



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Vergleichende phytochemische Untersuchungen an  
ausgewählten Arten der Gattung *Psychotria*  
(Rubiaceae)

verfasst von

Theresa Gruber

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 190 406 445  
Studienrichtung lt. Studienblatt: Lehramtsstudium  
UF Mathematik  
UF Biologie und Umweltkunde  
Betreut von: ao. Univ.- Prof. Dr. Karin Vetschera







# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Systematik, Taxonomie und Morphologie der Gattung <i>Psychotria</i> L.....	2
2.1.	Die Ordnung Gentianales .....	3
2.2.	Die Familie der Rubiaceae .....	3
2.3.	Einordnung der untersuchten Artengruppe innerhalb der Rubiaceae.....	4
3	Phytochemische Aspekte .....	6
3.1.	Isoprenoide und deren Biosynthese.....	6
3.1.1.	Zwei alternative Biosynthesewege führen zur Bildung von IPP und DMAPP..	7
3.2.	Iridoide .....	9
3.2.1.	Bioaktive Wirkung von Iridoiden und deren Rolle in der Pflanze .....	12
3.2.2.	Pharmakologische Wirkung .....	13
3.3.	Hydroxyzimtsäuren.....	13
4	Material und Methoden.....	15
4.1.	Pflanzenmaterial.....	15
4.2.	Analytische Methoden .....	16
4.2.1.	Dünnschichtchromatographie .....	16
4.2.2.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	16
4.2.3.	Kernspinresonanzspektroskopie .....	17
4.2.4.	Massenspektrometrie.....	18
4.3.	Präparative Methoden .....	18
4.3.1.	Säulenchromatographie.....	18
4.3.2.	Gel-Permeations-Chromatographie .....	19
5	Extraktion und Isolierung.....	20
5.1.	Extraktion .....	20
5.2.	<i>Psychotria mortoniana</i> .....	21
5.3.	<i>Psychotria pilosa</i> .....	22
5.4.	<i>Psychotria poeppigiana</i> .....	22
5.5.	Vergleichende Analysen .....	23
6	Ergebnisse und Diskussion .....	24
6.1.	<i>Psychotria mortoniana</i> .....	24
6.1.1.	Anmerkungen zur Detektion von Kaffeesäure.....	25
6.1.2.	Anmerkungen zu einer möglichen photochemisch katalysierten Bildung der Swerosid-Kaffeesäure .....	25
6.2.	<i>Psychotria pilosa</i> .....	26
6.3.	<i>Psychotria poeppigiana</i> .....	26
6.4.	Vergleichende Analysen .....	26
6.4.1.	<i>Psychotria mortoniana</i> .....	29
6.4.2.	<i>Psychotria pilosa</i> .....	30
6.4.3.	<i>Psychotria poeppigiana</i> .....	30

6.4.4. <i>Psychotria chiapensis</i> .....	32
6.4.5. <i>Psychotria capitata</i> .....	32
6.5. Konklusio im Hinblick auf chemosystematische Aspekte.....	33
7 Literaturverzeichnis.....	34
8 Anhang.....	39
8.1. Zusammenfassung.....	39
8.2. Abstract.....	40
8.3. Herbarbelege.....	41
8.4. NMR-Datenblätter.....	47
8.5. Danksagung.....	50
8.6. Curriculum Vitae.....	51

# 1 Einleitung

Die Gattung *Psychotria* zählt zur Familie der Rubiaceae und ist eine besonders diverse Artengruppe und aufgrund ihrer pantropischen Verbreitung sowie der morphologischen Ähnlichkeit einzelner Arten systematisch schwer abzugrenzen. Traditionell wurde aufgrund von morphologischen Merkmalen eine systematische Klassifizierung und Einordnung innerhalb der Subfamilie der Rubioideae getroffen. Aufgrund von neueren molekularbiologischen Daten wurden viele dieser Einordnungsversuche revidiert und einzelne Arten und Artengruppen in neue Verwandtschaftsverhältnisse gestellt. Die Tribus Palicoureeae, der auch alle untersuchten Arten angehören, umfasst laut Robbrecht & Manen (2006) die neotropischen Gattungen *Carapichea*, *Margaritopsis*, *Notopleura*, *Palicourea*, *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* und *Rudgea*, die pantropische Gattung *Geophila* und die paläotropischen Gattungen *Hymenocoleus* und *Chassalia*. Viele Vertreter dieser Gattungen akkumulieren Sekundärmetaboliten, die der Stoffklasse der Alkaloide zugeordnet werden können, wohingegen Vertreter der Tribus Psychotrieae Tannine und als Nebenkomponenten Metaboliten aus der chemischen Klasse der Iridoide enthalten (Berger, 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit werden phytochemische Analysen an fünf ausgewählten *Psychotria*-Arten durchgeführt um herauszufinden, ob Muster in der Akkumulation bestimmter sekundärer Inhaltsstoffe vorliegen bzw. um die bestehende Annahme der Akkumulation von Iridoiden in der entsprechenden Artengruppe (Berger, 2012) zu überprüfen. Durch Isolierung von Inhaltsstoffen aus den Rohextrakten getrockneter Blätter soll eine phytochemische Charakterisierung der einzelnen Arten erfolgen. Weiters sollen durch vergleichende Analysen mehrerer Individuen der untersuchten Arten allfällige Differenzierungen in deren phytochemischen Profilen erfasst werden.

## 2 Systematik, Taxonomie und Morphologie der Gattung *Psychotria* L.

Die Gattung *Psychotria* gehört der Familie der Rubiaceae an. Sie ist in tropischen Regionen verbreitet und mit ihren 1000 – 1650 Arten weltweit eine der größten Gattungen der Angiospermen (Lopes et al., 2004). Weil *Psychotria* taxonomisch höchst komplex ist, erwies sich eine systematische Einordnung anhand von morphologischen Merkmalen oder geographischen Verbreitungsmustern bisher als problematisch. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden fünf Arten der Gattung *Psychotria* untersucht, nämlich *P. mortoniana* Standl., *P. pilosa* Ruiz & Pav., *P. poeppigiana* Müll. Arg., *P. chiapensis* Standl. (= *Palicourea tetragona* (Donn. Sm.) C. M. Taylor & Lorence) und *P. capitata* Ruiz & Pav. Im folgenden Kapitel soll zunächst ein Überblick über die Morphologie und die systematische Einordnung dieser Arten gegeben werden.



**Abb. 1: Morphologie der untersuchten Arten:** l.o.: Blütenstände von *P. mortoniana*, r.o.: Hochblätter von *P. capitata*, l.u.: Blütenstand mit roten Hochblättern von *P. poeppigiana*, r.u.: Fruchstand von *P. pilosa* (Fotos: A. Berger)

## 2.1. Die Ordnung Gentianales

Die Familie der Rubiaceae gehört im Sinne der Klassifizierung der „Angiosperm Phylogeny Group III“ (2009) innerhalb der Klasse der Bedecktsamigen Pflanzen (Magnoliopsida) zu den Euasteriden I (Lamiids). Sie wird weiters in die Ordnung Gentianales Juss. ex Brecht. & J. Presl gestellt, die aus den fünf Familien Apocynaceae, Gelsemiaceae, Gentianaceae, Loganiaceae und Rubiaceae besteht. Neue molekularbiologische Daten bestätigen diese Aufteilung (Angiosperm Phylogeny Group III, 2009; Backlund et al., 2000). Morphologische Gemeinsamkeiten von Vertretern der Gentianales sind u.a. eine gegenständige ganzrandige Beblätterung und radiärsymmetrische, häufig fünfzählige Blüten. Nebenblätter können vorhanden sein (Backlund et al., 2000).

## 2.2. Die Familie der Rubiaceae

Die Familie der Kaffeegewächse bzw. Rötengewächse (Rubiaceae Juss.) ist eine monophyletische Gruppe (Bremer, 1996; Robbrecht & Manen, 2006) und repräsentiert mit ungefähr 620 Gattungen und schätzungsweise 13.000 Arten eine der fünf größten Familien der Magnoliopsida (Bremer & Eriksson, 2009). Vertreter der Rubiaceae kommen auf allen Kontinenten vor, mit einigen Arten von *Coprosma*, *Galium* und *Sherardia* sogar in der Antarktis. Die meisten Taxa sind jedoch tropisch und subtropisch. In den Tropen sind die meisten Arten der Rubiaceae kleine Bäume oder Sträucher, seltener hohe Bäume oder Lianen, wohingegen in temperaten Klimazonen annuelle oder perennierende krautige Pflanzen dominieren. Man findet Vertreter der Familie in allen Habitaten, die meisten Arten leben jedoch terrestrisch, wenige epiphytisch oder aquatisch. Die Familie der Rubiaceae wird morphologisch durch eine Kombination aus vegetativen und generativen Merkmalen charakterisiert: gegenständig oder kreuzgegenständig angeordnete ganzrandige Laubblätter, miteinander verwachsene Nebenblätter (= Interpetiolarstipel), zweigeschlechtliche, radiärsymmetrische, tetrazyklische 4-5-zählige Blüten und ein unterständiger Fruchtknoten mit zwei Karpellen (Delprete, 2004).

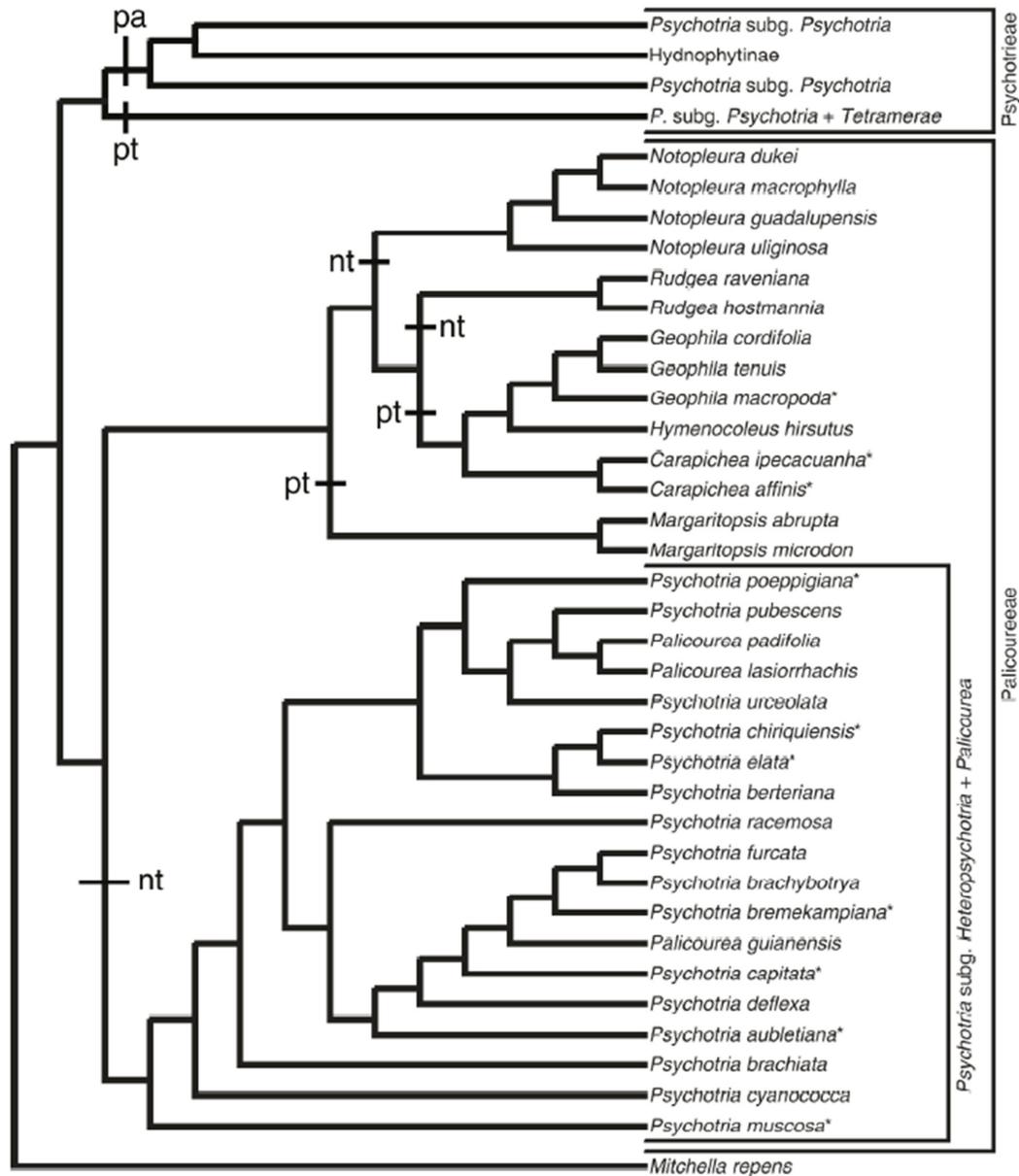
### 2.3. Einordnung der untersuchten Artengruppe innerhalb der Rubiaceae

Die Familie der Rubiaceae wurde zunächst in vier Unterfamilien geteilt: die Antirheoideae, Cinchonoideae, Rubioideae und Ixoroideae. Erstere stellte sich im Zuge von molekularbiologischen Untersuchungen aber als polyphyletisch heraus (Bremer & Manen, 2000) und wurde demnach ausgegliedert. Delprete (2004) geht demzufolge von drei Unterfamilien der Rubiaceae aus: den Cinchonoideae, Ixoroideae und Rubioideae. Robbrecht & Manen (2006) beschreiben hingegen im Rahmen einer Studie mit 300 Gattungen nur zwei Hauptkladen der Rubiaceae: die Cinchonoideae und Rubioideae.

Die Beschreibung der Unterfamilie Rubioideae, in die auch die untersuchte Artengruppe einzuordnen ist, blieb über Jahrzehnte konstant. Zu den Merkmalen dieser Gruppe zählen ein holziger oder krautiger Habitus, Einlagerung von Raphiden, also feinen Kristallen aus Kalziumoxalat in Blättern, zumeist valvate Knospendeckung, Heterostylie in den Blütenständen, hohe Ploidiegrade und Aluminium-Akkumulation. Die Rubioideae bestehen aus zwei Hauptkladen, sogenannten „Supertribes“, den überwiegend krautigen Rubioidinae und den überwiegend holzigen Psychotriidinae. Letztere wird auch „*Psychotrieae alliance*“ genannt und ist ein monophyletisches Taxon, zu dem acht Triben gehören: die Cratispermeae, Gaertnereae, Mitchelleae, Morindeae, Palicoureeae, Prismatomerideae, Psychotrieae und Schradereae (Berger, 2012). Durch jüngere makromolekular-phylogenetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Gattung *Psychotria* hochgradig paraphyletisch und taxonomisch sehr komplex ist und somit eine Zuordnung zu den einzelnen Triben erschwert wird.

Petit (1964, 1966) und Steyermark (1972) schlugen eine Gliederung der Gattung *Psychotria* in drei Untergattungen vor: *Psychotria* subg. *Psychotria*, *Psychotria* subg. *Tetramerae* und *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* (Lopes et al., 2004). Im Sinne der Klassifizierung der acht Triben der „*Psychotrieae alliance*“ sind also in der Tribus Palicoureeae die neotropischen Gattungen *Carapichea*, *Margaritopsis*, *Notopleura*, *Palicourea*, *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* und *Rudgea*, die pantropische Gattung *Geophila* sowie die paläotropischen Gattungen *Hymenocoleus* und *Chassalia* enthalten (Robbrecht & Manen, 2006). Morphologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass noch weitere Gattungen zu dieser Tribus gehören. Eine Eingliederung wurde aber aufgrund von unzureichenden Daten nicht vorgenommen. Die Tribus Psychotrieae hingegen umfasst die Untergattungen *Psychotria* subg. *Psychotria*, *Psychotria* subg. *Tetramerae* und weitere Gattungen (Berger, 2012). Im Stammbaum der folgenden Abbildung 2 werden die beschriebenen Verwandtschaftsverhältnisse aufgezeigt. Sowohl

die Arten *P. capitata* und *P. poeppigiana* als auch die nicht in der Abbildung angeführten Arten *P. mortoniana*, *P. pilosa* und *P. chiapensis* sind Vertreter der *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* und gehören somit der Tribus Palicoureeae an.



**Abb. 2: Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Triben Palicoureeae und Psychotrieae:** nt = neotropisch, pa = pazifisch, pt = pantropisch. Die untersuchten Arten *P. poeppigiana* und *P. capitata* sind in der Artengruppe *Psychotria* sug. *Heteropsychotria + Palicourea* vertreten (Berger, 2012).

### 3 Phytochemische Aspekte

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit aus *Psychotria*-Arten isolierten Stoffe gehören der Naturstoffklasse der Iridoide an. Iridoide sind cyclische Monoterpene und können somit in die große Gruppe der Isoprenoide eingeordnet werden.

#### 3.1. Isoprenoide und deren Biosynthese

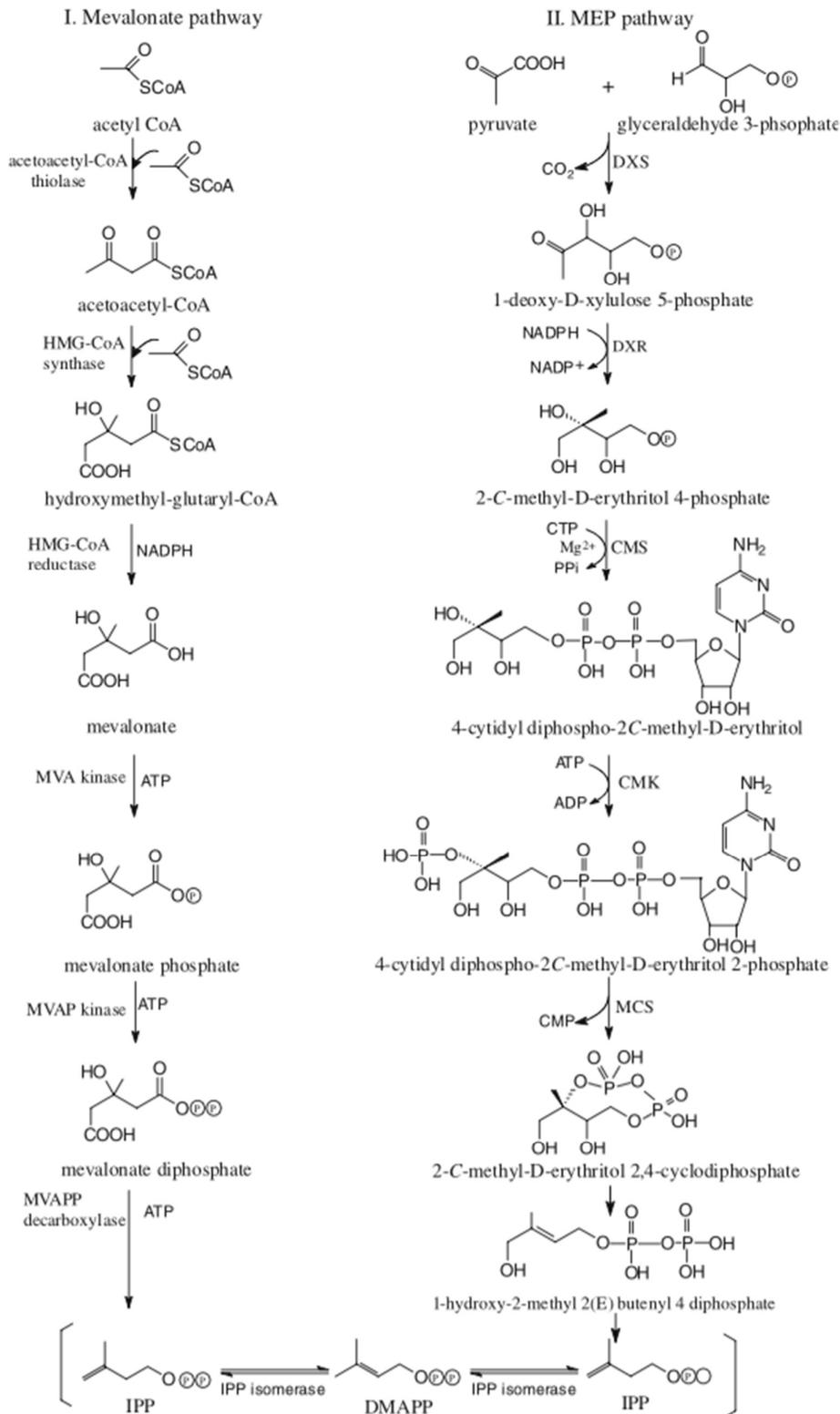
Die Stoffklasse der Isoprenoide bzw. Terpene ist die größte Familie von Naturstoffen mit mehr als 30.000 bekannten Substanzen und zugleich eine höchst diverse Gruppe an Metaboliten (El-Sayed & Verpoorte, 2007). Obwohl Isoprenoide in allen Organismen produziert werden, kommen sie besonders in höheren Pflanzen in großer Fülle und Vielfaltigkeit vor. Viele dieser pflanzlichen Isoprenoide können als Primärmetaboliten bezeichnet werden, da sie essentiell für den Stoffwechsel sind. Diese essentiellen Komponenten spielen beispielsweise eine tragende Rolle in der Bildung von Membranen (Sterole), in der Atmung (Ubichinone), in der Photosynthese (Chlorophylle, Carotinoide, Prenylchinone) und in der Regulation von Wachstum und Entwicklung (Cytokinine, Gibberelline, Strigolactone) und kommen deshalb in fast allen Pflanzenarten vor. Die meisten der in Pflanzen vorkommenden Isoprenoide sind jedoch Sekundärmetaboliten, d.h. nicht-essentielle Verbindungen mit spezialisierten Funktionen in biotischen und allelopathischen Interaktionen. Sie fungieren beispielsweise als Toxine oder Abwehrstoffe gegen Pathogene und Herbivoren, als Komponenten zum Schutz vor UV-Strahlung bzw. Verdunstung oder als Lockstoffe. Diese sekundären pflanzlichen Isoprenoide oder deren Kombinationen sind üblicherweise nur in bestimmten Pflanzenfamilien und/oder bestimmten Organen charakteristisch und spielen demnach eine entscheidende Rolle in Systematik und Chemotaxonomie (Rodriguez-Concepcion & Boronat, 2015). Eine Vielzahl an sekundären Isoprenoiden hat zudem ökonomische Relevanz als Medikamente, Geschmacksstoffe, Pigmente, Duftstoffe oder Insektizide (El-Sayed & Verpoorte, 2007).

Formal sind sämtliche Isoprenoid-Arten aus denselben  $C_5$ -Einheiten aufgebaut, nämlich aus Bausteinen des Moleküls Isopren. Durch Kondensation dieser Einheiten zu Prenyldiphosphatmolekülen entsteht eine Vielzahl an Verbindungen definierter Kettenlänge: Monoterpene sind demnach  $C_{10}$ -Körper, die durch Kondensation zweier  $C_5$ -Einheiten entstehen. Sesquiterpene sind  $C_{15}$ -Körper aus drei  $C_5$ -Einheiten, Diterpene  $C_{20}$ -Körper aus vier  $C_5$ -Einheiten usw. (Rodriguez-Concepcion & Boronat, 2015). In

diesem Zusammenhang gilt die Isoprenregel, die besagt, dass man durch schematische Ringöffnung eines Terpens acyclische Strukturformeln erhält, die sich formal in Isoprenbausteine zerlegen lassen, die also in bestimmten Abständen an C<sub>4</sub>-Resten Methylgruppen tragen (Hänsel & Sticher, 2010). Als Starterverbindungen für die Biosynthese aller Terpene, also auch aller Monoterpene fungieren die beiden Moleküle Isopentenylidiphosphat (IPP) und sein Doppelbindungsisomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), wobei die Isomerisation durch das Enzym IPP-Isomerase katalysiert wird. Aus je einem Molekül IPP und DMAPP entsteht durch Kopf-Schwanz-Kondensation Geranylidiphosphat (GPP), der Ausgangsstoff für die Monoterpene einschließlich der Iridoide (El-Sayed & Verpoorte, 2007). Monoterpene kommen als acyclische, meist jedoch als mono- oder bicyclische Verbindungen vor (Nuhn, 2006).

### 3.1.1. Zwei alternative Biosynthesewege führen zur Bildung von IPP und DMAPP

Die Bildung von IPP als Ausgangssubstanz für alle Isoprenoide kann auf zwei unterschiedliche nicht-verwandte Biosynthesewegen erfolgen: einerseits auf dem klassischen Mevalonat-Weg (MVA-Weg), der im Zytoplasma und in den Mitochondrien stattfindet, andererseits auf einem erst später entdeckten alternativen Biosyntheseweg, dem sogenannten Methylerythritol-4-Phosphat-Weg (MEP-Weg), der in den Plastiden abläuft. Im Zuge des MVA-Wegs werden zunächst zwei Moleküle Acetyl-CoA durch katalytische Tätigkeit des Enzyms Acetoacetyl-CoA-Thiolase verbunden und im Folgenden durch weitere Reaktionen Mevalonat und schließlich IPP gebildet (siehe Abbildung 3). In höheren Pflanzen werden via MVA-Weg typischerweise Sesquiterpene, Triterpene und Sterole hergestellt. Der Mevalonat-unabhängige Biosyntheseweg (MEP-Weg) geht von der Kondensation von Pyruvat mit D-Glyceraldehyd-3-Phosphat aus, wodurch in weiteren Schritten 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DXP) und 2-C-Metyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP) und schließlich IPP entsteht (siehe Abbildung 3). Diese mittels MEP-Weg in den Plastiden hergestellte Ausgangsstoffe IPP bzw. sein Isomer DMAPP werden in Pflanzen in weiterer Folge für die Biosynthese von Monoterpenen, Diterpenen, Carotinoiden, Gibberellinen und Seitenketten der Chlorophylle verwendet (El-Sayed & Verpoorte, 2007; Rodriguez-Concepcion & Boronat, 2015).



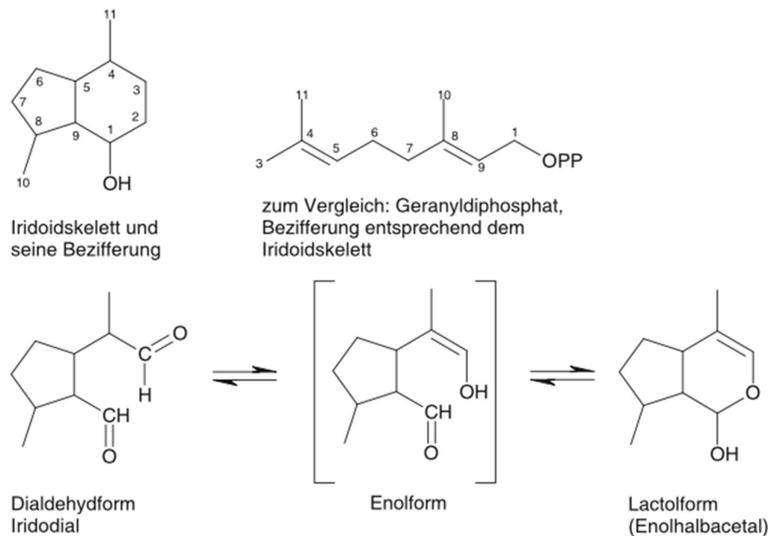
**Abb. 3: Biosynthese von IPP:** Die Abbildung zeigt die beiden alternativen Biosynthesewege, die zur Bildung von Isopentenylidiphosphat führen: den Mevalonat (MVA)-Weg und den Methylerythritol-5-Phosphat (MEP)-Weg mit den jeweils beteiligten Enzymen (El-Sayed & Verpoorte, 2007).

Obwohl durch Experimente in Pflanzenzellen ein beschränkter „crossflow“ von IPP und anderen isoprenoiden C-Körpern zwischen Plastiden und dem Zytoplasma und Interaktionen auf molekularbiologischer und metabolischer Ebene zwischen MVA- und MEP-Weg nachgewiesen werden konnte (Hemmerlin et al., 2012), besteht doch grundsätzlich eine Trennung der beiden Biosynthesewege in den unterschiedlichen Zellkompartimenten. Die Vorteile für höhere Pflanzen und manche Algen, Isoprenoide auf zwei alternativen Biosynthesewegen herstellen zu können, sind noch nicht vollständig geklärt. Es ist aber wahrscheinlich, dass durch die räumliche Trennung der beiden Wege eine optimale Versorgung mit metabolischen Ausgangsstoffen in den einzelnen Kompartimenten ermöglicht wird (Rodriguez-Concepcion & Boronat, 2015).

Die ersten Beschreibungen des Mevalonat-unabhängigen MEP-Biosynthesewegs stammen von Lichtenthaler et al. (1997) und Contin et al. (1998). Ein großes Interesse galt seither nicht nur der vollständigen Aufklärung der IPP-Biosynthese, sondern auch weiterer Isoprenoid-Biosynthesewege, wie der des Secologanins. Dieses sehr vielseitige Iridoid ist gemeinsam mit Tryptamin die Schlüsselverbindung für die Bildung von Strictosidin und der davon abgeleiteten Stoffgruppe der Monoterpen-Indol-Alkaloide (MIA) (O'Connor & Maresh, 2006), von denen eine Vielzahl bioaktiv und pharmakologisch interessant ist: Unter den MIA findet man beispielsweise die Chemotherapeutika Vinblastin und Vincristin aus *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) sowie Camptothecin aus *Camptotheca acuminata* (Cornaceae) und *Ophiorrhiza pumila* (Rubiaceae), das Antimalaria-Mittel Chinin aus *Cinchona ledgeriana* (Rubiaceae) und den blutdrucksenkenden Wirkstoff Ajmalicin aus *C. roseus* (De Luca et al., 2014).

### 3.2. Iridoide

Iridoide sind cyclische Monoterpene, die durch intramolekulare Ringschlussreaktion eines acyclischen Monoterpens entstehen (Habermehl et al., 2008). Dabei entsteht aus dem oben beschriebenen Geranyldiphosphat (GPP) das strukturelle Grundgerüst der iridoiden Verbindungen, das Iridodial ( $C_{10}H_{16}O_2$ ), eine Verbindung mit für Iridoide typischem Cyclopenta-[c]-pyranskelett (siehe Abbildung 4). Iridodial wurde erstmals aus dem Wehrsekret der Ameisenart *Iridomyrmex purpureus* isoliert (Cavill et al., 1956), die auch die Namensgeberin für die Stoffklasse der Iridoide ist.



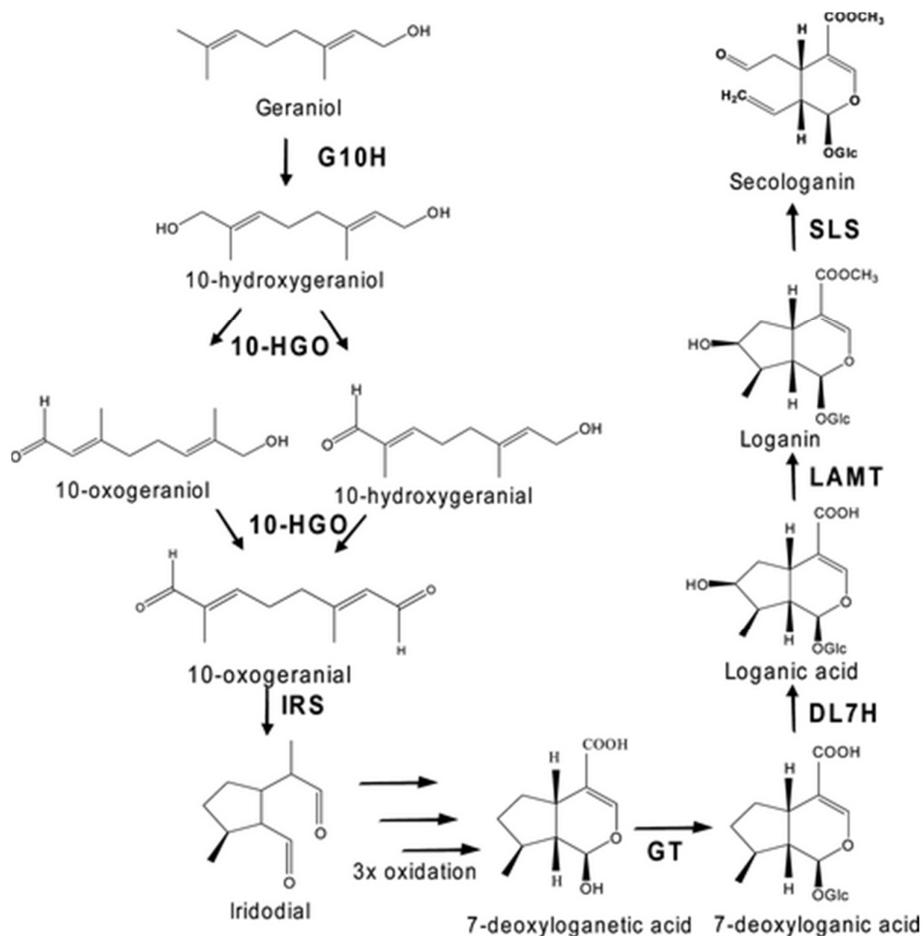
**Abb. 4: Iridodial als Grundkörper der Iridoide:** Abgebildet sind die Dialdehyd- und Lactolform von Iridodial, das durch eine intramolekulare Ringschlussreaktion aus GPP entsteht (Hänsel & Sticher, 2010).

Bisher wurden 2.500 – 3.000 vielfach bioaktive Iridoide aus Arten der Pflanzenfamilien Acanthaceae, Apocynaceae, Bignoniaceae, Caprifoliaceae, Gentianaceae, Lamiaceae, Laosaceae, Loganiaceae, Oleaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Valerianaceae und Verbenaceae isoliert (De Luca et al., 2014). Aufgrund ihrer chemischen Struktur können vier Hauptgruppen unterschieden werden: Iridoidglykoside, Secoiridoide bzw. Secoiridoidglykoside, nicht-glykosidische Iridoide (Aglykone) und Bisiridoide (Dobler et al., 2011).

Die Iridoidglykoside stellen dabei mit mehreren hundert identifizierten Strukturen die größte Gruppe der Iridoide dar. Alle Iridoidglykoside haben ein ähnliches Skelett: Sie sind cyclische monoterpenoide Verbindungen mit einem C<sub>8</sub>-, C<sub>9</sub>- oder C<sub>10</sub>-Körper, der am C-1-Atom mit einem Monosaccharid, üblicherweise mit β-D-Glukose, verbunden ist. Die Stoffgruppe der Iridoidglykoside weist eine hohe strukturelle Diversität auf, die auf unterschiedlichste funktionelle Gruppen wie verschiedene Zucker, Hydroxylierungen und Epoxidierungen am Monoterpen-Gerüst zurückzuführen sind (Dobler et al., 2011).

Secoiridoide entstehen durch oxidative Spaltung des Cyclopentanrings des iridoiden Grundkörpers. Verschiedene sekundäre Modifikationen des Secoiridoid-Skeletts wie Epoxidierung, Oxidation, Hydroxylierung und Veresterung führen zu einer großen Vielfalt an Verbindungen (Dinda et al., 2007b). Durch Glykosidierung am C-1-Atom, beispielsweise durch β-D-Glukose, werden analog zu den Iridoidglykosiden die

Secoiridoidglykoside gebildet. Eine der wichtigsten Verbindungen unter den Secoiridoiden ist das Secologanin, das als Ausgangssubstanz für die in Abschnitt 3.1.1. erwähnten, pharmazeutisch bedeutsamen Monoterpen-Indol-Alkaloide gilt. In Abbildung 5 ist die Biosynthese von Secologanin dargestellt. Ausgehend von Geraniol, das aus Geranyldiphosphat (GPP) gebildet wird, entsteht durch mehrere Oxidationsschritte Iridodial. Die Umwandlung und Cyclisierung von 10-Oxogeraniol zu Iridodial erfolgt dabei durch das NADPH-abhängige Enzym Iridoid-Synthase (IRS). Durch weitere chemische Reaktionen entstehen dann aus Iridodial Loganinsäure, Loganin und schließlich durch oxidative Ringöffnung Secologanin, wobei der letzte Schritt durch das Cytochrom P450-abhängige Enzym Secologanin-Synthase (SLS) katalysiert wird (Salim et al., 2013).



**Abb. 5: Biosynthese des Iridoids Secologanin:** Aus Geraniol entsteht durch die katalytische Wirkung mehrerer Enzyme Iridodial. Aus diesem wird durch weitere chemische Reaktionen zunächst Loganinsäure, dann Loganin gebildet. Das Enzym Secologanin-Synthase (SLS) katalysiert schließlich eine oxidative Spaltung des Cyclopentanrings, wodurch Secologanin entsteht (Salim et al., 2013).

### 3.2.1. Bioaktive Wirkung von Iridoiden und deren Rolle in der Pflanze

Ein selektiver Wert für Iridoid-produzierende Pflanzen liegt offensichtlich in deren protektiver Wirkung gegen Pathogene und Herbivoren. Wie viele andere Naturstoffe konnten Iridoide als Schlüsselmoleküle in Pflanzen-Insekten-Interaktionen aber auch in Interaktionen zwischen Insekten und deren Prädatoren identifiziert werden. Manche Komponenten wirken zunächst schon durch ihren bitteren Geschmack nachweislich abschreckend auf herbivore Insekten. Des Weiteren kann bei der Aufnahme von Iridoid- bzw. Secoiridoidglykosiden durch Fressfeinde ein toxischer Effekt durch die hydrolytische Abspaltung des Zuckers vom Iridoidglykosid durch das Enzym  $\beta$ -Glukosidase auftreten. Dabei tritt durch die mechanische Beanspruchung des Pflanzenmaterials das zunächst inaktive, in der Vakuole oder im Zytoplasma gespeicherte Iridoidglykosid mit der zuvor in einem separierten Zellkompartiment befindlichen  $\beta$ -Glukosidase in Berührung und wird dadurch zu einem äußerst reaktiven Aglykon umgewandelt. Dieses hat als Glutaraldehyd-ähnliche Verbindung starke denaturierende Eigenschaften auf Aminosäuren, Nucleinsäuren und Proteine im Verdauungstrakt der Herbivoren. Als Folge dessen konnten bei Iridoid- bzw. Secoiridoidglykosid fressenden Insekten verminderte Größen, eine Verlängerung des Larvalstadiums und geringere Überlebensraten durch reduziertes Fressverhalten bzw. durch toxische Effekte während der Verdauung nachgewiesen werden. (Dobler et al., 2011; Pungitore et al., 2004). Koudounas et al. (2015) beschreiben in diesem Zusammenhang das Abwehrsystem von *Olea europaea*, in welchem die Haupt-Secoiridoid-Komponente Oleuropein durch die hydrolytische Wirkung der  $\beta$ -Glukosidase zum toxischen Oleuropein-Aglykon umgewandelt wird.

Obwohl Iridoide in Bezug auf Insekten, die sich als Generalisten ernähren, im Allgemeinen abschreckend oder sogar toxisch wirken, trifft dies nicht auf Herbivoren zu, die sich auf den Verzehr von Iridoid-haltigen Pflanzenteilen spezialisiert haben. Dieses Phänomen wurde bereits in Studien über diverse Insektenarten aus den Ordnungen Lepidoptera und Coleoptera sowie über manche Blattlaus- und Blattwespenarten beschrieben. Diese Spezialisten sind nicht nur in der Lage Iridoid-haltige Nahrung zu verdauen, sondern können monoterpenoide Komponenten sogar speichern und akkumulieren („Sequestration“), um diese zu ihrem eigenen Schutz vor Prädatoren wie Vögel, Spinnen oder Ameisen zu verwenden. Wie vermutet wird, könnte also die Fähigkeit zur Akkumulation von Iridoiden einen erheblichen Selektionsvorteil für die betreffenden Insektenarten darstellen (Dobler et al., 2011).

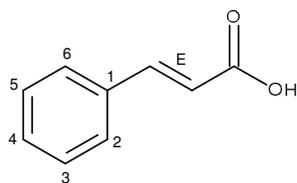
### 3.2.2. Pharmakologische Wirkung

Dinda et al. (2007a, 2007b, 2009, 2011) beschreiben eine Vielzahl an Strukturen kürzlich entdeckter Iridoide und belegen dabei in Zusammenhang mit deren bioaktiver Tätigkeit ein breites Spektrum an pharmakologischen Effekten, u.a. antibakterielle, antivirale, entzündungshemmende, antihepatotoxische sowie Antidiabetes- und Antitumor-Wirkung.

### 3.3. Hydroxyzimtsäuren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Addukt aus einem Iridoid und Kaffeesäure isoliert. In diesem Zusammenhang soll hier überblicksartig die chemische Klasse der Hydroxyzimtsäuren, der die Kaffeesäure angehört, beschrieben werden.

Die Hydroxyzimtsäuren und die Hydroxybenzoesäuren sind die beiden Hauptgruppen der Phenolsäuren bzw. Phenolcarbonsäuren, die sich strukturell durch jeweils mindestens einen aromatischen Ring und mindestens eine daran gebundene Hydroxygruppe auszeichnen. Phenolische Verbindungen inklusive der Phenolsäuren sind wichtige Sekundärmetaboliten in höheren Pflanzen, die im pflanzlichen Organismus zum Schutz gegen UV-Licht, Herbivoren und Pathogene dienen. Zu den Hydroxyzimtsäuren zählen die *o*-Cumarsäure, die *p*-Cumarsäure, die Kaffeesäure, die Ferulasäure, die Isoferulasäure und die Sinapinsäure. Diese sind in Abbildung 6 dargestellt.



Substituenten	
2-OH	<i>o</i> -Cumarsäure
4-OH	<i>p</i> -Cumarsäure
3,4-Di-OH	Kaffeesäure
3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	Ferulasäure
3-OH, 4-OCH <sub>3</sub>	Isoferulasäure
3,5-Di-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	Sinapinsäure

**Abb. 6: Die in der Natur häufig vorkommenden Hydroxyzimtsäuren:** Abgebildet ist das Grundgerüst dieser Stoffklasse und die Komponenten *o*-Cumarsäure, *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Isoferulasäure und Sinapinsäuren mit ihren jeweiligen Substituenten (*E* = *trans*). Die Kaffeesäure trägt am dritten und vierten C-Atom des aromatischen Rings jeweils eine Hydroxygruppe (Hänsel & Sticher, 2010).

Die Hydroxyzimtsäuren werden wie auch die Hydroxybenzoesäuren im Zuge des Shikimisäurewegs aus den Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin synthetisiert. Aus Zimtsäure bzw. p-Cumarsäure wird dabei durch Hydroxylierung des C-3- und C-4-Atoms des aromatischen Rings die Kaffeesäure gebildet (Heleno et al., 2015).

Die Kaffeesäure ist einer der am häufigsten in pflanzlicher Nahrung vorkommenden sekundären Pflanzenstoffe und findet sich beispielsweise in den Samen der Kaffeepflanze (Gattung *Coffea*) in besonders hohen Konzentrationen (Clifford, 1999). Die Kaffeesäure und vor allem auch die Ferulasäure sind wichtige Verbindungen in Bezug auf die Samenkeimung. Derartige Keimungshemmstoffe, sogenannte Blastokoline, sind z.B. dafür verantwortlich, dass die Samen nicht bereits in der Frucht keimen. In diesem Zusammenhang sei auch die allelopathische Wirkung der Kaffeesäure und Ferulasäure erwähnt, die das Wachstum von Konkurrenzpflanzen verhindern kann (Heleno et al., 2015; Nuhn, 2006).

Kaffeesäure besteht aus geruchlosen, weißen oder fast weißen Kristallen, die leicht in heißem Wasser oder Ethanol löslich sind. Auf Chromatogrammen ist die Kaffeesäure durch blaue Fluoreszenz im UV-Licht bei 365 nm erkennbar (Hänsel & Sticher, 2010). Wie viele andere Phenolsäuren zählt die Kaffeesäure zu den stark antioxidativ wirkenden Substanzen, die mit ihren Hydroxygruppen besonders wirksam freie Radikale binden können („Radikalfänger“). Sevgi et al. (2015) konnten in diesem Zusammenhang in Experimenten mit freien Radikalen für die Kaffeesäure sehr gute antioxidative Wirkung sowie sehr gute protektive Wirkung gegen DNA-Beschädigung durch UV-Strahlung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachweisen. Darüber hinaus wird vermutet, dass phenolische Verbindungen wie die Kaffeesäure auf zellulärer Ebene in Signaltransduktionsprozesse eingreifen und somit einen Multiplikationseffekt der antioxidativen Aktivität bewirken können.

## 4 Material und Methoden

### 4.1. Pflanzenmaterial

Das für die vorliegende Arbeit verwendete Pflanzenmaterial wurde bei phytochemischen Exkursionen nach Costa Rica im Juli 2008 sowie im November 2013 von Prof. H. Greger bzw. Dr. J. Schinnerl und anderen gesammelt. Die Pflanzenteile stammen aus Regenwaldgebieten nahe der Tropenstation La Gamba, die im „Regenwald der Österreicher“ am Rande des Nationalparks Piedras Blancas im Südwesten Costa Ricas liegt. Das Pflanzenmaterial wurde vor Ort bzw. in Wien identifiziert, getrocknet und mit Sammelnummern versehen. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Arten bzw. Individuen der Gattung *Psychotria* herangezogen:

**Tab. 1:** Die für die Isolierung und vergleichenden Analysen verwendeten Arten

Taxon	Sammelnr.	Herbarnr.	Sammelort	Organ	Menge
<i>Psychotria capitata</i>	HG 1907085	WU 0044520	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. capitata</i>	HG 1907086	WU 0044521	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. capitata</i>	HG 19070812	WU 0044522	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. capitata</i>	HG 2407089	WU 0067855	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. capitata</i>	HG 24070811	WU 0067846	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. capitata</i>	HG 24070812	WU 0067847	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. capitata</i>	HG 24070816	WU 0067856	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. capitata</i>	HG 2607085	WU 0067854	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. chiapensis</i>	HG 2807081	WU 0044578-9	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. mertoniana</i>	HG 1907084	WU 0044551-2	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. mertoniana</i>	HG 2207083	WU 0044549	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. mertoniana</i>	HG 2207084	WU 0044553	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. mertoniana</i>	HG 2207085		Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. mertoniana</i>	HG 2407083-5		Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	102 g
<i>P. mertoniana</i>	HG 2407087	WU 0044554-6	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. pilosa</i>	HG 1907087	WU 0074796	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. pilosa</i>	HG 2007087	WU 0074795	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. pilosa</i>	HG 2207089	WU 0074794	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	10.5 g
<i>P. pilosa</i>	HG 2607086	WU 0044557-8	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	24.4 g
<i>P. pilosa</i>	JS 2611131	W2014-0014447	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. poeppigiana</i>	HG 2607081	WU 0044514-5	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. poeppigiana</i>	HG 3007081	WU 0044516	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	100 mg
<i>P. poeppigiana</i>	JS 2611134	W2014-0014449	Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	2.6 g
<i>P. poeppigiana</i>	JS 2611135		Costa Rica. Puntarenas. La Gamba.	Blatt	2.1 g

## 4.2. Analytische Methoden

### 4.2.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wird oft zur Beurteilung des Trennerfolgs und zur Untersuchung von entstandenen Fraktionen im Anschluss an präparative Methoden eingesetzt. Unter Anwendung spezifischer Sprühreagenzien können auch erste Rückschlüsse auf die Struktur der entsprechenden Substanzen gezogen werden (Hänsel & Sticher, 2010). Der Trenneffekt in einzelne Komponenten entsteht dabei durch unterschiedlich starke Adsorptionwechselwirkungen der verschiedenen Substanzen mit dem Trägermaterial der stationären Phase.

Verwendet wurden 10cm breite mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten (Merck ® Silica gel 60 F<sub>254</sub> 20x20 cm), die nach mehrmaligem Auftrag der zu untersuchenden Substanz in eine mit einem geeigneten Laufmittel befüllte Trennkammer gestellt wurden. Als Laufmittel bzw. mobile Phase im Zuge der DC wurden je nach Polarität der zu trennenden Stoffe folgende Lösungsmittelgemische eingesetzt: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O im Verhältnis 80:20:1 bzw. CHCl<sub>3</sub>/MeOH im Verhältnis 70:30, die organische Phase von BuOH/H<sub>2</sub>O/AcOH im Verhältnis 5:4:1 und CH<sub>2</sub>Cl/MeOH im Verhältnis 80:20. Der Trennerfolg wurde einerseits unter UV-Detektion bei Wellenlängen von 254 nm und 366 nm, andererseits durch Besprühen der Platten mit Anisaldehyd-Reagenz bzw. Dragendorff-Reagenz analysiert. Anisaldehyd-Reagenz setzt sich aus 85 mL MeOH, 10 mL AcOH, 8mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 0.5 mL Anisaldehyd zusammen (nach Stahl, 1967; verändert). Nach dem Besprühen und Erhitzen der Platten kann durch unterschiedliche Farbreaktionen eine breite Gruppe an Naturstoffen nachgewiesen werden. Das Dragendorff-Reagenz wurde wie folgt hergestellt: Lösung A: 0.85 g Bismutsubnitrat in 10 mL AcOH + 40 mL H<sub>2</sub>O; Lösung B: 4 g Kaliumjodid in 10 mL H<sub>2</sub>O. Für das fertige Sprühreagenz wurden jeweils 5 mL der Lösungen A und B mit 10 mL AcOH und 80 mL H<sub>2</sub>O gemischt (nach Stahl, 1967; verändert). Dieses wird zur Detektion von Alkaloiden und tertiären Aminen eingesetzt.

### 4.2.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein weit verbreitetes chromatographisches Verfahren, das eine besonders rasche Trennung bei gleichzeitig hoher Trennschärfe ermöglicht. Die Trennsäule enthält ein feinkörniges Trägermaterial, durch das das zu untersuchende Substanzgemisch zusammen mit einem geeigneten

Eluenten unter hohem Eingangsdruck gepumpt wird (Latscha et al., 2004). Mit Hilfe der HPLC können Substanzen schnell und zuverlässig analysiert und identifiziert werden, indem man UV-Spektren und Retentionszeiten von gemessenen Peaks mit denen von Reinstoffen oder bereits bekannten UV-Spektren in einer Datenbank vergleicht.

Die im Zuge dieser Arbeit zu untersuchenden Proben wurden mit einem HPLC-Gerät Agilent 1100 Series gemessen, die UV-Detektion erfolgte durch einen Diodenarraydetektors (DAD). Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus wässrigem Puffer (A) mit 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 1.5 mM Tetrabutylammoniumhydroxid (nach Reisch et al., 1990; verändert) und Methanol (B) mit einem Gradienten von 15 - 100% verwendet. Zur Detektion einzelner Komponenten wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt: Hauptsächlich wurde mit Hilfe einer Agilent Hypersil BDS-C18 Trennsäule (4.6 x 250 mm, 5 µm Korngröße) unter Anwendung der Methode I (Tabelle 2a) gemessen, andererseits wurde aber auch mit Hilfe einer etwas kürzeren Säule (Agilent Hypersil BDS-C18, 4 x 100 mm, 3 µm Korngröße) die Methode II mit entsprechend abgeändertem Laufmittelgradienten (Tabelle 2b) angewandt. Das Einspritzvolumen lag bei Methode I bei 10 µL, bei Methode II bei 3 µL, die Durchflussrate bei 0.8 mL/min. Zur Detektion von Kaffeesäure wurde einmalig unter Anwendung von Methode III (Tabelle 2c) mit einer mobilen Phase aus einem wässrigen Puffer mit 10mM Ammoniumacetat (A) und Methanol (B) mit einem Gradienten von 40 – 100% gemessen. Die Durchflussrate lag in diesem Fall bei 1 mL/min, das Einspritzvolumen bei 10 µL.

**Tab. 2:** Laufmittelgradienten der verwendeten Methoden

Zeit [min]	A [Vol.%]	B [Vol.%]
0	85	15
15	40	60
20	0	100
25	0	100

a) Methode I

Zeit [min]	A [Vol.%]	B [Vol.%]
0	85	15
6	40	60
8	0	100
10	0	100

b) Methode II

Zeit [min]	A [Vol.%]	B [Vol.%]
0	60	40
12	10	90
12'1	0	100
16	0	100

c) Methode III

#### 4.2.3. Kernspinresonanzspektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) ist eines der wichtigsten Verfahren zur Strukturaufklärung von Molekülen und basiert auf magnetischen Eigenschaften, die der sogenannte Kernspin (Eigendrehimpuls) mancher Atomkerne erzeugt (Hart et al., 2007; Latscha et al., 2004). Dabei werden Proben in deuteriertem Lösungsmittel in ein starkes Magnetfeld gebracht und die Auswirkungen auf den Spin von <sup>1</sup>H- bzw. <sup>13</sup>C-

Kernen gemessen und analysiert. Alle NMR-Messungen wurden mit Hilfe eines Bruker DRX-400 AVANCE bzw. Bruker DRX-600 Spektrometers bei 400.13 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 100.61 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) in deuteriertem MeOH durchgeführt. Als Software wurde das Programm Topspin 1.3 verwendet. Die Messungen und Strukturaufklärungen der isolierten Substanzen wurden am Institut für Organische Chemie an der Universität Wien durchgeführt.

#### 4.2.4. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine analytische Methode, die es erlaubt Molekülmassen zu bestimmen und Strukturinformationen zu Komponenten aus bestehenden NMR-Messungen zu unterstützen bzw. zu bestätigen. Mit Hilfe eines Massenspektrometers werden Moleküle in Ionen überführt und nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis sortiert, wodurch die relative Anzahl jedes auftretenden Ions ermittelt werden kann (Hart et al., 2007). Alle Massenspektren wurden auf einem MaXis Spektrometer (Bruker Daltonics) unter Anwendung von Elektrospray Ionisation (ESI) am Institut für Organische Chemie der Universität Wien gemessen.

### **4.3. Präparative Methoden**

#### 4.3.1. Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie ist ein klassisches und phytochemisch das am häufigsten herangezogene Verfahren zur Trennung oder Reinigung von Substanzen. Der Trennvorgang erfolgt hierbei in einem nach unten verjüngten Glasrohr, das zuvor im Falle einer Flüssigchromatographie mit einer festen bzw. gelartigen stationären Phase befüllt wurde. Das zu trennende Substanzgemisch wird am oberen Ende der Säule aufgetragen, durch eine flüssige mobile Phase durch die stationäre Phase transportiert und aufgrund der unterschiedlich starken Retention in Einzelkomponenten aufgetrennt. In Abhängigkeit verschiedenster chromatographischer Fragestellungen haben sich Verfahren mit unterschiedlichen stationären bzw. mobilen Phasen etabliert (Hänsel & Sticher, 2010; Latscha et al., 2004).

#### 4.3.2. Gel-Permeations-Chromatographie

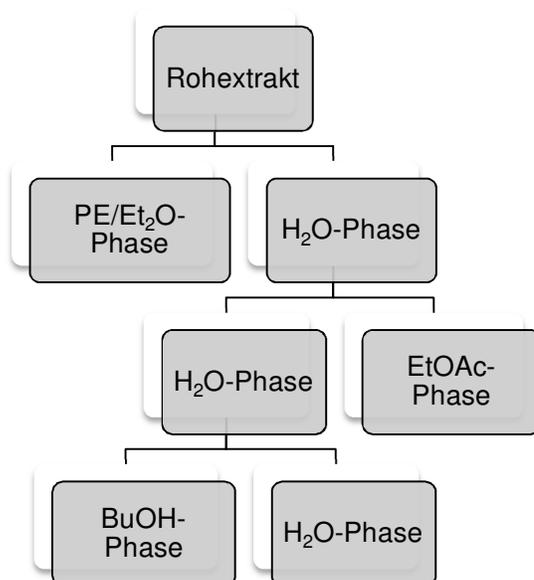
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) als spezielle Art der Säulenchromatographie verwendet. Sie beruht auf dem Größenausschluss-Prinzip und vermag dementsprechend Einzelkomponenten einer zu untersuchenden Substanz in der Reihenfolge abnehmender Molekülgrößen zu trennen. Als stationäre Phase werden häufig Dextranbeads mit Poren definierter Größe herangezogen, auf denen der Trennungseffekt im Zusammenspiel mit unterschiedlichen Diffusionsvolumina der unterschiedlich großen Moleküle basiert: Größere Moleküle können nicht in das Innere der Gelmatrix eindringen, werden in der mobilen Phase rasch mitgeführt und somit zuerst eluiert. Kleine diffusionsfähige Moleküle hingegen können in die porösen Polymere der stationären Phase eindringen und haben damit aufgrund des vergrößerten Diffusionsvolumens eine verlängerte Retentionszeit (Hänsel & Sticher, 2010; Latscha et al., 2004).

Als Trennmethode im Zuge einer ersten und später auch genaueren Fraktionierung der Einzelkomponenten war für die vorliegende Arbeit eine Trennsäule mit einer Höhe von 1m und einem Durchmesser von 15mm in Verwendung, die mit Sephadex LH-20 befüllt wurde. Eluiert wurde mit reinem Methanol.

## 5 Extraktion und Isolierung

### 5.1. Extraktion

Für die phytochemischen Untersuchungen von *P. mertoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana* wurden die getrockneten Blätter der jeweiligen Individuen mit einem Mixer zerkleinert, mit Methanol überschichtet und zunächst für 15 min im Ultraschallbad extrahiert. Danach erfolgten drei Extraktionsdurchläufe über den Zeitraum von jeweils fünf Tagen, wobei die Extrakte lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gelagert wurden. Anschließend wurden die Extrakte abfiltriert und mit Hilfe eines Vakuum-Rotationsverdampfers eingeengt. Basierend auf der unterschiedlichen Löslichkeit der einzelnen Stoffklassen erfolgten, wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, mehrere Trennungsschritte im Rahmen von Flüssig-Flüssig-Extraktionen mit PE/Et<sub>2</sub>O (95:5), EtOAc, BuOH und H<sub>2</sub>O.



**Abb. 7:** Übersicht über die Phasentrennung der Rohextrakte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Phasentrennung wurde hierbei mit Hilfe eines Schütteltrichters durch behutsames Ausschütteln erreicht, was zur Folge hatte, dass Iridoidglykoside im letzten Trennungsschritt in der BuOH-Phase konzentriert werden konnten, wohingegen anorganische Stoffe und Zucker in der EtOAc- bzw. H<sub>2</sub>O-Phase verblieben. In Tabelle 3 sind die Arten bzw. Individuen, die Mengen der Rohextrakte sowie die Mengen der im Zuge der Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen Phasen aufgelistet.

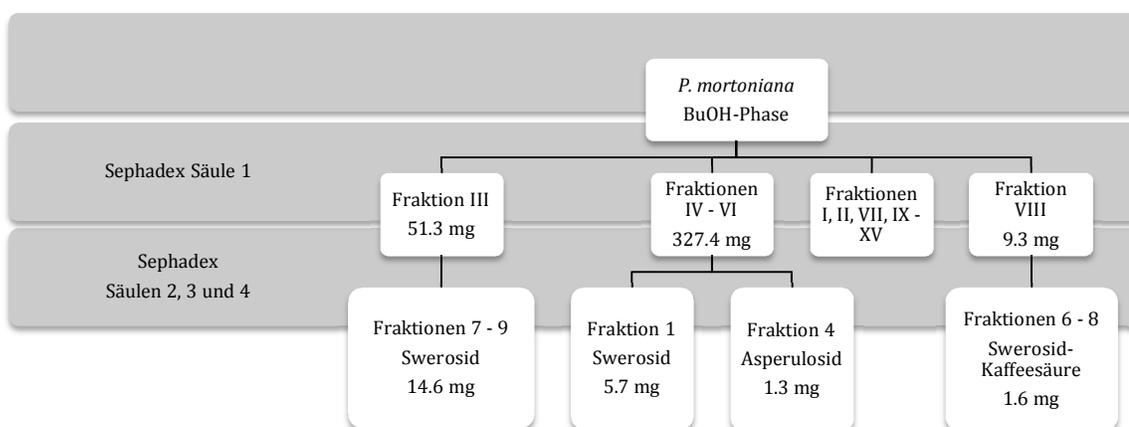
**Tab. 3:** Die für die Isolierung verwendeten Arten bzw. Individuen mit den Mengen der Rohextrakte und den jeweiligen aus der Phasentrennung resultierenden Mengen der PE/Et<sub>2</sub>O-, EtOAc-, BuOH- bzw. H<sub>2</sub>O-Phasen

Taxon	Sammelnr.	Rohextrakt Menge	Phasentrennung			
			PE/Et <sub>2</sub> O	EtOAc	BuOH	H <sub>2</sub> O
<i>P. mertoniana</i>	HG 2407083-5	9.2 g	1.5 g	900 mg	2.2 g	4.6 g
<i>P. pilosa</i>	HG 2207089	1.2 g	300 mg	200 mg	200 mg	200 mg
<i>P. pilosa</i>	HG 2607086	1.6 g	400 mg	n.d.	n.d.	1.2 g
<i>P. poeppigiana</i>	JS 2611134	400 mg	200 mg	n.d.	n.d.	200 mg
<i>P. poeppigiana</i>	JS 2611135	(vereinigt)				

n.d. = nicht durchgeführt

## 5.2. *Psychotria mertoniana*

Zunächst wurden geringe Mengen an zerkleinerten Blättern von *P. mertoniana* in Methanol extrahiert um erste DC- und HPLC-UV-Analysen durchzuführen. Zur Isolierung der Stoffe wurden 9.2 g des Rohextrakts allen oben beschriebenen Phasentrennungsschritten mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen und anschließend mit der BuOH-Phase weitergearbeitet. Im Zuge von insgesamt vier GPC-Durchgängen mit Sephadex LH-20 und während des Arbeitsprozesses regelmäßig durchgeführten HPLC-UV-Messungen konnten vier Substanzen isoliert werden (siehe Abbildung 8). Aus Fraktion III der Säule 1 wurden nach einer weiteren Fraktionierung in Säule 2 14.6 mg Swerosid (**1**) isoliert. Weiters wurden die Fraktionen IV bis VI der ersten Säule mittels einer weiteren GPC (Säule 3) aufgetrennt und abermals Swerosid (**1**) in einer Menge von 5.7 mg sowie 1.3 mg Asperulosid (**2**) isoliert. Mit 9.3 mg der Fraktion VIII der ersten Säule wurde eine weitere GPC durchgeführt (Säule 4), wodurch 1.6 mg eines Swerosid-Kaffeensäure Adduktes (**3**) isoliert werden konnten.



**Abb. 8:** Fraktionierung der BuOH-Phase von *P. mertoniana* im Zuge von vier GPC-Durchläufen, wodurch drei Iridoid-Verbindungen isoliert werden konnten

### 5.3. *Psychotria pilosa*

Wie bei *P. mertoniana* wurden zunächst kleine Mengen der Individuen *P. pilosa* HG 2207089 und *P. pilosa* HG 2607086 extrahiert und mittels DC und HPLC-UV analysiert. Der Gesamtextrakt des Individuums HG 2207089 wurde anschließend wie aus Tabelle 3 ersichtlich mit Hilfe von Flüssig-Flüssig-Extraktionen mit PE/Et<sub>2</sub>O, EtOAc, BuOH und H<sub>2</sub>O aufgetrennt, wodurch 200 mg BuOH-Phase gewonnen werden konnte. Ein Teil dieser Menge wurde auf einer GPC-Säule mit Sephadex LH-20 aufgetragen und in Fraktionen aufgetrennt. Zwei dieser Fraktionen ergaben insgesamt 9.8 mg Asperulosid (**2**). Anschließend wurde außerdem ein Teil der H<sub>2</sub>O-Phase mit drei aufeinander folgenden GPC-Säulen aufgetrennt, wodurch abermals 19.2 mg sowie 6.0 mg Asperulosid (**2**) isoliert werden konnten. Der Gesamtextrakt des Individuums HG 2607086 wurde mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit PE/Et<sub>2</sub>O aufgetrennt, anschließend wurde mit der gesamten Menge von 1.2 g der daraus resultierenden H<sub>2</sub>O-Phase weitergearbeitet. Bei einer ersten Fraktionierung mittels einer GPC mit Sephadex LH-20 wurden 690 mg der Fraktionen IX bis XIV gewonnen, die auf einer zweiten GPC-Säule aufgetragen und abermals aufgetrennt wurden. Ziel dieser Auftrennung war es, ein zuvor mit Hilfe von HPLC-UV-Messungen detektiertes Iridoidglykosid zu isolieren. Die Fraktionierung im Zuge der zweiten Säule ergab aber nur 1.1 mg dieser Substanz, wodurch die Möglichkeit einer Strukturaufklärung mittels NMR nicht gegeben war.

### 5.4. *Psychotria poeppigiana*

Die Extrakte der beiden Individuen JS 2611134 und JS 2611135 von *P. poeppigiana* wurden nach Analysen kleinerer Extraktmengen mittels DC und HPLC-UV aufgrund der Ähnlichkeit der HPLC-Profile vereinigt. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, wurde der Gesamtextrakt anschließend einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit PE/Et<sub>2</sub>O unterzogen und 200 mg der H<sub>2</sub>O-Phase im Zuge zweier GPC-Durchläufe mit Sephadex LH-20 aufgetrennt. Dadurch konnten 0.6 mg einer Substanz isoliert werden, die aufgrund von HPLC-UV-Messungen und Spektren-Vergleichen derselben Substanzklasse wie die zuvor isolierte Swerosid-Kaffeensäure zugeordnet werden kann. Eine Strukturaufklärung der Substanz mittels NMR war aber aufgrund der geringen Menge bisher nicht möglich.

## 5.5. Vergleichende Analysen

Um das Vorkommen und die Verteilung von Iridoidglykosiden innerhalb der Gattung *Psychotria* zu untersuchen wurden acht Individuen von *P. capitata*, ein Individuum von *P. chiapensis*, sechs Individuen von *P. mortoniana*, fünf Individuen von *P. pilosa* und vier Individuen von *P. poeppigiana* einer vergleichenden Analyse unterzogen. Hierzu wurden jeweils 100 mg zerkleinertes Pflanzenmaterial eingewogen und in 1 mL Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend bis zur Trockene eingeengt und durch Zugabe von reinem Methanol wurde eine Konzentration von 5 mg/mL eingestellt. Nach Filtration der Proben wurden HPLC-UV-Messungen durchgeführt.

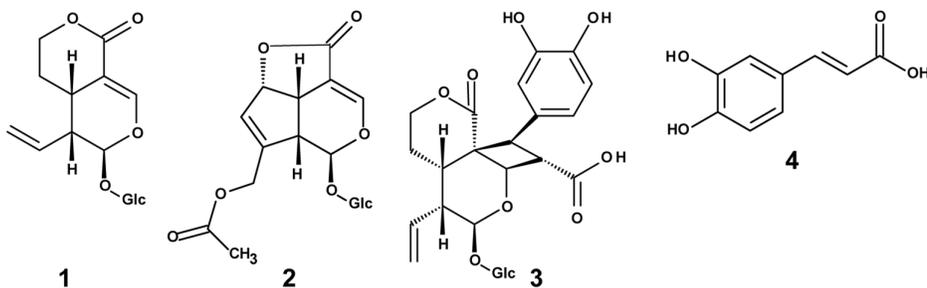
## 6 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Arten *P. mertoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana* im Detail analysiert und im Speziellen auf deren Gehalt an Iridoiden überprüft. Dabei konnten drei Iridoide isoliert und deren Strukturen aufgeklärt werden. Weiters wurden zwei Substanzen isoliert, die aufgrund ihrer UV-Spektren ebenfalls der Stoffklasse der Iridoide zugeordnet werden können. Die Aufklärung ihrer Strukturen war aber aufgrund der geringen Mengen nicht möglich.

Im weiteren Verlauf wurden 16 Individuen der Arten *P. capitata*, *P. chiapensis*, *P. mertoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana* in Bezug auf das Auftreten der isolierten Verbindungen innerhalb der einzelnen Arten und Individuen durch umfassende Analyse ihrer HPLC-Profile verglichen, um Anhaltspunkte für das mögliche Vorkommen eines stabilen Merkmals zu finden.

### 6.1. *Psychotria mertoniana*

Aus den Rohextrakten des Individuums *P. mertoniana* HG 2407083-5 konnten durch mehrere Extraktionsschritte drei Iridoide isoliert werden, deren Strukturen in Abbildung 9 dargestellt sind. Der Analyse der UV-Spektren zufolge akkumuliert *P. mertoniana* große Mengen des Secoiridoidglykosids Swerosid (1). Weiters fanden sich etwas geringere Mengen des Iridoidglykosids Asperulosid (2) und Spuren des zum ersten Mal isolierten Adduktes Swerosid-Kaffeensäure (3). Darüber hinaus konnten bei *P. mertoniana* Spuren von Kaffeensäure (4) nachgewiesen werden.



**Abb. 9: Strukturen der aus *P. mertoniana* isolierten bzw. im Rohextrakt nachgewiesenen Verbindungen:** Swerosid (1), Asperulosid (2), Swerosid-Kaffeensäure (3), Kaffeensäure (4)

### 6.1.1. Anmerkungen zur Detektion von Kaffeesäure

In HPLC-Chromatogrammen des Rohextrakts von *P. mertoniana* konnten sowohl Swerosid (**1**) als auch Asperulosid (**2**) und Swerosid-Kaffeesäure (**3**) bei einer Messung mit der ursprünglichen HPLC-Methode I (Tabelle 2a in Abschnitt 4.2.2.) nachgewiesen werden. Da aber die Retentionszeit der Kaffeesäure (**4**) im Zuge dieser Methode genau jener des Swerosids entspricht, der Peak der Kaffeesäure also vom Peak des Swerosids überlagert wird, ist sie in einem solchen Chromatogramm nicht nachweisbar. Zur Detektion der Kaffeesäure wurde deshalb im Zuge der HPLC-Messungen einmalig eine neue Methode (III unter Abschnitt 4.2.2.) mit einer mobilen Phase aus Ammoniumacetat (A) und Methanol (B) mit einem Gradienten von 40 – 100% verwendet. Mit dieser Methode konnten die beiden Verbindungen deutlich getrennt werden.

### 6.1.2. Anmerkungen zu einer möglichen photochemisch katalysierten Bildung der Swerosid-Kaffeesäure

Bei der Verbindung Swerosid-Kaffeesäure (**3**) handelt es sich chemisch gesehen vermutlich um eine Substanz, die durch intramolekulare [2+2]-Cycloaddition der Kaffeesäure mit Swerosid entstanden ist. Es scheint wahrscheinlich, dass eine solche Reaktion nicht enzymatisch, sondern photochemisch katalysiert wird. Die Verbindung Swerosid-Kaffeesäure könnte somit durch eine durch Sonnenlicht katalysierte Reaktion des Secoiridoids Swerosid (**1**) mit Kaffeesäure (**4**) entstanden sein.

Eine vergleichbare Verbindung konnte 2001 aus *Verbena littoralis* (Verbenaceae) isoliert und strukturell aufgeklärt werden (Li et al., 2001). Es handelt sich hierbei um Littoralison, eine Substanz mit heptacyclischer Grundstruktur aus dem Iridolacton Brasosid und einer *trans*-Zimtsäure. Aus biosynthetischer Sicht könnte der in dieser Verbindung enthaltene 4er-Ring ebenfalls durch intramolekulare [2+2]-Cycloaddition gebildet worden sein. Mangion & MacMillan (2005) gelang es erstmals, sowohl Brasosid als auch Littoralison vollständig zu synthetisieren. Diese Synthese bestätigt einerseits die absolute und relative Stereochemie der beiden zuvor publizierten Verbindungen und unterstützt andererseits auch aus chemischer Sicht die Möglichkeit eines Biosyntheseweges zwischen den Substanzen Brasosid und Littoralison. Rückschlüsse auf einen möglichen Biosyntheseweg zwischen den im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen Swerosid (**1**) und Swerosid-Kaffeesäure (**3**) scheinen demnach ebenfalls denkbar.

## 6.2. *Psychotria pilosa*

Aus den Rohextrakten der beiden Individuen *P. pilosa* HG 2207089 und *P. pilosa* HG 2607086 konnten zwei Iridoide detektiert und isoliert werden. Als Stoff mit der höchsten Intensität im HPLC-Chromatogramm konnte Asperulosid (2) identifiziert werden. Die Strukturaufklärung des ebenfalls isolierten Begleitstoffes gelang aufgrund zu geringer Mengen jedoch nicht. Aufgrund der Ähnlichkeit des UV-Spektrums dieser Substanz mit jenem des Asperulosids dürfte es sich dabei um ein weiteres Iridoidglykosid handeln. In weiterer Folge wird dieses Iridoid mit (5) beziffert. Swerosid (1), Swerosid-Kaffeensäure (3) und Kaffeensäure (4) konnten in *P. pilosa* nicht nachgewiesen werden.

## 6.3. *Psychotria poeppigiana*

Aus den vereinigten Rohextrakten der Individuen *P. poeppigiana* JS 2611134 und *P. poeppigiana* JS 2611135 konnte durch mehrere Extraktionsschritte eine Verbindung isoliert werden, deren UV-Spektrum jenem des Addukts Swerosid-Kaffeensäure ähnelt, weshalb eine vergleichbare Struktur vermutet werden kann. Diese Substanz wird in weiterer Folge mit (6) beziffert. Die Iridoide Swerosid (1) und Asperulosid (2) und das Addukt Swerosid-Kaffeensäure (3) konnten nicht nachgewiesen werden.

Interessanterweise wurde die Verbindung (6) nur in den beiden oben angeführten Individuen, nicht aber in zwei weiteren mit Hilfe von Spektrenvergleichen untersuchten Individuen derselben Art gefunden. In diesen findet man jedoch das Iridoidglykosid Asperulosid (2) in großen Mengen. Dieser Umstand und das Auftreten unterschiedlicher Sekundärmetaboliten in verschiedenen Individuen innerhalb derselben Art wird im folgenden Abschnitt 6.4. eingehender diskutiert.

## 6.4. Vergleichende Analysen

Die folgende Tabelle 4 stellt einen Vergleich der iridoiden Inhaltsstoffe in den einzelnen Individuen der Artengruppe *P. capitata*, *P. chiapensis*, *P. mortoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana* dar und soll das Auftreten der isolierten Substanzen Swerosid (1), Asperulosid (2), Swerosid-Kaffeensäure (3) sowie der isolierten Verbindungen (5) und (6) in den verschiedenen Individuen der Gattung *Psychotria* veranschaulichen.

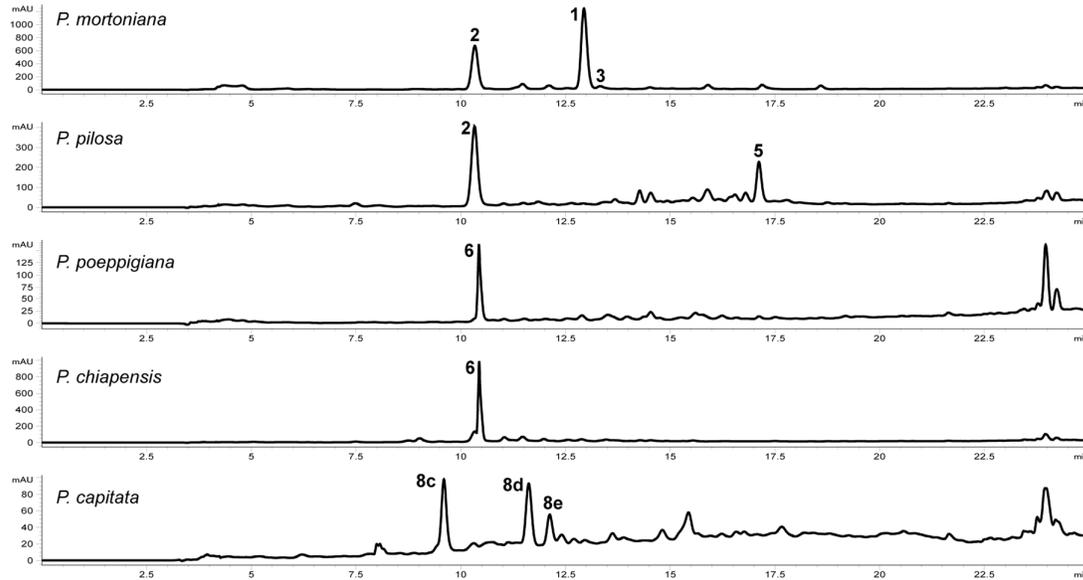
Tab. 4: Vorkommen der isolierten Iridoid-Verbindungen in der Artengruppe *P. capitata*, *P. chiapensis*, *P. mortoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana*

Taxon	Sammelnr.	Substanz					
		1	2	3	4	5	6
<i>P. capitata</i>	HG 1907085						
	HG 1907086						
	HG 19070812						
	HG 2407089						
	HG 24070811						
	HG 24070812						
	HG 24070816						
	HG 2607085						
<i>P. chiapensis</i>	HG 2807081		•				•
<i>P. mortoniana</i>	HG 1907084	•	•	○	○		
	HG 2207083	•	•	○	○		
	HG 2207084	•	•	○	○		
	HG 2207085	•	•	○	○		
	HG 2407083-5	•	•	○	○		
	HG 2407087	•	•	○	○		
<i>P. pilosa</i>	HG 1907087		•			○	
	HG 2007087		•			•	
	HG 2207089		•			•	
	HG 2607086		•			•	
	JS 2611131		•			•	
<i>P. poeppigiana</i>	HG 2607081		•			○	○
	HG 3007081	○	•				•
	JS 2611134						•
	JS 2611135					○	•

Angeführt sind die jeweiligen Individuen mit ihren Sammelnummern in Relation zu den Verbindungen Swerosid (1), Asperulosid (2), Swerosid-Kaffeensäure (3), Kaffeensäure (4), Iridoidglykosid (5), Swerosid-Kaffeensäure ähnliches Addukt (6). • = Hauptkomponente, ○ = Nebenkompente; In *P. capitata* wurden keine Iridoide, sondern vor allem Chlorogensäuren nachgewiesen.

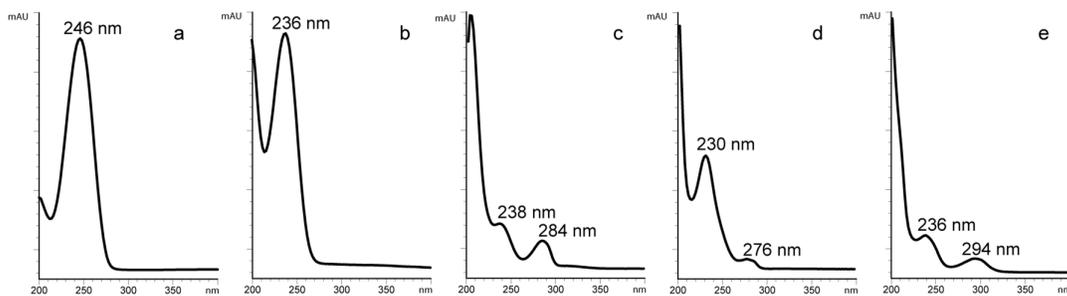
Die Daten der oben angeführten Tabelle 4 basieren auf einer umfangreichen vergleichenden Analyse der Chromatogramme und HPLC-UV-Spektren der entsprechenden Individuen, die im Rahmen einer einzigen durchgehenden HPLC-Messung entstanden. Um vergleichbare Chromatogramme zu erhalten und eine korrekte Auswertung zu gewährleisten, wurde die Messung mit Rohextrakten einheitlich in der Konzentration von 5 mg/mL durchgeführt.

In Abbildung 10 ist jeweils ein Individuum der fünf untersuchten Arten *P. capitata*, *P. chiapensis*, *P. mortoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana* mit den spezifischen Verteilungsmustern der darin nachgewiesenen Verbindungen dargestellt. Die darauffolgende Abbildung 11 zeigt die UV-Spektren der isolierten Verbindungen.



**Abb. 10: Verteilungsmuster der in den jeweiligen Arten nachgewiesenen Verbindungen:**

v. oben n. unten: *P. mortoniana* HG 2407083-5, *P. pilosa* HG 2207089, *P. poeppigiana* JS 2611135, *P. chiapensis* HG 2807081, *P. capitata* HG 1907085. Für die Messungen wurden jeweils die aus getrockneten Blättern gewonnenen Rohextrakte in einer Konzentration von 5 mg/mL verwendet.



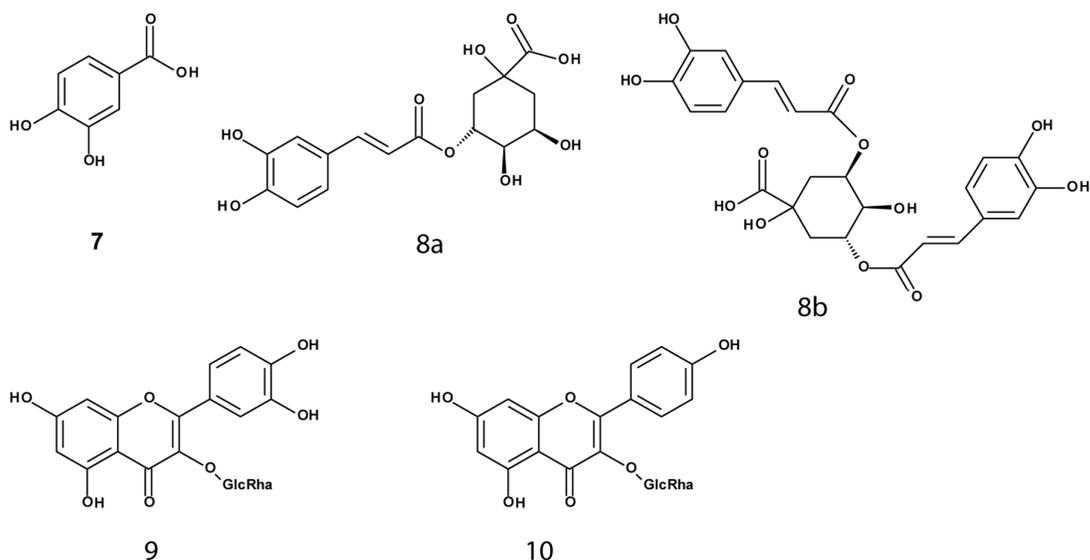
**Abb. 11: UV-Spektren der isolierten Verbindungen:** a: Swerosid (1), b: Asperulosid (2), c: Swerosid-Kaffeensäure (3), d: Verbindung (5), e: Verbindung (6)

#### 6.4.1. *Psychotria mertoniana*

Die sechs untersuchten Individuen von *P. mertoniana* sind in ihrem Verteilungsmuster der angeführten Substanzen sehr einheitlich (siehe Tabelle 4). So enthalten alle untersuchten Individuen dieser Art die Iridoide Swerosid (1) und Asperulosid (2) als Hauptkomponenten, sowie Spuren von Swerosid-Kaffeensäure (3) und Kaffeensäure (4). Lediglich das Verhältnis zwischen Swerosid (1) und Asperulosid (2) unterscheidet sich von Individuum zu Individuum in geringem Ausmaß, wobei in allen Individuen deutlich mehr Swerosid als Asperulosid nachgewiesen werden konnte.

Berger et al. (2015, in Vorbereitung) konnten in diesem Zusammenhang aus *P. mertoniana* neben dem Secoiridoidglykosid Swerosid noch fünf weitere nicht-iridoide Verbindungen aus unterschiedlichen chemischen Stoffklassen isolieren, deren Strukturen in Abbildung 12 dargestellt sind. Es handelt sich hierbei um die Verbindungen Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) (7), Chlorogensäure (8a) und ein weiteres Chlorogensäure-Derivat (8b). Die Chlorogensäuren sind eine Stoffklasse von Estern bestimmter Hydroxyzimtsäuren mit Chinasäure, die axiale Hydroxygruppen am C-1- und C-3-Atom und äquatoriale Hydroxygruppen an den C-Atomen 4 und 5 tragen (Clifford, 1999). Jenes Derivat, das weitläufig als „Chlorogensäure“ bezeichnet wird, ist ein Ester der Kaffeensäure mit der Chinasäure als alkoholischer Komponente (Abbildung 12).

Außerdem konnten mit Rutin (9) und Nicotiflorin (10) zwei Flavonole isoliert werden, die durch das Disaccharid Rutinose (= Glukose + Rhamnose) dasselbe Glykolisierungsmuster aufweisen. Flavonole sind chemische Verbindungen, die mit ihrem C<sub>15</sub>-Grundgerüst aus zwei Benzolringen und einem Pyranring eine Unterklasse der Flavonoide darstellen. Bei Rutin handelt es sich um ein Quercetin-Derivat, bei Nicotiflorin um ein Kämpferol-Derivat.



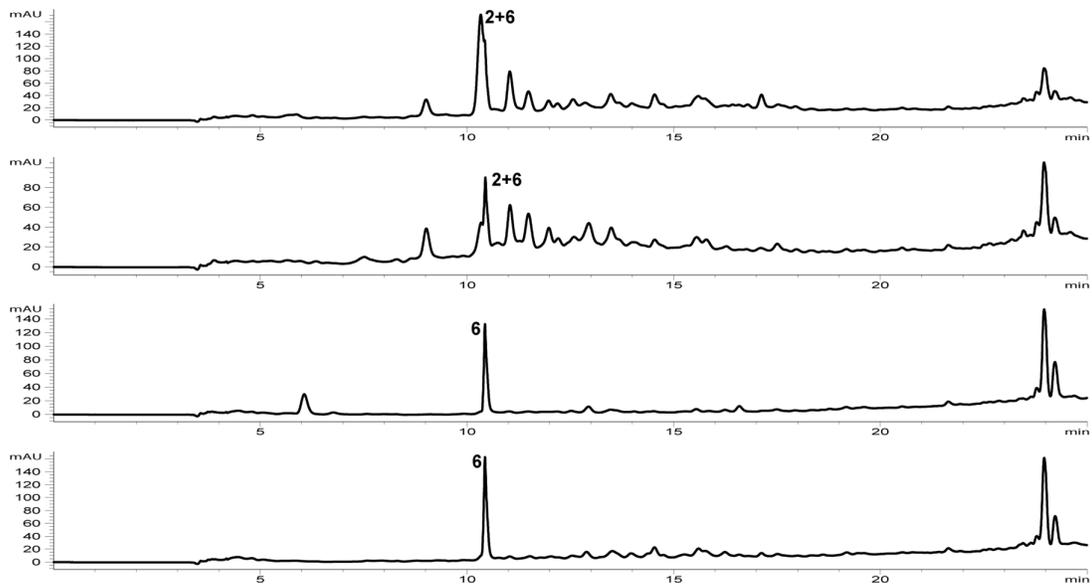
**Abb. 12: Weitere aus *P. mortoniana* isolierte Verbindungen:** Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) (**7**), Chlorogensäure (**8a**) und ein Chlorogensäure-Derivat (**8b**) sowie die beiden Flavonole Rutin (**9**) und Nicotiflorin (**10**)

#### 6.4.2. *Psychotria pilosa*

In allen Individuen der Art *P. pilosa* konnten zwei Iridoidglykoside nachgewiesen werden, nämlich zum einen Asperulosid (**2**), das in allen untersuchten Individuen als Hauptkomponente auftritt, und zum anderen ein weiteres Iridoidglykosid mit noch unbekannter chemischer Struktur (Substanz (**5**)). Auffällig ist dabei, dass die Menge dieser beiden Stoffe in den einzelnen Individuen stark variiert. So enthalten drei von fünf untersuchten Individuen deutlich mehr Asperulosid als Substanz (**5**), darunter auch das in Abschnitt 6.2. detailliert beschriebene Individuum HG 2207089 (siehe Abbildung 10). In den beiden übrigen Individuen von *P. pilosa*, darunter das Individuum HG 2607086, konnte dagegen deutlich mehr an Verbindung (**5**) als an Asperulosid detektiert werden.

#### 6.4.3. *Psychotria poeppigiana*

Wie in Abschnitt 6.3. bereits erwähnt wurde und aus der folgenden Abbildung 13 ersichtlich ist, unterscheiden sich die einzelnen Individuen von *P. poeppigiana* in Bezug auf das Verteilungsmuster iridoider Verbindungen deutlich voneinander.



**Abb. 13:** Die vier untersuchten Individuen von *P. poeppigiana*: v. oben n. unten: HG 2607081, HG 3007081, JS 2611134, JS 2611135

Im Rahmen der HPLC-UV-Spektren-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass der vereinigte Rohextrakt der Individuen JS 2611134 und JS 2611135 als Hauptkomponente die Substanz (6), jedoch kein Asperulosid (2) enthält (siehe Tabelle 4; Abbildung 13). In den beiden weiteren untersuchten Individuen HG 2607081 und HG 3007081 ist Asperulosid die Hauptkomponente. Das Individuum HG 3007081 weist zudem die Substanz (6) ebenfalls in größeren Mengen auf. In der Aufsammlung HG 2607081 konnten wiederum nur Spuren dieser Verbindung nachgewiesen werden. Die Gründe für dieses unterschiedliche Verteilungsmuster bzw. das Nicht-Auftreten von Asperulosid in den Individuen JS 2611134 und JS 2611135 konnten bisher nicht geklärt werden. Da aber die Blätter der beiden zuletzt genannten Individuen zwar in derselben Region Costa Ricas, jedoch mehr als fünf Jahre später als die Individuen HG 2607081 und HG 3007081 und vermutlich an anderen Standorten gesammelt wurden, erscheint es möglich, dass ökologische Faktoren mit der Bildung der neuen Substanz in Zusammenhang stehen. Denkbar ist in weiterer Folge auch, dass es sich bei der Substanz (6) um ein Artefakt handelt, das sich erst im Laufe der Isolierung selbst gebildet hat und somit die Folge eines chemischen Umwandlungsprozesses ist.

Eine weitere Möglichkeit der Entstehung von Substanz (6) betrifft die Ähnlichkeit der UV-Spektren der Substanz (6) und der Verbindung Swerosid-Kaffeensäure (3). Auffällig ist nämlich, dass das Verhältnis der Retentionszeiten des Swerosids (1) und der Swerosid-Kaffeensäure (3) im Chromatogramm von *P. mertoniana* (Abbildung 10) und

jenes der Retentionszeiten von Asperulosid (2) und Substanz (6) (Abbildung 12) annähernd das gleiche ist. Das bedeutet der Peak der Swerosid-Kaffeensäure ist im Chromatogramm bezüglich seiner Retentionszeit nur um den Bruchteil einer Minute in Bezug auf den Peak des Swerosids verschoben. Dasselbe gilt für den Peak von Substanz (6) in Bezug auf den des Asperulosids. Aufgrund dieser Tatsache und der Ähnlichkeit der UV-Spektren der beiden Verbindungen (3) und (6) erscheint es denkbar, dass die beiden Substanzen chemisch gesehen ähnlich aufgebaut sind, dass also die Substanz (6) möglicherweise analog zur Swerosid-Kaffeensäure durch eine photochemisch katalysierte [2+2]-Cycloaddition aus Asperulosid (2) und einem Zimtsäure-Derivat entstanden ist.

#### 6.4.4. *Psychotria chiapensis*

Das einzige untersuchte Individuum HG 2807081 der Art *P. chiapensis* enthält die im HPLC-Chromatogramm in Abbildung 10 deutlich als Hauptkomponente erkennbare Substanz (6) und zusätzlich geringere Mengen an Asperulosid (2). Die Auswertung der Chromatogramme einschließlich der UV-Spektren ist ebenso wie beim Individuum *P. pilosa* HG 3007081 erschwert, da sich die Peaks der beiden Verbindungen zum großen Teil überlagern und somit keine eindeutigen UV-Spektren liefern. Auch hier stellt sich die Frage nach der chemischen Struktur bzw. Entstehung der detektierten Substanz (6). Die Iridoide Swerosid (1) und Swerosid-Kaffeensäure (3) konnten in *P. chiapensis* nicht nachgewiesen werden.

#### 6.4.5. *Psychotria capitata*

Die Analyse der HPLC-UV-Spektren der acht untersuchten Individuen von *P. capitata* gestaltet sich durch die Vielzahl an Inhaltsstoffen und das uneinheitliche Auftreten verschiedenster Substanzen als durchaus schwierig. Die Hauptkomponenten in *P. capitata* sind offenbar keine Iridoid-Verbindungen, sondern Chlorogensäure-Derivate, von denen zumindest eine Komponente in allen untersuchten Individuen detektiert werden konnte. Im Individuum *P. capitata* HG 1907085 konnten drei Chlorogensäure-Derivate nachgewiesen werden, die in Abbildung 10 mit (8c), (8d) und (8e) gekennzeichnet sind.

## 6.5. Konklusio im Hinblick auf chemosystematische Aspekte

Sowohl durch die Isolierung von iridoiden Verbindungen aus *P. mertoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana* als auch durch die vergleichenden HPLC-UV-Analysen der einzelnen Individuen dieser drei Arten und *P. chiapensis* konnte die Akkumulation von Iridoiden als stabiles Merkmal für diese vier Arten festgestellt werden. In *P. capitata* konnten keine Iridoide nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Tatsache, dass viele *Psychotria*- und *Palicourea*-Arten des Tribus Palicoureeae keine Iridoide, sondern vor allem Tryptamin-Iridoid-Alkaloide akkumulieren (Berger, 2012) könnten aus den vorliegenden Ergebnissen und weiteren chemosystematischen Indizien Rückschlüsse auf die verwandtschaftlichen Beziehungen der fünf untersuchten Arten sowie deren Einordnung innerhalb der „*Psychotria* alliance“ bzw. innerhalb der Tribus Palicoureeae gezogen werden. Dies bedarf aber noch umfassenden weiterführenden Untersuchungen.

## 7 Literaturverzeichnis

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: AGP III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 105 – 121.

BACKLUND, M., OXELMAN 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.

BERGER, A. 2012. Distribution and systematic significance of selected secondary metabolites within Psychotriaceae/Palicoureeae (Rubiaceae). Diplomarbeit, Universität Wien.

BERGER, A., PREINFALK, A., ROBIEN, W., BRECKER, L., VALANT-VETSCHERA, K., SCHINNERL, J. 2015. New reports on flavonoids, benzoic- and chlorogenic acids as rare features in the Psychotria alliance (Rubiaceae). *Phytochemistry Letters*. (in Vorbereitung).

BREMER, B. 1996. Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. *Opera Botanica Belgica* 7, 33 – 50.

BREMER, B., ERIKSSON, T. 2009. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170, 766 – 793.

BREMER, B., MANEN, J. F. 2000. Phylogeny and classification of the subfamily Rudioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 225, 43 – 72.

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, 288 – 293.

CLIFFORD, M. N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 362 – 372.

CONTIN, A., VAN DER HEIJDEN, R., LEFEBER, A., 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, 413 – 416.

DELPRETE, P. G. 2004. Rubiaceae. In: SMITH, N., MORI, S. A., HENDERSON, A., STEVENSON, D. W., HEALD, S. V. Flowering plants of the Neotropics. Princeton University Press.

DE LUCA, V., SALIM, V., THAMM, A., MASADA-ATSUMI, S., YU, F. 2014. Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: progress on pathway elucidation. Current Opinion in Plant Biology 19, 35 – 42.

DINDA, B., CHOWDHURY, D. R., MOHANTA, B. C. 2009. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 57, 765 – 796.

DINDA, B., DEBNATH, S., BANIK, R. 2011. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 59, 803 – 833.

DINDA, B., DEBNATH, S., HARIGAYA, Y. 2007a. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 55, 159 – 222.

DINDA, B., DEBNATH, S., HARIGAYA, Y. 2007b. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 55, 689 – 728.

DOBLER, S., PETSCHENKA, G., PANKOKE, H. 2011. Coping with toxic plant compounds - The insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides. Phytochemistry 72, 1593 – 1604.

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

LICHTENTHALER, H. K., RHOMER, M., SCHWENDER, J. 1997: Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. Physiologia Plantarum 101, 643 – 652.

HABERMEHL, G., HAMMANN, P. E., KREBS, H. C., TERNES, W. 2008. Naturstoffchemie. Eine Einführung, 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 5 – 19.

HÄNSEL, R., STICHER, O. 2010. Pharmakognosie – Phytopharmazie, 9. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg, pp. 31 – 59, 737 – 772, 1060 – 1064.

HART, H., CRAINE, L. E., HART, D. J., HADAD, C. M. 2007. Organische Chemie, 3. Auflage. WILEY-VCH Verlag, pp. 445 – 478.

HELENO, S. A., MARTINS, A., QUEIROZ, M. J. R. P., FERREIRA, I. C. F. R. 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. Food Chemistry 173, 501 – 513.

HEMMERLIN, A., HARWOOD, J. L., BACH, T. J. 2012. A *raison d'être* for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? Progress in Lipid Research 51, 95 – 148.

KOUDOUNAS, K., BANILAS, G., MICHAELIDIS, C., DEMOLIOU, C., RIGAS, S., HATZOPOULOS, P. 2015. A defence-related *Olea europaea*  $\beta$ -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent. Journal of Experimental Botany 66, 2093 – 2106.

LATSCHA, H. P., LINTI, G. W., KLEIN, H. A. 2004. Analytische Chemie. Basiswissen 3, 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 411 – 425, 445 – 477.

LI, Y. S., MATSUNAGA, K., ISHIBASHI, M., OHIZUMI, Y. 2001. Littoralisone, a novel neuritogenic iridolactone having an unprecedented heptacyclic skeleton including four- and nine-membered rings consisting of glucose from *Verbena littoralis*. Journal of Organic Chemistry 66, 2165 – 2167.

LOPES, S., VON POSER, G. L., KERBER, V. A., FARIAS, F. M., KONRATH, E. L., MORENO, P., SOBRAL, M. E., ZUANAZZI, J. A. S., HENRIQUES, A. T. 2004. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). Biochemical Systematics and Ecology 32, 1187 – 1195.

MANGION, I. K., MACMILLAN, D. W. C. 2005. Total synthesis of Brasoside and Littoralisone. *Journal of the American Chemical Society* 127, 3696 – 3697.

NUHN, P. 2006. *Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*, 4. Auflage. S. Hirzel Verlag Stuttgart, pp. 194 – 202, 316 – 318.

O'CONNOR, S. E., MARESH, J. J. 2006. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Report* 23, 532 – 547.

PETIT, E. 1964. Les espèces Africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae). I. *Bulletin du Jardin botanique de l'Etat à Bruxelles* 34, 1 – 229.

PETIT, E. 1966. Les espèces Africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae). II. *Bulletin du Jardin botanique de l'Etat à Bruxelles* 36, 65 – 190.

PUNGITORE, C. R., AYUB, M. J., GARCIA, M., BORKOWSKI, E. J., SOSA, M. E., CIUFFO, G., GIORDANO, O. S., TONN, C. E. 2004. Iridoids as allelochemicals and DNA polymerase inhibitors. *Journal of Natural Products* 67, 357 – 361.

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* 76, 85 – 145.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, 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.

SALIM, V., YU, F., ALTAREJOS, J., DE LUCA, V. 2013. Virus-induced gene silencing identifies *Catharanthus roseus* 7-deoxyloganic acid-7-hydroxylase, a step in iridoid and monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal* 76, 754 – 765.

SEVGI, K., TEPE, B., SARIKURKCU, C. 2015. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* 77, 12 – 21.

STEYERMARK, J. A. 1972. Rubiaceae. In: B. M. Maguire & Collaborators, Flora of the Guayana Highlands. Memoirs of the New York Botanical Garden 23, 227 – 832.

## 8 Anhang

### 8.1. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden folgende fünf Arten der Gattung *Psychotria* phytochemisch untersucht: *P. capitata*, *P. chiapensis* (= *Palicourea tetragona*), *P. mortoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana*. Aus *P. mortoniana*, *P. pilosa* und *P. poeppigiana* konnten durch mehrere Extraktionsschritte das Secoiridoidglykosid Swerosid, das Iridoidglykosid Asperulosid und das Addukt Swerosid-Kaffeensäure isoliert werden. Bei letzterem handelt es sich um eine neue Verbindung, die in der Pflanze möglicherweise nicht enzymatisch, sondern durch eine photochemisch katalysierte Reaktion entstanden ist. Weiters konnten aus den oben genannten Arten zwei Substanzen isoliert werden, die ebenfalls der chemischen Klasse der Iridoide zugeordnet werden können, bei denen aber aufgrund zu geringer Mengen eine Strukturaufklärung bisher nicht gelang.

Im Zuge von vergleichenden HPLC-UV-Analysen von insgesamt 24 Individuen der untersuchten Artengruppe konnte für die vier Arten *P. mortoniana*, *P. pilosa*, *P. poeppigiana* und *P. chiapensis* ein durchgehendes Auftreten iridoider Verbindungen nachgewiesen werden, was als stabiles Merkmal interpretiert werden kann. Dennoch wurden sowohl Unterschiede zwischen den Arten in Bezug auf deren Iridoid-Akkumulation, als auch zwischen den einzelnen Individuen innerhalb derselben Art festgestellt. In *P. capitata* wurden keine Iridoide, sondern vorwiegend Chlorogensäuren detektiert. Inwieweit aus der Akkumulation von Iridoiden in vier der fünf untersuchten Arten Rückschlüsse auf verwandtschaftliche Verhältnisse und die systematische Einordnung der untersuchten Arten innerhalb des Artenkomplexes *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* bzw. innerhalb des Tribus Palicoureeae gezogen werden können, sollte jedoch noch in weiterführenden Studien untersucht werden. Überdies sollten weitere chemische, biologische und ökologische Aspekte zur Entstehung der neuen Verbindung Swerosid-Kaffeensäure untersucht und die vorliegenden Ergebnisse überprüft werden.

## 8.2. Abstract

In the course of this thesis five species of the genus *Psychotria* were analysed for their phytochemical composition: *P. capitata*, *P. chiapensis* (= *Palicourea tetragona*), *P. mortoniana*, *P. pilosa* and *P. poeppigiana*. Five compounds were obtained from extracts of leaves of *P. mortoniana*, *P. pilosa* and *P. poeppigiana*, among them the seco-iridoid glycoside sweroside, the iridoide glycoside asperuloside and a new compound, composed of the seco-iridoid sweroside linked to caffeic acid. This compound is possibly derived from a photochemical reaction in the plant, as no biosynthetic enzyme is known to date that could be involved in the biosynthesis. Furthermore, two compounds were isolated from the analysed group of species. Both of these could be confirmed to belong to iridoids, but precise structure elucidation was hampered by the small amounts of isolated compounds.

In the course of comparative HPLC-UV analysis 24 individuals of the analysed group of *Psychotria* species have been investigated. The four species *P. mortoniana*, *P. pilosa*, *P. poeppigiana* and *P. chiapensis* showed continuous accumulation of iridoids, which can be recognised as a stable feature of the group. However, there are differences in iridoid accumulation patterns between the species as well as between the individuals. *P. capitata* is lacking iridoids, but accumulates chlorogenic acids instead. So far, it is not clear to what extent iridoid patterns reflect systematic relationships in the analysed species of *Psychotria* within the subgenus *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*, or within the tribe Palicoureeae. Further and more detailed analyses are essential for clarification of this aspect. In addition, chemical, biological and ecological aspects of the formation of the new compound sweroside with caffeic acid should be investigated in detail.

### 8.3. Herbarbelege

In den Abbildungen 14 – 18 sind die in der vorliegenden Arbeit behandelten Arten der Gattung *Psychotria* alphabetisch aufgelistet. Die Bilder stammen aus dem virtuellen Herbarium JACQ und sind unter folgendem link zu finden: <http://herbarium.univie.ac.at/database/search.php>.



Abb. 14: *Psychotria capitata* Ruiz & Pav.: Bernhard, M. & Greger, H. HG 24070811, WU 0067846



Abb. 15: *Psychotria chiapensis* Standl.: Bernhard, M. & Greger, H. HG 2807081, WU 0044578

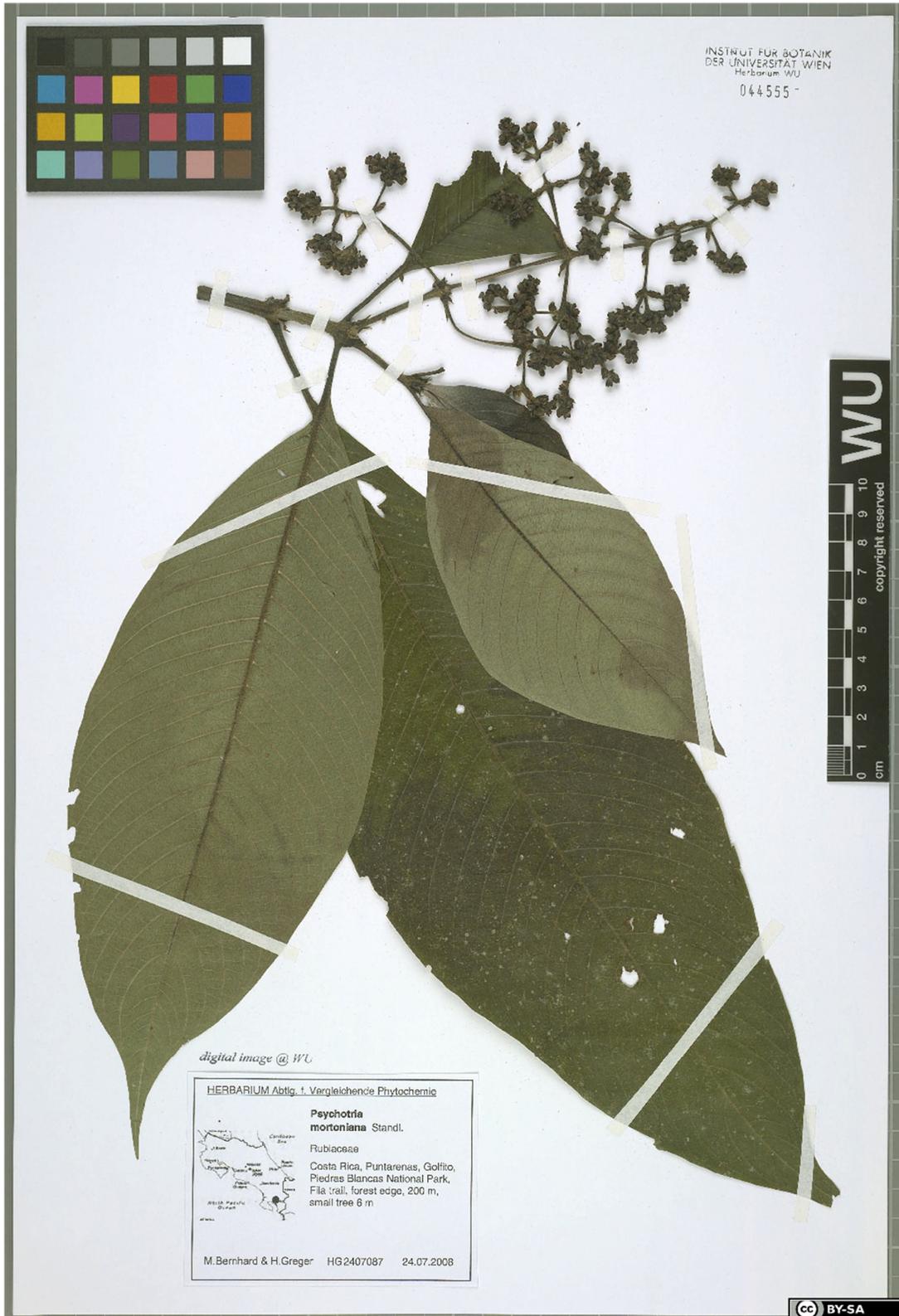


Abb. 16: *Psychotria mortoniana* Standl.: Bernhard, M. & Greger, H. HG 2407087, WU 0044555

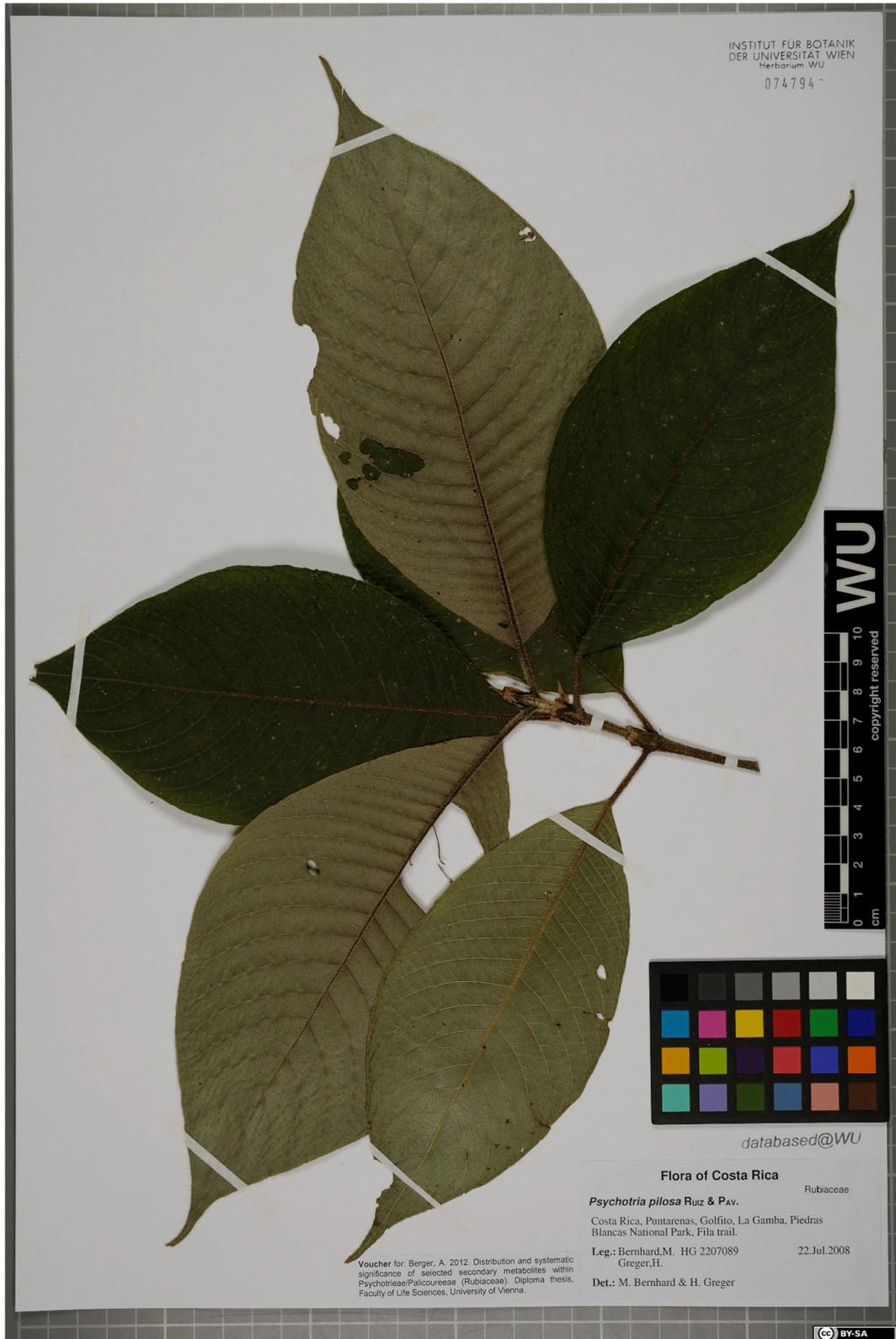


Abb. 17: *Psychotria pilosa* Ruiz & Pav.: Bernhard, M. & Greger, H. HG 2207089, WU 0074794

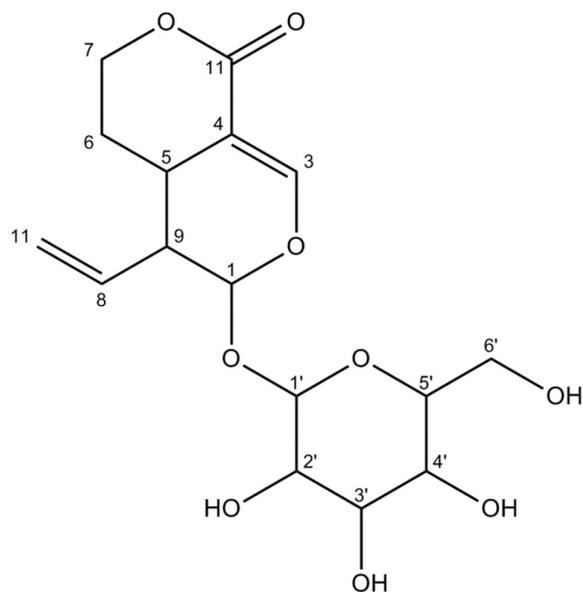


Abb. 18: *Psychotria poeppigiana* Müll. Arg.: Bernhard, M. & Greger, H. HG 0044514

## 8.4. NMR-Datenblätter

Swerosid

TG-PM01 (B)  
MeOD  
Nov1213 20-...

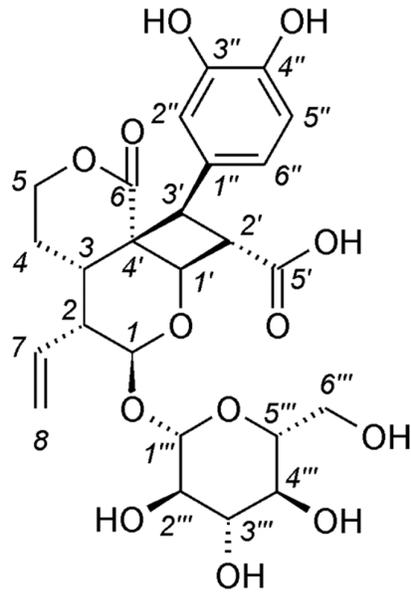


Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

Exact Mass: 358,13

Molecular Weight: 358,34

Atomnummer	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
1	98.01	5.55
3	153.95	7.59
4	105.6	-
5	28.5	3.19
6	25.9	1.7
7	69.7	4.67/4.46
8	133.35	5.55
9	43.8	2.7
10	120.8	5.29
11	167.5	-
1'	99.7	4.68
2'	74.7	3.14
3'	77.9a	3.40-3.24
4'	71.5	
5'	78.4a	
6'	62.7	3.89/§:&/



**TG-PM-02**

Nr.	CD <sub>3</sub> OD				CD <sub>3</sub> CN				Calculation		HMBC	NOE	
	<sup>1</sup> H	mult.	coupl.	int.	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	mult.	coupl.	int.	<sup>13</sup> C			<sup>13</sup> C (1)
1	5.253	d	2.3	1	97.04	5.100	d	2.3	1	95.49	101.8	3/7/1'/1'''	2/7/1''
2	2.447	ddd	10.2/4.0/2.3	1	48.02	2.368	ddd	10.0/3.5/2.3	1	45.95	46.5		3/4a/8
3	3.226	m		1	24.96	3.043	ddd	9.6/5.1/3.5	1	23.20	42.0		2/4ab/2'/2''/6''
4a	1.634	m		1	24.85	1.541	m		1	23.13	28.1	2/5	2/3/4b/5a
b	1.478	m		1		1.359	m		1			2	3/4a/5ab
5a	4.090	ddd	11.4/5.6/5.6	1	67.67	3.976	ddd	11.4/5.9/5.9	1	65.79	65.9	3/6	4ab/5b
5b	3.823	ddd	11.4/10.2/4.7	1		3.866	m		1			3	4b/5a/3'/(6)
6					177.10					172.9	171.8		
7	5.650	ddd	16.8/10.2/10.2/1	1	135.69	5.538	ddd	16.8/10.3/10.0	1	133.86	134.1		2/8b
8a	5.244	dd	16.8/1.2	1	121.36	5.195	dd	16.8/1.3	1	120.70	120.5	2	2/7/8b
b	5.229	dd	10.2/1.2	1		5.187	dd	10.3/1.3	1			2	2/7/8a
1'	4.884	d	8.6	1	68.84	4.766	d	8.7	1	66.95	65.3	1/2'/3'	2'/3'
2'	4.55	m(br)		1	48.1	4.515	dd	10.8/8.7	1	45.91	47.5	1'	3/1'/(1''')/2''/6''
3'	3.310	m		1	~49.0	3.238	m		1	45.58	47.0	6/5'/1''/2''/6''	1'/2''/6''
4'					n.d.					46.8	49.5		
5'					176.6					172.2	171.1		
1''					128.91					127.45	131.6		
2''	6.860	m		1	117.03	6.931	d	2.1	1	115.18	117.3	4''/6''	3/(5)/2'/3'
3''					146.67					144.55	146.1		
4''					146.63					144.81	146.6		
5''	6.186	m		1	116.76	6.739	d	8.0	1	115.05	116.3	1''/3''	6''
6''	6.186	m		1	121.81	6.667	dd	8.0/2.1	1	120.76	122.9	2''/4''	3/(5)/2'/3'/6''
1'''	4.958	d	7.9	1	97.95	4.811	d	7.6	1	95.93	99.6	1	1/(2')/2'''/3'''/5'''
2'''	3.377	dd	7.9/8.0	1	75.47	3.354	m		1	73.50	74.1	1'''/3'''	1'''/4'''
3'''	3.472	dd	8.0/8.0	1	78.93	3.36	m		1	76.90	77.3		1'''/5'''
4'''	3.339	m		1	71.66	3.233	m		1	70.20	71.3	3'''/5'''	6ab'''
5'''	3.328	m		1	78.36	3.335	m		1	76.95	77.9		1'''/3'''
6a'''	3.875	dd	14.4/2.3	1	62.62	3.688	m		1	61.34	62.5		4'''/6b'''
b'''	3.823	dd	14.4/7.5	1		3.525	dd	12.0/5.5	1				4'''/6a'''

## **8.5. Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle sehr herzlich bei Prof. Dr. Karin Vetschera für die gute Betreuung, das regelmäßige und motivierende Feedback und die kritischen wie auch zielführenden Korrekturen bedanken. Ein großer Dank gilt auch Mag. Dr. Johann Schinnerl, der mich geduldig beim Erlernen der praktischen Tätigkeiten unterstützte, stets ein offenes Ohr hatte und mit seinen fachlichen Hinweisen zum Voranschreiten meiner Arbeit beigetragen hat.

Ich danke meinen Eltern für die mentale und finanzielle Unterstützung, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Danke auch an Agnes, Maria, Carmen, Lisa, Sarah und Jenny für die stete freundschaftliche Begleitung während der gesamten Studienzeit.

## 8.6. Curriculum Vitae

Name: **Theresa Gruber**  
Adresse: Adamsgasse, A – 1030 Wien  
Email: gruber.theresa@gmx.at  
Staatsangehörigkeit: Österreich  
Geburtsdatum: 03.11. 1987  
Geburtsort: Wels  
Familienstand: ledig

### Ausbildung

10/2006 bis dato: Universität Wien  
Lehramtstudium der Unterrichtsfächer Mathematik und Biologie  
und Umweltkunde  
03/2009 bis 06/2009: Fachbezogenes Praktikum in Mathematik (Koll. Kalksburg, Wien)  
03/2013 bis 06/2013: Fachbezogenes Praktikum in Biologie (GRG Rainergasse, Wien)  
  
09/1998 bis 06/2006: Bundesgymnasium Dr. Schauerstraße, Wels  
06/2006: Abschluss der Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

### Berufserfahrung und praktische Tätigkeiten

10/2014 bis 03/2015: Sprachassistentenprogramm, Académie de Paris  
08/2013 u. 08/2014: Privatschule Obermair, Salzburg: Leitung von Mathematikkursen  
03/2011 bis 06/2013: Haus der Mathematik, Wien: Tätigkeit als Explainerin,  
wissenschaftl. Museumsbetreuung, Führungen für Schulklassen  
03/2010 bis 02/2011: Lernquadrat Wien: Schülernachhilfe in Mathematik  
04/2010 u. 06/2010: Berufsförderungsinstitut Wels: Leitung von Vorbereitungs-  
lehrgängen für die Berufsreifeprüfung (Modul Mathematik)  
07/2004 Tätigkeit als Praktikantin

**Sprachen:** Deutsch: Muttersprache  
Englisch: fließend in Wort und Schrift  
Französisch: sehr gute Kenntnisse