



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

Chemodiversitätsanalysen an ausgewählten Vertretern
der Gattung *Palicourea* (Rubiaceae)

verfasst von / submitted by

Katharina Fried

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 190 423 445

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Lehramtsstudium
UF Chemie
UF Biologie und Umweltkunde

Betreut von / Supervisor:

A.o. Univ. Prof. Dr. Karin Valant-Vetschera

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Karin Vetschera für die kompetente Betreuung, ihr hilfreiches Feedback und die viele Zeit, die sie sich für mich genommen hat, herzlich bedanken. Außerdem bin ich Mag. Dr. Johann Schinnerl für seine Unterstützung sowohl bei der praktischen Labortätigkeit, als auch beim Verfassen dieser Arbeit, überaus dankbar. Ich danke vor allem auch Mag. Andreas Berger PhD dafür, dass er mein Interesse an der Phytochemie geweckt hat und mir stets geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter danken, die mir mit ihrer finanziellen Unterstützung mein Studium ermöglicht hat. Meinen KollegInnen und FreundInnen danke ich für die mentale Unterstützung und dass sie mir immer den Rücken stärkten.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Katharina Fried,

geboren am 18.11.1987 in Wien

E-Mail: kathifried@hotmail.com

Ausbildung

1994-1998 Volksschule, 1230 Wien

1998-2006 Bundesgymnasium Anton Baumgartnerstraße 123, 1230 Wien (GRG 23)

2006 Matura mit gutem Erfolg

10/2006 Beginn des Chemie- und Biologiestudiums (Lehramt)

02/2011 Abschluss des ersten Abschnittes

Berufserfahrung

2006 - 2013 Nachhilfe in Mathematik, Englisch, Deutsch, Biologie, Physik und Chemie
an diversen Lerninstituten (IFL, Lernquadrat, Schülerhilfe)

2015 Buch, Regie und Postproduktion der Fernsehdokumentation „Schwarze Löcher – Rätsel des Weltalls“

seit 2013 Lehrtätigkeit in den Fächern Chemie und Biologie am GRG 23

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Morphologie und Systematik der Gattungen <i>Palicourea</i> und <i>Psychotria</i>	3
II.1. Ordnung Gentianales	3
II.2. Familie Rubiaceae.....	3
II.3. Unterfamilie Rubioideae	4
II.4. „ <i>Psychotria</i> Alliance“	5
II.5. Gattungen <i>Palicourea</i> und <i>Psychotria</i>	5
III. Sekundäre Metabolite.....	9
III.1. Terpenoide	10
III.1.1. Megastigmane.....	11
III.2. Tryptamin-Iridoid-Alkaloide	13
III.3. Polyphenole	16
III.3.1. Cumarine	18
III.3.2. Flavonoide	19
III.3.3. Lignane und Neolignane.....	20
III.4. Fettsäuremetaboliten.....	21
IV. Experimentelles	23
IV.1. Material	23
IV.2. Methoden.....	24
IV.3. Durchführung	27
V. Ergebnisse und Diskussion.....	30
VII. Anhang.....	36
VII.1. Zusammenfassung.....	36
VII.2. Abstract	37
VII.3. Literaturverzeichnis	38

I. Einleitung

Die Chemodiversitätsforschung beschäftigt sich mit der Analyse der Akkumulation, Verbreitung und biosynthetischen Herkunft pflanzlicher sekundärer Metabolite, von denen über 200.000 bisher bekannt sind. Deren Akkumulation und Verbreitung lässt sich durch chromatographische Methoden analysieren, und die so erhaltenen chemischen Profile bilden die Grundlage für weitere vergleichende Analysen. Unbekannte Stoffe müssen isoliert und ihre Strukturen identifiziert werden. Neben ubiquitärer Verbreitung kommt es häufig zu spezifischer Akkumulation biosynthetisch definierter Stoffklassen und deren Derivaten in taxonomisch definierten Pflanzengruppen (Arten, Gattungen, Familien). In diesem Falle erweisen sich die Sekundärmetabolite als chemische Merkmale (Wink, 2008).

Im Rahmen des Forschungsschwerpunkts „*Psychotria* alliance“ sollten kritische Sippen auf ihre Inhaltsstoffe untersucht werden. Diese Gruppe zählt zur Familie der Rubiaceae (Rötegewächse, Kaffeegewächse). Die Nutzung der Rötegewächse ist vielfältig und reicht von der Farbstoffgewinnung bis hin zur traditionell medizinischen Anwendung. *Psychotria* ist die artenreichste Gattung dieser Verwandtschaft und neben ihrer phytochemischen Diversität vor allem für ihre ethnobotanische Bedeutung bekannt (Berger, 2012). So wird die traditionelle Droge „Ayahuasca“ aus den Blättern von *Psychotria viridis* Ruiz & Pav. und der Rinde von *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.V.Morton gewonnen und aufgrund der halluzinogenen Wirkung im Rahmen ritueller Zeremonien verwendet (Rivier & Lindgren, 1972).

Die systematische Einordnung und Klassifizierung bestimmter Arten innerhalb dieser Pflanzenfamilie ist aufgrund der Merkmalsarmut schwierig. Das ursprünglich auf morphologischen Merkmalen basierende System wurde nach neueren phylogenetischen und molekularen Untersuchungen mehrfach revidiert. Viele Arten der Untergattung *Heteropsychotria* Steyermark. wurden daher ausgegliedert und nicht mehr der Gattung *Psychotria* L., sondern beispielsweise der Gattung *Palicourea* zugeordnet (Borhidi, 2011, 2017; Razafimandimbison et al., 2014). Auch zwei der in dieser Arbeit untersuchten Arten wurden ursprünglich als Vertreter der Gattung *Psychotria* L. subgen. *Heteropsychotria* klassifiziert: *Palicourea torresiana* (Standl.) Borhidi mit dem Basionym *Psychotria torresiana* Standl. und *Palicourea goldmanii* (Standl.) Borhidi, ursprünglich *Psychotria goldmanii* Standl.. Alle in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenarten gehören nun der Gattung *Palicourea* an, die zur Unterfamilie der

Rubioideae zählt. Über die Metabolite der mittelamerikanischen Art *Palicourea adusta* (Standl.) ist bislang wenig bekannt und die Literatur dazu ist teilweise widersprüchlich. Daher sollte diese Art hinsichtlich ihrer Blattinhaltstoffe genauer untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Stoffprofile von nahestehenden bzw. kritischen Arten der Gattungen *Palicourea* und *Psychotria* auf Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten hin analysiert und diskutiert werden.

II. Morphologie und Systematik der Gattungen *Palicourea* und *Psychotria*

II.1. Ordnung Gentianales (Juss. ex Bercht. & J.Presl)

Neben den Apocynaceae, Gelsemiaceae, Gentianaceae und Loganiaceae, gehört die Familie der Rubiaceae innerhalb der Klasse Magnoliopsida zur morphologisch vielfältigen Ordnung Gentianales, deren Vertreter meist holzige Pflanzen der Tropen und Subtropen sind (Angiosperm Phylogeny Group IV, 2016; Backlund et al., 2000; Yang et al., 2016) (Abb. 1). Zu den morphologischen Gemeinsamkeiten innerhalb dieser Ordnung zählen unter anderem die meist ganzrandigen, gegenständigen Laubblätter und die radiärsymmetrischen Blüten mit verwachsenen Kronblättern. Stipeln können vorhanden sein (Backlund et al., 2000).



Abb. 1: Einordnung der Gentianales innerhalb der Magnoliopsida.

II.2. Familie Rubiaceae

Die Familie der Kaffeegewächse oder Rötegewächse (Rubiaceae Juss.) ist weltweit verbreitet, mit den meisten Taxa in den Tropen und Subtropen. Sie ist mit über 600 Gattungen und mehr als 13.000 Arten die größte Familie innerhalb der Gentianales (Bremer & Eriksson, 2009). Die taxonomische Klassifizierung dieser monophyletischen Gruppe (Robbrecht & Manen, 2006; Razafimandimbison, 2014) ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Für eine genauere phylogenetische Zuordnung können unter Anderem sekundäre Metabolite als chemotaxonomische Marker verwendet werden. So liefert neben der Morphologie die Auswertung chemischer Profile wichtige Informationen über Klassifizierung, Phylogenie und Evolution innerhalb der Rubiaceae.

Dabei spielen viele verschiedene Substanzen wie Iridoide, Indolalkaloide, Anthrachinone, Terpenoide, Flavonoide und andere Phenolderivate eine wichtige Rolle.

Morphologische Gemeinsamkeiten von Vertretern der Rubiaceae sind unter anderem die gegenständigen oder kreuzgegenständigen, meist ganzrandigen Laubblätter, Interpetiolarstipeln (miteinander verwachsene Nebenblätter), zweigeschlechtliche, radiärsymmetrische, 4 – 5-zählige Blüten und ein meist unsterändiger, zweikarpelliger Fruchtknoten (Delprete, 2004). Die Wuchsformen innerhalb der Rubiaceae variieren je nach Klimazone von krautigen Pflanzen, über Sträucher, kleine Bäume, bis hin zu hohen Bäumen oder Lianen. Einige Vertreter der Rubiaceae spielen in wirtschaftlicher Hinsicht eine wichtige Rolle. Der bekannteste Vertreter ist *Coffea arabica* L., der zur Kaffeeproduktion angebaut wird. Vor allem in Rubiaceae vorkommende Alkaloide und andere sekundäre Metaboliten sind oft von pharmakologischem Interesse, dienen als Naturmedizin, Halluzinogene oder Gifte. Ein bekannter heimischer Vertreter der Rubiaceae ist der cumarinhaltige Waldmeister (*Galium odoratum*). Sein typisches Aroma entsteht bei der Trocknung durch enzymatische Abspaltung des in der Pflanze an Zucker gebundenen Cumarins. Die Stoffklasse der Cumarine wird im Kapitel III. Sekundäre Metabolite näher behandelt.

II.3. Unterfamilie Rubioideae

Die Unterfamilie Rubioideae ist die evolutionär älteste Unterfamilie innerhalb der Rubiaceae (Martins et al., 2015). Neben dieser zählen die Unterfamilien Cinchonoidea, die kleinste Unterfamilie, und die Ixoroideae zu den Rubiaceae, nachdem sich die Antirheoideae in molekularbiologischen Untersuchungen als polyphyletisch herausstellten und daher ausgegliedert wurden (Robbrecht & Manen, 2006).

Die morphologischen Merkmale der Rubioideae sind ein krautiger oder strauchiger Habitus (seltener Bäume), die Einlagerung von Calciumoxalatkristallen in Raphiden (Kristallidioblasten) in den Blättern, ganzrandige, zweigeteilte Stipeln und radiärsymmetrische Blüten. Robbrecht & Manen (2006) erwähnen weiters zumeist valvate Knospendeckung, heterostyle Blüten, hohe Ploidiegrade (Kiehn, 1995, 2010) und Aluminium-Akkumulation (Jansen et al., 2000a, 2002b).

II.4. „*Psychotria* Alliance“

Die Unterfamilie der Rubioideae wird in zwei Gruppen unterteilt: Die Supertriben Rubiidinae, die hauptsächlich krautig sind, und die vorwiegend holzigen Psychotriidinae. Die Psychotriidinae werden wiederum auch als „Psychotrieae alliance“ bezeichnet und sind eine monophyletische Gruppe, die aus acht Triben besteht: Cratispermeae, Gaertnereae, Mitchelleae, Morindeae, Palicoureeae, Prismatomerideae, Psychotrieae und Schradereae (Razafimandimbison et al., 2008; Robbrecht & Manen, 2006; Bremer & Eriksson, 2009). Die Triben Palicoureeae und Psychotrieae, die zusammen als „*Psychotria* Alliance“ bezeichnet werden, machen ca. 24% der Rubiaceae aus und sind ein wichtiger Teil tropischer Ökosysteme. Ihre Taxonomie ist komplex und die morphologische Abgrenzung teilweise schwer. In vergleichend-phytochemischen Analysen als Grundlage der Chemotaxonomie dienen Alkaloide und andere sekundäre Metabolite als taxonomische Marker. Dadurch und auf Basis von DNA-Analysen wurden einige Arten taxonomisch neu eingeordnet (Borhidi, 2017; Razafimandimbison et al., 2014).

II.5. Gattungen *Palicourea* und *Psychotria*

Die Gattungen *Palicourea* und *Psychotria* gehören zur Unterfamilie der Rubioideae innerhalb der Familie der Rubiaceae. Sie sind sich in vielen morphologischen Merkmalen ähnlich, weshalb die systematische Zuordnung mancher Arten komplex ist. So werden beispielsweise viele Arten der Untergattung *Heteropsychotria* aus der Gattung *Psychotria* jetzt der Gattung *Palicourea* zugeordnet. So auch zwei der in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen (*P. torresiana* und *P. goldmanii*). Die Pflanzen beider Gattungen sind verholzend und wachsen als Bäume oder Sträucher. Infloreszenzen sind solitär, terminal bzw. pseudoaxillär (Abb. 2). Die Früchte sind fleischige Beeren mit zwei Pyrenen („Steinen“) und werden durch Vögel verbreitet. Domatien sind bei manchen Arten vorhanden. Folgende Tabelle soll einen vereinfachten Überblick über die Unterschiede der beiden Gattungen bieten, wobei Ausnahmen hier nicht berücksichtigt werden (Tabelle 1).



Abb. 2: Infloreszenz von *Palicourea adusta* (Foto: A. Berger, 2015; Costa Rica, Barva)

Tabelle 1: Unterschiede zwischen den Gattungen *Palicourea* und *Psychotria* (Rubiaceae) im Überblick.

	<i>Palicourea</i> spp.	<i>Psychotria</i> spp.
Systematik	Tribus: <i>Palicoureeae</i> Gattung: <i>Palicourea</i> ca. 800 Arten	Tribus: <i>Psychotrieeae</i> Gattung: <i>Psychotria</i> ca. 1600 Arten
Verbreitung	neotropisch	pantropisch
Blüten	meist lebhaft gefärbt, lange Kronröhre, an der Basis oft sackartig erweitert	meist klein, weiß (oder gelb), kurze Kronröhre
Infloreszenz- und Blütenstiele	oft lang gestielt	ehrer kurz, manchmal sitzend oder kopfig
Bestäubung	Insekten oder Kolibris	Insekten
Fruchtfarbe	blau bis schwarz	Meist rot, selten weiß
Pyrenen	mit vorgeformten Keimöffnungen („preformed germination slits“, PGS) ohne rotes Samenschalenpigment	umgekehrte Pyreneigenschaften
Stipeln	bleiben	fallen ab
Phytochemie	Alkaloide	Gerbstoffe

Mit etwa 1.600 Arten ist die Gattung *Psychotria* eine der artenreichsten Gattungen der Angiospermen. Viele Arten dieser Gattung finden Verwendung in der traditionellen Medizin, zum Beispiel bei gastrointestinalen oder bronchialen Erkrankungen. Einige Arten sind auch von spiritueller und kultureller Bedeutung, so beispielsweise das traditionell im Amazonasbecken und angrenzenden Teilen Südamerikas als halluzinogene Droge verwendeten Ayahuasca. Hergestellt wird es aus den Blättern von

Psychotria viridis, die *N,N*-Dimethyltryptamin (DMT) enthalten, und der Rinde von *Banisteripsis caapi*. Diese enthält die β -Carbolin-Indolalkaloide Harmin, Harmalin und Tetrahydroharmin, die den enzymatischen oxidativen Abbau des halluzinogenen Wirkstoffes DMT inhibieren (Rivier & Lindgren, 1972). Von pharmakologischem Interesse sind einige Arten vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen. Es wurden bereits viele aktive Inhaltsstoffe isoliert, vor allem Alkaloide, Indole, Flavonoide, Cumarine, Terpenoide, Tannine u.v.m. Sie wirken teilweise cytotoxisch, analgetisch, antiviral, antifungal, oder modulieren die Aktivität des zentralen Nervensystems (Calixto et al., 2016).

III. Sekundäre Metabolite

Derzeit sind ca. 200.000 unterschiedliche Derivate des sogenannten Sekundärstoffwechsels in Pflanzen bekannt. Die große strukturelle Diversität ist jedoch nur auf wenige Grundbausteine, die aus dem Primärstoffwechsel stammen, zurückzuführen. Im Gegensatz zu den Produkten des Primärstoffwechsels sind Sekundärmetabolite entbehrlich für Wachstum und Entwicklung, jedoch unentbehrlich für den Fortbestand im Ökosystem (z.B. für Bestäubung, Verbreitung, Abwehr von Herbivoren etc.). Sekundäre Metabolite sind daher wesentlich im ökologischen Gefüge und spielen eine große Rolle in biotischen und abiotischen Interaktionen. Die wenigen Grundbausteine der Biosynthese sind Aminosäuren, Isopren (C_5) sowie Acetat (C_2). Die Biosynthese der Grundstrukturen der Sekundärmetaboliten erfolgt zumeist gerichtet, etwa in Form von Multi-Enzymkomplexen. Häufig werden Biosynthesewege kombiniert (z.B. Flavonoide). Die Seitenketten verändernden Enzyme, die Substituenten wie etwa Hydroxy- oder Methoxygruppen bzw. diverse Zucker anlagern, tragen zur strukturellen Vielfalt bei. Ebenso können Stressreaktionen der Pflanze zur Akkumulation spezifischer Sekundärmetaboliten führen (Hegnauer, 1994). Abb. 3 gibt über die biosynthetischen Zusammenhänge zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel Auskunft.

In den untersuchten Arten konnten Derivate aus allen drei Grundbausteinen detektiert werden. Diese umfassen Megastigmane (Derivate des Terpenstoffwechsels), Cumarine und Neolignane (Polyphenole mit der Aminosäure Phenylalanin als Ausgangspunkt) sowie die für die ganze Artengruppe charakteristischen Tryptamin-Iridoid-Alkaloide. In diesem Kapitel werden die jeweiligen Stoffgruppen beschrieben.

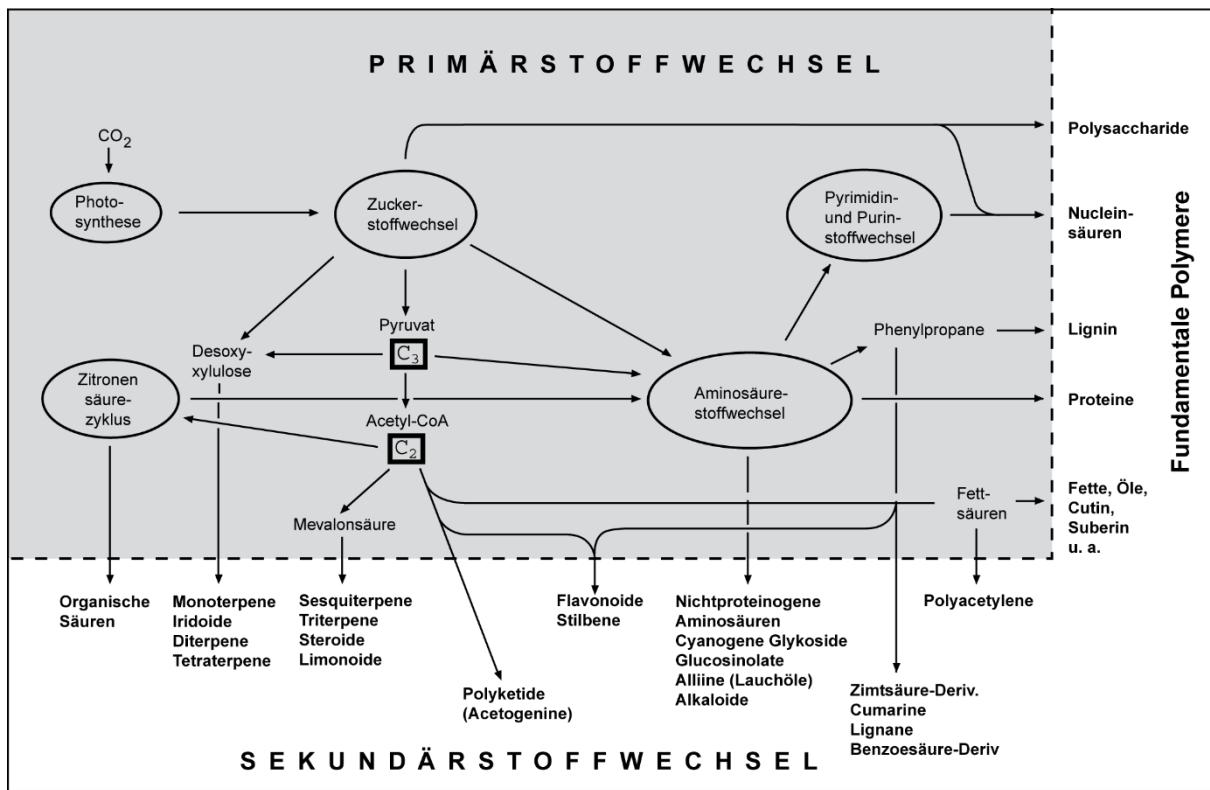


Abb. 3: Biosynthesezusammenhänge zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel (verändert nach Greger).

III.1. Terpenoide

Der Grundbaustein der Terpenoide ist das aus 5 Kohlenstoffatomen aufgebaute Isopren (Abb. 4). Durch Kondensation dieser Einheiten entstehen beispielsweise Monoterpene - sie bestehen aus 10 Kohlenstoffatomen, entsprechend zwei Isopreneinheiten, Sesquiterpene, die größte Untergruppe, mit 15 Kohlenstoffatomen aus drei. Während der Biosynthese können Kohlenstoffatome entfernt oder umgeordnet werden, somit ist ihre Anzahl nicht immer zwingend ein Vielfaches von fünf. Terpenoide sind eine sehr vielfältige und mit über 35.000 bekannten Substanzen die größte Naturstoffklasse (Hunter, 2007). Vor allem in höheren Pflanzen kommen sie größtenteils als Sekundärmetaboliten vor, zum Beispiel in Blütendüften, und können dank ihrer Spezifität als chemotaxonomische Marker verwendet werden (Rodriguez-Concepcion & Boronat, 2015).

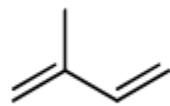


Abb. 4: Isopren als Grundstruktur der Terpenoide.

Ihre Biosynthese kann über zwei verschiedene Stoffwechselwege erfolgen. Sesqui- und Triterpene entstammen dem Mevalonat-Weg (MEV-Weg), Monoterpene (z.B. Iridoide, viele Duftstoffe), Di- und Tetraterpene in der Regel dem erst später entdeckten Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg). In beiden Fällen wird als „Baustein“ der Terpenoide Isopentylidiphosphat (IPP, „aktives Isopren“) beziehungsweise durch das Enzym IPP-Isomerase sein Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) gebildet (Hunter, 2007).

III.1.1. Megastigmane

Megastigmane ähneln mit ihren 13 Kohlenstoffatomen strukturell den Sesquiterpenoiden, sind aber Abbauprodukte von Tetraterpenen und stammen aus dem Carotinoidstoffwechsel. Carotinoide werden in den Plastiden über den MEP-Weg (nach dem Enzym 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase auch DOXP-Weg genannt) gebildet. Bedingt durch ihre konjugierten Doppelbindungen sind Carotinoide instabil und können leicht enzymatisch oder nicht-enzymatisch gespalten werden (Mendes-Pinto, 2009). Durch oxidative Spaltung der konjugierten Doppelbindungen können sogenannte Norisoprenoide mit 9, 10, 11 oder 13 Kohlenstoffatomen entstehen (Abb. 5). C₁₃-Norisoprenoide, die durch die regioselektive 9,10,(9',10')-Carotinoidspaltungsdioxygenase (CCD) entstehen, kommen in der Natur am häufigsten vor, zu ihnen zählen auch die Megastigmane (Abb. 6). Diese Stoffe spielen unter anderem eine wichtige Rolle als Aromastoffe in Wein (Mendes-Pinto, 2009).

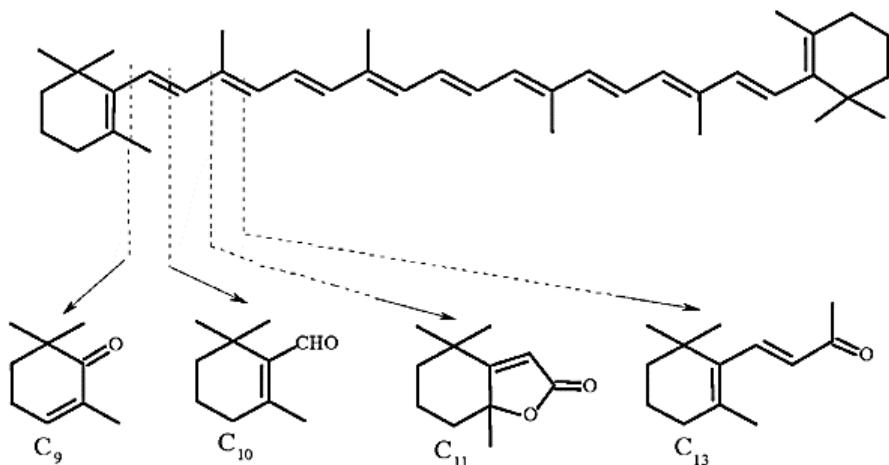


Abb. 5: Bildung von C₉-, C₁₀-, C₁₁- und C₁₃ – Norisoprenoiden aus β-Carotin (nach Mendes-Pinto, 2009).

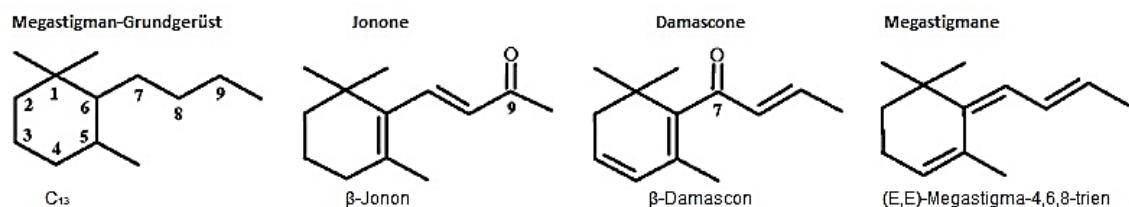


Abb. 6: Strukturen von Norisoprenoiden als Carotinoidabbauprodukte mit Megastigman-Grundgerüst (nach Mendes-Pinto, 2009).

Die Bildung von Norisoprenoiden in Pflanzen verläuft in drei Schritten: Die enzymatische Spaltung durch die Dioxygenase CCD, die enzymatische Transformation der primären Spaltprodukte zu Intermediaten und die säurekatalysierte Konversion dieser Intermediaten zu weiteren Derivaten. Megastigmane sind im Pflanzenreich weit verbreitet und viele wurden bereits aus verschiedenen Pflanzen isoliert, z.B. aus Blättern von *Juglans regia* L. (Walnuss) (Schwindl et al., 2017) oder aus *Vitis vinifera* L. (Weinrebe) (Skouroumounis et al., 1994).

Blumenol A

Blumenol A (Abb. 7), auch Vomifoliol genannt, ist ein sehr weit verbreiteter sekundärer Metabolit und kommt in zahlreichen Familien vor. In der Gattung *Psychotria* wurde es erstmals 2012 aus der philippinischen *Psychotria gitingensis* Elmer isoliert (Tan et al., 2012). Auch in anderen Vertretern der Rubiaceae wurde es nachgewiesen, zum Beispiel in *Hedyotis corymbosa* (L.) Lam., *Ochreinauclea maingayi* (Hook.f.) Ridsdale, *Palicourea alpina* DC. und *Morinda citrifolia* L. (Tan et al., 2013).

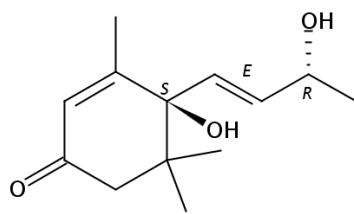


Abb. 7: Struktur des Megastigmans Blumenol A mit dem IUPAC-Namen (4S)-4-hydroxy-4-[(E,3R)-3-hydroxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-on.

Die Biosynthese von Blumenol A hat sich innerhalb der Familie der Rubiaceae wahrscheinlich mehrmals entwickelt (Tan et al., 2013). Das Vorkommen von Blumenol A oder seiner strukturellen Analoga kann ein Hinweis auf die Verwandtschaft innerhalb der Gattung sein (Tan et al., 2012), allerdings ist dieses Megastigmman generell weitverbreitet. Auch beispielsweise in Paprikapulver (*Capsicum annuum* L.), japanischem Reis (*Oryza sativa* L. cv. „Awaakamai“) oder Seidenraupenfäkalien, die in der traditionellen chinesischen Medizin als „CanSha“ verwendet werden, wurde Blumenol A nachgewiesen (Cui et al., 2007; Kato-Noguchi et al., 2011; Krammer et al., 2002). Als pflanzenwachstumhemmendes Toxin (Kato-Noguchi et al., 2011) wirkt es unter anderem phytotoxisch (Llanos et al., 2010), cytotoxisch gegen menschliche Krebszellen (Ren et al., 2009), antibakteriell gegen das Bakterium *Klebsiella oxytoca*, aber nicht gegen *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* (Tan et al., 2012).

III.2. Tryptamin-Iridoid-Alkaloide

Mit ursprünglich zehn Kohlenstoffatomen, entsprechend zwei Isopreneinheiten, gehören Iridoide zu den Monoterpenen. Sie haben in der Regel eine bizyklische Grundstruktur mit einem Cyclopentanopyran-Grundgerüst, sind meistens oxygeniert und glykosidisch gebunden (üblicherweise mit β -D-Glucose) (Dinda et al., 2011). Iridoidal, das strukturelle Grundgerüst (Abb. 8), wurde aus dem Wehrsekret der Ameise *Iridomyrmex purpureus* isoliert, woraus sich der Name für die Stoffklasse ableitet (Cavill et al., 1956).

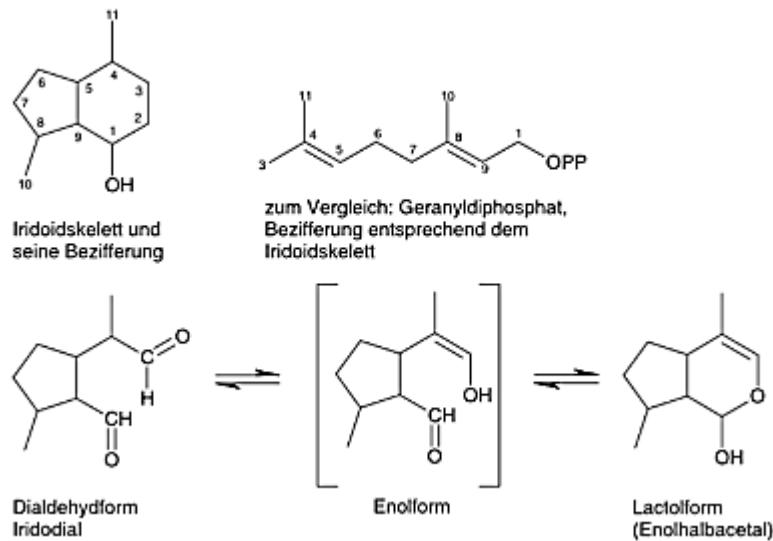


Abb. 8: Strukturelles Grundgerüst der Iridoide. Beziffertes Iridoidskelett und Iridoidal als Grundgerüst (Hänsel & Sticher, 2010).

Iridoide entstehen über den MEP-Weg durch Kondensation von IPP mit DMAPP zu Geranyldiphosphat (GPP), über das daraus gebildete Geraniol, das über mehrere Schritte zu Iridoidal oxidiert wird (Contin et al., 1998) (Abb. 9).

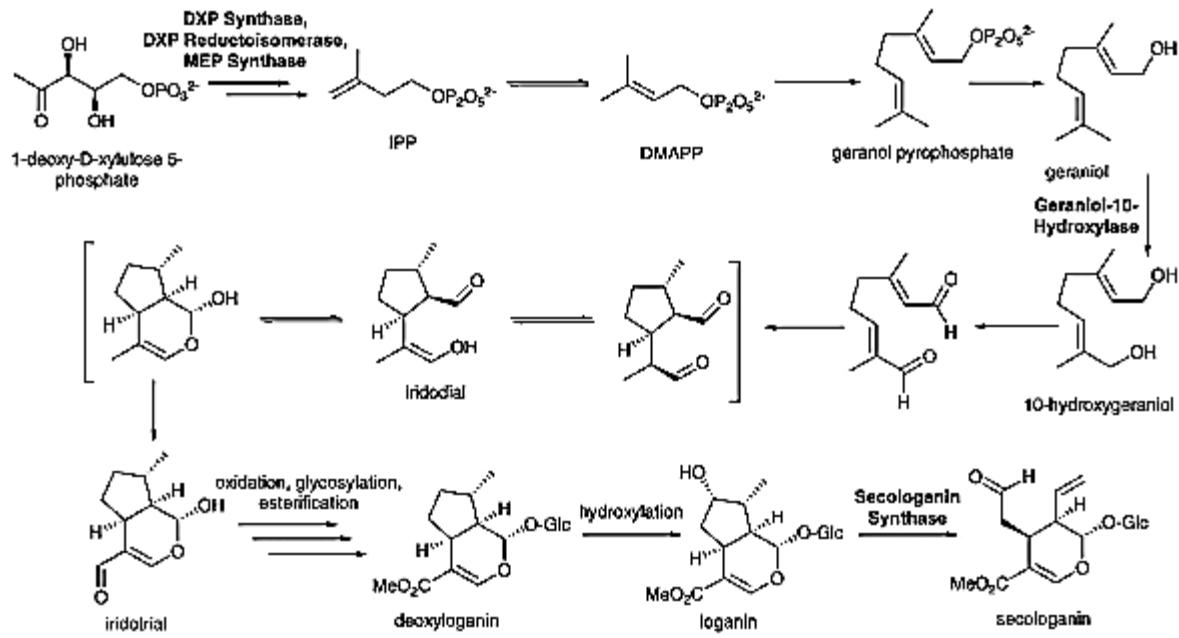


Abb. 9: Biosynthese von Iridoide. Über den MEP-Weg entsteht schrittweise Secologanin, einer der Ausgangsstoffe der Monoterpen-Indol-Alkaloide (O'Connor & Maresh, 2006).

Bisher sind knapp 3000 verschiedene Iridoide aus verschiedenen Pflanzenfamilien bekannt (De Luca et al., 2014). Sie dienen den Pflanzen meist als Schutz vor Herbivoren und Pathogenen. Fressfeinde werden in erster Linie durch ihren bitteren Geschmack abgeschreckt. Ein toxischer Effekt tritt auf, wenn durch mechanische Verletzung der Pflanze das inaktive Iridoidglykosid aus den Vakuolen freigesetzt wird und dadurch das Enzym β -Glucosidase die Glucose abspalten kann, wodurch das bioaktive Aglykon entsteht. Spezialisierte Insekten sind jedoch in der Lage, Iridoide zu verdauen und oder zum eigenen Schutz vor Fressfeinden zu akkumulieren (Dobler et al., 2011; Pungitore et al., 2004). Von Secoiridoiden spricht man, wenn der Pentanring des Grundkörpers durch oxidative Spaltung geöffnet ist (Abb. 10).

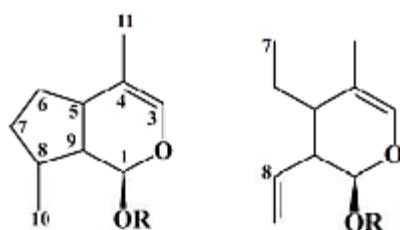


Abb. 10: Grundgerüst von Iridoide (links) und Secoiridoiden (rechts).

Eines der wichtigsten Secoiridoide ist Secologanin, welches eine zentrale Rolle in der Monoterpen-Indol-Alkaloid-Biosynthese spielt (O'Connor & Maresh, 2006; El-Sayed & Verpoorte, 2007). In den meisten Arten der *Psychotria*-Verwandtschaft liegen Iridoide gebunden vor – entweder als Tryptamin-Iridoid-Alkaloide oder Dopamin-Iridoid-Alkaloide. Der Tryptamin-Teil der Tryptamin-Iridoid-Alkaloide wird durch das Enzym Tryptophandecarboxylase (TDC) aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet. Durch Kondensation von Tryptamin mit Secologanin, katalysiert vom Enzym Strictosidinsynthase (STS), entsteht Strictosidin, von dem sich die Tryptamin-Iridoid-Alkaloide ableiten (O'Connor & Maresh, 2006) (Abb. 11).

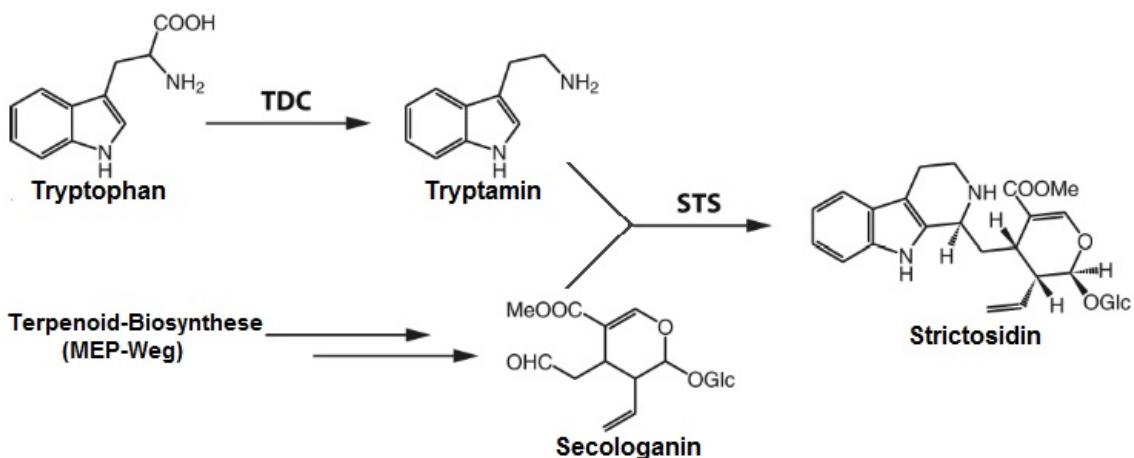


Abb. 11: Bildung von Tryptamin-Iridoid-Alkaloiden. Durch Kondensation entsteht aus Tryptamin und Secologanin Strictosidin (nach Berger, 2012).

III.3. Polyphenole

Der Shikimat- oder Shikimisäureweg ist Teil des Primärstoffwechsels, liefert aber auch Vorstufen für den sekundären Pflanzenstoffwechsel. Über diesen Biosyntheseweg entstehen die proteinogenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan (aus Chorismat), Phenylalanin und Tyrosin (aus dem aus Chorismat durch Claisen-Umlagerung gebildete Prephenat), sowie weitere wichtige Aromaten. Da Tiere nicht über diesen Biosyntheseweg verfügen, sind die drei genannten Aminosäuren für sie essentiell. Phenolische Substanzen können prinzipiell auch über andere Wege gebildet werden, was an ihren Strukturen erkennbar ist. Phenolische Terpenoide sind beispielsweise an ihrer Isoprenstruktur erkennbar, phenolische Polyketide an den meta-ständigen Hydroxylgruppen (Kreis, 2007). Nicht unmittelbar an ihrer Struktur lässt sich die Herkunft von aromatischen und phenolischen Zimtsäuren, Phenolcarbonsäuren oder einfachen Phenolen erkennen. Sie stammen aus dem Shikimisärestoffwechsel (Abb. 12). Phenylpropanoide, zu denen auch die Zimtsäure gehört, haben ein C₆-C₃-Bauelement als Grundgerüst. Der oxidative Abbau der Seitenketten von Zimtsäure führt zu Phenolcarbonsäuren und einfachen Phenolen.

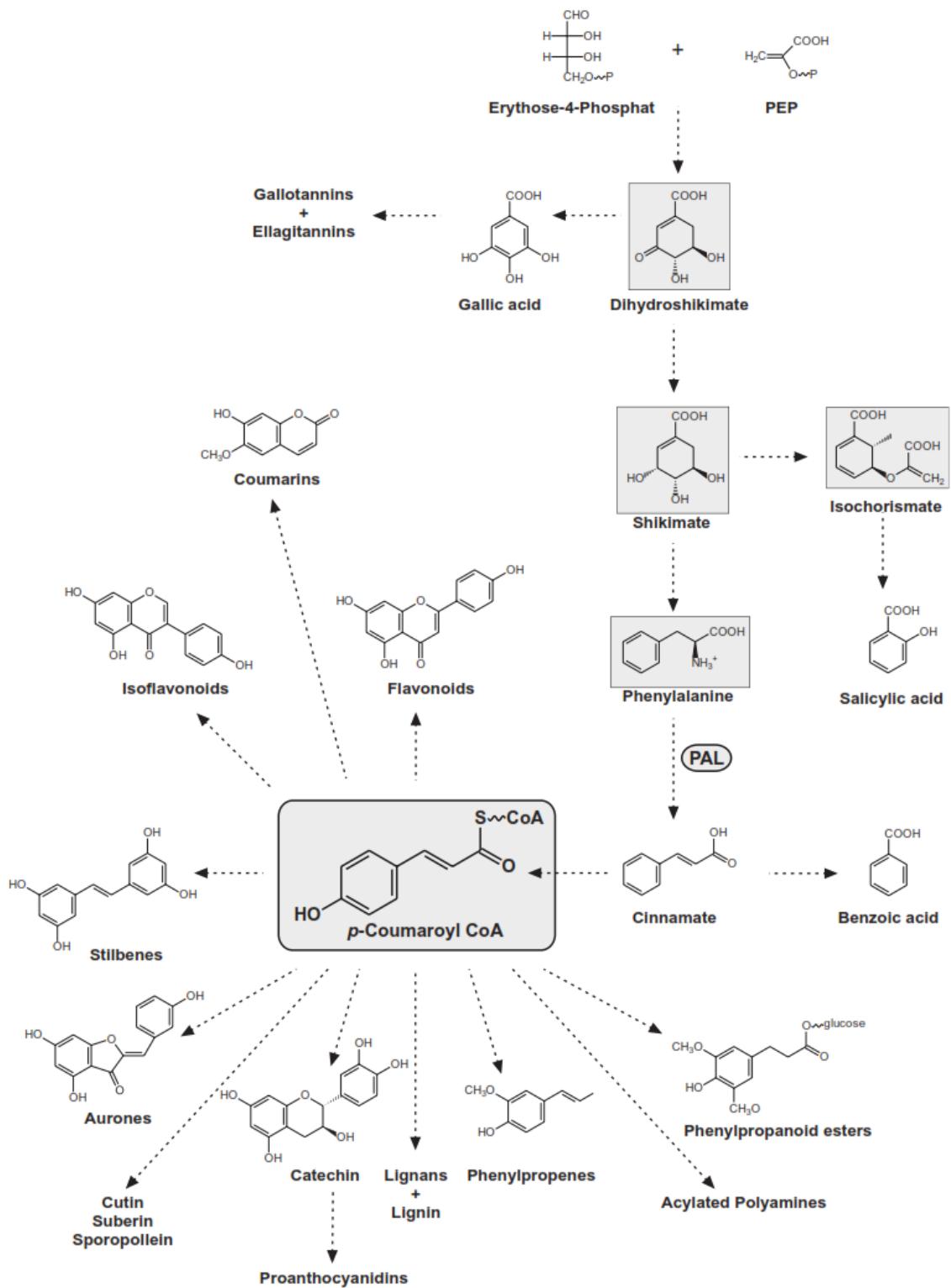


Abb. 12: Phenylpropanoid-Biosyntheseweg. Die Metabolite des Shikimisäureweges sind grau unterlegt. Aus der Shikimisäure wird Phenylalanin gebildet und daraus durch oxidative Desaminierung mithilfe des Enzyms Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) Zimtsäure. Abgeleitet vom zentralen Metaboliten p-Coumaroyl-CoA werden weitere Phenylpropanoide gebildet, sowie Cumarine, Flavonoide, Isoflavonoide, Stilbene, Cutin, Suberin, Proanthocyanidine, Lignane und Lignin und viele mehr (Vogt, 2010).

III.3.1. Cumarine

Cumarine sind Phenylpropanlactone (zyklische Ester) und stammen aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel. Sie sind ubiquitär in höheren Pflanzen zu finden (Harborne, 1999), wo sie meistens als Glykoside vorliegen. Durch *ortho*-Hydroxylierung von Zimtsäure, *tran/cis*-Isomerisierung der Seitenkette und Lactonisierung entsteht das Grundgerüst von Cumarinen (Abb. 13).

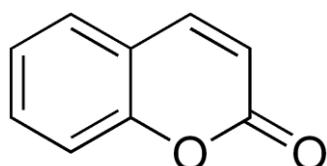


Abb. 13: Grundgerüst der Cumarine

Der Name stammt von der spanischen Bezeichnung für den Tonkabohnenbaum, Cumarú, der hohe Konzentrationen des Duftstoffes Cumarin enthält und aus dessen Bohnen die Substanz erstmals isoliert wurde. Zu Pflanzen mit hohem Cumaringehalt zählen außerdem Waldmeister (*Galium odoratum*) und die Rinde der Zimtkassie *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl.. Ceylon-Zimt, *Cinnamomum verum* J.Presl, enthält hingegen nur Spuren von Cumarin.

Cumarine können strukturell unterteilt werden in einfache Cumarine (1,2-Benzopyrone; methoxylierte und hydroxylierte Cumarine, z.B. Scopoletin) und die deutlich aktiveren, phototoxischen und als Kontaktallergene wirkenden Furanocumarine (7-oxygenierte Cumarine) und Pyranocumarine (Benzodipyran-2-one). Sie dienen Pflanzen als Schutz vor Phytopathogenen, konstitutiv oder induziert, als Reaktion auf abiotischen Stress, regulieren oxidativen Stress und spielen wahrscheinlich eine Rolle im Phytohormonsystem (Bourgaud et al., 2006). Viele Cumarine sind von therapeutischem Interesse und finden bereits Verwendung in der Medizin, zum Beispiel als Blutgerinnungshemmer (z.B. Marcumar), gegen Symptome bei Multipler Sklerose (Wulff et al., 1998) oder als Chemotherapeutika (Kawase et al., 2005).

Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxy-2H-chromen-2-on) beispielsweise ist ein einfaches phenolisches Cumarin und ein Phytoalexin. Seine Biosynthese wird induziert durch mikrobiellen Angriff oder abiotischen Stress, zum Beispiel mechanische Verletzungen oder Trockenstress (Tanaka et al., 1983). Die Bildung von Scopoletin in der Pflanze ist über mehrere Biosynthesewege möglich, aber noch nicht vollständig geklärt.

Abgeleitet von Cumarin wird es über den Shikimisäureweg gebildet (Beeching et al., 1998; Harborne, 1999; Kai et al., 2008). Es wurde bereits aus vielen verschiedenen Pflanzen isoliert und wirkt antibakteriell und antifungal. In der traditionellen afrikanischen, asiatischen und europäischen Medizin spielt es eine Rolle als Mittel gegen diverse Beschwerden, wie zum Beispiel Krämpfe, Entzündungen oder rheumatische Schmerzen (Gnonlonfin et al., 2012).

III.3.2. Flavonoide

Von den ubiquitär vorkommenden Flavonoiden sind derzeit ca. 10.000 Derivate bekannt. Sie kommen in allen Pflanzengruppen und -geweben vor, teilweise auch in Drüsenhaaren und Exkreten. Ihre Funktionen sind so vielfältig wie ihre Strukturen – sie dienen als Antioxidantien und zum UV-Schutz, der Pollenkeimung, Nodulation, haben Signalwirkung oder spielen eine Rolle in der Gentranskription. Flavonoide sind Polyphenole und haben ein aromatisches, heterozyklisches Grundgerüst (Abb. 14), das unter anderem durch Methylierung oder Prenylierung freier OH-Gruppen oder C-C-Bindungen, aromatische Substituenten oder Glykosylierung modifiziert sein kann. Dadurch entsteht eine große strukturelle Vielfalt innerhalb der Flavonoide.

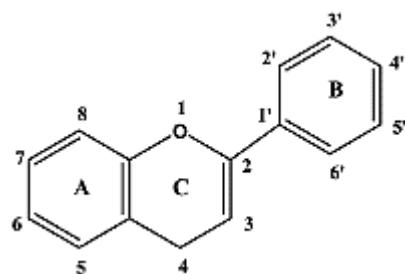


Abb. 14: Flavan, das Grundgerüst der Flavonoide, mit Kennzeichnung der Ringe und
Nummerierung der Kohlenstoffatome

Ihre Biosynthese, eine Kombination aus Aminosäure- und Acetatstoffwechsel, findet ER (endoplasmatisches Retikulum)-gebunden über Multienzymkomplexe im Cytoplasma statt (Abb. 15).

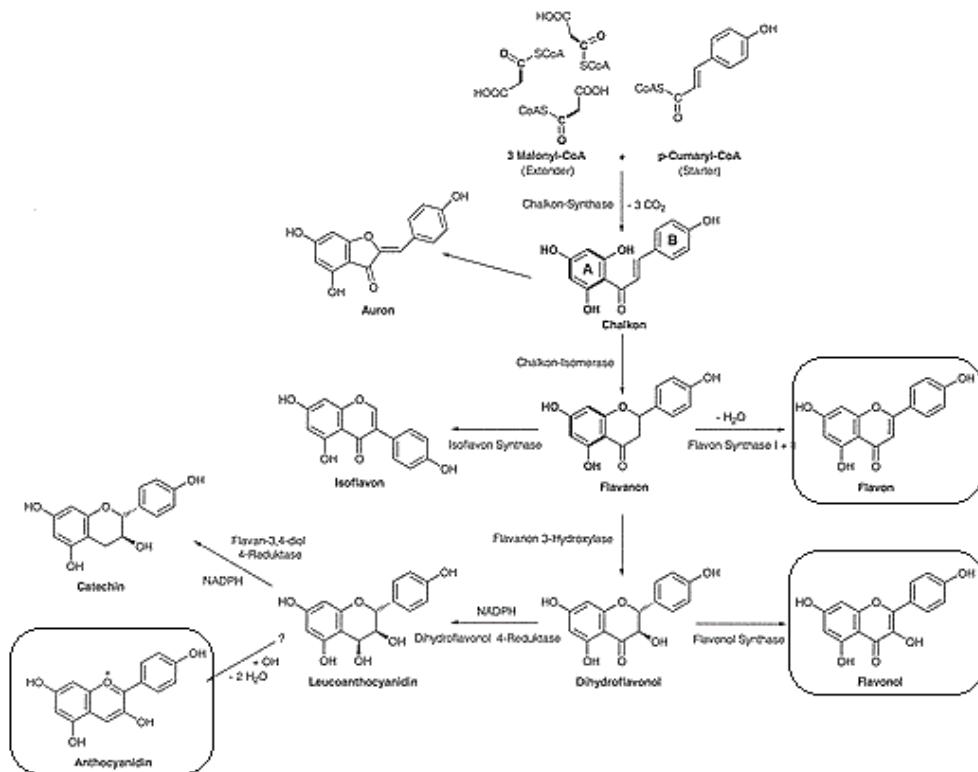


Abb. 15: Chalkon als Ausgangspunkt für die Biosynthese der wichtigsten Flavonoidklassen, zum Beispiel Flavone, Flavonole und Anthocyane (markiert) (nach Greger).

III.3.3. Lignane und Neolignane

Diese Stoffgruppe ist relativ weit verbreitet im Pflanzenreich und stammt ebenso aus dem Shikimat-Weg wie die anderen Polyphenole. Es handelt sich um dimere Strukturen, wobei zwei Phenylpropaneinheiten über eine β,β' -Verbindung gekoppelt sind. Dimere Verbindungen, die über ein *O*-Atom verethert sind, werden üblicherweise als Neolignane bezeichnet (Abb. 16). Derivate aus beiden Gruppen sind auch wesentlich an der Pflanzenverteidigung beteiligt. Sesam (*Sesamum indicum* L.), Lein (*Linum* L.) und Ginseng (*Panax ginseng* C.A.Mey.) sind bekannte Pflanzen, deren Lignane ernährungsmedizinisch von Bedeutung sind (Teponno et al., 2016).

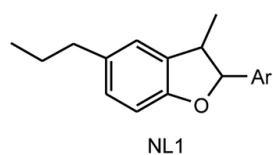


Abb. 16: Neolignan: Dihydrobenzofuran-Derivat (aus Teponno et al., 2016).

In den untersuchten Arten wurde Dihydrodehydrodiconyferylalkohol detektiert, das strukturell hier zugeordnet werden kann. Strukturell verwandte Verbindungen werden u.A. als Glykoside z.B. in Samen von *Crataegus*-Arten (Huang et al., 2013) oder in der Rinde von *Ulmus* (Lee et al., 2001) akkumuliert, in Aglycon-Form beispielsweise im Pericarp von *Juglans regia* L. (Tsasi et al., 2016). In Rubiaceen wurde diese Stoffgruppe selten detektiert.

III.4. Fettsäuremetaboliten

Hydroxyfettsäure

Das Hydroxyderivat der Stearinsäure, das im Zuge dieser Arbeit aus *P. adusta* isoliert wurde (Abb. 17), wurde bereits in diversen anderen Pflanzenarten nachgewiesen, innerhalb der Rubiaceae beispielsweise in *Morinda citrifolia* L. (Takashima et al., 2007).

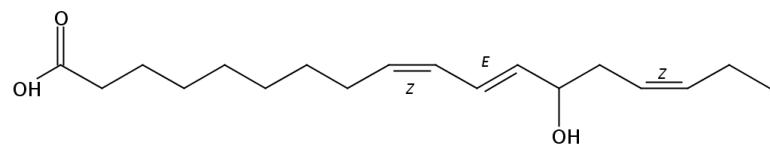


Abb. 17: Struktur der Hydroxyfettsäure (9Z,11E,15Z)-13-Hydroxyoctadeca-9,11,15-triensäure.

Die Biosynthese von Fettsäuren erfolgt durch die Addition von Malonyl-CoA (C_2 -Baustein) an eine Acetylgruppe und ist Teil des Primärstoffwechsels (siehe Abb. 3). Bis zu einer Kettenlänge von C_{18} geschieht dies über eine Reihe enzymatischer Reaktionen in den Plastiden, eine Verlängerung der Ketten darüber hinaus im endoplasmatischen Retikulum (ER).

Eine Akkumulation von gebundenen Hydroxyfettsäuren wurde in der Kutikula festgestellt – Hydroxyfettsäuren mit Kettenlängen von C_{16} oder C_{18} zählen zu den wichtigsten Monomereinheiten für die Bildung von Cutin (Seipold, 2004). Diese entstehen vermutlich im ER durch Cytochrom-P450-Oxygenasen aus den Coenzym A-Derivaten von Palmitinsäure und Ölsäure (Seipold, 2004). Die strukturell zur oben genannten Hydroxyfettsäure ähnliche Stearidonsäure (6,9,12,15-Octadecatetraensäure) ist eine Omega-3-Fettsäure. Als solche spielt sie eine Rolle in der Ernährung und soll sich in mehrererlei Hinsicht positiv auf die Gesundheit auswirken (gegen Herzkreislauferkrankungen, Entzündungen, Krebs und neurologische Störungen), kommt

aber kaum in pflanzlichen Lebensmitteln, sondern hauptsächlich in Fischen oder Algen (z.B. *Undaria pinnatifida*) vor. In Vertretern der Boraginaceae, Caryophyllaceae, Grossulariaceae und Primulaceae wurde Stearidonsäure nachgewiesen (Whelan, 2008).

IV. Experimentelles

IV.1. Material

Im Zuge dieser Arbeit wurden getrocknete Blätter verschiedener Arten untersucht.

Details zum verwendeten Material sind in Tabelle 2 angeführt.

Tabelle 2: Gesammeltes Material aus unterschiedlichen Regionen Costa Ricas. Verwendet wurden jeweils die getrockneten Blätter.

Palicourea	Sammelnummer	Provinz	Herbarnummer	Menge [g]
<i>P. adusta</i> Standl.	Berger, A. AB 10021002	Heredia	WU 0067363	48,5
<i>P. adusta</i> Standl.	Berger, A.; s.n. (2015)	Heredia	WU 0067363 (Nachsammlung)	124,5
<i>P. torresiana</i> (Standl.) Borhidi	Berger, A. & Schinnerl, J. 1500	Cartago	WU	49,4
<i>P. torresiana</i> (Standl.) Borhidi	Berger, A. & Schinnerl, J. 1619	Puntarenas	WU	49,7
<i>P. goldmanii</i> (Standl.) Borhidi	Berger, A. & Schinnerl, J. 1496	Cartago	WU 0082531	51,2

Das luftgetrocknete Pflanzenmaterial wurde zerkleinert und mit Methanol für 2 mal 3 Tage extrahiert. Danach wurden die Extrakte abfiltriert, vereinigt und unter Vakuum das Lösungsmittel verdampft. Die Rückstände wurden in Wasser aufgenommen und sukzessive mit Petrolether (PE), Chloroform (CHCl_3), Ethylacetat (EtOAc) und 1-Butanol ausgeschüttelt. Die erhaltenen Phasen wurden dann weiter mit verschiedenen chromatographischen Methoden untersucht bzw. aufgetrennt.

IV.2. Methoden

IV.2.1. Analytische Methoden

Dünnschichtchromatographie

Nach jedem präparativen Trennschritt wurden die erhaltenen Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie untersucht, um einerseits den Trennerfolg festzustellen und andererseits mithilfe von Sprühreagenzien erste qualitative Rückschlüsse auf die jeweils enthaltenen Substanzen ziehen zu können. Dabei werden die einzelnen Komponenten aufgrund ihrer unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit der stationären Phase getrennt.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Platten vom Typ Alugram SIL G/UV₂₅₄ (Aluminiumplatte beschichtet mit 0,20 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator) der Firma Merck verwendet. Abhängig von der Polarität der zu analysierenden Substanzen wurden verschiedene Lösungsmittelgemische als Laufmittel verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Laufmittel. Die Werte sind jeweils in Prozent angegeben.

Laufmittel	CHCl ₃	MeOH	BuOH	H ₂ O	AcOH
I	80	20			
II*			50	40	10
III	95	5			

*nur die organische Phase

Die Proben wurden in geeigneter Konzentration punktförmig auf die Platte aufgetragen und in eine Trennkammer mit geeignetem Laufmittel gestellt. Nach dem Entwickeln wurde die Platte unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm ausgewertet und anschließend mit Dragendorff's Reagenz oder Anisaldehyd-Reagenz besprüht. Dragendorff's Reagenz wird aus 5 mL Lösung I (0,85 g Bismutsubnitrat in 10 mL

Essigsäure und 40 mL Wasser), 5 mL Lösung II (4 g Kaliumiodid in 10 mL Wasser), 10 mL Essigsäure und 80 mL Wasser hergestellt. Es färbt viele Alkaloide durch Komplexbildung orange. Das Anisaldehyd-Reagenz, bestehend aus 85 mL Methanol, 10 mL Essigsäure, 8 mL konzentrierter Schwefelsäure und 0,5 mL Anisaldehyd, führt nach Erhitzen zu Additionsreaktionen mit diversen Farbreaktionen mit verschiedenen Substanzgruppen. Beispielsweise färbt es Terpene rosa-violett, Alkaloide grün-braun und Iridoide blau.

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Prinzipiell wird bei einer HPLC (High Performance Liquid Chromatography) die mobile Phase mit hohem Druck durch eine mit der stationären Phase dicht gepackten Säule gepumpt. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten mit der stationären Phase. Die kontinuierliche UV/VIS-Detektion des Eluats ermöglicht es, einzelne Substanzen zu detektieren und eine Informationen über deren Chromophore zu erhalten und so, unter Berücksichtigung der spezifischen Retentionszeit, erste Rückschlüsse auf deren Struktur schließen zu können. Die so erhaltenen Profile dienen einerseits dem qualitativen Vergleich verschiedener Proben (beispielsweise verschiedener Pflanzen oder unterschiedlicher Organe), andererseits der Überprüfung der Trennung nach angewendeten präparativen Methoden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Gerät des Typs Agilent 1100 mit einer Umkehrphasen-Säule verwendet. In der verwendeten Säule befindet sich mit unpolaren C18-Seitenketten modifiziertes Silikagel (Hypersil BDS-C18, 250 * 4.6 mm, 5 μ m Partikelgröße). So eluieren polare Substanzen zuerst, unpolare haben aufgrund stärkerer Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der stationären Phase eine längere Retentionszeit. Im Laufmittel wurde graduell die Menge an MeOH erhöht und an 10 mM wässriger Ammoniumacetatlösung verringert. (Von 40% MeOH zu 100% MeOH in 15 min und anschließend 10 min 100% MeOH.) Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 mL/min und das Injektionsvolumen 10 μ L. Während der Elution erfolgte kontinuierlich eine UV-Detektion bei 230 nm.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die chemischen Strukturen der isolierten Substanzen wurden unter Anwendung von Kernresonanzspektroskopischen Methoden (1D- und 2D-NMR) und Massenspektrometrie von Prof. Lothar Brecker (Department für Organische Chemie, Universität Wien) aufgeklärt.

Polarimetrie

Zur Bestimmung des spezifischen Drehwinkels wurde die optische Drehung mithilfe eines Polarimeters gemessen.

IV.2.2. Präparative Methoden

Gelpermeationschromatographie - Größenausschlusschromatographie mit Sephadex LH-20

Die als Sephadex bezeichneten Dextran-Epichlorhydrin-Copolymere bilden ein Gel mit Poren, die in der Säule eine Trennung nach Molekülgröße ermöglichen. Große Moleküle eluieren zuerst, da sie nicht in die Poren der stationären Phase eindringen.

Säulenchromatographie mit Kieselgel

Die Säule wurde mit feinem Kieselgel (Kieselgel 60, 40 – 63 µm) und Chloroform befüllt. Dazu wurde zuerst Watte vorgelegt, darauf grobes Kieselgel und zuletzt das aufgeschlämme feine Kieselgel (CHCl₃ vorgelegt; ca. 50 g Kieselgel mit der Korngröße von 40 – 63 µm aufgeschlämmt in CHCl₃).

MPLC

Als spezielle Form der Säulenchromatographie kam die MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography) zum Einsatz. Das Prinzip der Trennung ist dasselbe wie bei herkömmlichen Säulenchromatographien mit Kieselgel. Der Arbeitsdruck von 2 – 4 bar

ermöglicht allerdings die Verwendung eines Kieselgels mit 40 – 60 µm, wodurch die Trennung des Analytengemisches durch Erhöhung der Trennstufenanzahl verbessert wird. Dazu ist der Trennsäule eine Pumpe vorgeschaltet, durch die die gelöste Probe und das Laufmittel unter erhöhtem Druck eluieren.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Im Zuge dieser Arbeit wurden für die préparative DC 20 * 20 cm große, mit Kieselgel und Fluoreszenzmarker beschichtete Glasplatten verwendet (DC Kieselgel 60 F₂₅₄ 0,5 mm Schichtdicke, Merck). Die gelöste Probe wurde möglichst gleichmäßig und möglichst bandenförmig etwa 2 cm über dem unteren Rand der Platte mithilfe einer ausgezogenen Glaspipette aufgetragen und in eine Glaskammer mit geeignetem Laufmittel gestellt und entwickelt. Die unter UV-Licht (oder durch Besprühen der Plattenränder mit Anisaldehyd-Reagenz sichtbar gemachten) Banden wurden markiert und konnten vorsichtig von der Glasplatte gekratzt und in einen Erlenmeyerkolben überführt werden. Durch Extraktion mit Methanol im Ultraschallbad und anschließendem Abnutschen mithilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde das Kieselgel vom Analyten abgetrennt.

IV.3. Durchführung

Aus 124,5 g getrockneten Blättern von *P. adusta* wurde ein Gesamtextrakt mit Methanol hergestellt. Dafür wurden die getrockneten Blätter zerkleinert, in einer Glasflasche mit Methanol überschichtet und lichtgeschützt gelagert (2 * 3d). Nach der Filtration, Entfernen von Methanol mit dem Rotavapor und Anschließen an die Vakuumpumpe wurde der so erhaltene trockene Gesamtextrakt (6,55 g) in Wasser suspendiert. Danach wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln mehrmals ausgeschüttelt und in folgende in Tabelle 4 angeführten Phasen nach steigender Polarität getrennt.

Tabelle 4: Menge der bei der Flüssig-Flüssig Extraktion erhaltenen Fraktionen des Gesamtextrakts von *P. adusta*.

Lösungsmittel	Masse nach Trocknung
95% Petrolether (PE) + 5 % Aceton	2,11 g
Chloroform (CHCl ₃)	150 mg
Ethylacetat (EtOAc)	180 mg
1-Butanol (BuOH)	320 mg
Wasser (H ₂ O)	3,57 g

Etwa die Hälfte der Wasserphase (1,517 g) wurde in einer Größenausschlusschromatographie über eine Sephadex-Säule (S01) weiter getrennt. Der Trockenextrakt wurde in Methanol gelöst, auf die mit Sephadex LH20 befüllte Säule aufgetragen und mit Methanol als mobiler Phase eluiert. So wurde die H₂O-Phase in 10 Fraktionen (je ca. 50 mL) nach Molekülgröße getrennt (Fraktionen S01-1 bis S01-10). In den Fraktionen S01-7, S01-9 und S01-10 bildeten sich nach Verdampfen des Methanols unlösliche Kristalle, die vorerst für spätere Analysen vereinigt und in einem Braunglasfläschchen aufbewahrt wurden.

Die Fraktion S01-2 (109 mg) wurde über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60, 40 – 63 µm) mit Mischungen aus Chloroform (CHCl₃) und Methanol (MeOH) mit aufsteigender Polarität getrennt (KG01). Die Elution erfolgte anfangs mit einem Gemisch aus 90% CHCl₃ und 10% MeOH (100 mL), es folgte ein Gradient mit je 100 mL Lösungsmitteln (80% CHCl₃ + 20 % MeOH, 70% CHCl₃ + 30% MeOH, usw.). Es wurden insgesamt 18 Fraktionen gesammelt – die erste mit 100 mL, alle weiteren mit je ca. 50 mL (Fraktionen KG01-1 bis 18). Die Fraktion KG01-6 (2,0 mg) enthielt ein Gemisch der Substanzen Linalooloxid Pyranoid (**1**) und Roseosid (**2**).

Die aus dem Gesamtextrakt durch Ausschütteln erhaltenen CHCl₃-, EtOAc- und BuOH-Phasen wurden vereinigt und mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel (50 g Kieselgel 60 0,2 – 0,5 mm) weiter in je ca. 50 mL große Fraktionen getrennt (Fraktionen KG03-1 bis 22). Als Laufmittel wurde eine Startmischung von 80% PE und 20 % EtOAc, mit in Zehnerschritten steigendem EtOAc-Anteil, gefolgt von 80% EtOAc und 20% MeOH und zuletzt 100% MeOH verwendet. Die vereinigten Fraktionen KG03-9 bis 11

(46,1 mg) wurden über eine Sephadexsäule und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 95/5$ als Laufmittel weiter getrennt (S02).

Aus den Fraktionen S02-11 und 12 wurden mit Hilfe von präparativer DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 90/10$ als Laufmittel 3,6 mg Blumenol A (= Vomifoliol) (**3**) isoliert. Aus den Fraktionen S02-16 bis 18 wurden ebenfalls mittels präparativer DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 90/10$ als Laufmittel 2,0 mg Dihydrodehydroconiferyl (**5**) isoliert.

Die Hydroxyfettsäure (**4**) (5,3 mg) konnte aus der PE-Phase (860 mg) nach Trennschritten über eine grobe Kieselgel-Säule (KG04) mit Laufmittelgradienten von PE über EtOAc zu MeOH (s.o.), gefolgt von einer Sephadexsäule LH20 eluiert mit Methanol/Aceton (70:30) der Fraktionen KG04-7 bis 15 (113,2 mg) und anschließender MPLC isoliert werden. Bei der MPLC erfolgte die Trennung in einer Kieselgelsäule (KG05) mit PE/EtOAc = 80/20 als Laufmittel.

Die gesamten Isolierungsschritte sind zusammenfassend in der Abbildung 18 dargestellt.

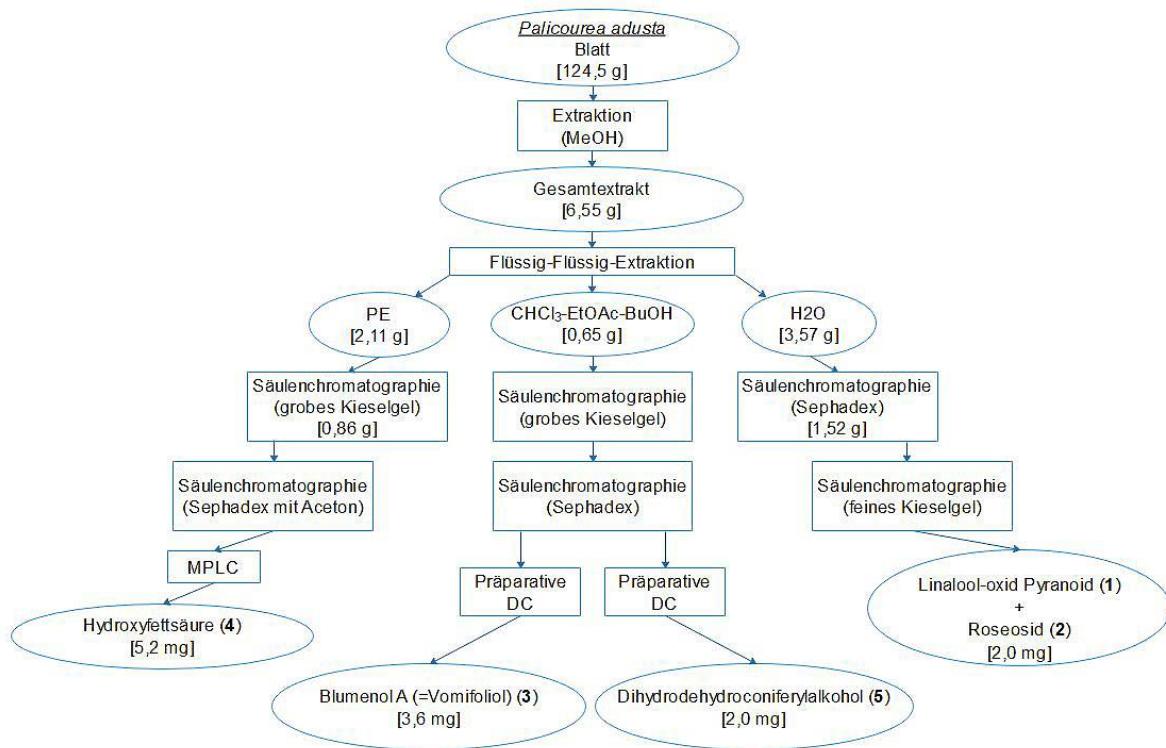


Abb. 18: Flussdiagramm zur Gewinnung der Reinstoffe **1 – 5** aus dem Blattextrakt von *P. adusta*.

V. Ergebnisse und Diskussion

V.1. Ergebnisse

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnten aus dem Blattextrakt von *P. adusta* das Monoterpenenglucosid Linalooloxid (1), die beiden Megastigmane Roseosid (2) und Blumenol A (3), sowie die Hydroxyfettsäure (9Z,11E,15Z)-13-Hydroxyoctadeca-9,11,15-triensäure (4) und das Neolignan Dihydrodehydrodiconiferylalkohol (5) isoliert werden (Abb. 19). Zusätzlich wurden das Cumarin Scopoletin (6) und das Flavonolglykosid Nicotiflorin (7) durch Vergleich von Retentionszeiten und UV-Spektren nachgewiesen (Abb. 20).

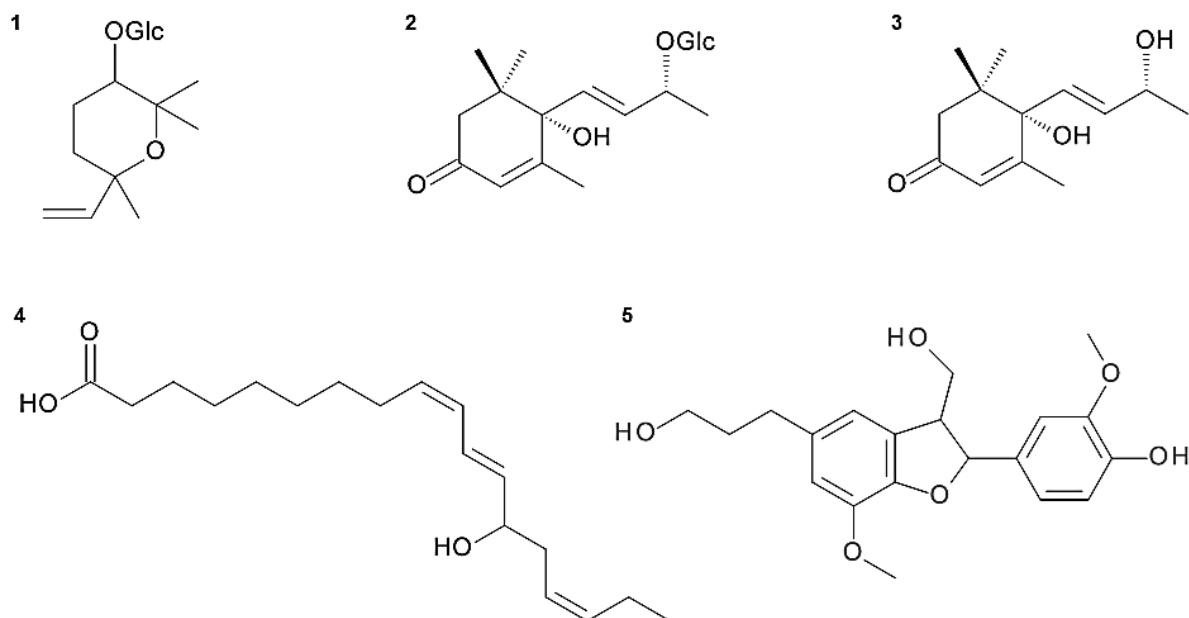


Abb. 19: Strukturformeln der aus *P. adusta* isolierten Verbindungen.

Linalooloxid Pyranoid (1), Roseosid (2), Blumenol A (3), (9Z,11E,15Z)-13-Hydroxyoctadeca-9,11,15-triensäure (4) und Dihydrodehydrodiconiferylalkohol (5). Die Positionen der Methoxygruppen am entsprechenden Ring von 5 konnten noch nicht eindeutig zugeordnet werden.

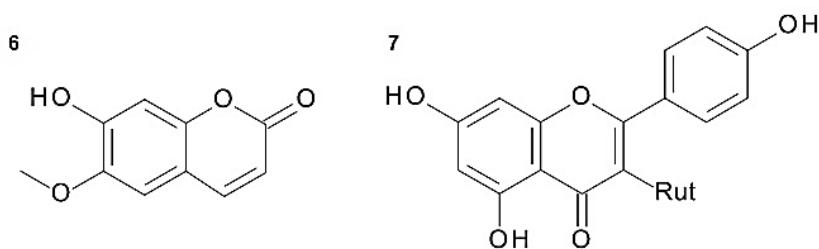


Abb. 20: Die Strukturen der in *P. adusta* co-chromatographisch nachgewiesenen Substanzen Scopoletin (6) und Nicotiflorin (7). Rut = Glc-Rha.

Die Verbindungen **1** und **2** (2,0 mg) wurden aus der wässrigen Phase des Gesamtextraktes isoliert. Die CHCl_3 -, EtOAc - und BuOH -Phasen wurden vereinigt und mittels zwei Säulenchromatographien weiter aufgetrennt. Das Megastigman **3** (3,6 mg) wurde aus einer darauffolgenden präparativen Dünnschichtchromatographie isoliert. Aus derselben Phase wurde **5** (2,0 mg) isoliert. Die Hydroxyfettsäure **4** (5,2 mg) konnte aus der PE-Phase nach mehreren säulenchromatographischen Trennschritten isoliert werden. Ein Überblick über die eingesetzten Methoden zur Isolierung der Stoffe **1–5** (Abb. 18), sowie Details zur Durchführung sind im Kapitel 4 angeführt. Die Abbildung 21 zeigt die HPLC-Profile der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen Fraktionen und des methanolischen Gesamtextraktes. Die Substanzen **1–7** sind darin markiert, sofern sie im jeweiligen Profil sichtbar sind.

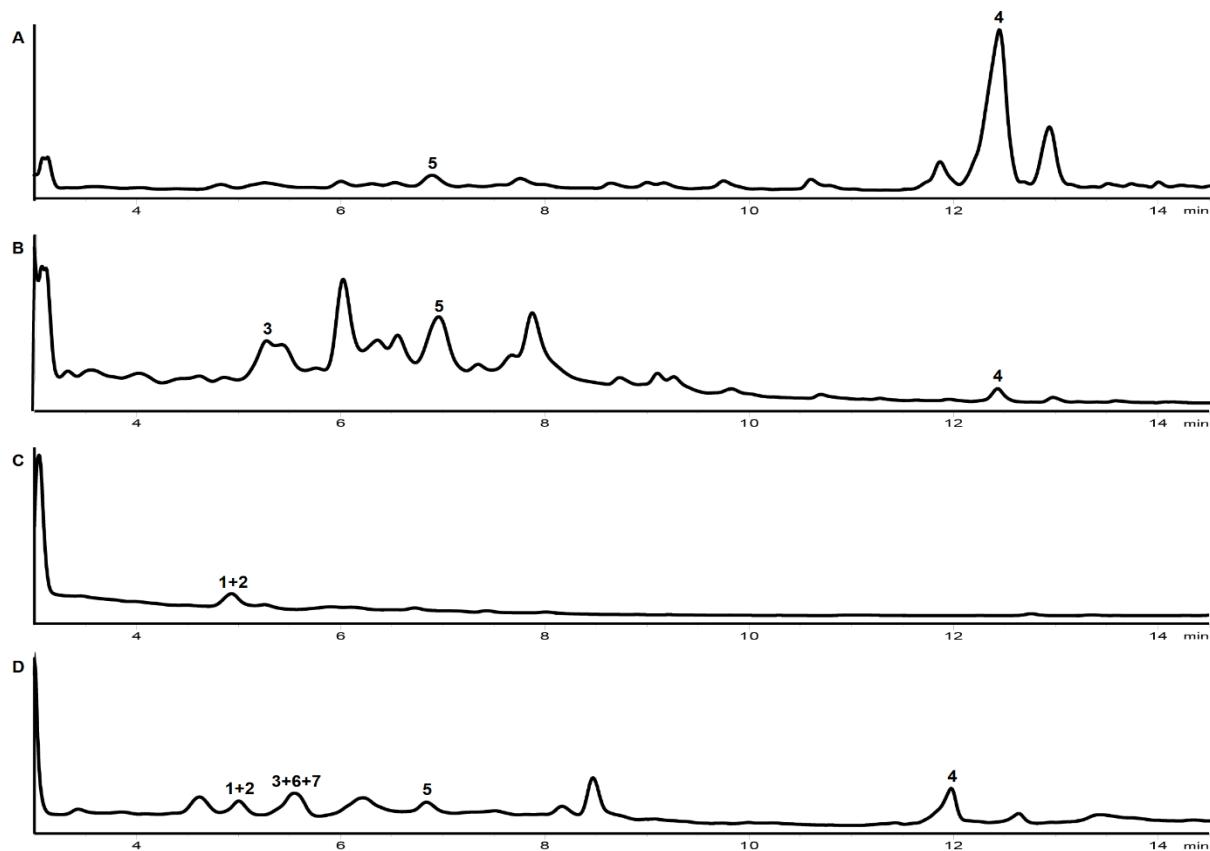


Abb. 21: HPLC Profile des methanolischen Gesamtextraktes von *P. adusta* und der durch Flüssig-Flüssig Extraktion erhaltenen Phasen. PE-Phase (A), EtOAc-Phase (B), Wasserphase (C) und Gesamtextrakt (D). Linalooloxid Pyranoid (1), Roseosid (2), Blumenol A (3) sowie die Hydroxyfettsäure (4) und Dihydrodehydrodiconiferylalkohol (5).

Zusätzlich wurden vergleichende HPLC Analysen von den Blattextrakten der beiden nahe verwandten Arten *P. torresiana* und *P. goldmanii* durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Abb. 22 und die Strukturen der detektierten Substanzen in Abb. 23 dargestellt. Die Tabelle 5 zeigt einen Überblick über die aus *P. adusta*, *P. torresiana* und *P. goldmanii* isolierten oder nachgewiesenen Substanzen (Kählig, 2018; Kozak, 2017; Schmidtbauer, 2017).

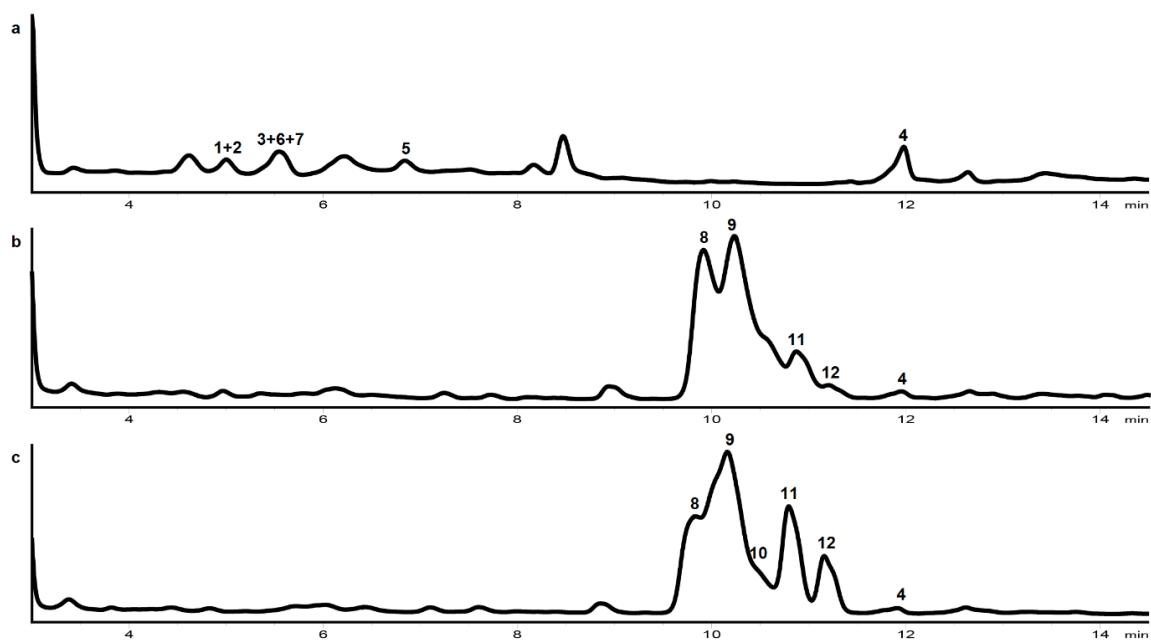


Abb. 22: Vergleichende HPLC Profile der Arten *P. adusta* (a), *P. torresiana* (b) und *P. goldmannii* (c). Die Verbindungen **8** – **12** wurden aus *P. goldmannii* isoliert und deren Struktur aufgeklärt (Kählig, 2018; Schmidtbauer, 2017). **8** und **9** wurden aus *P. torresiana* isoliert (Kozak, 2017). Strictosidin (**8**), Strictosamid (**9**), Vallesiachotamin (**10**), Feroyl-Lyalosid (**11**), Lyalosid (**12**).

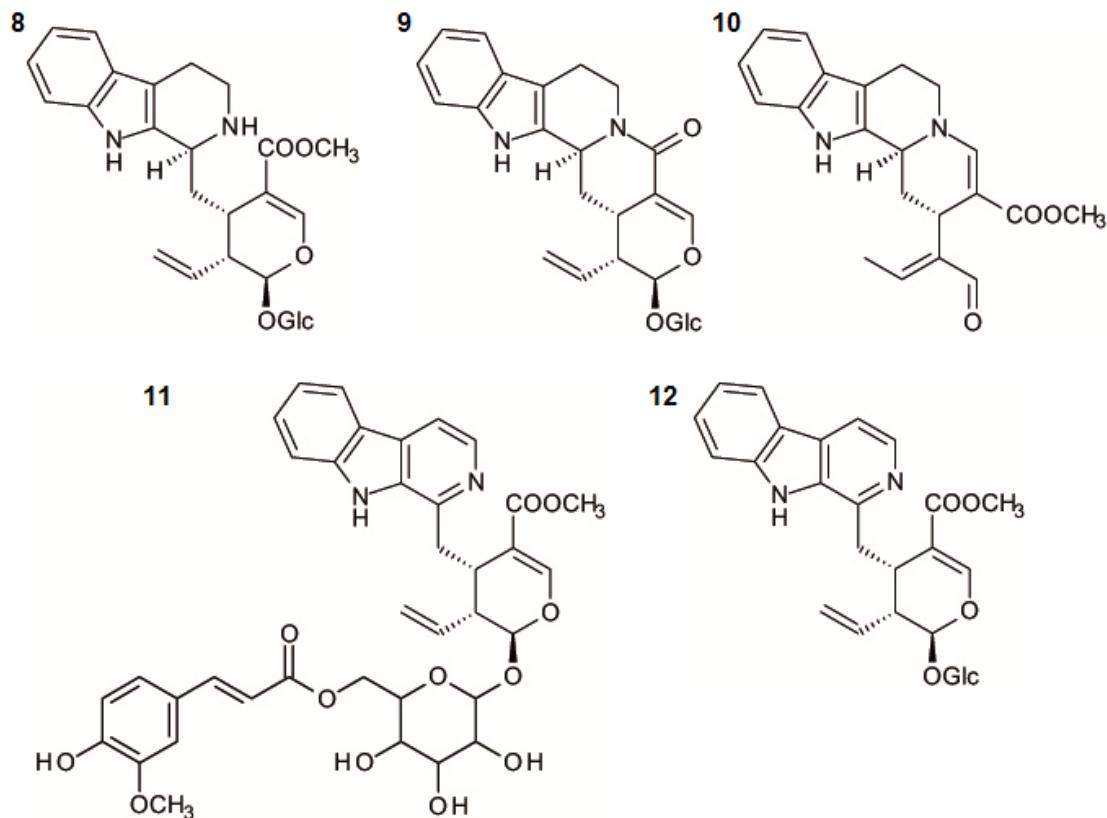


Abb. 23: Die Strukturen der in *P. torresiana* und *P. goldmannii* identifizierten Sustanzen. Strictosidin (**8**), Strictosamid (**9**), Vallesiachotamin (**10**), Feroyl-Lyalosid (**11**), Lyalosid (**12**).

Tabelle 5: Isolierte oder co-chromatographisch nachgewiesene Substanzen aus *P. adusta*, *P. goldmannii* und *P. torresiana*.

	Monoterpene	Fettsäurederivat	Neolignan	Cumarine	Flavonoide	Tryptamin-Iridoid-Alkaloide				
	1, 2, 3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>P. adusta</i>	x		x	x	x					
<i>P. torresiana</i>		x				x	x		x	x
<i>P. goldmannii</i>		x				x	x	x	x	x

Linalooloxid Pyranoid (1), Roseosid (2), Blumenol A (3), Hydroxyfettsäure (4), Dihydrodehydrodiconiferylalkohol (5), Scopoletin (6), Nicotiflorin (7), Strictosidin (8), Strictosamid (9), Vallesiachotamin (10), Feroyl-Lyalosid (11), Lyalosid (12).

V.2. Diskussion

Das Monoterpen glucosid Linalooloxid (1) und die Megastigmanderivate Roseosid (2) und Blumenol A (3) konnten erstmalig im Rahmen dieser Arbeit für *P. adusta* beschrieben werden. Das Megastigman Roseosid (2) wurde erstmals aus *Catharanthus roseus* (L.) G.Don isoliert (Bhakuni et al., 1974, unter dem Namen *Vinca rosea*). Blumenol A (3) wurde erstmals von Pousset et al. (1969) aus *Rauvolfia vomitoria* Afzel. und innerhalb der Gattung *Psychotria* aus der philippinischen *Psy. gitingensis* Elmer isoliert (Tan et al., 2012). Des Weiteren wurde 3 zusammen mit weiteren Megastigmanderivaten auch in der philippinischen *Psy. cadigensis* Merr. nachgewiesen (Tan et al., 2014). Innerhalb der Rubiaceae wurde 3 unter anderem in den Arten *Villaria odorata* Merr. (Tan et al., 2012), *Oldenlandia corymbosa* Aiton (Stuart et al., 1975, unter dem Namen *Hedyotis corymbosa*), *Ochreinauclea maingayi* (Farine et al., 1996), *Palicourea alpina* (Kuang et al., 2009) und *Morinda citrifolia* (Mukhtar et al., 2012) identifiziert. Weitere Megastigmanderivate wurden auch aus *Pal. correae* (Achenbach et al., 1995, als *Psy. correae*) und *Psy. stachyoides* Benth. (Pimenta et al., 2011) isoliert.

Das Neolignanderivat Dihydrodehydrodiconiferylalkohol (5) wurde erstmalig aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Mariendistel) beschrieben (Weinges et al., 1970) und mehrmals in unterschiedlichen Verwandtschaftskreisen nachgewiesen.

Valverde et al. (1999) beschreibt verschiedene Tryptamin-Iridoid Alkaloide aus *P. adusta*. Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit keine Tryptamin-Iridoid Alkaloide in *P. adusta* nachgewiesen werden. Das ist umso bemerkenswerter, weil das von Valverde et al. (1999) untersuchte Pflanzenmaterial ebenfalls aus Costa Rica stammt. Im Rahmen phytochemischer Untersuchungen von getrockneten Blättern der morphologisch sehr ähnlichen Arten *P. torresiana* und *P. goldmanii* wurden Lyalosid und dessen Derivate isoliert und deren Struktur aufgeklärt (Kählig, 2018; Kozac, 2017; Schmidtbauer, 2017) (Abb. 22 und Tabelle 5). Diese Ergebnisse stimmen mit der Studie von Valverde et al. (1999) überein, stehen aber in Widerspruch zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit. Ein möglicher Grund für diese Diskrepanzen sind unter Anderem chemische Differenzierungen innerhalb der Art, im Sinne von Bildung chemischer Rassen. Ebenso könnten abiotische oder biotische Stressfaktoren eine Rolle bei der Biosynthese von Sekundärstoffen spielen. Letztendlich könnte aber auch das Pflanzenmaterial von Valverde et al. (1999) fehlbestimmt sein, was in Anbetracht der Merkmalsarmut und Schwierigkeiten bei der korrekten Zuordnung nicht unwahrscheinlich ist. Aufschluss über mögliche Verwechslungen oder eventuelle Variationsbreiten könnten weitere phytochemische Analysen mehrerer Individuen von *P. adusta* bringen.

VII. Anhang

VII.1. Zusammenfassung

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden Arten der Gattung *Palicourea* (Rubiaceae) hinsichtlich ihrer Sekundärmetabolite untersucht. Blattextrakte von *P. adusta*, *P. torresiana* und *P. goldmanii* wurden über HPLC aufgetrennt und die erhaltenen phytochemischen Profile vergleichend analysiert. Aus *P. adusta* konnten unter Anwendung mehrerer chromatographischer Trennmethoden das MonoterpenGlucosid Linalooloxid (**1**), die Megastigmane Roseosid (**2**) und Blumenol A (**3**), sowie die Hydroxyfettsäure (9Z,11E,15Z)-13-Hydroxyoctadeca-9,11,15-triensäure (**4**) und das Neolignan Dihydrodehydrodiconiferylalkohol (**5**) isoliert und identifiziert werden. Weiters wurde durch Vergleich von Retentionszeiten und UV-Spektren aus den HPLC-Profilen das Cumarin Scopoletin (**6**) und das Flavonolglykosid Nicotiflorin (**7**) identifiziert. Anhand der jeweiligen HPLC-Profile konnte in *P. torresiana* das Vorkommen der Indolalkaloide Strictosidin (**8**), Strictosamid (**9**), Feroyl-Lyalosid (**11**), sowie Lyalosid (**12**) und die aus dem Extrakt von *P. adusta* isolierte Hydroxyfettsäure (**4**) nachgewiesen werden. In Extrakten von *P. goldmanii* wiesen die Retentionszeiten und UV-Spektren ebenfalls auf diese Verbindungen und zusätzlich auf das Indolalkaloid Vallesiachotamin (**10**) hin. Entgegen bisheriger Arbeiten (Valverde et al., 1999) konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Indolalkaloide in *P. adusta* gefunden werden. Da über Gründe für diese widersprüchlichen Ergebnisse nur spekuliert werden kann, sind weitere phytochemische Analysen zur Abklärung der Variation erforderlich. Die vergleichenden Analysen zeigen jedenfalls, dass die ansonsten typischen Indolalkaloide nicht in jeder Art dieser Verwandtschaftsgruppe akkumuliert werden. Die beobachtete chemische Differenzierung könnte somit chemotaxonomisch bedeutsam sein.

VII.2. Abstract

In the course of this thesis, species of the genus *Palicourea* have been analyzed for their secondary metabolites. Phytochemical profiles of *P. adusta*, *P. torresiana* and *P. goldmanii* were obtained by HPLC-UV and analyzed comparatively. Several components were isolated from *P. adusta*: The monoterpane glucoside linalooloxide (**1**), the megastigmanes roseoside (**2**) and blumenol A (**3**), as well as the hydroxy fatty acid (9Z,11E,15Z)-13-hydroxy octadeca-9,11,15-trienoic acid (**4**) and the neolignane dihydrodehydro-diconiferylalcohol (**5**). By comparing retention times and UV-spectra, the coumarin scopoletin (**6**) and the flavonol glycoside nicotiflorin (**7**) were identified. Similarly, retention times and HPLC-UV-spectra indicated the presence of the indole alkaloids strictosidine (**8**), strictosamide (**9**), feroyl-lyaloside (**11**), lyaloside (**12**) in *P. torresiana* extract as well as the above mentioned hydroxy fatty acid (**4**) isolated from *P. adusta*. The profiles of *P. goldmanii* revealed the presence of the same substances, and additionally of the indole alkaloid vallesiochotamine (**10**). Contrary to previous works (Valverde et al. 1999), no alkaloids were detected in *P. adusta* in the current study. Reasons for these contradictory results are speculative, indicating the necessity of further phytochemical analyses. In any case, these analyses showed that the otherwise typical indolalkaloids are not detectable in all taxa of this group, which might be of chemotaxonomic significance.

VII.3. Literaturverzeichnis

- ACHENBACH, H., LOTES, M., WAIBEL, R., KARIKAS, G. A., CORREA, M. D., & GUPTA, M. P. (1995). Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. *Phytochemistry*, 38(6), 1537 – 1545.
- AIMI, N., SEKI, H., & SAKAI, S. I. (1992). Synthesis of lyaloside, a prototypal β -carboline gluco indole alkaloid in rubiaceous plants. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(9), 2588 – 2590.
- BACKLUND, M., OXELMA B., Bremer, B. (2000). Phylogenetic relationships within the Gentianales based on *ndhF* and *rbcL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae. *American Journal of Botany*, 87, 1029 – 1043.
- BEECHING, J. R., HAN, Y., GÓMEZ-VÁSQUEZ, R., DAY, R. C., COOPER, R. M. (1998). Wound and defense responses in cassava as related to post-harvest physiological deterioration. In *Phytochemical Signals and Plant-Microbe Interactions*: Springer, Boston, MA, 231 – 248.
- BERGER, A., FASSHUBER, H., SCHINNERL, J., ROBIEN, W., BECKER, L., & VALANT-VETSCHERA, K. (2011). Iridoids as chemical markers of false ipecac (*Ronabea emetica*), a previously confused medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(3), 756 – 761.
- BERGER, A. (2012). Distribution and systematic significance of selected secondary metabolites within Psychotrieae/Palicoureeae (Rubiaceae). Diplomarbeit, Universität Wien.
- BHAKUNI, D. S., JOSHI, P. P., UPRETY, H., KAPIL, R. S. (1974). Roseoside-A C13 glycoside from *Vinca rosea*. *Phytochemistry*, 13(11), 2541 – 2543.
- BORHIDI, A. L. (2017). El subgénero *Heteropsychotria* (Rubiaceae, Palicoureeae) en México y Mesoamerica. *Acta Botanica Hungarica*, 59(1-2), 13 – 23.
- BOURGAUD, F., HEHN, A., LARBAT, R., DOERPER, S., GONTIER, E., KELLNER, S., MATERN, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5(2 – 3), 293 – 308.
- BREMER, B., ERIKSSON, T. (2009). Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences*, 170(6), 766 – 793.
- CALIXTO, N. O., PINTO, M. E. F., RAMALHO, S. D., BURGER, M., BOBEY, A. F., YOUNG, M. C. M., BOLZANI, V.S., PINTO, A. C. (2016). The genus *Psychotria*: Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and biological properties. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(8), 1355 – 1378.

CAVILL, G. W. K., FORD, D. L., LOCKSLEY, H. D. (1956). The chemistry of ants. I. Terpenoid constituents of some Australian *Iridomyrmex* species. *Australian Journal of Chemistry*, 9(2), 288 – 293.

CHASE, M. W., CHRISTENHUSZ, M. J. M., FAY, M. F., BYNG, J. W., JUDD, W. S., SOLTIS, D. E., MABBERLEY, D.J., SENNIKOV, A.N., SOLTIS, P. S., STEVENS, P. F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1 – 20.

CONTIN, A., VAN DER HEIJDEN, R., LEFEBER, A. W., VERPOORTE, R. (1998). The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS letters*, 434(3), 413 – 416.

DE LUCA, V., SALIM, V., THAMM, A., MASADA, S. A., YU, F. (2014). Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: progress on pathway elucidation. *Current opinion in plant biology*, 19, 35 – 42.

DELLAGRECA, M., DI MARINO, C., ZARRELLI, A., D'ABROSCA, B. (2004). Isolation and Phytotoxicity of Apocarotenoids from *Chenopodium album*. *Journal of natural products*, 67(9), 1492 – 1495.

DELPRETE, P. G., CORTÉS-B, R. (2004). A phylogenetic study of the tribe Sipaneeae (Rubiaceae, Ixoroideae), using trnL-F and ITS sequence data. *Taxon*, 53(2), 347 – 347.

Dinda, B., Debnath, S., & Banik, R. (2011). Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(7), 803-833.

DOBLER, S., PETSCHENKA, G., PANKOKE, H. (2011). Coping with toxic plant compounds—the insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides. *Phytochemistry*, 72(13), 1593 – 1604.

EL-SAYED, M., VERPOORTE, R. (2007). *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochemistry Reviews*, 6(2-3), 277 – 305.

FRAGA, B. M. (1992). Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports*, 9(6), 557 – 580.

GNONLONFIN, G. B., SANNI, A., BRIMER, L. (2012). Review scopoletin—a coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 47 – 56.

GRUBER, T. (2015). Vergleichende phytochemische Untersuchungen an ausgewählten Arten der Gattung *Psychotria* (Rubiaceae), Diplomarbeit, Universität Wien.

GUO, A. J., CHOI, R. C., ZHENG, K. Y., CHEN, V. P., DONG, T. T., WANG, Z. T., ... TSIM, K. W. K. (2012). Kaempferol as a flavonoid induces osteoblastic differentiation via estrogen receptor signaling. *Chinese medicine*, 7(1), 10.

HARBORNE, J. B., BAXTER, H. (1999). *The handbook of natural flavonoids. Volume 1 and Volume 2*. John Wiley and Sons.

HEGNAUER, R. (2013). *Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Band 3: Dicotyledoneae: Acanthaceae—Cyrillaceae* (Vol. 18). Springer-Verlag.

HU, L., WANG, K., WANG, Z., LIU, J., WANG, K., ZHANG, J., ... ZHANG, Y. (2016). A New Megastigmane sesquiterpenoid from *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. *Molecules*, 21(3), 383.

HUANG, X. X., ZHOU, C. C., LI, L. Z., PENG, Y., LOU, L. L., LIU, S., ... SONG, S. J. (2013). Cytotoxic and antioxidant dihydrobenzofuran neolignans from the seeds of *Crataegus pinnatifida*. *Fitoterapia*, 91, 217 – 223.

HUNTER, W. N. (2007). The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21573 – 21577.

HUNTER, W. N., BOND, C. S., GABRIELSEN, M., KEMP, L. E. (2003). Structure and reactivity in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis, *Biochemical Society Transactions*, 31(3), 537 – 542.

ITO, N., ETOH, T., HAGIWARA, H., KATO, M. (1997). Novel synthesis of degradation products of carotenoids, megastigmatrienone analogues and blumenol-A. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1(10), 1571 – 1580.

JANSEN, S., DESSEIN, S., PIESSCHAERT, F., ROBBRECHT, E., SMETS, E. (2000). Aluminium accumulation in leaves of Rubiaceae: systematic and phylogenetic implications. *Annals of Botany*, 85(1), 91 – 101.

KÄHLIG, P. (2018). Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen aus *Psychotria goldmannii*, Diplomarbei, Universität Wien.

KATO-NOGUCHI, H., TAMURA, K., SASAKI, H., SUENAGA, K. (2012). Identification of two phytotoxins, blumenol A and grasshopper ketone, in the allelopathic Japanese rice variety Awaakamai. *Journal of Plant Physiology*, 169(7), 682 – 685.

KAWASE, M., SAKAGAMI, H., MOTOHASHI, N., HAUER, H., CHATTERJEE, S. S., SPENGLER, G., VIGYIKANNE, A. V., MOLNAR, A., MOLNAR, J. (2005). Coumarin derivatives with tumor-specific cytotoxicity and multidrug resistance reversal activity. *In Vivo*, 19(4), 705 – 711.

- KIEHN, M. (1995). Chromosome survey of the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 398 – 408.
- KIEHN, M. (2010). Chromosomes of Neotropical Rubiaceae. I: Rubioideae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 91 – 105.
- KOZAK, F. (2017). Isolierung und Analyse von Sekundärstoffen aus *Psychotria torresiana* Standl., Bachelorarbeit, Universität Wien.
- KREIS, W. (2007). Prinzipien des Sekundärstoffwechsels. In *Pharmakognosie—Phytopharmazie*, Springer, Berlin, Heidelberg. 3 – 30.
- KWON, J. H., KIM, S. B., PARK, K. H., LEE, M. W. (2011). Antioxidative and anti-inflammatory effects of phenolic compounds from the roots of *Ulmus macrocarpa*. *Archives of Pharmacological Research*, 34(9), 1459.
- LAU, T. (2008). A Healthy Way to Live: The occurrence, bioactivity, biosynthesis, and synthesis of kaempferol. *Chemistry*, 150, 1 – 3.
- LEAL, M. B., ELISABETSKY, E. (1996). Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 54(1), 37 – 40.
- LIU, X., TIAN, F., ZHANG, H. B., PILARINOU, E., MCLAUGHLIN, J. L. (1999). Biologically active blumenol A from the leaves of *Annona glabra*. *Natural Product Letters*, 14(1), 77 – 81.
- LLANOS, G. G., VARELA, R. M., JIMÉNEZ, I. A., MOLINILLO, J. M., MACIAS, F. A., BAZZOCHI, I. L. (2010). Metabolites from *Withania aristata* with potential phytotoxic activity. *Natural Product Communications*, 5(7), 1043 – 1047.
- LOPES, S., VON POSER, G. L., KERBER, V. A., FARIAS, F. M., KONRATH, E. L., MORENO, P., HENRIQUES, A. T. (2004). Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(12), 1187 – 1195.
- MARTINS, D., NUNEZ, C. V. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*, 20(7), 13422 – 13495.
- MCGARVEY, D. J., CROTEAU, R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1015.
- MENDES-PINTO, M. M. (2009). Carotenoid breakdown products—the norisoprenoids—in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 236 – 245.

MONGRAND, S., BADOC, A., PATOUILLE, B., LACOMBLEZ, C., CHAVENT, M., BESSOULE, J. J. (2005). Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry*, 66(5), 549 – 559.

NASCIMENTO, A. F., CONSTANTINO, M. G., DONATE, P. M. (2012). Total synthesis of aripuanin, a megastigmane from *Ficus aripuanensis*. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 4(4), 253 – 262.

O'CONNOR, S. E., MARESH, J. J. (2006). Chemistry and biology of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports*, 23(4), 532 – 547.

PIMENTA, A. T., UCHÔA, D. E., BRAZ-FILHO, R., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S. (2011). Alkaloid and other chemical constituents from *Psychotria stachyoides* Benth. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(11), 2216 – 2219.

PLAGG, M. (2012). Chemotaxonomische Beiträge zur Gliederung der Gattung *Psychotria* L. Diplomarbeit, Universität Wien.

POUSSET, J. L., POISSON, J. (1969). Vomifoliol: terpene alcohol isolated from leaves of *Rauvolfia vomitoria* Afz. *Tetrahedron letters*, 15(9), 1173.

PUNGITORE, C. R., AYUB, M. J., BORKOWSKI, E. J., TONN, C. E., CIUFFO, G. M. (2004). Inhibition of Taq DNA polymerase by catalpol. *Cellular and Molecular Biology*, 50(6), 767 – 772.

RAFFAUF, R. F. (1996). *Plant alkaloids: a guide to their discovery and distribution*. Food Products Press.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G., TAYLOR, C. M., WIKSTRÖM, N., PAILLER, T., KHODABANDEH, A., BREMER, B. (2014). Phylogeny and generic limits in the sister tribes Psychotrieae and Palicoureeae (Rubiaceae): Evolution of schizocarps in *Psychotria* and origins of bacterial leaf nodules of the Malagasy species. *American journal of botany*, 101(7), 1102 – 1126.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G., RYDIN, C., BREMER, B. (2008). Evolution and trends in the Psychotrieae alliance (Rubiaceae)—A rarely reported evolutionary change of many-seeded carpels from one-seeded carpels. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1), 207 – 223.

RIVIER, L., LINDGREN, J. E. (1972). “Ayahuasca,” the South American hallucinogenic drink: An ethnobotanical and chemical investigation. *Economic Botany*, 26(2), 101 – 129.

ROBBRECHT, E., MANEN, J. F. (2006). The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on rbcL, rps16,

trnL-trnF and atpB-rbcL data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. *Systematics and Geography of Plants*, 85 – 145.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M., BORONAT, A. (2015). Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 17 – 22.

SCHMIDTBAUER, L. B. (2017) Untersuchung der Bioaktivität von Inhaltsstoffen der *Palicourea goldmanii* Standl. Bachelorarbeit, Universität Wien.

SCHWINDL, S., KRAUS, B., HEILMANN, J. (2017). Phytochemical study of *Juglans regia* L. leaves. *Phytochemistry*, 144, 58 – 70.

SEIPOLD, L. (2004). Blütenöle: Chemische Analyse, Biosynthese und Betrachtungen zur Entstehung von Ölblumen. Doktorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

SKOUROUMOUNIS, G. K., WINTERHALTER, P. (1994). Glycosidically bound norisoprenoids from *Vitis vinifera* cv. Riesling leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(5), 1068 – 1072.

TAKASHIMA, J., IKEDA, Y., KOMIYAMA, K., HAYASHI, M., KISHIDA, A., OHSAKI, A. (2007). New constituents from the leaves of *Morinda citrifolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(2), 343 – 345.

TAN, M. A., PANGHULAN, G. F. M., UY, M. M., TAKAYAMA, H. (2014). Chemical Constituents from *Psychotria cadigensis* and their chemotaxonomic relevance. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 1(4), 18 – 19.

TAN, M. A., EUSEBIO, J. A., VILLACORTA, R. A. P., KOGURE, N., TAKAYAMA, H., ALEJANDRO, G. J. D. (2013) Isolation and Identification of Vomifoliol from Two Endemic Philippine Rubiaceae Species, *Psychotria gitingensis* and *Villaria odorata*. *Asia-Pacific Journal of Science, Mathematics and Engineering*, 1(1), 2244 – 5471

TAN, M. A., EUSEBIO, J. A., ALEJANDRO, G. J. D. (2012). Chemotaxonomic implications of the absence of alkaloids in *Psychotria gitingensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, (45), 20 – 22.

TANAKA, Y., DATA, E. S., HIROSE, S., TANIGUCHI, T., URITANI, I. (1983). Biochemical changes in secondary metabolites in wounded and deteriorated cassava roots. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(4), 693 – 700.

TEPONNO, R. B., KUSARI, S., SPITELLER, M. (2016). Recent advances in research on lignans and neolignans. *Natural Product Reports*, 33(9), 1044 – 1092.

TRAPP, S. C., CROTEAU, R. B. (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 158(2), 811 – 832.

TSASI, G., SAMARA, P., TSITSILONIS, O., JÜRGENLIEMK, G., SKALTSA, H. (2016). Isolation, identification and cytotoxic activity of triterpenes and flavonoids from green walnut (*Juglans regia* L.) pericarps. *Records of Natural Products*, 10(1).

VALVERDE, J., TAMAYO, G., HESSE, M. (1999). β -Carboline monoterpenoid glucosides from *Palicourea adusta*. *Phytochemistry*, 52(8), 1485 – 1489.

VOGT, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2 – 20.

WHELAN, J. (2008). Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits. *The Journal of Nutrition*, 139(1), 5 – 10.

WINK, M. (2014). Evolution of secondary metabolism in plants. *Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions*, 38 – 48.

WINK, M. (2008). Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural Product Communications*, 3(8), 1205-1216.

YANG, L. L., LI, H. L., WEI, L., YANG, T., KUANG, D. Y., LI, M. H., LIAO, Y., CHEN, Z., WU, H., ZHANG, S. Z. (2016). A supermatrix approach provides a comprehensive genus-level phylogeny for Gentianales. *Journal of Systematics and Evolution*, 54(4), 400 – 415.

ZI, J., MAFU, S., PETERS, R. J. (2014). To gibberellins and beyond! Surveying the evolution of (di) terpenoid metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 259 – 286.