1H -NMR-Signale in ppm, J in Hz	Belege (HMBC Korrelationen von Protonen zu C-Atomen)	Belege (NOE Korrelation von Protonen Protonen)	^{13}C -NMR Signale Vorhersage mittels Chem/BioDraw
33,62	CH ₂	C-7	1,06-1,13; 1,76-1,81	H-15	H-5a; H-6; H-8; H-8a; H-9; H-16	34,2
35,92	CH ₂	C-4	2,09-2,10; 2,45 $J_{4,5} = 14,5$ $J_{4,14} = 3,9$	H-14, H-5	H-5a; H-6; H-14; H-15	36,1
37,55	CH	C-6	1,43-1,46	H-15; H-8	H-4; H-5; H-7; H-12; H-14	36,7
44,99	CH	C-8a	1,76-1,81	H-16; H-9	H-6; H-7; H-8; H-9; H-16	41,6
50,08	CH	C5a	1,43-1,46	H-4; H-5; H-15	H-4; H-5; H-7; H-12; H-14	51,8
79,52	C _q	C-12a	-	H-5a; H-6; H-8; H-8a; H-12	-	87,4
93,73	CH	C-12	5,88	H-5a; H-6; H-8a	H-7; H-8; H-14	97,3
105,41	C _q	C-3	-	H-12; H-14; H-9	-	120,1
172,09	C _q	C-10	-	H-8a; H-9; H-16; H-12	-	172,4

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter H. Seeberger, Direktor des Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Potsdam, danken wir sehr für seine Impulse zur Artemisinin-Isolierung am Rande eines Kolloquiums im Dezember 2015 in Leipzig.

Aus: Praktikum Organische Chemie-Fortgeschrittene / 2015 im AK Prof. Dr. A. Giannis
 Institut für Organische Chemie der Universität Leipzig
 Leitung: Prof. Dr. Dieter Sicker