



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Naturstoffe der neotropischen Art *Palicourea luxurians*

verfasst von / submitted by

Christoph Kornpointner, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfillment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2018 / Vienna 2018

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

A 066 862

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

Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dipl.-Chem. Dr. Priv.-Doz. Lothar Brecker

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Wien, am 11.06.2018

Unterschrift

(Kornpointner Christoph)

Dank

An erster Stelle möchte ich meiner Familie danken, die mich bei all meinen Entscheidungen während meines Studiums unterstützte und immer an mich glaubte. Besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die mir im Laufe dieser Zeit familiären und finanziellen Rückhalt boten.

Ebenso danke ich meinen Betreuer Univ.-Prof. Dipl.-Chem. Dr. Priv.-Doz. Lothar Brecker, der mir das Thema meiner Masterarbeit anvertraute und jederzeit ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte. Ich konnte jederzeit auf sein Fachwissen vertrauen, wenn ich einmal nicht weiter wusste.

Der Abteilung Botanik und Biodiversitätsforschung, Division für systematische und evolutionäre Botanik der Universität Wien danke ich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials. Ich möchte mich auch bei Dr. Johann Schinnerl bedanken, der mich dort bei meiner Laborarbeit unterstützte und mir mit seinen guten Ratschlägen zur Seite stand.

Großer Dank gilt dem technischen Team des NMR- und des Massenspektrometrie-Zentrums der Universität Wien für den reibungslosen Ablauf aller Messungen.

Für die Messungen mit Infrarotspektroskopie möchte ich Ass.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Dieter Baurecht danken.

Auch gilt mein Dank meiner Arbeitsgruppe und den Kollegen der Phytochemie für die freundschaftliche Atmosphäre und den anregenden Diskussionen während meiner Masterarbeit.

Zu guter Letzt möchte ich die Möglichkeit nutzen und dem Staat Österreich für die Finanzierung meines Studiums in Form der Studienbeihilfe danken, da mein Studium ohne diese Unterstützung nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Pflanze <i>Palicourea luxurians</i>	1
1.2 Phytochemische Aspekte	2
1.2.1 Secoiridoidglycoside	2
1.2.2 Indolalkaloide	4
1.2.3 Terpene	5
1.3 Ziel der Arbeit	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Methoden zur Reinigung und Isolierung von Naturstoffen.....	8
2.1.1 Extraktionsmethoden	8
2.1.2 Chromatographische Trennmethoden.....	9
2.2 Methoden zur Charakterisierung von Pflanzeninhaltsstoffen	10
2.2.1 Untersuchung mit HPLC	11
2.2.2 UV/Vis-Absorptionsspektroskopie.....	11
2.2.3 NMR-Spektroskopie	11
2.2.4 Massenspektrometrie	13
2.2.5 Infrarotspektroskopie	14
2.2.6 Computergestützte Methoden.....	14
2.3 Verwendete Geräte und Materialien.....	14
2.3.1 Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien.....	14
2.3.2 Chromatographische Trennmethoden.....	14
2.3.3 Analysengeräte	15

3 Experimentelles	17
3.1 Extraktion der Pflanzeninhaltsstoffe	17
3.1.1 Erstellung des Rohextrakts	17
3.1.2 Grobauftrennung der Pflanzeninhaltsstoffe	18
3.2 Isolierung der Pflanzeninhaltsstoffe	20
3.2.1 Isolierung von CK-Lux01	20
3.2.2 Isolierung von CK-Lux02	23
3.2.3 Isolierung von CK-Lux03 und CK-Lux04	24
3.2.4 Isolierung von CK-Lux05	25
3.2.5 Isolierung von CK-Lux06	26
3.2.6 Isolierung von CK-Lux07 und CK-Lux08	27
3.2.7 Isolierung von CK-Lux09, CK-Lux10, CK-Lux11 und CK-Lux12	28
3.2.8 Isolierung von CK-Lux13	30
4 Ergebnisse	32
4.1 Ergebnisse von CK-Lux01	32
4.1.1 Strukturaufklärung von CK-Lux01	34
4.2 Ergebnisse von CK-Lux02 und CK-Lux12	35
4.2.1 Strukturaufklärung von CK-Lux02 und CK-Lux12	38
4.3 Ergebnisse von CK-Lux03	40
4.3.1 Strukturaufklärung von CK-Lux03	42
4.4 Ergebnisse von CK-Lux04	43
4.4.1 Strukturaufklärung von CK-Lux04	44
4.5 Ergebnisse von CK-Lux05	45
4.5.1 Strukturaufklärung von CK-Lux05	47
4.6 Ergebnisse von CK-Lux06	48
4.6.1 Strukturaufklärung von CK-Lux06	51
4.7 Ergebnisse von CK-Lux07	52

4.7.1 Strukturaufklärung von CK-Lux07	54
4.8 Ergebnisse von CK-Lux08	55
4.9 Ergebnisse von CK-Lux09 und CK-Lux10	55
4.9.1 Strukturaufklärung von CK-Lux09 und CK-Lux10	57
4.10 Ergebnisse von CK-Lux11	58
4.10.1 Strukturaufklärung von CK-Lux11	60
4.11 Ergebnisse von CK-Lux13	61
4.11.1 Strukturaufklärung von CK-Lux13	63
5 Diskussion	65
5.1 Terpene	65
5.2 Secoiridoidglycoside	67
5.3 Indolalkaloide (Indol:Secologanin 1:1)	69
5.4 Indolalkaloide (Indol:Secologanin 1:2)	70
6 Zusammenfassung	72
7 Abstract.....	74
8 Literaturverzeichnis	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Pflanze <i>Palicourea luxurians</i>	2
Abbildung 2: Secoiridoid-Biosyntheseweg	3
Abbildung 3: Schema verschiedener Secoiridoidglycoside mit dem Secologanin als Basismolekül	3
Abbildung 4: Biosynthese von Strictosidin aus Secologanin und Tryptamin durch das Enzym Strictosidin-Synthase	4
Abbildung 5: Pictet-Spengler Kondensationsreaktion, die auch durch das Enzym STS- Synthase katalysiert wird	4
Abbildung 6: Vorgeschlagene Biosynthese von Alstrostin A	5
Abbildung 7: Mögliche Abbauwege (A bzw. B) von β -Carotin zu den verschiedenen Megastigmanen	6
Abbildung 8: Diversität Megastigmane	6
Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes in MeOH ($\lambda = 230$ nm)	17
Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm der CHCl_3 -Phase ($\lambda = 230$ nm)	18
Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm der EtOAc-Phase ($\lambda = 230$ nm)	18
Abbildung 12: HPLC-Chromatogramm der <i>n</i> -BuOH-Phase ($\lambda = 230$ nm)	19
Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm der H_2O -Phase ($\lambda = 230$ nm)	19
Abbildung 14: Schema des gesamten chromatographischen Trennfortschrittes	20
Abbildung 15: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux01 bei $t_R = 6.069$ min ($\lambda = 230$ nm)	22
Abbildung 16: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux02 bei $t_R = 8.253$ min ($\lambda = 230$ nm)	24
Abbildung 17: Chromatogramme inkl. Absorptionsspektren der Peaks von CK-Lux03 und CK-Lux04 ($\lambda = 230$ nm)	25
Abbildung 18: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux05 bei $t_R = 6.443$ min ($\lambda = 230$ nm)	26

Abbildung 19: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux06 bei $t_R = 4.643 \text{ min}$ ($\lambda = 230 \text{ nm}$).....	27
Abbildung 20: Chromatogramme inkl. Absorptionsspektren der Peaks von CK-Lux07 und CK-Lux08 ($\lambda = 230 \text{ nm}$).....	28
Abbildung 21: Chromatogramme inkl. Absorptionsspektren der Peaks von CK-Lux09, CK-Lux10, CK-Lux11 und CK-Lux12 ($\lambda = 230 \text{ nm}$).....	30
Abbildung 22: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux13 bei $t_R = 7.154 \text{ min}$ ($\lambda = 230 \text{ nm}$).....	31
Abbildung 23: Struktur von Blumenol C-Sulfat (CK-Lux01).....	32
Abbildung 24: Struktur von Palicouresid (CK-Lux02 und CK-Lux12).....	36
Abbildung 25: Struktur von Dimethylacetal-Secologanin (CK-Lux03)	40
Abbildung 26: Struktur der Secologaninsäure (CK-Lux04).....	43
Abbildung 27: Struktur von 5α -Carboxystrictosidin (CK-Lux05)	45
Abbildung 28: Struktur von Dehydro-Rudgeifolin (CK-Lux06)	49
Abbildung 29: Struktur von Dibutylacetal-Secologanin (CK-Lux07)	53
Abbildung 30: Struktur von Demethyl-Secologanol (CK-Lux09 und CK-Lux10).....	56
Abbildung 31: Struktur von Swerosid (CK-Lux11).....	58
Abbildung 32: Struktur von (<i>E</i>)-Aldosecologanin (CK-Lux13)	61
Abbildung 33: Schema möglicher Biosynthesewege in <i>P. luxurians</i>	65
Abbildung 34: Vielfalt des Blumenol C	65
Abbildung 35: Secologanin	67
Abbildung 36: Biosynthese von Swerosid aus Secologanin mit der Secologaninsäure als Zwischenprodukt	68
Abbildung 37: Bekannte Alstroline	70
Abbildung 38: Übersicht der Verbindungen	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Trockenmasse in g der verschiedenen Extrakte	19
Tabelle 2: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. und neg. mode) von Blumenol C-Sulfat mit den dazu berechneten exakten Molekülonen	32
Tabelle 3: NMR-Daten von Blumenol C-Sulfat in Methanol- d_4	33
Tabelle 4: Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie von Blumenol C-Sulfat in MeOH	33
Tabelle 5: Ergebnisse der Untersuchung mit ATR-Infrarotspektroskopie von Blumenol C-Sulfat.....	33
Tabelle 6: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. und neg. mode) von Palicouresid (CK-Lux02) mit den dazu berechneten exakten Molekülonen	36
Tabelle 7: NMR-Daten von Palicouresid (CK-Lux02) in Methanol- d_4	36
Tabelle 8: Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie von Palicouresid in MeOH.....	38
Tabelle 9: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von Dimethylacetal-Secologanin mit den dazu berechneten exakten Molekülonen	41
Tabelle 10: NMR-Daten von Dimethylacetal-Secologanin in Methanol- d_4	41
Tabelle 11: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von Secologaninsäure mit den dazu berechneten exakten Molekülonen	43
Tabelle 12: NMR-Daten der Secologaninsäure in Methanol- d_4	43
Tabelle 13: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von 5 α -Carboxystrictosidin mit den dazu berechneten exakten Molekülonen	46
Tabelle 14: NMR-Daten von 5 α -Carboxystrictosidin in Methanol- d_4	46
Tabelle 15: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von Dehydro-Rudgeifolin mit den dazu berechneten exakten Molekülonen	49
Tabelle 16: NMR-Daten von Dehydro-Rudgeifolin in Methanol- d_4	49
Tabelle 17: Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie von Dehydro-Rudgeifolin in MeOH ..	51
Tabelle 18: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von Dibutylacetal-Secologanin mit den dazu berechneten exakten Molekülonen	53
Tabelle 19: NMR-Daten von Dibutylacetal-Secologanin in Methanol- d_4	53

Tabelle 20: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. und neg. mode) von Demethyl-Secologanol (CK-Lux09) mit den dazu berechneten exakten Molekülionen	56
Tabelle 21: NMR-Daten von Demethyl-Secologanol (CK-Lux09) in Methanol- d_4	56
Tabelle 22: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) des Swerosid mit den dazu berechneten exakten Molekülionen	59
Tabelle 23: NMR-Daten des Swerosid in Methanol- d_4	59
Tabelle 24: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von (<i>E</i>)-Aldosecologanin mit dem dazu berechneten exakten Molekülion	61
Tabelle 25: NMR-Daten von (<i>E</i>)-Aldosecologanin in Methanol- d_4	61

1 Einleitung

1.1 Die Pflanze *Palicourea luxurians*

Die Pflanzenart *Palicourea luxurians* zählt zur Pflanzenfamilie der Rötengewächse (Rubiaceae), welche zu den fünf artenreichsten Familien der Welt gehört. Die Familie umfasst 660 Gattungen sowie 13150 Arten und erstreckt sich in Form von Sträuchern, Bäumen, Lianen und Kräutern über alle Kontinente. Vorzugsweise ist sie in den Tropen und Subtropen aufzufinden, jedoch konnten einzelne Arten sogar auf dem antarktischen Kontinent nachgewiesen werden. [1]

Aufgrund der Artenvielfalt der Rötengewächse können die einzelnen Pflanzenarten sowohl als Nutzpflanzen oder auch als Zierpflanzen verwendet werden. Sehr viele Gattungen der Rubiaceae sind wichtige Quellen für Sekundärmetaboliten in Form von verschiedensten Alkaloiden, die in der Naturmedizin oder als Halluzinogene Gebrauch finden. [2] Die bekannteste Vertreterin der Pflanzenfamilie ist die Art *Coffea arabica*, die idealerweise in Äquatornähe angebaut wird und sich weltweit aufgrund des enthaltenen Koffeins in der Kaffeebohne größter Beliebtheit erfreut. [3] Eine weitere wichtige Pflanzengattung ist die *Cinchona*, welche auch unter dem Namen Chinarindenbaum bekannt ist. Sie wird in Südamerika als Heilpflanze angebaut und enthält den Arzneistoff Chinin, welcher als das älteste Therapeutikum gegen Malaria gilt. [4] Wie zuvor erwähnt, können einige Gattungen auch psychedelisch wirkende Inhaltsstoffe produzieren, wie beispielsweise die Art *Psychotria viridis*, welche zur Pflanzengattung der Brechsträucher (*Psychotria*) zählt. Die Pflanze erlangte durch die Biosynthese des psychoaktiven Tryptamin-Alkaloids *N,N*-Dimethyltryptamin Bekanntheit. Dieser Pflanzeninhaltsstoff wird von indigenen Völkern im Amazonas-Regenwald als wahrnehmungsveränderndes Rauschmittel für rituelle Zwecke eingesetzt. [5]

Die Pflanzengattung *Psychotria* weist eine große Diversität an Alkaloiden auf und ist eng mit der in dieser Arbeit untersuchten Gattung *Palicourea* verwandt. Die *Palicourea* selbst ist weniger gut erforscht und erstreckt sich mit etwa 200 Arten primär in den Neotropen über Mittel- und Südamerika. [6] Einige Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, dass die Gattung *Palicourea* eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten biosynthetisch produzieren kann, wie unter anderem verschiedenste Indolalkaloide. [7, 8, 9] Ebenso wurden auch einige niedermolekulare Verbindungen in der Pflanzenart *Palicourea coriacea* gefunden, wie das oxidative Harnsäureabbauprodukt Allantoin und verschiedene Benzoesäure- sowie

Zimtsäurederivate. [10] Die Untersuchung der bis jetzt noch nicht beschriebenen Pflanze *P.luxurians* (Abb.1) in dieser Masterarbeit soll ebenso durch die Isolierung und Strukturaufklärung diverser Alkaloide einen Beitrag für das Verständnis dieser Pflanzengattung leisten.

Die Pflanze wurde im Esquinas Regenwald gesammelt, der sich im Südwesten von Costa Rica erstreckt. Ein Teil davon gilt als Naturschutzgebiet und wird durch den Verein "Regenwald der Österreicher", welcher 1991 von Michael Schnitzler zur Erhaltung des bedrohten Regenwaldgebietes gegründet wurde, geschützt. [11]

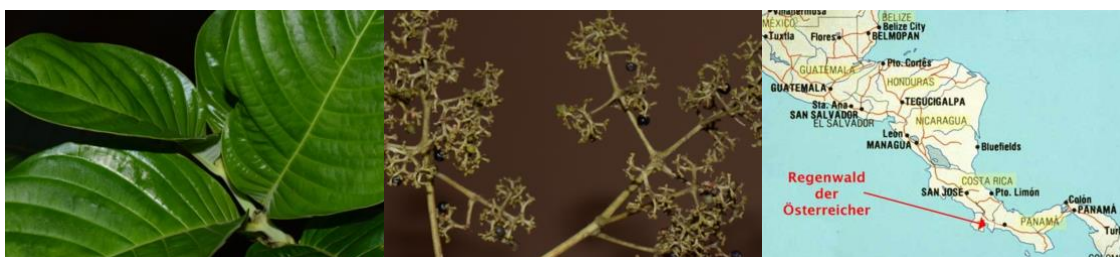


Abbildung 1: Die Pflanze *Palicourea luxurians*. **links:** Die untersuchten Blätter der Pflanze. (Foto: A.Berger) **mitte:** Die Früchte der Pflanze. (Foto: A.Berger) **rechts:** Standort des Esquinas Regenwaldes in Costa Rica. [11]

1.2 Phytochemische Aspekte

Ein Teilgebiet der Phytochemie befasst sich mit der Erforschung verschiedenster Sekundärmetaboliten einer Pflanze. Die Isolierung von Pflanzeninhaltsstoffen kann Aufschluss über den Metabolismus einer Pflanzengattung geben oder kann in manchen Fällen dabei helfen, neue enzymatischen Reaktionswege zu entdecken.

1.2.1 Secoiridoidglycoside

Ein Schlüsselbaustein bei der biologischen Synthese von vielen Alkaloiden ist das Iridoidglycosid Secologanin. Dieses besteht aus einem Secoiridoid-Strukturelement, welches O-glycosidisch mit einer β -D-Glucose verknüpft ist. [12] Für die Biosynthese des Secologanin wird das über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) gebildete Isopentenylpyrophosphat (IPP) bzw. dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) benötigt. Anschließend werden zwei DMAPP-Einheiten zu der Monoterpeneinheit Geraniol verknüpft, welches ein wichtiges Zwischenprodukt der Biosynthese darstellt. Durch nachfolgende Reaktionen wird über mehrere Schritte das Monoterpen-Alkaloid Loganin gebildet, welches letztendlich durch die Secologanin-Synthase enzymatisch zum Secologanin umgewandelt wird. [13] Eine Darstellung des Biosyntheseweges ist in Abb.2 zu sehen.

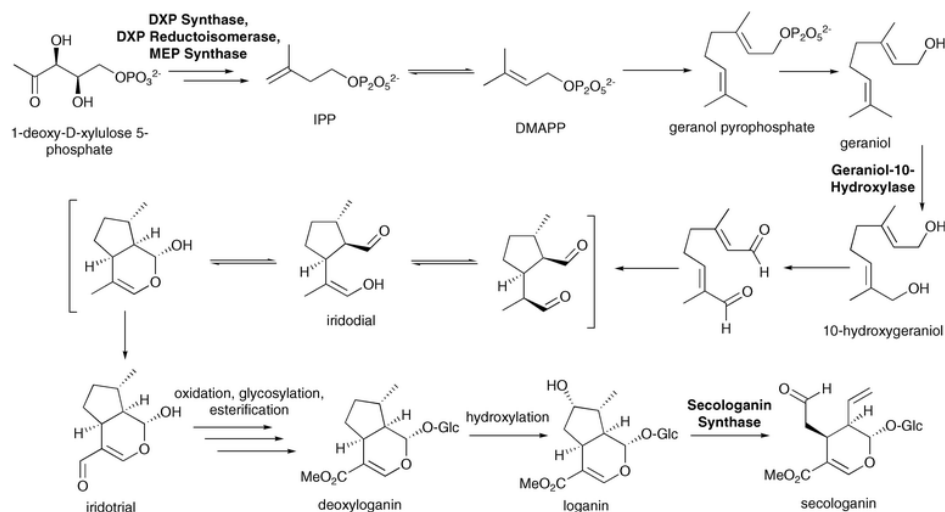


Abbildung 2: Secoiridoid-Biosyntheseweg. Das Schema zeigt die enzymatischen Syntheseschritte des Intermediates 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat zum Secologanin. [14]

Das Secologanin kann in Pflanzen biologisch zu einer Vielzahl an verschiedensten Monoterpen-Alkaloiden umgewandelt werden. In etwa 25% aller lebenden Organismen entstehen zahlreiche Alkaloide auf diese Weise. [12] Ein Auszug einfach gebildeter Secoiridoidglycoside aus dem Secologanin ist in Abb.3 zu sehen. Bei diesen Sekundärmetaboliten handelt es sich aufgrund der angeknüpften β -D-Glucose um gut wasserlösliche Alkaloide, die die Pflanze gegen Fressfeinde schützen. Die Pflanze speichert auf diese Weise Substanzen als nicht toxische Glycoside, welche bei der Zerstörung der Pflanzenzelle ihre Wirkung als Giftstoffe freisetzen. Ebenso können Glycosylierungen als Detoxifizierungsmaßnahme gegen Schadstoffe genutzt werden. [15]

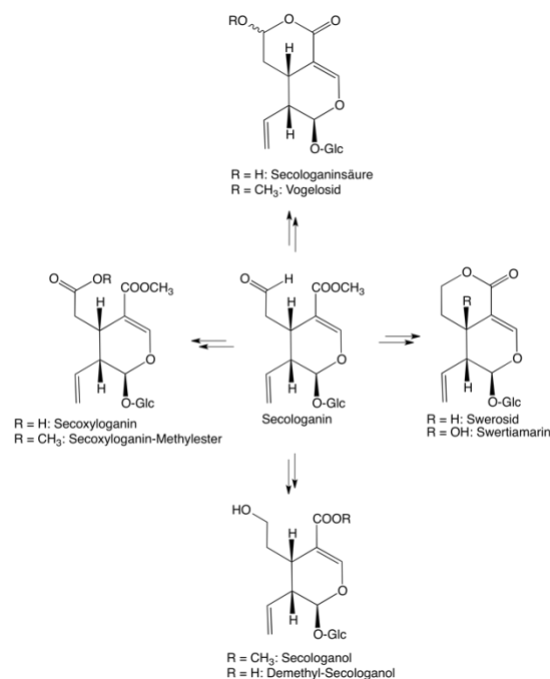


Abbildung 3: Schema verschiedener Secoiridoidglycoside mit dem Secologanin als Basismolekül.

1.2.2 Indolalkaloide

Das Secologanin kann auch komplexere Verbindungen bilden. Dafür reagiert es zB.: mit der Aminosäure Tryptamin zu Strictosidin, welches das Anfangsglied der Indolalkaloid-Biosynthese darstellt und somit für eine Reihe von Tryptamin-Iridoid-Alkaloiden eine zentrale Rolle spielt. [14]

Für die Biosynthese decarboxyliert das Enzym Tryptophan-Decarboxylase das L-Tryptophan zu Tryptamin, das in einem nächsten wichtigen Schritt mit dem Secologanin zu Strictosidin reagiert (Abb.4). Dieser Schritt wird durch das Enzym Strictosidin-Synthase (STS-Synthase) katalysiert. [14] Viele Pflanzenfamilien, wie die Hundsgift-, Brechnuss- sowie auch die Rötengewächse nutzen diesen Stoffwechselweg für die biologische Synthese des Strictosidin und dessen Umwandlung in Folgeprodukte. [16]

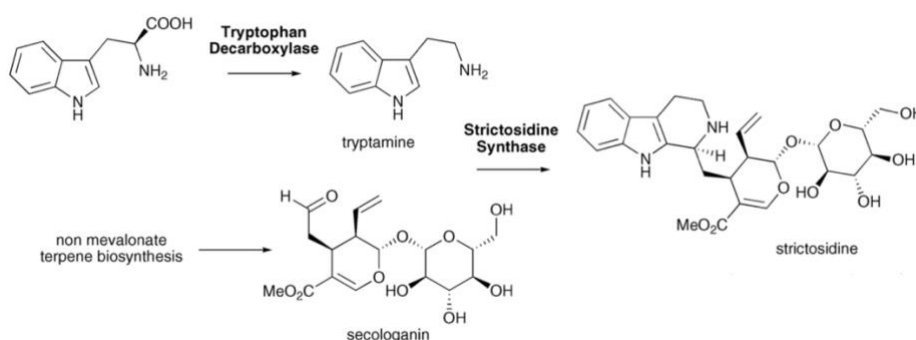


Abbildung 4: Biosynthese von Strictosidin aus Secologanin und Tryptamin durch das Enzym Strictosidin-Synthase. [14]

Im Detail katalysiert die STS-Synthase die sogenannte Pictet-Spengler Reaktion, welche auch chemisch im Jahr 1911 von Armé Pictet und Theodor Spengler für die Wirkstoffsynthese von Alkaloiden erfolgreich entwickelt wurde. [17] Dabei greift das primäre Amin des Tryptamin den elektrophilen Aldehyd des Secologanin an und durch Abspaltung von Wasser wird somit der zweite N-Heterozyklus des Strictosidin geformt (Abb.5).

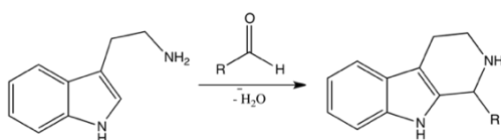


Abbildung 5: Pictet-Spengler Kondensationsreaktion, die auch durch das Enzym STS-Synthase katalysiert wird.

Jedoch gibt es auch weitere Indolalkaloide, die weder die STS-Synthase benötigen noch das Schlüsselmolekül Strictosidin als Vorstufe besitzen. Dabei handelt es sich

beispielsweise um die erst kürzlich entdeckten Alstroline, welche über einen anderen enzymatischen Mechanismus in den Pflanzen biologisch synthetisiert werden können (Abb.6). Über das Enzym selbst ist nicht viel bekannt, jedoch wird angenommen, dass es eine Form der Kondensationsreaktion von sekundären Aminen mit den Aldehyden des Secologanin ermöglicht. Ebenso wird durch weitere Enzymkatalyse zusätzlich der *N,N*-Heterozyklus geformt und danach oxidativ eine Hydroxygruppe eingeführt. Bei der biologischen Synthese ist das Verhältnis von Strictosidin:Secologanin nicht 1:1 sondern 1:2 und somit eröffnet sich für die Pflanzen ein neuer Biosyntheseweg für weitere Tryptamin-Iridoid-Alkaloide mit einem tetrazyklischen Ringsystem. [18]

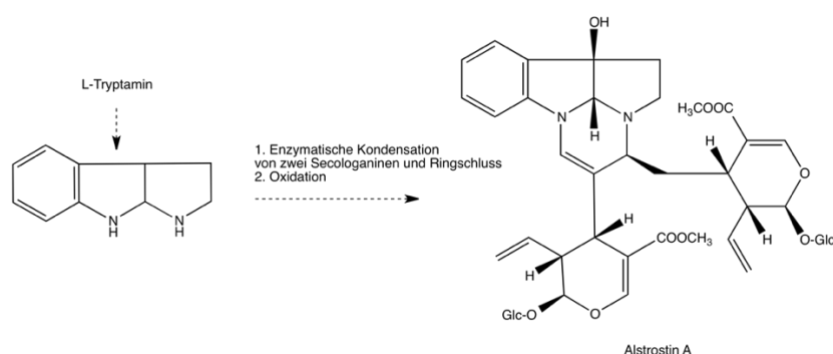


Abbildung 6: Vorgeschlagene Biosynthese von Alstrostin A. [18]

1.2.3 Terpene

Neben den bereits erwähnten Monoterpen-Alkaloiden gibt es noch eine große Anzahl an weiteren Sekundärmetaboliten in einer Pflanze. Eine Klasse dieser Naturstoffe stellen die Terpene und im speziellen die Carotinoide dar. Die primäre Aufgabe der Tetraterpene ist die Absorption von Licht und der Energietransport in den Chromoplasten höherer Pflanzen. Somit spielen die Tetraterpene eine zentrale Rolle bei der Photosynthese. Das Absorbieren des Lichtes wird durch das konjugierte Doppelbindungssystem des C_{40} -Kohlenstoffkörpers, welcher biosynthetisch aus insgesamt acht Isopren-Einheiten aufgebaut wird, ermöglicht. Eine zusätzliche Funktion der langkettigen Moleküle ist die Aufnahme nicht nutzbarer Lichtstrahlung und Umwandlung in Wärme, um das Chlorophyll vor der Zerstörung durch Photooxidationen zu schützen. [19] Die Carotinoide werden in Carotine, welche aus Kohlenstoff und Wasserstoff aufgebaut sind und in Xantophylle, bei denen es sich um sauerstoffhaltige Derivate der Carotine handelt, eingeteilt. Diese langkettigen Tetraterpene sind jedoch in der Naturstoffisolierung wenig von Interesse, da die verschiedenen Strukturvariationen und Aufgaben in der Pflanze größtenteils bekannt sind.

Weitaus vielseitiger sind die Biomoleküle, die durch den Abbau dieser Tetraterpene entstehen können. Bei einer Gruppe dieser Abbauprodukte handelt es sich um die sogenannten Megastigmane mit einem Grundgerüst aus 13 Kohlenstoff, welche aus dem β -Carotin über mehrere Zwischenschritte entstehen. [20] Dieser Abbau kann chemisch durch Licht, Sauerstoff oder Wärme induziert werden oder das β -Carotin wird enzymatisch durch eine Dioxygenase gespalten und anschließend erfolgen bei beiden Abbauwegen enzymatische Transformationen zu den jeweiligen Megastigmanen als Endprodukte. [21] Der schematische Abbau des β -Carotin ist in Abb.7 zu sehen.

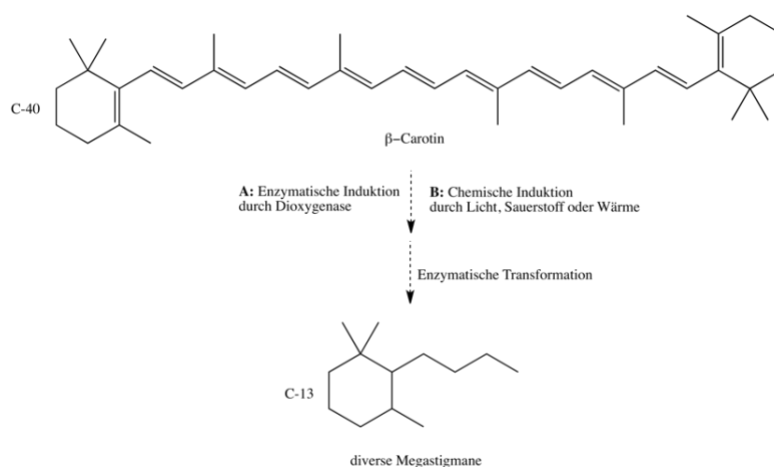


Abbildung 7: Mögliche Abbauewege (A bzw. B) von β -Carotin zu den verschiedenen Megastigmanen.

Derzeit sind etwa 150 Megastigmane bekannt, wobei einige aufgrund ihres intensiven blumigen Duftes als Aromastoffe eingesetzt werden. [20] Die Tetraterpen-Abbauprodukte treten in zahlreichen Formen auf und können an verschiedenen Stellen oxidiert oder auch glycosyliert sein. [22, 23, 24]. Eine Auswahl diverser Megastigmane ist in Abb.8 ersichtlich. Einige dieser kleinen Terpenoide wurden auch schon in *Psychotria* nachgewiesen. Beispielsweise konnte das abgebildete Vomifoliol in der Art *Psychotria cadigensis* isoliert werden und das Blumenol C-Glucosid in der Pflanze *Psychotria stachyodis* gefunden werden. [22, 24] Somit sind diese Verbindungen auch in der Familie Rubiaceae präsent, was ein mögliches Auftreten in der der Pflanzengattung *Palicourea* nicht ausschließen lässt.

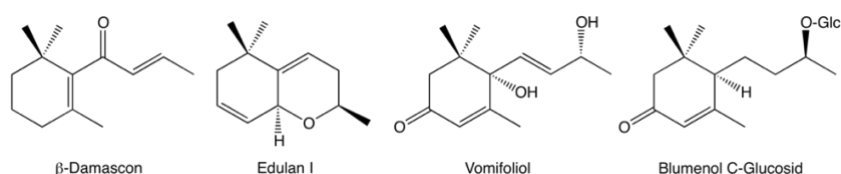


Abbildung 8: Diversität Megastigmane.

1.3 Ziel der Arbeit

Diese Masterarbeit befasst sich mit der Untersuchung der neotropischen Pflanzenart *Palicourea luxurians*, welche ein Teil der Familie Rubiaceae ist. Im Fokus steht die Isolierung und Strukturaufklärung diverser Pflanzeninhaltsstoffe aus den Blättern der Pflanze.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Isolierung und Reinigung der Naturstoffe. Dafür wird ein alkoholisches Blätterextrakt der Pflanze untersucht, anschließend verschiedene Extraktionsphasen erstellt und diese chromatographisch analysiert. Die Reinigung und Trennung erfolgt hauptsächlich mit Säulenchromatographie. Für eine ideale Separierung der Substanzen werden verschiedene stationäre und mobile Phasen kombiniert. Die Kontrolle der Reinheit der gesammelten fraktionierten Proben und Reinstoffe erfolgt mit Dünnschichtchromatographie. Eine detaillierte Analyse der Qualität der vorliegenden Fraktionen oder der reinen Substanzen erfolgt analytisch mit einer optimierten HPLC-Methode.

Bei signifikant ausreichender Menge und Reinheit werden die isolierten Inhaltsstoffe mit spektroskopischen Methoden charakterisiert. Die Strukturaufklärung umfasst somit den zweiten Teil dieser Masterarbeit. Die vorliegenden Substanzen werden mit eindimensionaler (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) sowie zweidimensionaler (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY) NMR-Spektroskopie untersucht. Unter anderem werden für die Analyse der Struktur ergänzend sowohl diverse Massenspektren angefertigt als auch Infrarotspektroskopie genutzt. Ebenfalls werden die Pflanzeninhaltsstoffe mit UV/Vis-spektroskopischen Methoden verifiziert. Zusätzlich werden die Ergebnisse mit passenden Computerdatenbanken analysiert und ebenso vergleichende Literatur für die Strukturaufklärung der isolierten Substanzen genutzt. Des Weiteren wird auch mit entsprechenden wissenschaftlichen Arbeiten Rückschlüsse auf die Biosynthesewege der Pflanzengattung *P.luxurians* gezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden zur Reinigung und Isolierung von Naturstoffen

Für die vollständige Trennung eines Naturstoffes aus den Blättern einer Pflanze sind mehrere Aufarbeitungsschritte für die schlussendliche Charakterisierung notwendig. Als chemische Trennverfahren eignen sich besonders gut die Extraktion und die Chromatographie, um einen Reinstoff mit guter Ausbeute und hoher Reinheit isolieren zu können. [25]

2.1.1 Extraktionsmethoden

Zur Gewinnung der einzelnen Pflanzeninhaltsstoffe werden die Blätter getrocknet, zerkleinert und danach einige Tage mit MeOH extrahiert. Zur Verbesserung der Extraktion wird dieser Schritt mehrmals wiederholt. Dadurch können die einzelnen Komponenten extrahiert werden und der entstehende Alkoholextrakt kann weiter untersucht werden. Üblicherweise wird danach das Lösungsmittel unter milden Bedingungen im Rotationsverdampfer abgedampft, damit sich die Pflanzeninhaltsstoffe nicht zersetzen und anschließend die Gesamtmenge des trockenen Rohextraktes bestimmt. [26]

Zu Beginn wird ein Teil des Pflanzenextrakts in Petrolether (PE) gelöst, damit sich der Großteil des vorhandenen Chlorophylls der Pflanze und etwaige lipophile Bestandteile entfernen lassen. [27] Daraufhin werden die Inhaltsstoffe der Pflanze in mehreren Schritten über ihre Polarität mit Flüssig-Flüssig Extraktion in einem Scheidetrichter getrennt. Zuerst werden in einem ersten Zweiphasensystem aus $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ die restlichen apolaren Verbindungen in Chloroform aufgenommen und anschließend die polaren Stoffe nacheinander mit EtOAc bzw. *n*-BuOH aus der Wasserphase separiert. In der alkoholischen Wasserphase befinden sich letztendlich nur noch der Hauptbestandteil des vorhandenen Zuckers und weitere polare Stoffe. [28] Das Extrahieren mit den genannten Lösungsmitteln sorgt für eine grobe Vortrennung der vorhandenen Pflanzeninhaltsstoffe und verringert die Anzahl der nachfolgenden chromatographischen Trennschritte.

Für eine effiziente Extraktion eines Stoffes wird mit geringen Mengen, jedoch dafür einige Male mit neuem Lösungsmittel extrahiert. Durch das Ausschütteln mit einer ungesättigten Lösung wird die Aufnahmefähigkeit verbessert und somit die Qualität der Extraktion gesteigert. Ebenso sollte sich der Stoff besser im Extraktionsmittel lösen. Die Verteilung einer Komponente in einem angrenzenden Zweiphasensystem verhält sich wie im Nernst'schen Verteilungsgesetz Glg.1 beschrieben. [29]

$$K_D = \frac{c_1}{c_2} \quad \text{Glg.1}$$

K_D Nernst'scher Verteilungskoeffizient

c_1 Konzentration von Substanz A in der ersten Phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

c_2 Konzentration von Substanz A in der zweiten Phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Es sollte in Betracht gezogen werden, dass sich dieses Verteilungsgesetz auf eine Substanz A mit bekannter Konzentration bezieht und im Falle der Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen eine unbekannte Anzahl an gelösten Stoffen in der angrenzenden Phase vorhanden ist. Ebenso ist über die Löslichkeit der einzelnen Naturstoffe nichts bekannt und somit soll das Nernst'sche Verteilungsgesetz nur als Anhaltspunkt dienen.

2.1.2 Chromatographische Trennmethoden

Eine der gängigsten Methoden zur Trennung von Naturstoffen in der Phytochemie ist die Säulenchromatographie. Mit verschiedenen Variationen an stationären- und mobilen Phasen lassen sich Pflanzeninhaltsstoffe nicht nur über ihre Polarität, sondern auch über ihre Größe im kleinen und großen Maßstab trennen. Einerseits kann mit Normalphase getrennt werden. Dabei wird als Säulenmaterial feinpulvriges Kieselgel SiO_2 oder Aluminiumoxid Al_2O_3 mit einem mäßig polaren Lösungsmittel verwendet. Für die mobile Phase wird meist MeOH mit EtOAc oder CHCl_3 kombiniert. Andererseits kann auch mit Umkehrphase gearbeitet werden, wobei als stationäre Phase ein modifiziertes Kieselgel mit kovalent gebundenen hydrophoben Alkylketten verwendet wird, welches für die chromatographische Trennung mit einem polaren Lösungsmittel, wie zum Beispiel einem Gemisch aus H_2O und MeOH, eluiert wird. [30]

Eine weitere Art der Säulenchromatographie ist die Medium Pressure Liquid Chromatography, kurz MPLC, welche eine Separierung bei erhöhtem Druck ermöglicht. Die Wahl des Druckes hängt dabei unter anderem von einigen Parametern, wie Menge an aufgetragener Substanz, eingesetzter Eluent und dem verwendeten Säulenmaterial ab. Der verwendete Druck bewegt sich üblicherweise in einem Bereich zwischen 5-20 bar. Ebenso wie zuvor beschrieben, kann auch mit Normalphase oder Umkehrphase gearbeitet werden. [31]

Des Weiteren ist eine Trennung mittels Größenausschlusschromatographie mit einem porösen Polymer als Säulenmaterial möglich, um die einzelnen Naturstoffe über ihre Größe trennen zu können. Durch das Vorhandensein der Poren können kleine Moleküle hineinwandern, was folglich für größere Verbindungen nicht möglich ist, und

somit resultieren verschiedene Retentionszeiten. [29] In dieser Masterarbeit wurde ein quervernetztes Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer verwendet, welches auch unter dem Namen Sephadex (Separation Pharmacia Dextran) bekannt ist. [32]

Zusätzlich können die oben genannten säulenchromatographischen Trennmethoden mit einem UV-Detektor kombiniert werden, welcher bei geeigneter Wellenlänge detektiert und somit die fraktionierte Separierung erleichtert. Anzumerken ist, dass ebenso die Wahl des Eluenten eine wichtige Rolle spielt, da dieser sowohl isochratisch als auch gradientisch eingesetzt werden kann und deshalb ein wichtiger Parameter für die selektive Trennung ähnlich polarer Stoffe ist. [30]

Ebenfalls hat sich die Dünnschichtchromatographie (TLC) im Bereich der Isolierung von Pflanzeninhaltsstoffen etabliert. Sie dient zur schnellen und qualitativen Kontrolle der Sauberkeit einzelner Fraktionen. Als stationäre Phase wird üblicherweise SiO_2 auf einem Trägermaterial (Aluminium oder Glas) genutzt und als Eluent ein Gemisch aus polaren und apolaren Lösungsmitteln, je nach Anforderung an die Trennung, verwendet. Die getrennten Substanzen können danach im UV-Licht betrachtet werden und alternativ dazu kann die Platte mit einem Reagenz besprüht (z.B.: Anisaldehyd oder Dragendorff-Reagenz) werden. Die dabei entstehenden Farbreaktionen helfen bei der Identifikation einzelner spezieller funktioneller Gruppen bzw. der Zuordnung der Substanz zu einer bestimmten Naturstoffklasse. [33]

Als weitere Möglichkeit lässt sich auch eine analytische oder auch präparative Dünnschichtchromatographie (prepTLC) einsetzen, um in einem letzten Trennschritt kleine Mengen selektiv trennen zu können. Die Probe wird hochkonzentriert auf eine SiO_2 -Glasplatte aufgetragen und anschließend in die Laufmittelkammer gestellt. Die Wahl des Laufmittels hängt, wie auch bei der zuvor erwähnten Dünnschichtchromatographie, von den polaren Eigenschaften der zu trennenden Stoffe ab und sollte letztendlich zu einer signifikanten Trennung der entstehenden Banden führen. Danach werden die getrennten Banden markiert, das Kieselgel von Trägermaterial entfernt, die adsorbierten Substanzen in MeOH überführt und auf ihre Reinheit analysiert. [33]

2.2 Methoden zur Charakterisierung von Pflanzeninhaltsstoffen

Nach erfolgreicher Trennung eines Naturstoffes, lässt sich dieser *in situ* mit verschiedenen analytischen Methoden untersuchen. Unter Anderem sind für die Charakterisierung sowohl der molare dekadische Extinktionskoeffizient sowie die Absorptionsmaxima notwendig.

Für die zusätzliche Aufklärung der molekularen Struktur müssen die Pflanzeninhaltsstoffe mit verschiedenen spektroskopischen Methoden und auch computergestützten Methoden analysiert werden. [25]

2.2.1 Untersuchung mit HPLC

Eine der wichtigsten und schnellsten analytischen Methoden zur Überprüfung der Sauberkeit einzelner Fraktionen oder auch Reinstoffen ist die High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Hierfür wird ein Aliquot der gelösten Probe mit einer optimierten HPLC-Methode analysiert. Folgende Parameter bestimmen die Qualität der Trennung: Art der Substanz, Zusammensetzung des Laufmittels, Material und Größe der Trennsäule, Einspritzvolumen und Flussrate sowie die Temperatur. Die dafür erstellte Messmethode sollte über die gesamte Messserie nicht verändert werden, um die einzelnen Chromatogramme bei gleicher Detektionswellenlänge qualitativ vergleichen zu können. [30]

2.2.2 UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

Ein gängiges Maß für die Charakterisierung eines Stoffes ist der molare dekadische Extinktionskoeffizient ε , welcher mit einem Photometer bestimmt wird. Für die Messung wird eine bestimmte Menge des Reinstoffes in einem definierten Volumen gelöst und in eine Quarzküvette gefüllt. Daraufhin wird die Extinktion E gemessen und ε über das Lambert-Beer'sche-Gesetz (Glg.2) bestimmt. Dieser wird in der Literatur üblicherweise in $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für das jeweilige Absorptionsmaximum angegeben und zusätzlich wird das Lösungsmittel angeführt, indem die Messung stattgefunden hat. [34]

$$E = \log \left(\frac{I_0}{I_I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Glg.2}$$

E Extinktion

I_0 Intensität des einfallenden Lichtstrahls

I_I Intensität des ausfallenden Lichtstrahls

ε molare dekadische Extinktionskoeffizient ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

c Konzentration der Substanz ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

d Schichtdicke der Küvette (cm)

2.2.3 NMR-Spektroskopie

Zur Strukturbestimmung von Naturstoffen bietet sich die Kernspinresonanzspektroskopie an, da sie eine vollständige Aufklärung der Struktur ermöglicht. Für die NMR-Messung

wird ein Stoff in ausreichender Menge und mit hohem Reinheitsgrad benötigt, welcher in einem geeigneten deuterierten Lösungsmittel gelöst wird. Mit einer Kombination aus 1D- und 2D-NMR Spektroskopie können komplexe Strukturen beschrieben werden sowie deren absolute Konfiguration bestimmt werden. [35]

Die Überprüfung der Reinheit einer isolierten Substanz erfolgt durch die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums, da diese Messung rasch erfolgt und sehr sensitiv ist. Im aufgenommenen Protonenspektrum sind folgende Parameter ablesbar wie, die chemische Verschiebung δ_{H} , die Multiplizität, das Flächenintegral und die Kopplungskonstante J , welche für den Erfolg der Strukturaufklärung von Nöten sind. [35]

Als weitere 1D-NMR-Methode wird standardmäßig ein ^{13}C -Spektrum gemessen, welches die Zuordnung der im Molekül vorhandenen Kohlenstoffatome ermöglicht. Zusätzlich dazu, kann eine erste Grobunterscheidung zwischen den einzelnen Methyl-, Methylen-, Methingruppen und den quartären Kohlenstoffatomen vorgenommen werden. Ähnlich wie bei der ^1H -NMR-Spektroskopie gibt die chemische Verschiebung δ_{C} Auskunft über die elektronische Umgebung des jeweiligen ^{13}C -Atoms, was wiederum zur Identifikation verschiedener funktioneller Gruppen führen kann. [35]

Neben den eindimensionalen Messmethoden können auch zweidimensionale Spektren, wie das 2D-COSY (Correlated Spectroscopy) aufgenommen werden. Dies beschreibt die homonukleare Wechselwirkung zweier Protonen über zwei, drei oder mehr Bindungen und erlaubt somit das Verknüpfen von Kohlenwasserstoffgerüsten. Die Intensität des sogenannten Cross Peaks resultiert dabei aus der Entfernung des nächsten Kerns und dem geteilten Winkel der Bindung. Die Stärke der Wechselwirkung in Abhängigkeit des Torsionswinkels hängt von der Karplus-Beziehung ab, welche besagt, dass bei einem geteilten Winkel von 0° bzw. 180° die Stärke der $^3J_{\text{H-H}}$ -Kopplung größer ist als bei nahezu 90° . Dadurch können zusätzliche Informationen über die Konformation des Moleküls gewonnen werden. [36]

Auch das 2D-TOCSY (Total Correlated Spectroscopy) dient zur Untersuchung von HH-Korrelationen im zweidimensionalen Frequenzraum und kann einzelne abgeschlossene Spinsysteme darstellen. Diese Technik liefert wertvolle Zusatzinformationen im Bereich der Strukturaufklärung von Naturstoffen, da diese meist aus mehreren Strukturelementen bestehen, die durch Heteroatome oder quartäre Kohlenstoffe getrennt sind und ermöglicht somit einen guten Überblick über die vorhandenen Strukturteile eines Moleküls. [36]

Die Zuordnung der einzelnen Protonen zu ihrem zugehörigen Kohlenstoffatom erfolgt mit dem Messen eines 2D-HSQC (Hetero Nuclear Single Quantum Correlation). Dadurch lassen sich nicht nur CH-Korrelationen über eine Bindung darstellen, sondern auch quartäre Kohlenstoffe identifizieren, da diese keine $^1J_{H-C}$ -Kopplung besitzen und folglich kein Korrelationssignal im 2D-Spektrum zeigen. [36]

Das 2D-HMBC (Hetero Multiple Bond Correlation) ist eine weitere heteronukleare Messmethode und beschreibt, im Gegensatz zum HSQC-Experiment, die CH-Kopplungen über zwei, drei oder in wenigen Fällen auch vier oder fünf Bindungen. Die dargestellten $^{2,3}J_{C-H}$ -Kopplungen sind hilfreich bei der Aufklärung komplexerer Strukturelemente, da diese die Interpretation einzelner Kohlenstoffgerüste ermöglichen und ebenfalls Auskunft über die möglichen Verknüfungspositionen der verschiedenen Teile der Molekülstruktur geben. [36]

Ebenfalls gibt es noch die Möglichkeit ein 2D-NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) Spektrum aufzunehmen. Diese Messtechnik ermöglicht die homonukleare Untersuchung der räumlichen Nähe einzelner Protonen und somit kann ebenso die Stereochemie eines Moleküls mit Kernresonanzspektroskopie gelöst werden. Dafür wird im Wesentlichen der Kern-Overhauser-Effekt genutzt, welcher die Darstellung der Wechselwirkung einzelner koppelnder Kerndipole erlaubt. Für die Signalintensität spielen beispielsweise der räumliche Abstand der Protonenkerne zueinander sowie die Größe und Beweglichkeit des Moleküls eine Rolle. Deshalb empfiehlt sich zur Erhöhung der Signalstärke bei einer Molekülgröße von ~ 1000 Da die zusätzliche Aufnahme eines 2D-ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) Spektrums zur vollständigen Identifikation der einzelnen Chiralitätszentren. [36]

2.2.4 Massenspektrometrie

In Kombination mit der NMR-Spektroskopie wird üblicherweise die Massenspektrometrie für die Untersuchung von Pflanzeninhaltsstoffen eingesetzt, da sie die exakte Masse eines Moleküls bei sehr kleinen Mengen bestimmen kann. In dieser Arbeit wurde ein HR-TOF-Massenspektrometer (High Resolution Time-of-Flight) verwendet und zur Ionisation Elektronensprayionisation (ESI) aus der flüssigen Phase genutzt. Hier wird der zu untersuchende Analyt unter milden Bedingungen an der Spitze einer Metallkapillare im elektrischen Feld ionisiert, wodurch sowohl positive Ionen als auch negative Ionen, je nach angelegter Spannung, erzeugt werden können. [37]

2.2.5 Infrarotspektroskopie

Zusätzlich kann zur Strukturaufklärung einzelner Naturstoffe die Infrarotspektroskopie verwendet werden. Diese Methode dient hauptsächlich zur Identifikation funktioneller Gruppen, wie zum Beispiel Keto-, Hydroxy- oder auch Sulfatgruppen, da diese eine sehr signifikante Absorptionsbande im Infrarotspektrum zeigen. Hierfür wurde als Messinstrument ein ATR-Infrarotspektrometer (Attenuated Total Reflection) genutzt, da dieses die Analyse von kleinen Probenmengen ermöglicht. Die gelöste Probe wird auf den ATR-Kristall aufgetragen, das Lösungsmittel verdampft und die Abschwächung der Totalreflexion gemessen. [38]

2.2.6 Computergestützte Methoden

Als zusätzliche Kontrolle von Strukturvorschlägen können die chemischen Shifts eines Moleküls neben der vorhandenen Literatur auch mit digitalen Datenbanken verglichen werden. Für die Überprüfung der dreidimensionalen Strukturen einiger isolierter Substanzen wurde CSEARCH und SPECINFO genutzt und die berechneten ^{13}C -Shifts mit den Gemessenen auf Übereinstimmung verglichen. [39]

2.3 Verwendete Geräte und Materialien

2.3.1 Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien

Die genutzten Lösungsmittel und Chemikalien in dieser Arbeit wurden nicht zusätzlich gereinigt und entsprachen somit dem angegebenen Reinheitsgrad der Hersteller.

Chemikalien von Carl Roth GmbH & Co. KG

NH_4OAc

Chemikalien von Merck

Aceton, Anisaldehyd, CHCl_3 , Eisessig, Et_2O , EtOAc , H_2O , H_2SO_4 , MeOH , *n*-BuOH, PE

Chemikalien von Sigma Aldrich

Methanol- d_4

2.3.2 Chromatographische Trennmethoden

Material Normalphase

Säule: Kieselgel 60 (40-63 μm) (Merck)

Material Größenausschlusschromatographie

Säule: Sephadex LH 20 (GE Healthcare)

MPLC

Gerät: Pump Controller C-610/Pump Module C-601 mit gekoppelten UV-Photometer (Büchi)

Säule A: Lobar Fertigsäule Größe B 310, LiChoprep Si 60 (40-63 μm)

Säule B: Lobar Fertigsäule Größe B 310-25, LiChoprep RP-18 (40-63 μm)

Material Dünnschichtchromatographie

Standartplatte: DC-Fertigfolien ALUGRAM Sil G/UV₂₅₄ 0.20 mm (Macherey-Nagel)

Präparative Platte: Glass Plates Sil G/UV₂₅₄ 0.25 mm (Macherey-Nagel)

2.3.3 Analysengeräte

HPLC-System

Gerät: Agilent 1100 series mit einem LAMAG UV-Diodenarray Detektor

Säule: Hypersil BDS-C₁₈ Säule (250 x 4.6 mm, 5 μm)

Einspritzvolumen: 10 μL

Flussrate: 1 mL/min

Temperatur: 293 K

Laufmittel: (A) 10 mM NH₄OAc, (B) MeOH

Gradient der HPLC-Methode: 0 min 40% B, 12 min 90% B, 12.1 min 100% B, 22 min 100% B, posttime 10 min

UV/Vis-Spektrometer

Gerät: Specord 205 Photometer

Schichtdicke der Quarzküvette: 10 mm

NMR-Spektrometer

Gerät: Bruker DRX-600

Parameter: 600 MHz (¹H), 150 MHz (¹³C), T = 293 K

Software: Topspin 3.5

Massenspektrometer

Gerät: HR-TOF-Massenspektrometer gekoppelt mit ESI (maXis, Bruker Daltonics)

Parameter: $U = 4 \text{ kV}$, $I = 30\text{-}50 \text{ nA}$

Trärgasparamater: N_2 , $T = 180 \text{ }^\circ\text{C}$, $p = 0.3 \text{ bar}$, $V = 4.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Infrarotspektrometer

Gerät: FT-IR Spektrometer (InfraRed Bruker Tensor 37) inkl. PLATINUM ATR Einheit

3 Experimentelles

3.1 Extraktion der Pflanzeninhaltsstoffe

3.1.1 Erstellung des Rohextrakts

Die Pflanze *Palicourea luxurians* (Nr.: 2069) wurde nahe der La Gamba Forschungsstation in Costa Rica von Mitarbeitern der Abteilung Botanik und Biodiversitätsforschung, Division für systematische und evolutionäre Botanik der Universität gesammelt.

Zu Beginn wurden die Blätter vom Rest der Pflanze entfernt, lichtgeschützt luftgetrocknet und die Trockenmasse von 113.5 g bestimmt. Das Pflanzenmaterial wurde zerkleinert, zwei Tage lang bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss mit 1.0 L MeOH extrahiert und daraufhin der entstandene alkoholische Extrakt filtriert. Diese Arbeitsschritte wurden dreimal wiederholt, die Extrakte vereinigt, das MeOH im Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 38 °C abgedampft und der Rückstand im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Trockenmasse wurde mit einer Laborwaage bestimmt und betrug 23.7 g. Zur Analyse des Rohextraktes wurde die Probe in 10 mL MeOH gelöst und 300 µL Aliquot entnommen und mit 300 µL MeOH für die Messung mit der HPLC verdünnt, welche in Abb.9 zu sehen ist. Dieses und auch folgenden HPLC-Chromatogramme in dieser Arbeit zeigen einen Ausschnitt von 17 min, da die Bereiche bei höheren Retentionszeiten und der gewählten Detektionswellenlänge von 230 nm nicht relevant waren.

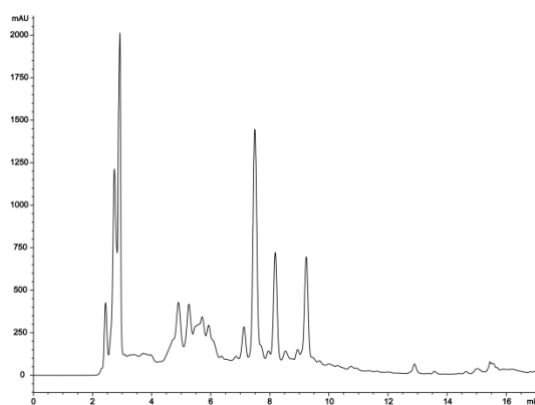


Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes in MeOH ($\lambda = 230$ nm).

Die Temperatur des Wasserbades wurde auch bei weiteren Experimenten in dieser Arbeit nicht verändert und ebenso wurden weitere Probenmengen auf die gleiche Art getrocknet und eingewogen, wie in diesem Punkt beschrieben.

3.1.2 Grobauftrennung der Pflanzeninhaltsstoffe

Für die weitere Untersuchung wurde der getrocknete Rohextrakt in 250 mL PE (8% Diethylether, 5% Aceton) in einem Rundkolben gelöst und der schwarz-grüne Überstand entfernt. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt und anschließend der nicht gelöste Rückstand in einem Gemisch aus 300 mL CHCl_3 und 200 mL H_2O aufgenommen. Das nicht mischbare Zweiphasensystem wurde für die weitere Trennung in einen passenden Scheidetrichter überführt, ausgeschüttelt und die bräunlich schwarze Chloroformphase abgetrennt. Dies Arbeitsschritt wurde noch zweimal mit je 300 mL CHCl_3 wiederholt, die CHCl_3 -Phasen kombiniert, im Rotationsverdampfer konzentriert und davon ein HPLC-Chromatogramm (Abb.10), wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, aufgenommen und danach die Trockenmasse ermittelt (Tab.1).

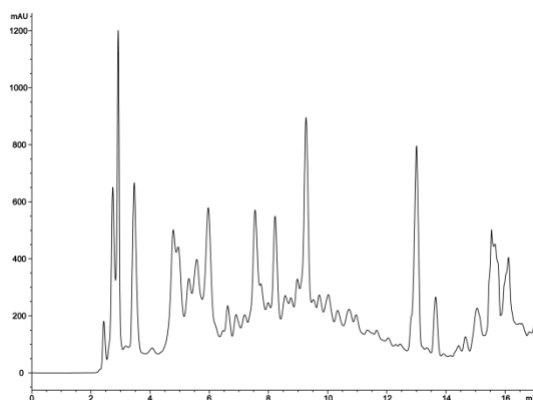


Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm der CHCl_3 -Phase ($\lambda = 230 \text{ nm}$).

Als nächstes wurde die H_2O -Phase dreimal mit je 250 mL EtOAc ausgeschüttelt und eine HPLC-Messung (Abb.11) durchgeführt und der trockene Extrakt eingewogen (Tab.1).

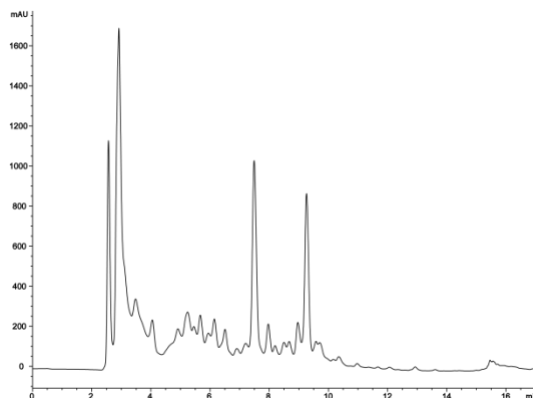


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm der EtOAc-Phase ($\lambda = 230 \text{ nm}$).

Danach wurde die wässrige Phase dreimal vorsichtig mit je 250 mL *n*-BuOH extrahiert und die Alkoholphase mit HPLC (Abb.12) analysiert sowie die getrocknete Masse (Tab.1) bestimmt.

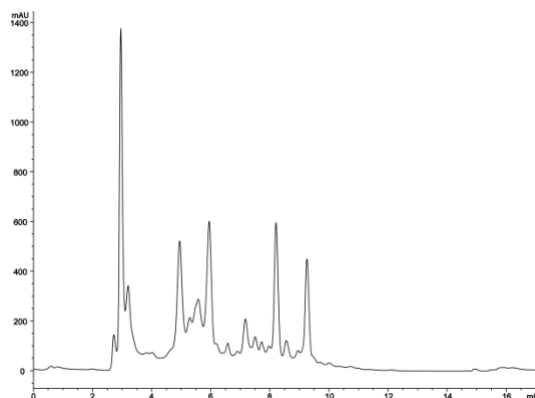


Abbildung 12: HPLC-Chromatogramm der *n*-BuOH-Phase ($\lambda = 230$ nm).

Schlussendlich wurde zur weiteren Überprüfung noch ein HPLC-Chromatogramm der vorhandenen Wasserphase, siehe Abb.13 angefertigt und ebenso die Masse (Tab.1) ermittelt.

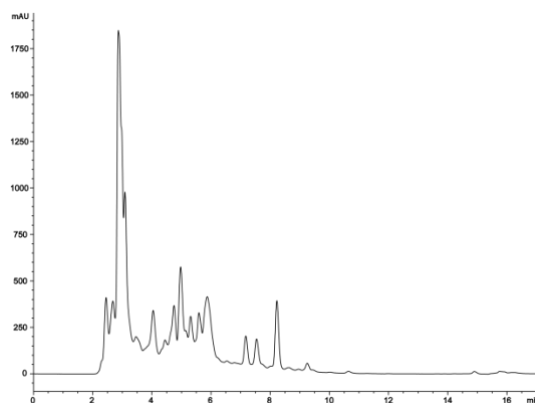


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm der H₂O-Phase ($\lambda = 230$ nm).

Tabelle 1: Trockenmasse in g der verschiedenen Extrakte

Extraktionsphase	Masse (g)
CHCl ₃	5.4
EtOAc	1.0
<i>n</i> -BuOH	5.9
H ₂ O	10.3

3.2 Isolierung der Pflanzeninhaltsstoffe

Für die Trennung und Reinigung der einzelnen Naturstoffe wurden verschiedene chromatographische Trennmethoden kombiniert, um sie daraufhin spektroskopisch untersuchen zu können. Ein Schema des Trennfortschrittes ist in Abb.14 zu sehen.

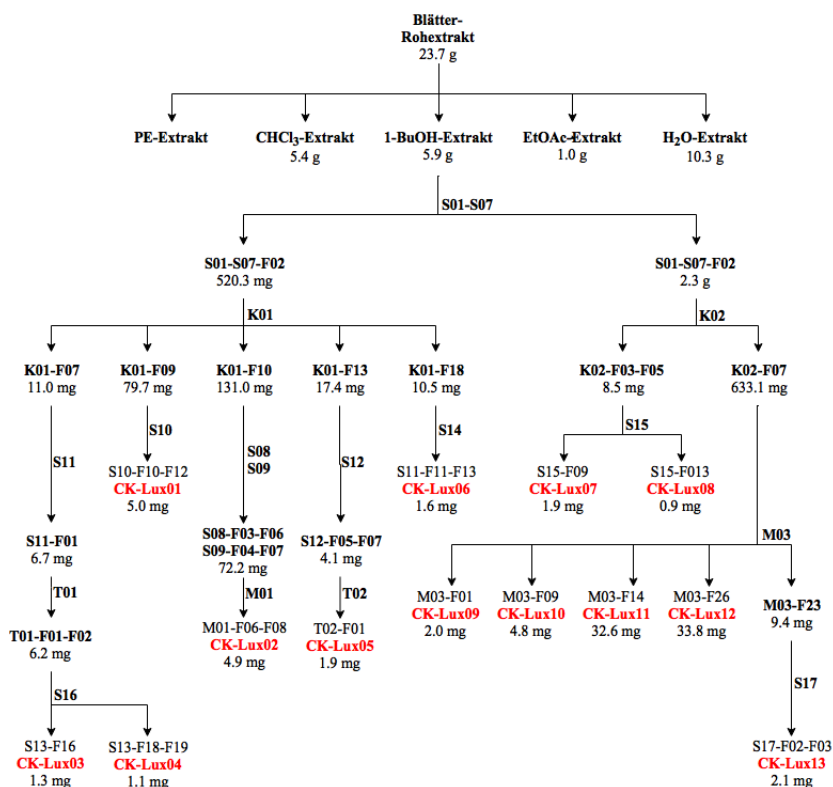


Abbildung 14: Schema des gesamten chromatographischen Trennfortschrittes. Die isolierten Naturstoffe sind rot markiert.

3.2.1 Isolierung von CK-Lux01

Für die weitere Trennung wurde der *n*-BuOH Extrakt untersucht und die vorhandenen 5.9 g in 70 mL MeOH vollständig gelöst, ein Aliquot von 10 mL entnommen und im Rotationsverdampfer konzentriert, da die gesamte Menge der Probe zur Überladung der nachfolgenden Trennsäule geführt hätte. Anschließend wurde die konzentrierte Probe auf eine mit MeOH voreluierte Sephadexsäule (S01) mit einer Länge von 50 cm und einem Durchmesser von 1.5 cm aufgetragen und isochratisch mit MeOH eluiert. Die Größe der Fraktionen betrug 40 mL und es wurden insgesamt zehn Fraktionen geschnitten. Die aufgefundenen Fraktionen wurden bis zur Trockene eingedampft und anschließend in 4.0 mL MeOH gelöst. Nun erfolgte die Durchführung einer TLC (80:20 CHCl₃:MeOH) zur Teiluntersuchung der einzelnen Fraktionen. Anschließend wurden jene Fraktionen, welche in der TLC intensive Banden im UV-Licht (245 nm und 366 nm) zeigten, ausgewählt und ein HPLC-Profil erstellt. Dafür wurden 500 µL an Probenvolumen

entnommen und in ein HPLC-Vial überführt. Bei zu starker Signalintensität wurde die Probe 1:1 mit MeOH verdünnt. Nach erfolgreicher Messung wurde das Aliquot wieder mit der ursprünglichen Fraktion vereinigt.

Daraufhin wurden die restlichen 60 mL der Probelösung gleichmäßig auf sechs weitere Sephadexsäulen (S02-S06), welche ident zu Säule S01 waren, verteilt. Aus Zeitersparnis und mangelnder Signalintensitäten der späteren Fraktionen wurden nur je fünf Proben fraktioniert. Aufgrund guter Übereinstimmung der einzelnen Signale in den Chromatogrammen wurden je die sieben ersten Fraktionen (S01-F01, S02-F01, S03-F01, usw.) der genannten Sephadexsäulen vereint und eine gesamte Trockenmasse von 520.7 mg ermittelt.

Die abgewogene Menge wurde in wenigen Millilitern EtOAc, mit einigen Tropfen MeOH, gelöst. Zur weiteren Trennung dieser Probenmenge wurden 29.8 g Kieselgel (K01) verwendet, welches in 100 mL 60:40 PE:EtOAc aufgeschlämmt wurden. Danach wurden zuerst mit einem Gradient aus PE:EtOAc bis zum Erreichen von 100% EtOAc eluiert und anschließend mit einem zweiten Gradienten aus EtOAc:MeOH bis zum Endpunkt von 100% MeOH getrennt. Der Eluent wurde stufenweise in 20 % Schritten zu je 100 mL gesteigert. Insgesamt konnten 23 Fraktionen zu je 40-70 mL gesammelt werden, welche mit einer TLC (3x 80:20 EtOAc:MeOH) analysiert wurden und die Platte zusätzlich danach mit Anisaldehyd im Abzug besprüht wurde. Das Sprühreagenz wurde mit 85 mL MeOH und 10 mL Eisessig, welche unter Eiskühlung vorsichtig zuerst 0.8 mL H₂SO₄ und anschließend 0.5 mL Anisaldehyd zugetropft wurden, hergestellt. Das Reagenz wurde nach der Verwendung bei 4 °C gelagert und auch für spätere Experimente verwendet bzw. nach dieser Vorschrift eine neue Reagenzlösung erstellt. Alle weiteren TLC-Platten wurden nach der Elution zur Vorabuntersuchung mit Anisaldehyd besprüht und danach im UV-Licht betrachtet. Ident, wie auch schon zuvor in diesem Kapitel beschrieben, wurde von allen nachfolgenden Fraktionen eine HPLC-Analyse durchgeführt.

Aufgrund der Qualität der Signale und Menge der Fraktion K01-F09 von 72.2 mg wurde diese weiter behandelt. Zur weiteren Untersuchung wurde diese Fraktion in einer geringen Menge MeOH gelöst und wiederum auf eine mit MeOH aktivierte Sephadexsäule (S10) aufgetragen. Die Säule hatte eine Länge von 80 cm und einen Durchmesser von 1.0 cm. Diese Abmessungen eigneten sich besser zur Trennung und Reinigung kleinerer Fraktionen. Die nachfolgenden Trennsäulen aus Sephadex (S11-S17) in dieser Arbeit wiesen die gleichen Abmessungen auf. Insgesamt wurden 14 Fraktionen zu je 4-6 mL

aufgefangen, das MeOH über Nacht abgedampft und die Probe am nächsten Tag in 2 mL MeOH rückgelöst, damit sie in höherer Konzentration vorliegt und somit die Durchführung einer TLC ermöglicht. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte in einem Gemisch aus 70:30 EtOAC:MeOH und von den vielversprechenderen Fraktionen wurde ein HPLC-Profil, wie zuvor schon beschrieben, erstellt.

Aufgrund der hohen Reinheit und Übereinstimmung der HPLC-Chromatogramme der Fraktionen S10-F10, -F11, -F12 wurde diese vereinigt, eine Masse von 5.0 mg ermittelt und als CK-Lux01 gekennzeichnet. Das Chromatogramm sowie das vom Detektor zusätzlich aufgenommene Absorptionsspektrum sind in Abb.15 zu sehen.

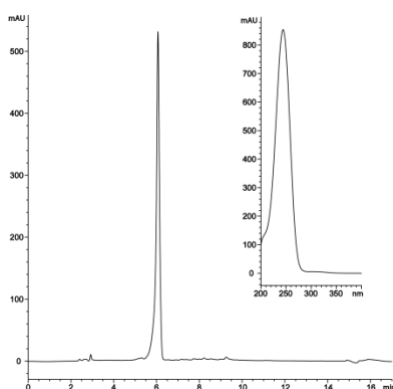


Abbildung 15: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux01 bei $t_R = 6.069$ min ($\lambda = 230$ nm). Das Absorptionsmaximum beträgt 244 nm.

Für die die NMR-Messung wurde die gesamte Menge in 0.7 mL CD_3OD gelöst, in ein NMR-Röhrchen überführt und ein 1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC und NOESY aufgenommen. Ein Tropfen der gelösten Substanz wurde für die massenspektrometrische Analyse mit HR-ESI-TOF-MS verwendet. Diese Vorgehensweise wurde auch bei allen weiteren Substanzmessungen für die spätere Strukturaufklärung auf diese Weise durchgeführt. Für die Untersuchung mit UV/Vis-Spektroskopie wurde die Probe in 1.0 mL MeOH gelöst und 1:100 mit MeOH verdünnt und bei Raumtemperatur gemessen. Als Referenz wurde MeOH verwendet. Zusätzlich wurde eine Messung mit Infrarotspektroskopie durchgeführt und dafür der Reinstoff in 500 μ L MeOH gelöst und 1-2 Tropfen auf die ATR-Einheit aufgetragen. Ebenfalls wurde ein IR-Spektrum des reinen MeOH für etwaige Backgroundsignale aufgenommen.

Nach den spektroskopischen Untersuchungen wurde das MeOH abgedampft und der trockene Reinstoff bei -20 °C gelagert. Weitere isolierte Reinstoffe dieser Arbeit wurden bei derselben Temperatur trocken aufbewahrt.

3.2.2 Isolierung von CK-Lux02

Für die chromatographische Reinigung und Isolierung des zweiten Reinstoffes CK-Lux02 wurde die Fraktion K01-F10 weiter getrennt. Die Masse der Fraktion betrug 131.1 mg, da diese Menge zu groß für die verwendete Sephadexsäule war, wurden zwei separate Trennungen durchgeführt.

Zuerst wurden 85.2 mg mit Sephadex (S08) als stationäre Phase in 15 Fraktionen zu je 4-6 mL mit MeOH getrennt und anschließend die restlichen 45.9 mg mit einer weiteren Sephadexsäule (S09) zu zehn Fraktionen mit MeOH ebenfalls zu je 4-6 mL geschnitten. Ebenso wurde für die Fraktionen beider Trennsäulen eine TLC (3x 80:20 EtOAc:MeOH) durchgeführt und wiederum HPLC-Chromatogramme angefertigt.

Die chromatographischen Untersuchungen zeigten eine Übereinstimmung zwischen den Fraktionen S08-F03, -F04, -F05, -F06 und den Fraktionen S09-F04, -F05, -F06, -F07, welche daraufhin vereinigt wurden und eine Masse von 72.2 mg ermittelt wurde. Da diese kombinierte Fraktion noch nicht die Reinheitskriterien für die spektroskopischen Untersuchungen erfüllte, musste sie weiter gereinigt werden.

Dafür wurde die vorliegende Probe in einem Gemisch aus 5 mL 10:90 MeOH:CHCl₃ gelöst und in die Probenschleife der MPLC (M01) gespritzt. Für die Trennung wurde eine Flussrate von 7.5 mL·min⁻¹ bei etwa 2-5 bar eingestellt und simultan bei den Wellenlängen 236 nm und 240 nm detektiert. Als stationäre Phase wurde Säule A verwendet, welche in Kapitel 2.3.2 erwähnt wird. Zu Beginn der Trennung wurde dieselbe Zusammensetzung an MeOH und CHCl₃ gewählt, wie auch die der zuvor gelösten Probe. Anschließend wurde die Elutionskraft stufenweise mit je 100 mL um 20 % bis zum Erreichen von 100 % MeOH erhöht. Insgesamt konnten 15 Fraktionen zu je 50-200 mL gesammelt werden, welche mit TLC (70:30 EtOAc:MeOH) analysiert und danach die Fraktionen M01-F03-F15 mit HPLC untersucht wurden.

Da die Fraktionen M01-F06, -F07, -F08 zeigten eine deutliche chromatographische Übereinstimmung, wiesen ebenfalls eine hohe Reinheit auf und wurden daraufhin vereinigt und eine Masse von 4.9 mg ermittelt. Der Reinstoff wurde als CK-Lux02 bezeichnet und das HPLC-Chromatogramm inkl. Absorptionsmaximum ist in Abb.16 zu sehen.

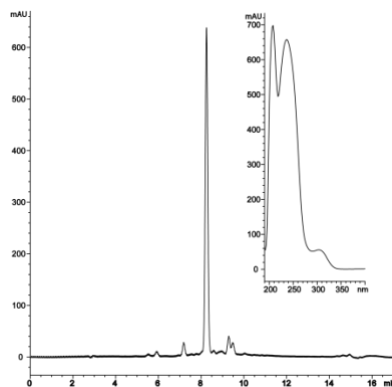


Abbildung 16: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux02 bei $t_R = 8.253$ min ($\lambda = 230$ nm). Die Absorptionsmaxima betragen 208 ,236 und 306 nm.

Ebenfalls wurden 1D- und 2D-NMR Spektren sowie massenspektrometrische Analysen durchgeführt, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Zusätzlich wurde im Gegensatz zu CK-Lux01, ein ROESY für die Strukturaufklärung angefertigt, da die Untersuchung mit Massenspektrometrie auf ein großes Molekül hindeutete. Wie zuvor, wurde die Probe in 1.0 ml MeOH gelöst und eine 1:100 Verdünnung mit dem UV/Vis-Spektrometer bei Raumtemperatur zur Bestimmung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ untersucht.

3.2.3 Isolierung von CK-Lux03 und CK-Lux04

Anschließend wurde eine weitere Fraktion (K01-F07) der ersten Kieselgelsäule K01 untersucht und eine Trockenmasse von 11.0 mg ermittelt. Für die Trennung wurde die Substanz konzentriert auf eine weitere Sephadexsäule (S11) aufgetragen und mit MeOH in 15 Fraktionen zu je 4-6 mL eluiert. Ebenso wurde eine TLC (80:20 EtOAc:MeOH) der einzelnen Fraktionen durchgeführt und anschließend die signalintensiven Fraktionen mit HPLC analysiert.

Aufgrund dieser Messdaten wurde die Fraktion S11-F01 weiter untersucht und eine Masse von 6.7 mg ermittelt. Für den nächsten Trennschritt wurde eine prepTLC mit einer SiO₂-beschichteten Glasplatte mit einer Größe von 20x20 cm verwendet, worauf die Probe hochkonzentriert und punktförmig aufgetragen wurde. Es wurde mit einem Eluent aus 90:10 EtOAc:MeOH getrennt, danach die drei entstanden Banden (T01-F01, F02, F03) separat mit einem Spatel aus der Platte gekratzt und in je 50 mL MeOH extrahiert. Die Extrakte wurden filtriert, konzentriert und mit HPLC analysiert. Die Fraktionen T01-F01 und T01-F02 wurden kombiniert, da die Retentionszeiten einiger Peaks ident waren.

Die resultierende Masse betrug 6.2 mg und als abschließender Trennschritt wurde eine weitere Sephadexsäule (S13) genutzt. Alles in allem wurden 20 Fraktionen zu je

2-4 mL mit MeOH getrennt, wiederum eine TLC mit einem Laufmittelgemisch aus 80:20 EtOAc:MeOH verwendet und die Fraktionen mit den stärksten Banden für die HPLC-Messung ausgewählt.

Als CK-Lux03 wurde fortan die Fraktion S13-F16 bezeichnet, da sie die Reinheitskriterien für die nachfolgenden spektroskopischen Untersuchungen erfüllte sowie in ausreichender Menge von 1.3 mg vorhanden war. Hinzukommend konnte aus der Sephadexsäule S13 ein weiterer Reinstoff namens CK-Lux04 isoliert werden. Dafür wurden die Fraktionen S13-F18 und S13-F19 vereinigt und eine Masse von 1.1 mg bestimmt. Die HPLC-Chromatogramme sowie die Absorptionsmaxima der Substanzen CK-Lux03 und CK-Lux04 sind in der Abb.17 zu sehen.

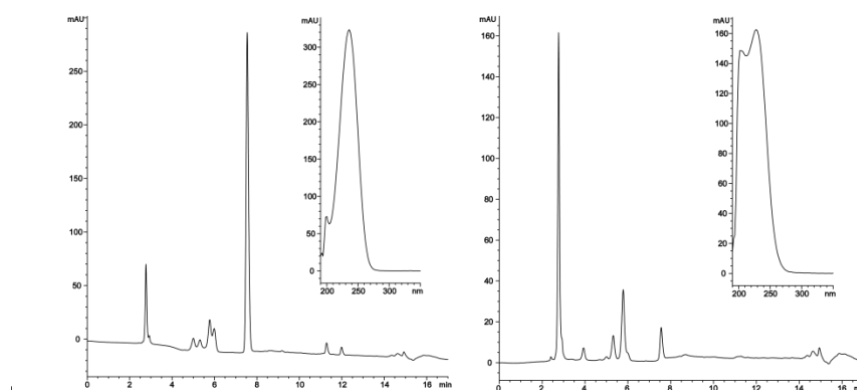


Abbildung 17: Chromatogramme inkl. Absorptionsspektren der Peaks von CK-Lux03 und CK-Lux04 ($\lambda = 230$ nm). **links:** CK-Lux03 bei $t_R = 7.545$ min und Absorptionsmaxima bei 198 und 236 nm; **rechts:** CK-Lux04 bei $t_R = 2.774$ min und Absorptionsmaxima bei 202 und 228 nm.

Sowohl von CK-Lux03 als auch von CK-Lux04 wurden NMR-spektroskopische Daten für die Strukturaufklärung erhoben sowie die notwendige genaue Masse für die Charakterisierung der Reinstoffe mit HR-ESI-TOF-MS bestimmt.

3.2.4 Isolierung von CK-Lux05

Für die Isolierung dieses Naturstoffes (CK-Lux05) wurden die abgewogenen 17.4 mg der Fraktion KG01-F13 verwendet und anschließend mit einer weiteren Sephadexsäule (S12) getrennt. Die mobile Phase war MeOH und es konnten insgesamt 16 Fraktionen zu je 4-7 mL gesammelt werden. Diese Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch (3x 80:20 EtOAc:MeOH) analysiert und ein Teil dieser fraktionierten Proben wurde mit HPLC untersucht.

Die Ergebnisse der analytischen Messungen der Fraktionen S12-F05, -F06, F07 korrelierten weitgehend und deshalb wurden diese vereinigt. Es resultierte eine trockene Masse von 4.1 mg, welche auf Grund der zu geringen Reinheit weiter gereinigt werden

musste. Für die anschließende Reinigung wurde eine prepTLC (T02) durchgeführt, wie auch schon in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Hierfür wurde jedoch als Laufmittel ein Gemisch aus 70:30 CHCl₃:MeOH verwendet, mit dem dreimal eluiert wurde, um eine selektive Trennung der Banden erreichen zu können. Es wurden zwei Fraktionen getrennt und je ein HPLC-Profil erstellt.

Die Fraktion T02-F01 wurde wegen ihrer ausreichenden Reinheit und Menge von 1.9 mg als CK-Lux05 bezeichnet. Die chromatographischen Daten der isolierten Substanz sind in Abb.18 zu sehen.

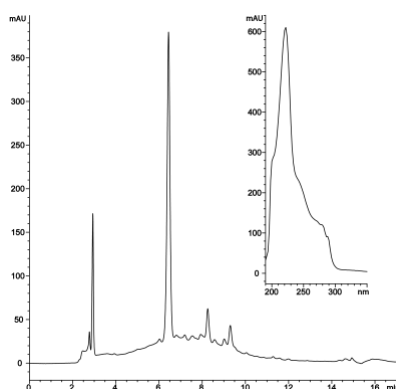


Abbildung 18: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux05 bei $t_R = 6.443$ min ($\lambda = 230$ nm). Das Absorptionsmaximum beträgt 222 nm.

Für die Strukturaufklärung von CK-Lux05 wurde die Substanz ebenfalls in CD₃OD gelöst, 1D- und 2D-NMR-spektroskopische Messungen durchgeführt und eine Analyse mit HR-ESI-TOF-MS vollzogen.

3.2.5 Isolierung von CK-Lux06

Als letzte Fraktion der Kieselgelsäule K01 wurde die Fraktion K01-F18 zur weiteren Reinigung gewählt und eine Masse von 10.5 mg abgewogen. Für die Trennung wurde ebenso wie zuvor Sephadex (S14) als stationäre Phase gewählt. Durch Elution mit MeOH konnten 15 Fraktionen zu je 3-6 mL aufgefangen werden. Unter anderem wurden die Proben wieder mit TLC (60:40 EtOAc:MeOH) untersucht und eine HPLC-Analyse der Fraktionen mit den signifikanteren Banden durchgeführt.

Die gelb fluoreszierenden Fraktionen S14-F11, -F12, -F13 wurden wegen ihrer ähnlichen HPLC-chromatographischen Daten und ihrer hohen Reinheit vereinigt. Die abgewogene Masse betrug 1.6 mg und der Reinstoff wurde als CK-Lux06 gekennzeichnet. Ein Ausschnitt des gemessenen HPLC-Chromatogramms inklusive des vom Gerät zusätzlich aufgenommenen Absorptionsspektrums sind in Abb.19 zu sehen.

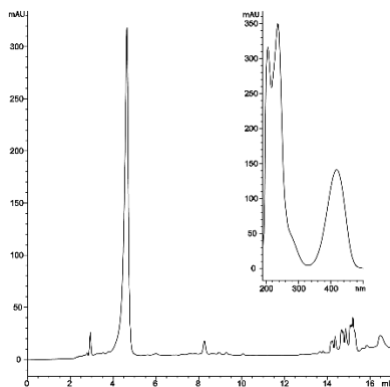


Abbildung 19: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux06 bei $t_R = 4.643$ min ($\lambda = 230$ nm). Die Absorptionsmaxima betragen 206, 236 und 418 nm.

Wie auch schon bei den zuvor isolierten Reinstoffen war für die spektroskopische Strukturaufklärung sowohl verschiedene NMR-Messungen, unter anderem die Aufnahme eines ROESY-Spektrums, als auch die Untersuchung mit Massenspektrometrie, notwendig. Für die zusätzliche Messung der Extinktion und anschließenden Berechnung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ε wurde die gesamte Probenmenge in 1.0 mL MeOH aufgenommen und eine 1:40 Verdünnung der Probe mit dem UV/Vis-Spektrometer bei Raumtemperatur gemessen. Als Referenz diente MeOH.

3.2.6 Isolierung von CK-Lux07 und CK-Lux08

Als Ausgangspunkt für die Isolierung der nächsten Gruppe an Reinstoffen wurden die Fraktionen der ersten sieben Sephadexsäulen (S01 bis S07) des *n*-BuOH Extraktes vereinigt, da sie idente HPLC-Chromatogramme aufwiesen. Es handelte sich um die Fraktionen S01-F02, S02-F02...bis S07-F02, welche eine vereinte Trockenmasse von 2.3 g aufwiesen.

Als nächstes wurde die vereinten Fraktionen in einem Gemisch aus 5 mL 80:20 EtOAc:PE gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer konzentriert. Für die Säulenchromatographie wurden 35.1 g Kieselgel (K02) verwendet, welche in 100 mL 80:20 EtOAc:PE aufgeschlämmt wurden. Die Substanz wurde auf die Säule aufgetragen und zu Beginn wurde mit demselben Gemisch eluiert, wie die stationäre Phase aktiviert wurde. Die Elutionskraft wurde in 20% Schritten mit 100 mL bis zum Erreichen von 100% EtOAc erhöht. Danach wurde bis zum Endpunkt von 100% MeOH alle 100 mL der Anteil von MeOH um 20% erhöht. Schlussendlich konnte eine Gesamtanzahl von 19 Fraktionen mit 50-70 mL separat gesammelt werden. Die fraktionierten Proben wurden mit TLC untersucht und dafür wurde eine mobile Phase aus 80:20 EtOAc:MeOH gewählt und von allen Fraktionen ein HPLC-Profil erstellt.

Aufgrund der HPLC-Analyse wurden die Fraktionen K02-F03, -F04, -F05 kombiniert und die Masse bestimmt. Die Trockenmasse betrug 8.5 mg, jedoch musste diese für die folgenden spektroskopischen Untersuchungen weiter gereinigt werden. Als letzter Trennschritt zum Erhalt der Reinstoffe wurde eine Sephadexsäule (S15), wie auch schon in dem vorherigen Kapitel beschrieben, genutzt. Zu je 3-5 mL konnten insgesamt 21 Fraktionen geschnitten werden, welche ebenfalls mit Dünnschichtchromatographie (90:10 EtOAc:MeOH) auf ihre Qualität getestet wurden. Die qualitativ aussagekräftigeren Fraktionen wurden für eine anschließende HPLC-chromatographische Untersuchung ausgewählt.

Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme (Abb.20) der Sephadexsäule S15 ergab einerseits den Reinstoff CK-Lux07 aus der Fraktion S15-F09 mit einer Masse von 1.9 mg in guter Reinheit und andererseits den Reinstoff CK-Lux08 aus der Fraktion S15-F13 mit einer Masse von 0.9 mg.

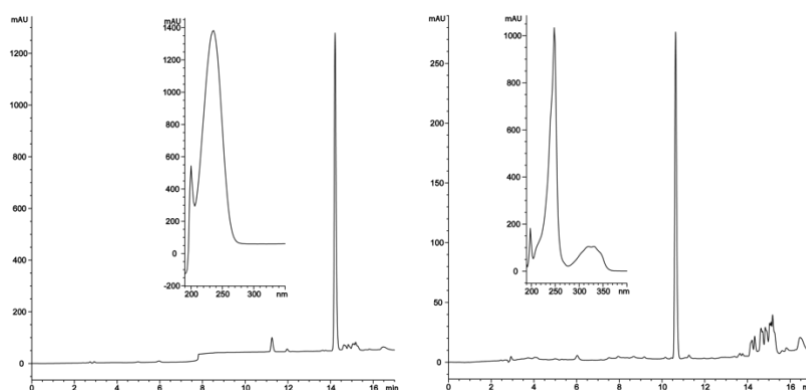


Abbildung 20: Chromatogramme inkl. Absorptionsspektren der Peaks von CK-Lux07 und CK-Lux08 ($\lambda = 230$ nm).
links: CK-Lux07 bei $t_R = 14.214$ min und Absorptionsmaxima bei 200 und 236 nm; **rechts:** CK-Lux08 bei $t_R = 10.636$ min und Absorptionsmaxima bei 198, 248 und 324 nm.

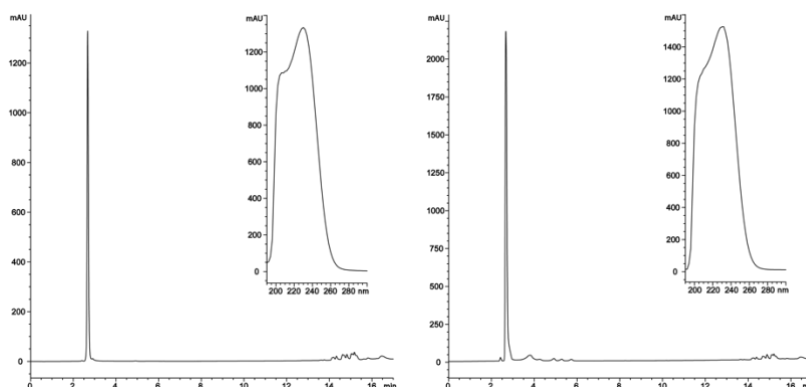
Ebenfalls war zur Identifikation der Molekülstrukturen eine Messung mit 1D- und 2D-NMR und HR-ESI-TOF-MS notwendig. Im Gegensatz zur isolierten Substanz CK-Lux07 war die isolierte Menge von 0.9 mg der Substanz CK-Lux08 nicht für die NMR-spektroskopische Untersuchung ausreichend. Es konnte nur ein Massenspektrum aufgenommen werden, welches zu wenig Information für die geplante Strukturaufklärung bot.

3.2.7 Isolierung von CK-Lux09, CK-Lux10, CK-Lux11 und CK-Lux12

Dieses Kapitel befasst sich mit der Isolierung vier weiterer Naturstoffe. Dafür wurde eine verhältnismäßig große Fraktion (K02-F07) von 633.1 mg der zweiten Kieselgelsäule K02 für die weitere chromatographische Reinigung ausgewählt.

Für die Trennung wurde ein weiteres Mal eine MPLC (M03) angesetzt, jedoch wurde diesmal mit Umkehrphase gearbeitet. Hierfür wurde Säule B verwendet, welche in Kapitel 2.3.2 erwähnt wird. Die Probe wurde in 5 mL 95:5 H₂O:MeOH gelöst, die Durchflussrate auf 7.5 mL·min⁻¹ bei einem Druck zwischen 2-5 bar eingestellt und bei einer Wellenlänge von 236 nm detektiert. Zu Beginn wurde fünfmal mit 100 mL 95:5 H₂O:MeOH eluiert und danach bis zum Erreichen von 60:40 H₂O:MeOH der Gradient in 100 mL Schritten um 10-15% gesteigert. Diese Zusammensetzung wurde nun fünfmal zur Trennung genutzt, danach in 100 mL Abständen der Anteil von MeOH um 20% bis zum Endpunkt der Trennung von 100% MeOH erhöht. Es konnte eine Summe von 30 Fraktionen zu je 20-80 mL aufgefangen werden, welche wiederum mit TLC (80:20 EtOAc:MeOH) auf ihre qualitativen Eigenschaften untersucht wurden. Von den Fraktionen mit den stärksten Banden wurde eine HPLC-Messung durchgeführt.

Einige dieser MPLC-Fraktionen erfüllten die chromatographischen Bedingungen für die anschließende spektroskopische Untersuchung. Die erste fraktionierte Probe, welche die Reinheitskriterien erfüllte, war die Fraktion M03-F01. Die isolierte Menge betrug 2.0 mg und erhielt daraufhin den Namen CK-Lux09. Der nächste Reinstoff CK-Lux10 konnte aus der Fraktion M03-F09 mit einer abgewogenen Trockenmasse von 4.8 mg gewonnen werden. Ebenfalls zeigten spätere Fraktionen dieser Trennsäule hohe Reinheit auf, wie zum Beispiel die Fraktion M03-F14, welcher noch dazu in einer beachtlichen Menge von 32.4 mg vorlag und fortan als CK-Lux11 bezeichnet wurde. Schlussendlich konnte noch ein vierter Reinstoff (CK-Lux12) aus der Fraktion M03-F26 isoliert werden, welcher ebenso mit sehr großer Menge von 33.8 mg die größte gemessene Masse in dieser Arbeit aufwies. Die aufgenommenen HPLC-Chromatogramme dieser vier Substanzen und deren Absorptionsmaxima sind in Abb.21 ersichtlich.



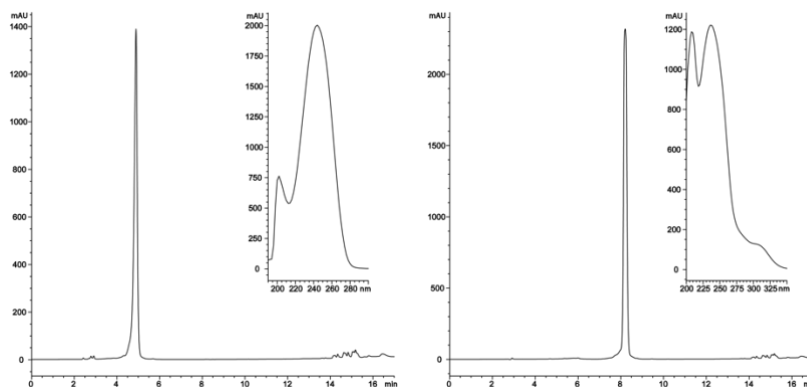


Abbildung 21: Chromatogramme inkl. Absorptionsspektren der Peaks von CK-Lux09, CK-Lux10, CK-Lux11 und CK-Lux12 ($\lambda = 230$ nm). **links oben:** CK-Lux09 bei $t_R = 2.678$ min und Absorptionsmaximum bei 230 nm; **rechts oben:** CK-Lux10 bei $t_R = 2.680$ min und Absorptionsmaximum bei 230 nm; **links unten:** CK-Lux11 bei $t_R = 4.898$ min und Absorptionsmaxima bei 202 und 244 nm; **rechts unten:** CK-Lux12 bei $t_R = 8.207$ min und Absorptionsmaxima bei 208, 238 und 308 nm.

Alle Verbindungen wurden mit NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie untersucht. Zusätzlich wurde für die Verbindung CK-Lux12 ein 2D-ROESY Experiment durchgeführt, da es eine große Masse im Massenspektrum zeigte.

3.2.8 Isolierung von CK-Lux13

Ein weiterer Reinstoff, der in dieser Arbeit isoliert wurde, war CK-Lux13. Dafür wurde die Fraktion M03-F23 der im vorherigen Kapitel beschriebenen MPLC (M03) weiter getrennt. Die Probe wurde eingedampft, eine Masse von 19.4 mg ermittelt und als letzter Trennschritt eine stationäre Phase mit Sephadex (S17) verwendet. Mit einer mobilen Phase aus MeOH konnten insgesamt 16 Fraktionen zu je 2-4 mL isochratisch gesammelt werden. Zur Überprüfung der Trennleistung wurde eine TLC (90:10 EtOAc:MeOH) durchgeführt und die signalintensiveren Fraktionen mit der beschriebenen HPLC-Methode auf ihre Reinheit überprüft.

Die zwei Fraktionen S17-F02 und S17-F03 waren bei der detektierten Wellenlänge in der HPLC größtenteils ident und wurden deshalb kombiniert, was eine anschließende abgewogene Trockenmasse von 2.1 mg zur Folge hatte. Ebenfalls war die vereinte Fraktion rein genug für die vorgesehen spektroskopischen Experimente und bekam somit den Namen CK-Lux13. Ein Ausschnitt des gemessenen HPLC-Profiles ist in Abb.22 zu sehen.

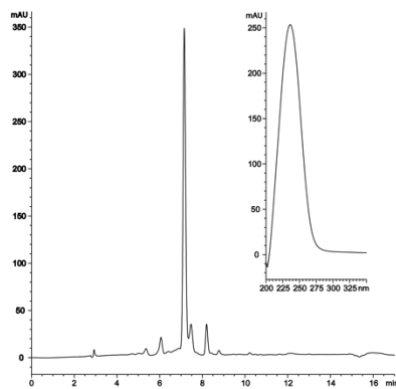


Abbildung 22: Chromatogramm inkl. Absorptionsspektrum des Peaks von CK-Lux13 bei $t_R = 7.154$ min ($\lambda = 230$ nm). Das Absorptionsmaximum beträgt 236 nm.

Ebenfalls wurden ein- und zweidimensionale NMR-Messungen sowie eine Analyse mit Massenspektrometrie durchgeführt, wie auch schon bei den zuvor isolierten Reinstoffen, um die Struktur der letzten Substanz vollständig aufklären zu können.

4 Ergebnisse

Dieses Kapitel zeigt die spektroskopischen Ergebnisse und die daraus resultierenden Strukturen. Zusätzlich dazu, befasst es sich mit der Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen des untersuchten Blattextraktes der Pflanze *Palicourea luxurians* und beschreibt im Detail die Interpretation der gemessenen spektroskopischen Daten in Kombination mit Lehrbüchern, Vergleichsliteratur und computergestützten Daten. [40, 41]

4.1 Ergebnisse von CK-Lux01

Das Blumenol C-Sulfat konnte erstmalig in dieser Arbeit isoliert und bestimmt werden. Es ergab sich eine Summenformel von $C_{13}H_{21}O_5S$ und eine daraus resultierende Molmasse von $289.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die dreidimensionale Struktur von Blumenol C-Sulfat ist in Abb.23 ersichtlich.

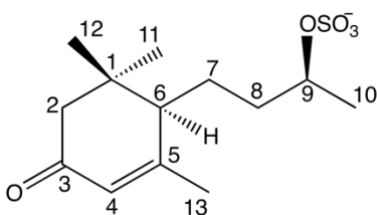


Abbildung 23: Struktur von Blumenol C-Sulfat (CK-Lux01).

Eine Auflistung der positiven und negativen geladenen Molekülionensignale ist in Tab.2 zu sehen, welche mit den exakten theoretischen Molekülmassen der beschriebenen Struktur korrelieren.

Tabelle 2: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. und neg. mode) von Blumenol C-Sulfat mit den dazu berechneten exakten Molekülionen

Molekülion	m/z_{gem}	m/z_{theo}
$[M-H]^-$	289.1112	289.1115
$[M+H+Na]^+$	313.1090	313.1080
$[M+2Na]^+$	335.0899	335.0899

Eine Zuordnung der Signale des ^1H -NMR und ^{13}C -NMR zu den jeweiligen nummerierten Kohlenstoffen zeigt die Tab.3. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte nach Abb.23.

Tabelle 3: NMR-Daten von Blumenol C-Sulfat in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta\ ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta\ ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	37.3, s
2	1.97 (1H, m) 2.48 (1H, d, 16.9)	48.1, t
3	-	202.4, s
4	5.81 (1H, s)	125.4, d
5	-	169.9, s
6	1.99 (1H, m)	52.3, d
7	1.51 (1H, m) 2.02 (1H, m)	26.7, t
8	1.69 (2H, m)	37.7, t
9	4.40 (1H, dt, 6.1, 6.1)	77.1, d
10	1.32 (3H, d, 6.3)	21.2, q
11	1.10 (3H, s)	27.5, q
12	1.01 (3H, s)	29.0, q
13	2.05 (3H, d, 1.1)	24.9, q

Da es sich um eine bis dato nicht beschriebene Verbindung handelt wurde der molare dekadische Extinktionskoeffizient ϵ ermittelt. Dafür wurde eine Extinktion gemessen und ϵ gemäß Glg.2 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab.4 zu sehen.

Tabelle 4: Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie von Blumenol C-Sulfat in MeOH. Gegeben ist das Absorptionsmaximum mit der jeweiligen Extinktion E und ϵ in $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

UV_{max} (nm) ^{a)}	E	ϵ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
244	1.0680	3.79

^{a)} in MeOH/ NH_4OAc

Für die weitere Charakterisierung diverser funktioneller Gruppen wurde eine Messung mit Infrarotspektroskopie durchgeführt. Die Signale sind in Tab.5 aufgelistet.

Tabelle 5: Ergebnisse der Untersuchung mit ATR-Infrarotspektroskopie von Blumenol C-Sulfat. Angegeben sind die jeweiligen Schwingungsarten mit der dazugehörigen Wellenzahl in cm^{-1}

Schwingungsart	Wellenzahl (cm^{-1})
$\nu_{\text{a}}\text{CH}_3$	2963 (m)
$\nu_{\text{a}}\text{CH}_2$	2937 (m)
$\nu\text{C=O}$	1655 (s)
δCH_3	1460 & 1380 (w)

$\nu\text{S=O}$	1250 & 1223 (ss)
$\nu\text{C-O}$	1047 (m)
$\delta\text{C=C}$	786 (w)

4.1.1 Strukturaufklärung von CK-Lux01

Die Messung mit HR-TOF-MS-ESI ergab ein negativ geladenes MolekÜlion $[\text{M-H}]^-$ mit m/z 289.1112, welches mit der chemischen Summenformel $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{S}$ und dessen berechneten m/z 289.1115 korrelierte.

Die 2D-NMR Daten deuteten auf ein Grundgerüst mit 13 Kohlenstoffen hin, bestehend aus vier Methyl-, drei Methylen-, drei Methingruppen und drei quartäre Kohlenstoffe. Es konnte zusätzlich festgestellt werden, dass es sich um ein Megastigman handelt.

Die Hochfeldverschiebung des Singulettsignals H-4 im ^1H -NMR deutete auf ein isoliertes olefinisches Proton hin, welches sich dazu in einem konjugierten System mit einer Ketogruppe (C-3) befand. Die Ketofunktion konnte zusätzlich durch eine starke Absorptionsbande im Infrarotspektrum bei 1655 cm^{-1} charakterisiert werden, welche durch die Konjugation mit der Doppelbindung in den niedrigeren Wellenzahlenbereich verschoben war. Dazu wurde die Position von H-4 durch die $^3J_{\text{H-C}}$ Kopplungen mit den Kohlenstoffen C-2, C-6, C-13 im HMBC definiert. Die weitere Struktur des Sechsrings wurde durch die $^{2,3}J_{\text{H-C}}$ Kopplungen der Methylgruppen in den Positionen 11, 12 und 13 bestimmt. Es konnte durch die $^3J_{\text{H-C}}$ Kopplungen von H-11/H-12 mit C-1, C-2, C-6 sowie deren Kopplung untereinander deren Position an C-1 lokalisiert werden. Die Unterscheidung von H-11 und H-12 erfolgte nach bekannter Literatur. [24] Des Weiteren ergab sich durch den höheren chemischen Shift von H-13, welcher dazu ein Singulett war und den $^{2,3}J_{\text{H-C}}$ Kopplungen mit C-4 und C-5 das restliche Cyclohexanon-Ringsystem. Die chemischen Shifts in den ^1H - und ^{13}C -Spektren des Cyclohexanon korrelierten stark mit dem bekannten Megastigman Blumenol C. [23]

Durch die $^2J_{\text{H-C}}$ Kopplungen von C-7 mit H-6 und H-8 konnte der Ring mit dem Butylrest verknüpft werden. Der Alkylrest wurde durch H-9 und dessen $^3J_{\text{H-H}}$ Kopplungen im COSY mit H-8 und H-10 vollständig beschrieben. Der Dublett im ^1H -NMR von H-10 deutete zusätzlich auf eine terminale Position dieser Methylgruppe hin.

Für die Charakterisierung der funktionellen Gruppe am C-9 mussten mehrere verschiedene Daten kombiniert werden, um schlussendlich den vorhandenen Sulfatrest

identifizieren zu können. Einerseits konnte die Sulfatgruppe mit NMR-Spektroskopie aufgrund des hohen chemischen Shifts in Position 9 (δH 4.40 ppm, δC 77.1 ppm, CD_3OD) nur teilweise bestimmt werden, andererseits ein Hydroxygruppe, wie beim Blumenol C (δH 3.70 ppm, δC 68.9 ppm, CD_3OD) jedoch ausgeschlossen werden. [23] Außerdem korrelierten die Daten in dieser Position mit dem strukturähnlichen nicht natürlich vorkommenden α -Ionol Sulfat (δH 4.25 ppm, δC 72.0 ppm, DMSO). [42] Zur weiteren Identifikation wurde ein Infrarotspektrum des Moleküls angefertigt und es konnten sehr starke Absorptionsbanden der Sulfatgruppe bei 1223 und 1250 cm^{-1} gefunden werden, welche wiederum im Infrarotspektrum des Blumenol C fehlten. [23] Anzumerken ist, dass unter anderem das Isotopenmuster im Massenspektrum ebenfalls auf einen Schwefel im Molekül hindeute, da ein A+2 Peak mit einer Größe von etwa 5% des Molekülionenpeaks vorhanden war und somit auf das Isotop ^{34}S hindeutete.

Die Aufklärung der zwei vorhanden stereochemischen Zentren erfolgte im NOESY-Experiment. Die Protonen H-6 und H-9 zeigten ein Korrelationssignal und dies führte zur vollständigen Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Moleküls.

Ein weiterer Unterschied zwischen der isolierten Verbindung und dem Blumenol C zeichnete sich in den Absorptionsmaxima ab. CK-Lux01 hatte ein UV-Maximum bei 244 nm in $\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OAc}$, wobei das Blumenol C bei 333 nm in MeOH lag. [23]

Die Kontrolle der beschriebenen ^{13}C -Shifts der Struktur mit CSEARCH zeigte eine sehr große Übereinstimmung zwischen den gemessenen ^{13}C -Shifts und jenen, die vom Programm für die Struktur in Abb.23 berechnet wurden. [39]

Die Nummerierung der Kohlenstoffatome und die Namensgebung der neuen Verbindung wurde an das bekannte Blumenol C und dessen Derivat Blumenol C-Glucosid angelehnt. [43, 24] Der Name des neuen Terpenoids lautet Blumenol C-Sulfat.

4.2 Ergebnisse von CK-Lux02 und CK-Lux12

Die Ergebnisse aller spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass es sich bei den beiden isolierten Verbindungen CK-Lux02 und CK-Lux12 um dieselbe und eine bis jetzt nicht beschriebene Verbindung handelt. Die neue Substanz wurde als Palicouresid (Abb.24) gekennzeichnet. Die Summenformel beträgt $\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{19}$ mit einer daraus berechneten molekularen Masse von 917.0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

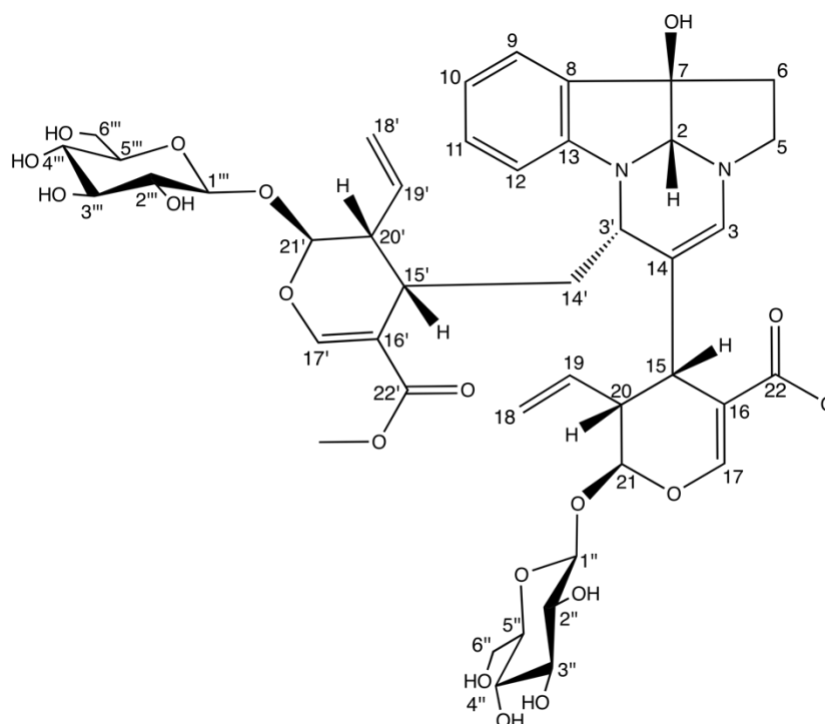


Abbildung 24: Struktur von Palicouresid (CK-Lux02 und CK-Lux12).

Die folgende Tab.6 zeigt die massenspektrometrischen Messdaten von CK-Lux02. Anzumerken ist, dass beide Messungen keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Tabelle 6: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. und neg. mode) von Palicouresid (CK-Lux02) mit den dazu berechneten exakten Molekülionen

Molekülion	m/z_{gem}	m/z_{theo}
$[\text{M}-\text{H}]^-$	915.3414	915.3404
$[\text{M}+\text{H}]^+$	917.3572	917.3550
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	939.3398 ^{a)}	939.3369

^{a)} CK-Lux12 m/z 939.3392

Auch hier sind nur die NMR Daten von CK-Lux02 gegeben (Tab.7), da sowohl die chemischen Shifts als auch die Korrelationssignale in den homonuklearen und heteronuklearen 2D-Experimenten für CK-Lux12 ident waren. Die Kohlenstoffatome wurden nach Abb.24 nummeriert.

Tabelle 7: NMR-Daten von Palicouresid (CK-Lux02) in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
2	4.68 (1H, s)	79.4, d
3	5.67 (1H, s)	133.4, d
5	2.39 (1H, m)	53.3, t
	3.36 (1H, m)	

Position	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
6	2.40 (1H, m)	36.8, t
	2.45 (1H, m)	
7	-	86.4, s
8	-	133.2, s
9	7.27 (1H, d, 7.2)	125.3, d
10	6.76 (1H, t, 6.6)	119.7, d
11	7.20 (1H, t, 7.2)	131.0, d
12	6.58 (1H, d, 7.9)	110.4, d
13	-	153.3, s
14	-	116.8, s
15	3.24 (1H, m)	36.7, d
16	-	111.0, s
17	7.45 (1H, d, 0.8)	153.1, d
18	5.15 (2H, m)	119.2, t
19	5.51 (1H, m)	137.0, d
20	2.54 (1H, m)	47.3, d
21	5.28 (1H, d, 7.7)	97.2, d
22	-	168.9, s
22-OCH ₃	3.63 (3H, s)	51.7, q
3'	3.98 (1H, m)	53.1, d
14'	2.08 (1H, m)	33.0, t
	2.16 (1H, m)	
15'	3.12 (1H, m)	28.0, d
16'	-	112.5, s
17'	7.41(1H, d, 1.6)	152.6, d
18'	5.38 (1H, d, 10.7)	120.3, t
	5.44 (1H, d, 17.2)	
19'	5.83 (1H, m)	135.9, d
20'	2.77 (1H, m)	45.2, d
21'	5.48 (1H, m)	98.1, d
22'	-	169.3, s
22'-OCH ₃	3.64 (3H, s)	51.8, q
1''	4.65 (1H, d, 7.9)	100.2, d
2''	3.14 (1H, t, 8.6)	74.6, d
3''	3.31 (1H, m)	78.0, d ^{a)}
4''	3.24 (1H, m)	71.4, d ^{b)}
5''	3.24 (1H, m)	78.3, d ^{c)}
6''	3.63 (1H, m)	62.6, t
	3.85 (1H, dd, 12.0, 1.7)	
1'''	4.60 (1H, d, 7.9)	99.9, d

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
2'''	3.09 (1H, t, 8.6)	74.4, d
3'''	3.31 (1H, m)	78.0, d ^{a)}
4'''	3.24 (1H, m)	71.4, d ^{b)}
5'''	3.19 (1H, m)	78.0, d ^{c)}
6'''	3.53 (1H, dd, 12.0, 5.3)	62.6, t
	3.66 (1H, m)	

^{a)-c)} nicht unterscheidbar

Unter anderem wurde ebenso ϵ für die verschiedenen Absorptionsmaxima nach Glg.2 berechnet. Dies wurde nur für die Substanz CK-Lux02, da die Maxima in den Online-Absorptionsspektren (Abb.16 und Abb.21) ident waren, durchgeführt und die Ergebnisse sind in Tab.8 zu sehen.

Tabelle 8: Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie von Palicouresid in MeOH. Gegeben sind die Absorptionsmaxima mit der jeweiligen Extinktion E und ϵ in $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

UV_{max} (nm) ^{a)}	E	ϵ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
208	1.6002	4.48
236	0.9292	4.24
306	0.1323	3.39

^{a)} in MeOH/NH₄OAc

4.2.1 Strukturaufklärung von CK-Lux02 und CK-Lux12

Mit HR-TOF-ESI-MS konnte je ein positiv geladenes Molekülion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ von CK-Lux02 bei m/z 939.3398 und je eines von CK-Lux12 bei m/z 939.3392 gefunden werden, welche mit der Summenformel $\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{Na}$ bei m/z 939.3369 gut übereinstimmten.

Anhand der Messungen mit Massenspektrometrie ließ sich eine erste Aussage über die Übereinstimmung der Größe beider isolierten Moleküle treffen und diese Annahme wurde durch die späteren NMR-Messungen unterstrichen, da diese deckungsgleich waren. Daher bezieht sich die Interpretation der spektroskopischen Daten nur auf die Substanz CK-Lux02, jedoch lässt sie sich auch auf die Verbindung CK-Lux12 übertragen.

Die heteronuklearen NMR-Messungen ergaben eine Anzahl von zwei Methyl-, sieben Methylen-, 27 Methingruppen und acht quartäre Kohlenstoffatome. Es konnte ein Tryptamin-Iridoid-Alkaloid identifiziert werden, welches aus einem tetracyclischen Ringsystem und zwei Secologanin-Strukturelementen besteht. [26]

Der Aromat wurde durch die hohen chemischen Shifts, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten im ^1H -NMR der Positionen H-9 (Dublett), H-10 (Triplett), H-11 (Triplett), H-12 (Dublett) beschrieben. Durch $^3J_{\text{H-C}}$ Kopplungen zwischen H-11 und C-13 sowie H-12 und C-8 wurde das aromatische System vollständig im HMBC beschrieben. Die beiden Tetrahydropyrrol-Strukturelemente konnten unter anderem durch die $^{2,3}J_{\text{H-C}}$ Kopplungen des singulettischen H-2 mit C-6, C-8, C-13 sowie dem $^3J_{\text{H-H}}$ Crosspeak zwischen den Protonen H-5b und H-6a im COSY identifiziert werden. Der chemische Shift von C-2 deutete zusätzlich auf eine OH-Gruppe in dieser Position hin.

Der *N,N*-heterocyclische Sechsring konnte einerseits durch den olefinischen Singulett H-3, welcher $^{2,3}J_{\text{H-C}}$ Kopplungen mit C-2, C-14, C-3' zeigte und andererseits durch die $^{2,3,4}J_{\text{H-C}}$ Kopplungen von H-3' mit C-2, C-3, C-8, C-13, C-14, welches durch den benachbarten Stickstoff einen höheren chemischen Shift aufwies, beschrieben werden. Außerdem ließen sich die einzelnen in sich abgeschlossenen Spinsysteme im vorhanden tetrazyklischen Ringsystem sehr gut im TOCSY beobachten.

Die chemischen Shifts im ^1H -NMR und im ^{13}C -NMR der beiden Secologanin Reste ähnelten sehr stark dem bereits beschriebenen Alstrostin A. [18] Die Position des ersten Secoirioides konnte durch die zusätzlichen $^3J_{\text{H-C}}$ Kopplungen von H-3 mit C-15 lokalisiert werden und das zweite Secoiridoid konnte durch die $^3J_{\text{H-H}}$ Kopplungen der Protonen H-14 der verbindenden Methylengruppe mit H-3' und H-15' bestimmt werden.

Beide Iridoidglycoside wiesen ähnliche Kopplungsmuster sowohl im COSY als auch im HMBC auf. Der Iridoidring konnte durch die $^{2,3}J_{\text{H-C}}$ Kopplungen von H-17 (H-17') mit C-15 (C-15'), C-16 (C-16'), C-22 (C-22') sowie durch einen Crosspeak in COSY von H-15 (H-15') mit H-20 (H-20') vollständig beschrieben werden. Die Lokalisierung der einzelnen Substituenten erfolgte durch weitere Untersuchung der 2D-NMR-Daten. Die Identifizierung des Methylesters erfolgte durch die $^3J_{\text{H-C}}$ Kopplung zwischen den 3H-Singulett der Methylgruppe und C-22 (C-22'). Die hohen Verschiebungen der Signale H-18 (H-18') und H-19 (H-19') sowie die $^3J_{\text{H-H}}$ Kopplungen untereinander deuteten auf das Vorhandensein einer Vinylgruppe hin. Ebenso unterstrich das $^3J_{\text{H-H}}$ Korrelationssignal zwischen H-19 (H-19') und H-20 (H-20') die Position der Ethylengruppe. Der hohe chemische Shift von C-21 (C-21') wies auf eine O-glycosidische Bindung zu einer β -D-Glucose hin, welches auch durch die vorhandene $^3J_{\text{H-C}}$ Kopplung mit C-1'' (C-1''') beschrieben wurde. Die restlichen Positionen (C2''-C6''/C2'''-C6''') des Zuckers ergaben sich durch Vergleich mit bekannter Literatur. [44]

Die relativen Konfigurationen der Positionen 2 und 7 ergaben sich durch die angenommene Biosynthese des Indols. [18] Die Chiralitätszentren C-15 (C-15'), C-20 (C-20'), C-21 (C-21') wurden durch die Biosynthese des Secologanin definiert und diese Stereochemie wurde auch durch die ROESY Crosspeaks von H-15 (H-15') mit H-20 (H-20') unterstrichen. [45] Die Position H-3' konnte durch die Crosspeaks im ROESY-Experiment mit den Protonen H-12, H-15, H-20, H-15', H-20' und mit den beiden Kernen der Methylengruppe H-14 gedeutet werden. Anzumerken ist, dass kein Signal mit dem strukturnahen H-2 zu sehen war, jedoch dieses mit den Protonen H-6, H-15' und H-14' koppelte. Außerdem korrelierte das aromatische H-12 mit H-18 und H-19 der Vinylgruppe, was zur Positionierung der Doppelbindung nahe dem Aromaten führte.

Die gefundenen UV-Maxima bei 208, 236 und 306 nm in MeOH/NH₄OAc deuteten darauf hin, dass es sich um eine Alstrostin A strukturnahe Verbindung handelt, da dieses ähnliche Absorptionsmaxima (212, 234, 278 und 314 nm; MeOH) aufwies. [44]

Die Interpretation der spektroskopischen Daten ergab eine bis dato nicht beschriebenen Verbindung. Das neue Molekül wurde Palicouresid genannt. Die Wahl des Namens wurde an die Pflanze *Palicourea luxurians* angelehnt.

4.3 Ergebnisse von CK-Lux03

Bei der isolierten Substanz handelt es sich um das bereits bekannte Dimethylacetal-Secologanin mit einer Molmasse von 434.4 g·mol⁻¹ und einer Summenformel von C₁₉H₃₀O₁₁. [46] Die Interpretation der spektroskopischen Daten ergab folgende Molekülstruktur in Abb.25.

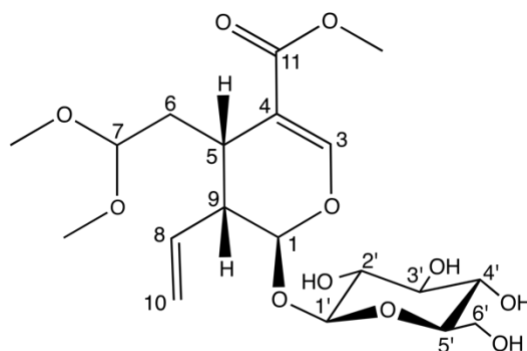


Abbildung 25: Struktur von Dimethylacetal-Secologanin (CK-Lux03).

Mit HR-TOF-ESI-MS konnten zwei positiv geladene Molekülionen gefunden werden, welche mit dem Molekülionen des Dimethylacetal-Secologanin korrelierten. Die Ergebnisse sind in Tab.9 zu sehen.

Tabelle 9: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von Dimethylacetal-Secologanin mit den dazu berechneten exakten Molekülionen

Molekülion	m/z_{gem}	m/z_{theo}
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	457.1686	457.1680
$[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$	479.1503	479.1500

Die verschiedenen chemischen Shifts der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten, sowie deren Zuordnung und Nummerierung nach Abb.25 sind in der nachfolgenden Tab.10 aufgelistet.

Tabelle 10: NMR-Daten von Dimethylacetal-Secologanin in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5.51 (1H, d, 5.4)	97.8, d
3	7.43 (1H, s)	153.2, d
4	-	111.7, s
5	2.91 (1H, q, 6.6)	29.3, d
6	1.63 (1H, m)	33.2, t
	2.08 (1H, m)	
7	4.49 (1H, t, 5.6)	104.4, d
7-OCH ₃	3.28 (3H, s)	52.5, q
7-OCH ₃	3.29 (3H, s)	53.9, q
8	5.73 (1H, m)	135.8, d
9	2.67 (1H, m)	45.3, d
10	5.26 (1H, d, 10.6)	119.8, t
	5.31 (1H, d, 17.0)	
11	-	161.1, s
11-OCH ₃	3.70 (3H, s)	51.7, q
1'	4.67 (1H, d, 8.0)	100.1, d
2'	3.19 (1H, t, 8.5)	74.6, d
3'	3.35 (1H, m)	78.0, d
4'	3.27 (1H, m)	71.5, d
5'	3.30 (1H, m)	78.4, d
6'	3.66 (1H, dd, 12.0, 5.9)	62.7, t
	3.90 (1H, dd, 12.0, 1.5)	

Die UV-Maxima der Substanz in MeOH/NH₄OAc lagen bei den Wellenlängen 198 nm und 236 nm.

4.3.1 Strukturaufklärung von CK-Lux03

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse konnte ein positiv geladenes Molekülion $[M+Na]^+$ bei m/z 457.1686 gefunden werden. Dieses korrelierte mit dem berechneten m/z 457.1680 der Summenformel $C_{19}H_{30}O_{11}Na$.

Durch die Interpretation des ^{13}C -NMR und des HSQC konnte eine erste Grobunterscheidung der einzelnen vorhandenen Kohlenstoffatome getroffen werden. Es wurden drei CH_3 -, drei CH_2 -, elf CH -Gruppen und zwei C_q gefunden. Die weitere Untersuchung ergab eine Struktur, ähnlich dem Secologanin. Die einzelnen 1H - und ^{13}C -Shifts stimmten sehr gut mit der bereits publizierten Verbindung Dimethylacetal-Secologanin überein. [46]

Der Secoiridoid-Ring konnte durch die $^{2,3}J_{H-C}$ Kopplungen von H-3 mit C-1, C-4, C-5, C-11 bestimmt werden. Durch das Korrelationssignal von H-1 mit C-1' konnte die vorhandene β -D-Glucose identifiziert werden. Die Vinylgruppe wurde durch die chemischen Shifts und Kopplungskonstanten von H-8 und H-10 sowie der $^3J_{H-H}$ Kopplungen von H-8 mit H-9 und H-5 im COSY charakterisiert. Die Lokalisierung des Acetals erfolgte durch die $^3J_{H-H}$ Crosspeaks des H-6 der Methylengruppe mit H-7 und H-5.

Die drei vorhandenen Methylgruppen konnten anhand ihres Integrals und ihres Singuletts im 1H -NMR einzeln identifiziert werden. Die Feinunterscheidung erfolgte danach in den heteronuklearen 2D-Spektren. Einerseits zeigte das quartäre C-11 der Methylestergruppe eine $^3J_{H-C}$ Kopplung mit der etwas niedrigen verschobenen CH_3 -Gruppe (δH 3.0 ppm) und andererseits koppelte C-7 über drei Bindungen im HMBC mit den ähnlich verschoben Protonen der beiden Methoxygruppen (δH 3.28 und δH 3.29 ppm).

Die chiralen Zentren wurden sowohl durch die vorhandene Literatur des Dimethylacetal-Secologanin und der Biosynthese des Secologanins als auch durch die Korrelation von H-5 mit H-9 und dem fehlenden Crosspeak zwischen H-5 und H-1 im NOESY unterstrichen. [46, 45]

Für die UV-Absorptionsmaxima bei 198 nm und 236 nm in MeOH/ NH_4OAc konnte keine vergleichende Literatur gefunden werden, jedoch ähnelten die Ergebnisse dem strukturverwandten Secologanin ($UV_{max} = 236$ nm). [47]

4.4 Ergebnisse von CK-Lux04

Als nächster Naturstoff konnte ein weiteres Secoiridoidglycosid namens Secologaninsäure charakterisiert werden. Die Summenformel beträgt $C_{16}H_{22}O_{10}$ mit einer Molekülmasse von $374.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. [48] Die Struktur der Verbindung ist in Abb.26 zu sehen.

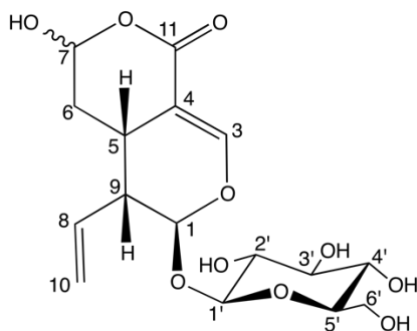


Abbildung 26: Struktur der Secologaninsäure (CK-Lux04).

Ebenso, wie in Kapitel 4.2, konnten zwei positiv geladenen Molekülionen (Tab.11) im Massenspektrum gefunden werden, welche auf die Secologaninsäure hindeuten.

Tabelle 11: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von Secologaninsäure mit den dazu berechneten exakten Molekülionen

Molekülion	$m/z_{\text{gem.}}$	$m/z_{\text{theor.}}$
$[M+Na]^+$	397.1107	397.1105
$[M-H+2Na]^+$	419.0925	419.0925

Eine Liste aller gefunden chemischen Shifts im ^1H -NMR sowie im ^{13}C -NMR sind in Tab.12 gegeben. Die Nummerierung der Kohlenstoffe erfolgte nach Abb.26.

Tabelle 12: NMR-Daten der Secologaninsäure in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5.57 (1H, d, 2.1)	97.9, d
3	7.60 (1H, d, 2.3)	154.1, d
4	-	105.2, s
5	3.12 (1H, m)	25.3, d
6	1.46 (1H, dt, 13.7, 9.9)	31.7, t
	1.99 (1H, m)	
7	5.33 (1H, m)	105.5, d
8	5.52 (1H, m)	133.1, d
9	2.67 (1H, m)	43.7, d
10	5.29 (2H, m)	121.2, t
11	-	167.7, s

Position	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1'	4.68 (1H, d, 8.0)	99.7, d
2'	3.19 (1H, m)	74.7, d
3'	3.31 (1H, m)	78.4, d
4'	3.28 (1H, m)	71.3, d
5'	3.35 (1H, m)	77.9, d
6'	3.66 (1H, m)	62.7, t
	3.89 (1H, d, 11.9)	

Die gemessenen UV-Maxima während der HPLC-Messung betrugen 202 und 228 nm in MeOH/NH₄OAc.

4.4.1 Strukturaufklärung von CK-Lux04

Ebenso konnte ein positiv geladenes Molekülion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ bei m/z 397.1107 gefunden werden, welches eine gute Übereinstimmung mit dem theoretischen m/z 397.1105 der Summenformel C₁₆H₂₂O₁₀Na zeigte.

Die Untersuchung der 2D-NMR Daten ergab in Summe drei Methylen-, elf Methingruppen und zwei quartäre Kohlenstoffe. Unter Anderem konnte durch die Deutung der chemischen Shifts eine Strukturähnlichkeit mit dem Secologanin nachgewiesen werden. Die Interpretation der vorhandenen chemischen Shifts im ^1H -NMR und ^{13}C -NMR wiesen auf die bereits bekannte Verbindung Secologaninsäure, welche eine Halbacetal-Form des Secologanin darstellt, hin. [48]

Aufgrund einiger Verunreinigungen (siehe Chromatogramm in Abb.17) und der geringen Substanzmenge waren einige Kopplungen im Iridoid-Ringsystem im HMBC nicht sichtbar. Neben den Signalen der Secologaninsäure konnten noch weitere chemische Shifts identifiziert werden, welche auf das zuvor beschriebene Dimethylacetal-Secologanin und dem strukturverwandten Vogelosit als zusätzliche Verbindungen hindeuteten. Das Vogelosit hat im Gegensatz zur Secologaninsäure eine *R*-konfigurierte Methoxygruppe in Position 7. [49] Außerdem konnten im Massenspektrum die Molekülionen beider genannten Verbindungen gefunden werden. Jedoch wiesen die Signalintensitäten des Vogelosit als auch jene des Dimethylacetal-Secologanin im ^1H -NMR sowie im ^{13}C -NMR eine zu geringe Signalgröße im Vergleich zu jenen der Secologaninsäure auf und konnten deshalb als primär vorliegende Substanzen ausgeschlossen werden.

Die $^{2,3}J_{H-H}$ Kopplungen im COSY zwischen H-6a mit H-5, H-6b und dem hochfeldverschobenen H-7 des Semiacetals deuteten auf einen zusätzlichen Heterozyklus hin. Dazu wies der chemische Shift von C-11 auf einen konjugierten Carbonsäureester in dieser Position hin. Die $^3J_{H-C}$ Kopplungen zwischen H-3 mit C-1 definierten das Secoiridoid und der $^3J_{H-C}$ Crosspeak zwischen H-1 und C-1' unterstrich wiederum das Vorhandensein einer β -D-Glucose. Schlussendlich gaben die chemischen Shifts von C-8 und C-10 Aufschluss über den substituierten Vinylrest, welcher durch die $^{2,3}J_{H-H}$ Kopplungen zwischen H-8 mit H-10 und H-9 beschrieben werden konnte.

Die Identifizierung der Stereozentren in den Positionen 1, 5 und 9 im NOESY war ident wie beim dem zuvor beschriebenen Dimethylacetal-Secologanin und wurde ebenfalls durch die Biosynthese des Secologanins bestimmt. [45] Außerdem stimmten die Ergebnisse mit bereits bekannten Daten überein. [48]

In der Literatur konnten keine vergleichenden Daten zu den gemessenen UV-Maxima der Secologaninsäure gefunden werden (202 und 228 nm in MeOH/NH₄OAc), jedoch ähnelten sie ebenso dem Secolganin und dem Vogelosid (UV_{max} = 244 nm in MeOH). [47, 49]

4.5 Ergebnisse von CK-Lux05

Bei dieser Substanz handelt es sich um die einzige Verbindung, welche Ähnlichkeiten mit dem Strictosidin aufweist. Das Molekül konnte als 5 α -Carboxystrictosidin identifiziert werden, welches in Abb.27 zu sehen ist. [50] Die Summenformel beträgt C₂₈H₃₄N₂O₁₁ und daraus resultiert eine molekulare Masse von 574.6 g·mol⁻¹.

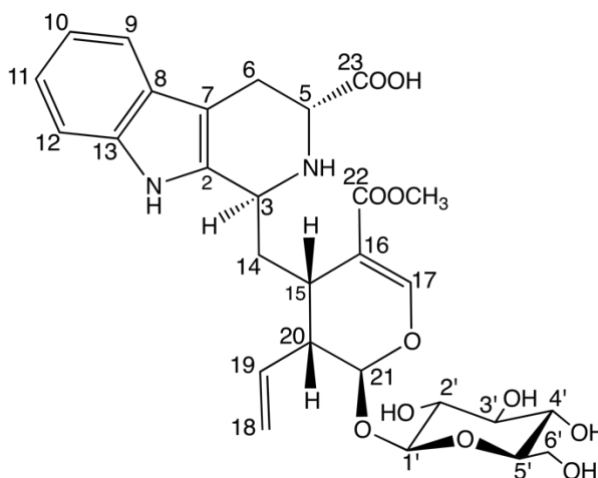


Abbildung 27: Struktur von 5 α -Carboxystrictosidin (CK-Lux05).

Für das CK-Lux05 konnten im HR-TOF-ESI-MS mehrere positiv geladene Molekülonen (Tab.13) gefunden werden, welche mit der beschriebenen Struktur korrelierten.

Tabelle 13: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von 5 α -Carboxystrictosidin mit den dazu berechneten exakten Molekülonen

Molekülon	m/z_{gem}	m/z_{theo}
[M+H] ⁺	575.2244	575.2235
[M+Na] ⁺	597.2065	597.2055
[M+H+2Na] ⁺	619.1886	619.1872

Eine Zuordnung (Nummerierung nach Abb.27) der einzelnen chemischen Shifts der ¹H-NMR und ¹³C-NMR Spektren ist in Tab.14 aufgelistet.

Tabelle 14: NMR-Daten von 5 α -Carboxystrictosidin in Methanol-*d*₄. Die Tabelle zeigt die ¹H-NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ¹³C-NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
2	-	130.4, s
3	4.66 (1H, m)	53.1, d
5	3.97 (1H, dd, 12.2, 5.1)	59.4, d
6	3.04 (1H, m)	24.0, t
	3.47 (1H, dd, 16.0, 5.1)	
7	-	108.3, s
8	-	127.5, s
9	7.49 (1H, d, 8.0)	119.2, d
10	7.05 (1H, t, 7.4)	120.6, d
11	7.13 (1H, t, 7.5)	123.4, d
12	7.31 (1H, d, 8.0)	112.2, d
13	-	138.7, s
14	2.22 (1H, td, 13.4, 4.0)	34.6, t
	2.45 (1H, td, 13.4, 3.1)	
15	3.10 (1H, m)	32.8, d
16	-	108.6, s
17	7.84 (1H, s)	157.3, d
18	5.27 (1H, d, 10.6)	119.8, t
	5.39 (1H, d, 17.8)	
19	5.85 (1H, m)	135.3, d
20	2.79 (1H, m)	45.3, d
21	5.92 (1H, d, 9.7)	97.3, d
22	-	171.9, s

Position	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
22-OCH ₃	3.81 (3H, s)	52.9, q
23	-	180.4, s
1'	4.83 (1H, d, 8.1)	100.4, d
2'	3.19 (1H, m)	74.6, d
3'	3.35 (1H, m)	78.0, d ^{a)}
4'	3.24 (1H, m)	71.8, d
5'	3.35 (1H, m)	78.0, d ^{a)}
6'	3.67 (1H, m)	63.1, t
	3.88 (1H, m)	

^{a)} nicht unterscheidbar

Für das 5 α -Carboxystrictosidin wurde ein UV_{max} bei 222 nm in MeOH/NH₄AOc bestimmt.

4.5.1 Strukturaufklärung von CK-Lux05

Die Untersuchung mit HR-TOF-ESI-MS zeigte ein positives geladenes Molekülion [M+H]⁺ bei m/z 575.2244, welches mit der chemischen Summenformel C₂₈H₃₅N₂O₁₁ (m/z 575.2235) in Zusammenhang gebracht werden konnte.

Mit dem zweidimensionalen HSQC-Experiment wurden eine CH₃-, vier CH₂-, 16 CH-Gruppen und sieben protonenlose Kohlenstoffatome gefunden. Unter anderem deuteten die spektroskopischen Daten auf ein Secologanin-Grundgerüst hin, das mit einem Tryptamin-Strukturelement verknüpft ist. Das Molekül konnte als das Indolalkaloid 5 α -Carboxystrictosidin charakterisiert werden. [50]

Ebenso, wie bei dem zuvor beschriebenen CK-Lux04, war diese Substanz verunreinigt (siehe Abb.18) und wies in einigen ppm-Bereichen mehrere Störsignale anderer Substanzen auf. Ein Teil dieser Signale konnte dem ebenfalls isolierten Blumenol C-Sulfat zugeordnet werden und einige andere chemische Shifts gehörten zu nicht weiter charakterisierbaren Glycosiden. Jedoch unterstrichen die größeren Integrale im ^1H -NMR und die Vollständigkeit der vorhandenen chemischen Shifts des 5 α -Carboxystrictosidin die Annahme, dass dies die vorrangige Verbindung sein muss.

Der Aromat des Tryptamin-Strukturelements wurde durch die chemischen Shifts und Multiplizitäten der dublettischen Protonen H-8 und H-12 sowie den triplettischen Protonen H-9 und H-11 teils beschrieben. Die dazugehörigen quartären Kohlenstoffe C-8/C-13 wurden aufgrund ihrer $^{2,3}J_{\text{H-C}}$ Kopplungen einerseits von H-10 mit C-8 und

andererseits von H-11/H-12 mit C-13 lokalisiert. Die Positionen 2 und 7 wurden durch die vorhandene Literatur identifiziert, wobei C-7 auch eine sehr schwache $^5J_{H-C}$ Kopplung im HMBC mit H-10 aufwies. [51] Der quartäre Kohlenstoff C-2 zeigte keine detektierbare Kopplung. Anhand der $^{2,3}J_{H-H}$ Kopplungen im COSY von H-6a mit H-5 und H-6b konnten diese als geschlossenes Spinsystem definiert werden. Der 1H -Shift und das Integral von H-5 deuteten sowohl auf einen benachbarten Stickstoff als auch auf einen weiteren Substituenten hin. Schlussendlich konnte in dieser Position eine Carboxygruppe (C-23) angeknüpft werden. Ebenso wie C-5 zeigte C-1 den typischen chemischen Shift für ein benachbartes sekundäres Amin im ^{13}C -NMR.

Das Indol konnte mit dem Secoiridoidglycosid über die Methylengruppe (C-14) verbunden werden und diese Verknüpfung wurde durch den $^3J_{H-H}$ Crosspeak von H-14b einerseits mit H-1 und andererseits mit H-15 unterstrichen. Unter anderem wies H-17 die typischen $^{2,3}J_{H-C}$ Kopplungen mit C-15, C-16, C-21 und eine schwache Kopplung mit C-22 auf. Das Korrelationssignal über drei Bindungen von C-22 mit der Methylgruppe des Methylesters im HMBC, die $^3J_{H-H}$ Kopplungen von H-19 mit H-18 und H-20 des Vinyls sowie der $^3J_{H-C}$ Crosspeak zwischen H-1' der β -D-Glucose und C-21 definierten das Iridoid. Die Positionen 2'-6' entsprachen der Literatur. [51]

Die dreidimensionale Struktur des CK-Lux05 konnte aufgrund der vergleichenden Literatur und der bekannten *in vivo* Synthese des Secologanin charakterisiert werden. [51, 8, 9, 45]

Für das gemessene UV-Maximum von 5 α -Carboxystrictosidin bei 222 nm in MeOH/NH₄OAc konnten keine Daten gefunden werden. Jedoch ist anzumerken, dass das sehr strukturnahe Strictosidin in MeOH ein großes Absorptionsmaximum bei 222 nm und ein deutlich Kleineres bei 272 nm besitzt. [52]

4.6 Ergebnisse von CK-Lux06

Zusätzlich konnte ein weiteres Alstrostin identifiziert werden. Der Name der neuen Verbindung lautet Dehydro-Rudgeifolin. Aus der aufgeklärten Struktur (Abb.28) ergab sich eine chemische Summenformel von C₄₃H₅₂N₂O₁₉ und einer daraus resultierenden Molmasse von 900.9 g·mol⁻¹.

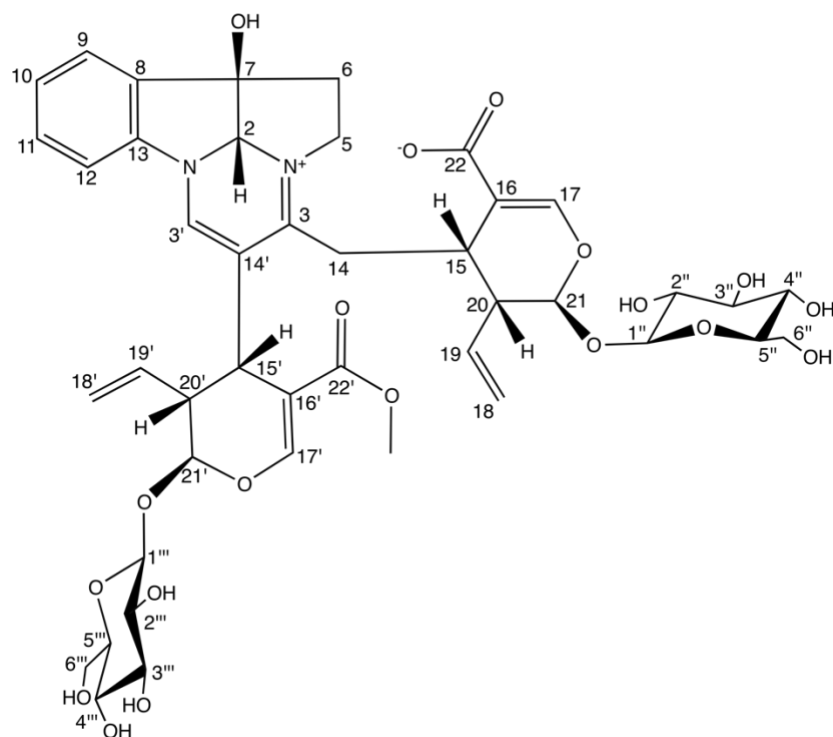


Abbildung 28: Struktur von Dehydro-Rudgeifolin (CK-Lux06).

Mit ESI-HF-TOF-MS konnten zwei positiv geladene Molekülonen bestimmt werden. Diese sind in Tab.15 den exakt berechneten Molekülonen gegenübergestellt.

Tabelle 15: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von Dehydro-Rudgeifolin mit den dazu berechneten exakten Molekülonen

Molekülion	m/z_{gem}	m/z_{theo}
$[M+H]^+$	901.3248	901.3237
$[M+Na]^+$	923.3065	923.3056

Die Kohlenstoffe wurde nach der Struktur in Abb.28 nummeriert und eine Auflistung aller chemischen Shifts ist in Tab.16 ersichtlich.

Tabelle 16: NMR-Daten von Dehydro-Rudgeifolin in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
2	4.97 (1H, s)	84.7, d
3	-	166.9, s
5	4.22 (1H, m) 4.29 (1H, m)	52.5, t
6	2.07 (1H, m) 2.51 (1H, 14.0, 6.6)	38.9, t
7	-	88.2, s

Position	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
8	-	138.7, s
9	7.54 (1H, d, 7.6)	125.6, d
10	7.30 (1H, t, 7.5)	128.3, d
11	7.41 (1H, m)	131.7, d
12	7.50 (1H, d, 8.2)	114.3, d
13	-	140.1, s
14	n.d.	n.d.
15	3.37 (1H, m)	36.7, d
16	-	114.2, s
17	7.41 (1H, m)	151.5, d
18	5.36 (1H, m)	120.3, t
	5.47 (1H, m)	
19	5.95 (1H, m)	135.7, d
20	2.75 (1H, q, 6.8)	45.5, d
21	5.77 (1H, d, 9.0)	96.4, d
22	-	173.6, s
3'	7.68 (1H, s)	139.2, d
14'	-	116.7, s
15'	4.18 (1H, m)	31.9, d
16'	-	108.2, s
17'	7.72 (1H, d, 1.8)	156.2, d
18'	5.31 (1H, dd, 10.1, 1.6)	123.6, t
	5.47 (1H, m)	
19'	5.73 (1H, m)	135.1, d
20'	3.19 (1H, m)	46.7, d
21'	5.55 (1H, d, 2.9)	99.3, d
22'	-	168.4, s
22'-OCH ₃	3.64 (3H, s)	51.9, q
1''	4.79 (1H, d, 7.9)	100.2, d
2''	3.29 (1H, m)	74.6, d
3''	3.35 (1H, m) ^a	78.5, d
4''	3.25 (1H, m) ^b	71.7, d
5''	3.35 (1H, m) ^a	78.0, d
6''	3.59 (1H, dd, 12.0, 6.6)	62.8, t
	3.86 (1H, dd, 12.0, 2.0)	
1'''	4.72 (1H, d, 7.9)	101.5, d
2'''	3.23 (1H, m)	74.7, d
3'''	3.35 (1H, m) ^a	78.6, d
4'''	3.25 (1H, m) ^b	71.7, d
5'''	3.35 (1H, m) ^a	78.4, d

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
6'''	3.66 (1H, m)	63.0, t
	3.94 (1H, dd, 12.0, 2.0)	

^{a)-b)} nicht unterscheidbar

Für das Dehydro-Rudgeifolin wurde unter anderem auch ε für die verschiedenen Absorptionsmaxima nach Glg.2 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab.17 zu sehen.

Tabelle 17: Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie von Dehydro-Rudgeifolin in MeOH. Gegeben sind die Absorptionsmaxima mit der jeweiligen Extinktion E und ε in $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

UV_{max} (nm) ^{a)}	E	ε ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
206	1.5406	4.54
236	0.7187	4.21
418	0.1825	3.61

^{a)} in MeOH/NH₄OAc

4.6.1 Strukturaufklärung von CK-Lux06

Die massenspektrometrische Analyse ergab ein positiv geladenes Molekülon $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei m/z 901.3248. Dieses korrelierte mit der Summenformel $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{19}$ mit einem theoretisch berechneten m/z 901.3237.

1D- und 2D-Experimente ergaben in Summe eine Methyl-, sieben Methylen- und 26 Methingruppen sowie neun quartäre Kohlenstoffatome. Wobei anzumerken ist, dass eine CH_2 -Gruppe nicht identifiziert werden konnte. Die weitere Strukturanalyse ergab ein Kohlenstoffskelett, welches dem Palicouresid (siehe Kapitel 4.2) sehr ähnelte. Somit besteht CK-Lux06 ebenfalls aus zwei Secologanin-Strukturelementen, welche mit einem Indol verknüpft sind.

Die beiden Secologanin-Reste wiesen ähnliche Kopplungsmuster, jedoch teils unterschiedliche chemische Shifts, im Vergleich zum Palicouresid, auf. Ein Unterschied war beispielsweise der erhöhte Shift von C-22, da in dieser Position anstatt des Methylesters eine deprotonierte Säuregruppe aufzufinden ist. Die Kopplungen des Indols wiesen im Bereich des Aromaten und der Tetrahydropyrrol-Strukturelemente große Übereinstimmungen mit dem Palicouresid auf. Jedoch unterschied sich der N,N -Heterozyklus. Anhand der $^2,3J_{\text{H-C}}$ Kopplungen zwischen C-3' mit H-2, H-3, H-13, H-14' und H-15' im HMBC konnte dessen Position sowie die umliegenden Kohlenstoffe beschrieben werden. Somit konnte auch das erste Secoiridoid an das Indol geknüpft

werden. Da die Methylengruppe in Position 14 weder Signale im ^1H -NMR noch im ^{13}C -NMR Signale zeigte, konnte in den zweidimensionalen NMR-Experimenten keine Kopplungen gefunden werden und eine Verbindung zum zweiten Secoiridoidglycosid nicht vollständig bewiesen werden. Nichtsdestotrotz ergab sich die CH_2 -Gruppe aus der resultierende exakten Masse des HR-ESI-TOF-MS Experiments und der Biosynthese der Alstroline, für welche zwei Secologanine notwendig sind. [18] Deshalb kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von dieser Struktur ausgegangen werden. Ein Grund für das zu schwache Signal könnte ein sehr starke Peakverbreiterung sein, welche durch die positive Ladung am Stickstoff verursacht wird. Dadurch könnte es im Molekül zu Isomerisierungen kommen und somit hätte C-14 einen partiellen Doppelbindungscharakter. Folglich stünde die Verbindung in einem ständigen dynamischen Wechsel und dies würde eine Koaleszenz der Signale verursachen, was in manchen Fällen schwierig im NMR zu detektieren ist. Anzumerken ist auch, dass sich die Ladung am Stickstoff nicht nur auf diese Methylengruppe auswirkt, sondern auch die höheren Shift von C-3, C-13 und den beiden Kernen in Position 5 sowie dem Proton H-13' verursacht.

Die Stereochemie in den Position 2 und 7 ergab sich durch die Biosynthese der Alstroline und ebenso durch Vergleiche mit den strukturnahen Verbindungen Alstrostin A sowie dem Rudgeifolin. [18, 44] Durch die Korrelationssignale zwischen H-15 (H-15') und H-20 (H-20') im ROESY und der biologischen Synthese des Secologanin konnten diese chiralen Zentren definiert werden. [45]

Auch deuteten die UV-Maxima bei 206, 236 und 418 nm in $\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OAc}$ auf eine Alstrostin-Struktur hin. Im Vergleich lagen die Absorptionsmaxima des verwandten Rudgeifolin bei 210, 230, 278 und 314 nm in MeOH in einem ähnlichen Bereich. [44] Erwähnenswert ist an dieser Stelle auch, dass das CK-Lux06 stark gelb-fluoreszierte, was möglicherweise auf das konjugierte System der Verbindung zurückzuführen ist.

Die Strukturaufklärung ergab ein neues Alstrostin mit dem Namen Dehydro-Rudgeifolin. Der Name ist an das bereits bekannte Rudgeifolin angelehnt. [44]

4.7 Ergebnisse von CK-Lux07

Als CK-Lux07 konnte ein weitere acetalische Verbindung namens Dibutylacetal-Secologanin charakterisiert werden. [53] Die Molmasse beträgt $518.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei einer Summenformel von $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_{11}$. Die Strukturaufklärung ergab folgende Struktur in Abb.29.

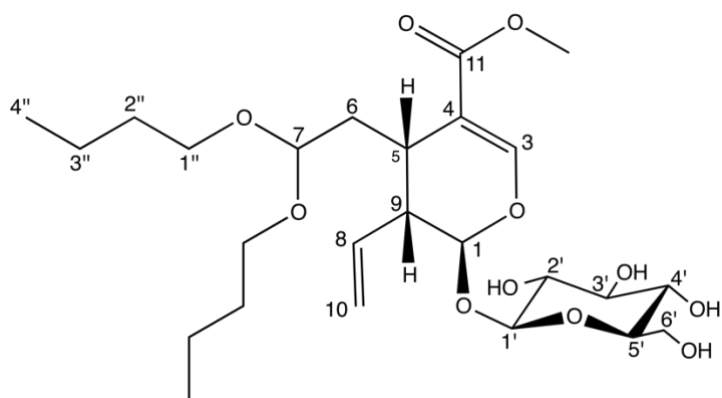


Abbildung 29: Struktur von Dibutylacetal-Secologanin (CK-Lux07).

In diesem Fall wurden ebenfalls zwei positiv geladene Molekülionensignale im Massenspektrum gefunden, welche mit dem Dibutylacetal-Secologanin korrelierten. Siehe Tab.18.

Tabelle 18: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von Dibutylacetal-Secologanin mit den dazu berechneten exakten Molekülionen

Molekülion	m/z_{gem}	m/z_{theo}
$[M+Na]^+$	541.2430	541.2619
$[M+K]^+$	557.2359	557.2161

Die Nummerierung der Kohlenstoffatome nach Abb.29 und die dazugehörigen chemischen Shifts sind in der folgenden Tab.19 zu sehen.

Tabelle 19: NMR-Daten von Dibutylacetal-Secologanin in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5.50 (1H, d, 5.3)	97.9, d
3	7.42 (1H, d, 1.0)	153.2, d
4	-	111.7, s
5	2.94 (1H, m)	29.2, d
6	1.62 (1H, m)	34.0, t
	2.12 (1H, m)	
7	4.61 (1H, m)	103.1, d
8	5.72 (1H, m)	135.8, d
9	2.68 (1H, m)	45.3, d
10	5.26 (1H, dd, 10.3, 1.4)	119.8, t
	5.31 (1H, d, 17.3)	
11	-	169.1, s
11-OCH ₃	3.66 (3H, s)	51.7, q

Position	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1'	4.67 (1H, d, 8.0)	100.1, d
2'	3.18 (1H, t, 8.6)	74.4, d
3'	3.35 (1H, m)	78.1, d
4'	3.26 (1H, m)	71.6, d
5'	3.30 (1H, m)	78.4, d
6'	3.66 (1H, m)	62.8, t
	3.90 (1H, dd, 12.0, 2.0)	
1''	3.42 (2H, m) ^{c)}	66.1, t
	3.60 (2H, m) ^{c)}	(67.4, t) ^{d)}
2''	1.54 (4H, m) ^{c)}	33.1, t ^{a)}
3''	1.40 (4H, m) ^{c)}	20.5, t ^{b)}
4''	0.94 (6H, m) ^{c)}	14.3, q
		(14.4, q) ^{e)}

^{a)-b)} zwei nicht getrennte ^{13}C -Shifts

^{c)} doppelte Signalintensität aufgrund nicht unterscheidbarer ^1H -Shifts

^{d)-e)} getrenntes ^{13}C -Signal für gleiches ^1H -Signal

Das Dibutylacetal-Secologanin zeigte zwei Absorptionsmaxima bei 200 und 239 nm in MeOH/NH₄OAc.

4.7.1 Strukturaufklärung von CK-Lux07

Unter Anderem konnte für diese Verbindung ein Molekölion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ mit einer positiven Ladung gefunden werden. Es wurde ein m/z 541.2430 im Massenspektrum gefunden, welches eine gute Übereinstimmung mit dem theoretisch berechneten m/z 541.2619 der chemische Summenformel C₂₅H₄₂O₁₁Na aufwies.

Die Interpretation der 2D-NMR-Spektren führte zu einem Kohlenstoffskelett aus drei Methyl-, neun Methylen-, elf Methingruppen und zwei quartären Kohlenstoffen. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich eine sehr ähnliche Struktur, wie die des Dimethylacetal-Secologanin, das in Kapitel 4.3 beschrieben wurde. Anhand der spektroskopischen Daten konnte das CK-Lux07 als das bereits bekannte Secologanin-Artefakt Dibutylacetal-Secologanin identifiziert werden. [53]

Die Butylgruppen wiesen im ^1H -NMR Protonensignale doppelte Intensität auf, da sie chemisch quasi äquivalent sind und konnten somit auch nur vereinzelt im ^{13}C -NMR unterschieden werden. Anhand der $^3J_{\text{H-H}}$ COSY-Crosspeaks konnten die terminale Methylgruppe C-4'', die zwei Methylengruppen C-3'' und C-2'' und die aufgrund des benachbarten Sauerstoffs höher verschobene Methylengruppe C-1'' charakterisiert werden.

Außerdem zeigten die Protonen H-1"-H-4" ein in sich abgeschlossenes Spinsystem im TOCSY.

Anhand der $^3J_{H-C}$ Kopplungen im HMBC zwischen dem acetalischen C-7 und den beiden Kernen von H-1' konnten die Butylgruppen mit dem Secoiridoidglycosid verbunden werden. Weitere chemische Shifts, $^3J_{H-H}$ Kopplungen im COSY und $^{2,3}J_{H-C}$ Kopplungen im HMBC waren sehr ähnlich zu dem in beschriebenen Dimehtylacetal-Secologanin und somit konnten die restlichen Strukturelemente vollständig identifiziert werden.

Ebenfalls waren für die Aufklärung der Stereochemie die NOESY Crosspeaks zwischen den chiralen Zentren C-1, C-5 und C-9 entscheidend, welche ident zu dem zuvor beschriebenen CK-Lux03 waren. Zusätzlich dazu wurden bereits bekannte Daten der Verbindung und die Biosynthese des Secologanin für die Charakterisierung genutzt. [53, 45]

Es wurden zwei Absorptionsmaxima bei 198 und 236 nm in MeOH/NH₄OAc für die Substanz gefunden, wobei das zweite Maximum signifikant größer war. Diese Daten korrelierten mit dem bereits bekannten UV-Maximum bei 236 nm. [45]

4.8 Ergebnisse von CK-Lux08

Im HR-TOF-ESI-MS-Massenspektrum konnten mehrere Signale im Bereich zwischen m/z 250-545 gefunden werden, wobei das stärkste Signal bei m/z 282.0682 lag. Das Molekülion konnte aufgrund fehlender spektroskopischer Informationen nicht zugeordnet werden. Ebenfalls wurden drei Absorptionsmaxima HPLC-analytisch in MeOH/NH₄OAc bestimmt, welche bei 198, 248 und 324 nm lagen. Aufgrund der geringen Masse der Substanz CK-Lux08 konnten jedoch keine NMR-Daten erhoben werden, was zur Folge hatte, dass keine Aufklärung der Struktur möglich war.

4.9 Ergebnisse von CK-Lux09 und CK-Lux10

Die Analyse der spektroskopischen Daten führte zu dem Ergebnis, dass die isolierten Substanzen CK-Lux09 und CK-Lux10 ident waren. Bei den beiden Substanzen handelt es sich um die bereits bekannte Verbindung Demethyl-Secologanol (Abb.30). [54] Es ergab sich eine Summenformel von C₁₆H₂₄O₁₀ mit einer resultierenden molekularen Masse von 376.4 g·mol⁻¹.

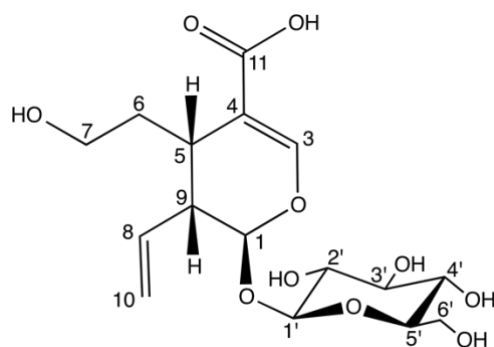


Abbildung 30: Struktur von Demethyl-Secologanol (CK-Lux09 und CK-Lux10).

Es konnten für die isolierten Verbindungen CK-Lux09 und CK-Lux10 sowohl positiv geladene als auch negativ geladene Molekülonen mit HR-TOF-ESI-MS gefunden werden. In Tab.20 sind nur die Ergebnisse von CK-Lux09 gelistet, da keine signifikanten Unterschiede zu sehen waren.

Tabelle 20: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. und neg. mode) von Demethyl-Secologanol (CK-Lux09) mit den dazu berechneten exakten Molekülonen

Molekülion	m/z_{gem}	m/z_{theo}
$[\text{M}-\text{H}]^-$	375.1358 ^{a)}	375.1298
$[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$	397.1181	397.1116
$[\text{M}+\text{H}]^+$	377.1292	377.1442
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	399.1110 ^{b)}	399.1261

^{a)} CK-Lux10 m/z 375.1362

^{b)} CK-Lux10 m/z 399.1108

Die folgenden chemischen Shifts (Tab.21) und deren Nummerierung nach Abb.30 sind auch nur für das CK-Lux09 angeführt, da die einzelnen Signale im ^1H -NMR und ^{13}C -NMR keine relevanten Unterschiede zeigten.

Tabelle 21: NMR-Daten von Demethyl-Secologanol (CK-Lux09) in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5.42 (1H, d, 6.3)	96.9, d
3	7.09 (1H, s)	147.7, d
4	-	117.9, s
5	2.92 (1H, q, 7.0)	31.6, d
6	1.73 (2H, m)	33.9, t
7	3.53 (1H, m)	60.8, t
	3.60 (1H, m)	
8	5.82 (1H, m)	136.9, d
9	2.59 (1H, m)	45.8, d

Position	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
10	5.19 (1H, d, 10.5) 5.24 (1H, d, 18.0)	118.5, t
11	-	176.4, s
1'	4.68 (1H, d, 7.9)	99.8, d
2'	3.20 (1H, d, 8.0)	74.4, d
3'	3.37 (1H, m)	77.8, d
4'	3.27 (1H, m)	71.6, d
5'	3.28 (1H, m)	78.3, d
6'	3.66 (1H, dd, 12.0, 5.6) 3.89 (1H, dd, 12.0, 1.4)	62.8, t

Das Demethyl-Secologanol zeigte ein starkes Absorptionsmaximum bei 230 nm in MeOH/NH₄OAc.

4.9.1 Strukturaufklärung von CK-Lux09 und CK-Lux10

Einerseits wurde mit HR-TOF-ESI-MS ein negativ geladenes MolekÜlion [M-H]⁻ mit *m/z* 375.1358 für CK-Lu09 und andererseits für CK-Lu10 ein *m/z* 375.1362 gefunden. Beide gefundenen MolekÜlionen korrelierten mit dem berechneten *m/z* 375.1298 der Summenformel C₁₆H₂₃O₁₀.

Die massenpektrometrischen Untersuchungen führten zu der Annahme, dass es sich bei beiden isolierten Substanzen um ein und dieselbe Verbindung handelt. Dies wurde ebenso durch die späteren Auswertungen der NMR-Spektren verdeutlicht, da sich sowohl die chemischen Shifts im ^1H - und ^{13}C -NMR sehr ähnelten als auch die Kopplungsmuster der zweidimensionalen Experimente (COSY, HMBC oder NOESY) im Rahmen der Messungenauigkeit ident waren.

Durch die Interpretation des ^{13}C -NMR und des HSQC konnte keine Methyl-, jedoch vier Methylen- und zehn Methingruppen sowie zwei protonenlose Kohlenstoffe entdeckt werden. Es wurde ebenso ein Kohlenstoffgrundgerüst gefunden, welches große Ähnlichkeit mit dem Secologanin hatte und die Substanz konnte schlussendlich als Demethyl-Secologanol charakterisiert werden. [54]

Die Korrelationssignale im COSY und HMBC der einzelnen Strukturelemente, wie dem vorhandenen Secoiridoid-Ring, der Vinylgruppe und der β -D-Glucose waren größtenteils vergleichbar mit den bereits beschriebenen CK-Lux03 oder dem CK-Lux07,

obwohl die chemischen Shifts des Demethyl-Secologanol in diesen Strukturteilen geringe Unterschiede zeigten.

Es konnte eine Säuregruppe in der Position 11 gefunden werden, da zum einen der ^{13}C -Shift höher als bei der gewohnten Methylestergruppe war und zum anderen keine $^3J_{\text{H-C}}$ Kopplung zwischen C-11 und einer Methylgruppe im HMBC zu sehen war. Zusätzlich konnten durch die $^3J_{\text{H-H}}$ Kopplungen von H-6 mit H-5 und H-7 die restlichen Positionen definiert werden. Außerdem wies der chemischen Shift der terminalen Methylengruppe C-7 auf eine benachbarte Hydroxygruppe hin.

Die NOESY-Daten zu H-1, H-5, und H-9 (siehe CK-Lux03), die enzymatische Synthese des Secologanolin und die vorhandene Literatur definierten die relative Konfiguration des Moleküls. [45, 54]

Ein weiteres Indiz für das Vorhandensein des Demethyl-Secologanol brachte der Vergleich des gemessenen UV_{max} bei 230 nm in MeOH/NH₄OAc mit der Literatur ($\text{UV}_{\text{max}} = 233 \text{ nm}$ in MeOH). [54]

4.10 Ergebnisse von CK-Lux11

Das kleinste Secoiridiodglycosid, welches in dieser Arbeit isoliert werden konnte, war die Substanz CK-Lux11. Die Interpretation der Spektren wies auf das bereits bekannte Swerosid mit einer chemischen Formel von C₁₆H₂₂O₉ und einer Molekülmasse von 358.4 g·mol⁻¹ hin. [55] Die Struktur ist in Abb.31 ersichtlich.

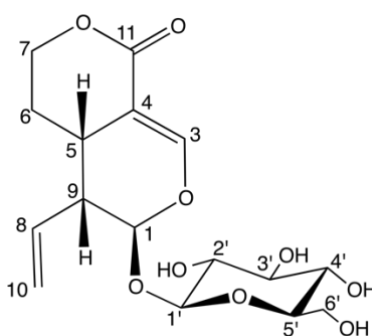


Abbildung 31: Struktur von Swerosid (CK-Lux11).

Im HF-TOF-ESI-MS Massenspektrum wurden mehrere mit dem Swerosid korrelierende positiv geladene Molekülonen gefunden, welche in der folgenden Tab.22 aufgelistet sind.

Tabelle 22: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) des Swerosid mit den dazu berechneten exakten Molekülionen

Molekülion	m/z_{gem}	m/z_{theo}
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	381.1169	381.1156
$[\text{M}-\text{H}+\text{Na}]^+$	403.0989	403.0975
$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	739.2443	739.2419

Die einzelnen Kohlenstoffatome wurden nach Abb.31 nummeriert und die dazugehörigen chemischen Shifts der Protonen und Kohlenstoffe sind in Tab.23 gegeben.

Tabelle 23: NMR-Daten des Swerosid in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5.56 (1H, d, 1.9)	97.9, d
3	7.60 (1H, d, 2.4)	154.0, d
4	-	106.0, s
5	3.15 (1H, m)	28.4, d
6	1.71 (1H, qd, 12.8, 2.3) 1.78 (1H, m)	25.9, t
7	4.37 (1H, td, 12.0, 2.4) 4.46 (1H, ddd, 11.2, 4.5, 1.9)	69.7, t
8	5.55 (1H, m)	133.3, d
9	2.70 (1H, dd, 9.5, 9.8)	43.8, d
10	5.28 (1H, dd, 10.0, 1.7) 5.32 (1H, dd, 17.3, 1.7)	120.8, t
11	-	168.6, s
1'	4.68 (1H, d, 7.9)	99.6, d
2'	3.19 (1H, t, 8.6)	74.7, d
3'	3.37 (1H, t, 9.0)	77.8, d
4'	3.27 (1H, t, 9.2)	71.5, d
5'	3.33 (1H, m)	78.4, d
6'	3.66 (1H, dd, 12.0, 6.0) 3.90 (1H, dd, 12.0, 2.0)	62.6, t

Ebenso konnte in den Absorptionsspektren, welche mit der HPLC aufgenommen wurden, zwei Absorptionsmaxima bei 202 und 244 nm in MeOH/ NH_4OAc ermittelt werden.

4.10.1 Strukturaufklärung von CK-Lux11

In dem gemessenen Massenspektrum wurde ein positiv geladenes MolekÜlion $[M+Na]^+$ mit m/z 381.1169 identifiziert. Dieses stimmte gut mit dem berechneten m/z 381.1156 der chemischen Summenformel $C_{16}H_{22}O_9Na$ Überein.

Die Auswertung der zweidimensionalen NMR-Spektren wies auf insgesamt vier CH_2 -, zehn CH -Gruppen und zwei C_q hin. Wie zuvor, konnte keine CH_3 -Gruppe gefunden werden. Die Interpretation der spektroskopischen Daten deutete auf eine Struktur hin, welche das gleiche Kohlenstoffskelett, wie die beschriebene Secologaninsäure in Kapitel 4.4 hatte. Durch die weitere Aufklärung der Struktur konnte die Substanz CK-Lux11 als das Secoiridoidglycosid namens Swerosid bestimmt werden. [55]

Die jeweiligen Muster der Korrelationssignale im COSY und HMBC stimmten grÖßtenteils mit der Secologaninsäure Überein, da die beiden Strukturen bis auf Position 7 ident sind. Trotz allem waren einige 1H - und ^{13}C -Shifts in den gleichen Positionen verschieden. Anzumerken ist auch, dass manche Kopplungen und Signale des Swerosid intensiver waren, als die der Secologaninsäure, da es in grÖßerer Menge und hÖherer Reinheit isoliert werden konnte. Dies hatte zur Folge, dass zum Beispiel die typischen *cis/trans*-Kopplungskonstanten für die Protonen H-10a/H-10b mit H-9 sowie deren geminale Kopplungskonstante im 1H -NMR identifiziert werden konnten. Außerdem verdeutlichte die $^3J_{H-C}$ Kopplung zwischen H-7b und C-11 den Ringschluss an dieser Position.

Die Identifikation von C-7 erfolgte anhand der $^3J_{H-H}$ Kopplungen zwischen H-6a/H-6b mit H-5 und den beiden Kernen H-7a/H-7b der Methylengruppe. Zusätzlich deutete der Shift von C-7 auf ein Lacton hin.

Die Stereochemie verhielt sich wie in Kapitel 4.4 beschrieben und wurde dazu durch die Secologanin-Biosynthese bestimmt. Außerdem wurden die einzelnen Chiralitätszentren ebenso mit Hilfe bekannter Daten charakterisiert. [45, 55]

Unter anderem ergaben die UV-spektroskopischen Daten zwei Absorptionsmaxima bei 202 und 244 nm (MeOH/ NH_4OAc), welche mit dem gemessenen UV_{max} von 244 nm für das Swerosid einer anderen Diplomarbeit mit einer ähnlichen mobilen Phase aus MeOH/ NH_4OAc Übereinstimmten. [56]

4.11 Ergebnisse von CK-Lux13

Für die diese isolierte Substanz ergab die Strukturaufklärung ein weiteres Secoiridoidglycosid mit dem Namen (*E*)-Aldosecologanin und die resultierende Struktur ist in Abb.32 zu erkennen. [57] Die Summenformel beträgt $C_{34}H_{46}O_{19}$ und die dazugehörige Molmasse $758.7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

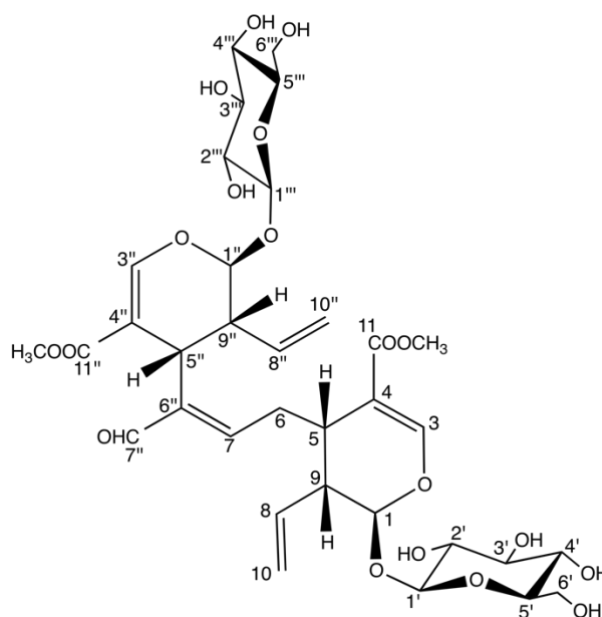


Abbildung 32: Struktur von (*E*)-Aldosecologanin (CK-Lux13).

Im HR-TOF-ESI-MS wurde ein positiv geladenes Molekülion für das CK-Lux13 gefunden, welches in Tab.24 mit dem korrelierenden Molekülion zu sehen ist.

Tabelle 24: HR-TOF-ESI-MS Daten (pos. mode) von (*E*)-Aldosecologanin mit dem dazu berechneten exakten Molekülion

Molekülion	m/z_{gem}	m/z_{theo}
$[M+Na]^+$	781.2551	781.2526

Ebenso wie bei den vorhergehenden Substanzen ist eine komplette Liste aller ^1H - und ^{13}C -Shifts in Tab.25 zu finden. Die Kohlenstoffe wurden anhand von Abb.32 nummeriert.

Tabelle 25: NMR-Daten von (*E*)-Aldosecologanin in Methanol- d_4 . Die Tabelle zeigt die ^1H -NMR Shifts (ppm) mit dazugehörigen Integral, Multiplizität und Kopplungskonstante (Hz) sowie die ^{13}C -NMR Shifts (ppm) mit Integral

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5.59 (1H, m)	97.7, d
3	7.55 (1H, s)	154.3, d
4	-	110.5, s

Position	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
5	3.12 (1H, m)	33.6, d
6	2.44 (1H, m)	29.7, t
	3.11 (1H, m)	
7	6.72 (1H, t, 6.9)	157.0, d
8	5.76 (1H, m)	135.6, d ^{a)}
9	2.79 (1H, m)	45.4, d
10	5.29 (1H, m)	120.4, t
	5.36 (1H, d, 17.0)	
11	-	169.1, s ^{b)}
11-OCH ₃	3.73 (3H, s)	52.0, q ^{c)}
1'	4.69 (1H, d, 8.1)	100.2, d ^{d)}
2'	3.18 (1H, m)	74.7, d ^{e)}
3'	3.35 (1H, m)	77.9, d ^{f)}
4'	3.28 (1H, m)	71.6, d ^{f)}
5'	3.32 (1H, m)	78.4, d ^{h)}
6'	3.67 (1H, m)	62.8, t ⁱ⁾
	3.88 (1H, m)	
1''	5.49 (1H, m)	97.4, d
3''	7.47 (1H, s)	152.1, d
4''	-	109.4, s
5''	4.06 (1H, m)	30.9, d
6''	-	143.3, s
7''	9.22 (1H, s)	197.1, d
8''	5.60 (1H, m)	135.4, d ^{a)}
9''	2.59 (1H, m)	46.5, d
10''	5.02 (1H, m)	119.4, t
	5.07 (1H, d, 17.0)	
11''	-	169.1, s ^{b)}
11''-OCH ₃	3.59 (3H, s)	51.7, q ^{c)}
1'''	4.69 (1H, d, 8.1)	99.7, d ^{d)}
2'''	3.18 (1H, m)	74.7, d ^{e)}
3'''	3.35 (1H, m)	77.9, d ^{f)}
4'''	3.28 (1H, m)	71.5, d ^{g)}
5'''	3.32 (1H, m)	78.3, d ^{h)}
6'''	3.67 (1H, m)	62.6, t ⁱ⁾
	3.88 (1H, m)	

^{a)-i)} nicht unterscheidbar

Für das (*E*)-Aldosecologanin konnte eine intensive Absorptionsbande im gemessenen Absorptionsspektrum bei 236 nm in MeOH/NH₄OAc festgestellt werden.

4.11.1 Strukturaufklärung von CK-Lux13

Das aufgenommene HR-TOF-ESI-MS Spektrum zeigte ein positives Molekülionensignal $[M+H]$ bei m/z 781.2551. Es konnte eine gute Übereinstimmung mit der chemischen Summenformel $C_{34}H_{46}O_{19}Na$ mit einem theoretischen m/z 781.2526 festgestellt werden.

Durch die Analyse der zweidimensionalen NMR-Experimenten wurden zwei Methyl-, fünf Methylen-, 22 Methingruppen und fünf quartäre Kohlenstoffatome gefunden. Die 2D-NMR Daten deuteten wiederum auf Secologanin-Strukturelemente hin, welche dieses Mal als eine Art verknüpftes Dimer vorlagen. Die Verbindung wurde schlussendlich als (*E*)-Aldosecologanin identifiziert. [57]

Die Kopplungsmuster der beiden Secoiridoidglycoside in den HMBC-, COESY- und TOCSY-Spektren ähnelten stark einigen beschriebenen Substanzen (CK-Lux03, CK-Lux07, CK-Lux09) in dieser Arbeit. Manche Kopplungen konnten jedoch aufgrund geringer Signalintensitäten nicht vollständig identifiziert werden, da das CK-Lux13 mit einer weiteren Substanz, welche Megastigman-ähnliche Eigenschaften aufwies (siehe CK-Lux01), verunreinigt war. Trotz allem waren die Integrale dieser Verbindung nicht vollständig und somit konnte als primär vorliegende Substanz das (*E*)-Aldosecologanin bestimmt werden.

Die Positionen der Kohlenstoffe C-6, C-7, C-6'' und C-7'' der Verbindung der beiden Iridoidglycoside ergaben sich aufgrund einiger spezifischer Kopplungen in den 2D-NMR-Experimenten. Anhand der $^3J_{H-H}$ Kopplungen im COSY von H-6a mit H-5 und H-7 konnte der erste Teil dieses Verbindungsstückes beschrieben werden. Der Triplet im 1H -NMR und die chemische Verschiebung von C-7/H-7 wiesen auf eine anschließende Doppelbindung hin. Die $^3J_{H-C}$ Kopplung zwischen dem singulettischen H-7'' des Aldehyds, welcher dazu die typischen 1H - und ^{13}C -Shifts zeigte, und dem quartären C-6 definierten die restlichen Positionen des Bindeglieds. Zusätzlich deutete das im Vergleich zu H-5 höher verschobene H-5' auf eine angrenzende Doppelbindung hin.

Die Unterscheidung zwischen der (*E*)- und (*Z*)-Konfiguration konnte aufgrund bekannter und signifikant verschiedener Shifts in den Positionen 6, 7 und 7'' in der vergleichenden Literatur gelöst werden. Ebenfalls konnten somit die restlichen chiralen Zentren bestimmt werden, welche sich zusätzlich auch durch die biologische Synthese des Secologanin ergaben. [45, 57]

Neben den NMR- und MS-Daten deuteten auch die UV/Vis Ergebnisse auf das (*E*)-Aldosecologanin hin. Das gemessene $UV_{\max}$ bei 236 nm in MeOH/NH₄OAc korrelierte stark mit dem bereits veröffentlichten $UV_{\max}$ bei 236 nm in MeOH. [57]

5 Diskussion

Die Charakterisierung der gefunden Substanzen ergab eine hohe Chemodiversität an verschiedenen Naturstoffen in Form von einfachen Terpenen sowie Secoiridoidglycosiden bis hin zu strukturell komplexeren Alstrostinen. Ein Schema der angenommenen Biosynthesewege ist in Abb.33 erkennbar.

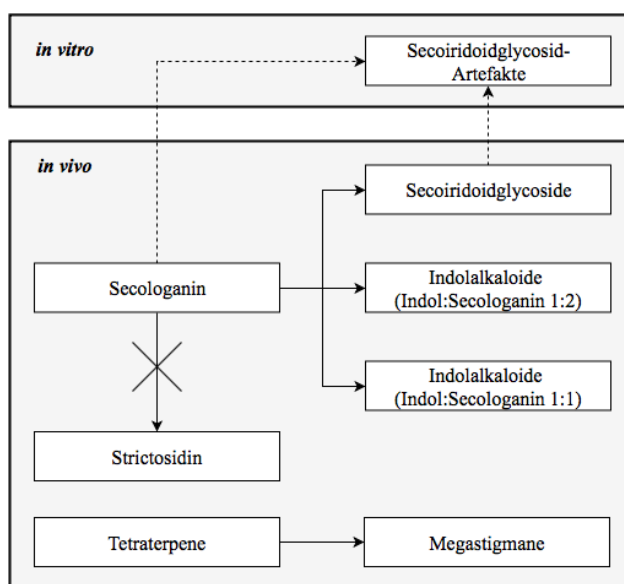


Abbildung 33: Schema möglicher Biosynthesewege in *P. luxurians*.

5.1 Terpene

Das Blumenol C-Sulfat repräsentiert als einziger Naturstoff die Klasse der Megastigmane in dieser Arbeit und hat somit im Gegensatz zu allen anderen Verbindungen kein Secologanin als Basis. Diese Terpene konnten noch nicht in *Palicourea* nachgewiesen werden, jedoch in der verwandten Pflanzengattung *Psychotria*. [24]

Durch die verschiedenen Abbaumöglichkeiten des β -Carotin können diverse Megastigme entstehen, welche auch in Abb.8 zu sehen sind. Diese Vielfalt zeigt sich bei genauerer Betrachtung der Verbindung Blumenol C und dessen Derivate, zu denen nicht nur das Blumenol C-Glucosid sondern auch das isolierte Blumenol C-Sulfat gehört (Abb.34).

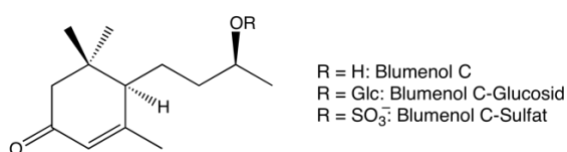


Abbildung 34: Vielfalt des Blumenol C.

Beispielsweise konnten durch die Untersuchung der Pflanzenart *Eucommia ulmoides* alleine vier verschiedene Enantiomerenpaare des Blumenol C isoliert werden. [23] Dies alleine spricht für eine große Bandbreite an verschiedenen Abbaureaktionen der vorhandenen Tetraterpene. Zusätzlich dazu wurde eine O-Glycosid des Blumenol C in den Blättern der Pflanze *Psychotria stachyodis* mit dem Namen Blumenol C-Glucosid gefunden und somit eine weitere Modifikation dieser Verbindung beschrieben. [24] In einer wissenschaftlichen Arbeit über Carotinoid-Abbau wurden glycolysierte Intermediate in Form von Megastigmanen in Weintrauben entdeckt. Dafür soll ein alternativer enzymatischer Abbaumechanismus der Carotinoide verantwortlich sein. Laut Autor (M. Mendes-Pinto et al., 2009) gibt es jedoch wenig Informationen über die enzymatischen Aktivitäten. [21] Unter anderem könnte dies die Entstehung des Blumenol C-Glucosid in *P.stachyodis* erklären. Erwähnenswert ist ebenso, dass glycolysierte Verbindungen in Pflanzen nichts Seltenes sind, was auch die isolierten Secoiridoidglycoside in dieser Arbeit unterstreichen.

Weitaus seltener sind sulfonierte Verbindung, wie das isolierte Blumenol C-Sulfat, welches ein weiteres natürliches Derivat des Blumenol C darstellt. Es ist auszuschließen, dass das isolierte Blumenol C-Sulfat bei der chemischen Aufarbeitung entstanden ist, da weder mit stark oxidierenden noch mit sulfathaltigen Chemikalien gearbeitet wurde. Auch sollte die Pflanze einen natürlichen Zugang zu Sulfationen aus dem Boden haben, welche anschließend im primären Stoffwechsel zu den Aminosäuren Cystein und Methionin umgewandelt werden. Im Sekundärstoffwechsel bestünde somit die Möglichkeit der Bildung verschiedener schwefelhaltiger Biomoleküle.

Es wurden bereits sulfonierte Flavonoide in über 160 verschiedenen Arten beschrieben, wobei anzumerken ist, dass diese fast ausschließlich in der Nähe von aquatischen Lebensräumen gefunden wurden. Ein Grund für die Bildung dieser Flavonoide könnte laut Autor (J. Harbourne et al., 1975) die Ausscheidung von Schadstoffen aufgrund der Erhöhung der Wasserlöslichkeit durch das Sulfation sein, welche eine alternative Ausscheidungsform der weitaus gängigeren Glycosylierung darstellt. [58]

Dies könnte zu einem Teil das Auftreten des Blumenol C-Sulfat als eine Art Entgiftungsprodukt in der untersuchten Pflanze *P. luxurians* oder als freigesetztes Toxin zur Abwehr gegen äußere Einwirkungen, erklären. Die Entstehung des Blumenol C-Sulfat könnte durch einen neuen enzymatischen Abbaumechanismus des β -Carotin erklärbar sein, wobei in einem Zwischenschritt ein Sulfat gebildet wird. Da es das erste natürliche

Megastigman mit einer Sulfatgruppe ist bleiben jedoch viele Fragen über den Grund der Bildung in der Pflanze unbeantwortet und folglich sind weitere Funde dieser Organosulfate für das bessere Verständnis notwendig.

5.2 Secoiridoidglycoside

Die isolierten Secoiridoidglycosid-Verbindungen zeigen, dass die Pflanze *P.luxurians* Secologanin biologisch synthetisiert und daraus verschiedene Monoterpen-Alkaloide im Sekundärstoffwechsel gebildet werden. Durch die große Anzahl an gefunden Secoiridoidglycosiden in dieser Arbeit kann die Annahme gestellt werden, dass sich das Secologanin anreichert und sich die Pflanzenart für den Abbau unkonventioneller Stoffwechselwege bedient. Da im Gegensatz zum primären Stoffwechsel, welcher bei nahezu allen Pflanzen gleich ist, der sekundäre Stoffwechsel sehr vielfältig sein kann und sich im Laufe der Evolution durch Anpassung an die Umwelt individuell verändern haben könnte.

Durch die hohe Reaktivität des Aldehyds des Secologanin können somit zahlreiche Verbindungen entstehen, da das Secologanin nicht nur mit sich selbst sondern auch mit kleinen Verbindungen in der Pflanze reagieren kann. Somit tritt bei den meisten gefunden Secoiridoidglycosiden eine chemische Veränderung der Position 7 oder des Methylesters auf (Abb.35). Eine Modifikation der β -D-Glucose oder der Vinylgruppe konnte nicht nachgewiesen werden.

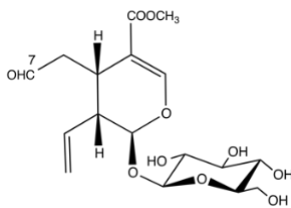


Abbildung 35: Secologanin.

Die wohl dem Secologanin ähnlichsten Verbindungen, welche isoliert werden konnten, sind das Swerosid und die Secologaninsäure. Beide Secoiridoidglycoside sind Beispiele für mögliche intramolekulare Umwandlungen des Secologanin. Die Biosynthese in Abb.36 zeigt sehr gut, dass das vorhandene Secologanin zuerst die semiacetalische Secologaninsäure bildet und danach in einem zweiten Schritt unter Abgabe der Hydroxygruppe zum Swerosid reduziert wird. [59] Anzumerken ist, dass das Swerosid ca. 0.03% der gesamten untersuchten Trockenmasse der Blätter ausmachte und die Secologaninsäure nur in Spuren vorkam. Dies spricht für eine begünstigte Weiterreaktion

zum Lacton und dass diese Form biologisch stabiler zu sein scheint als die Secologaninsäure. Ebenso wurde das Swerosid in der Pflanze *Palicourea rigida* gefunden und ist somit nicht neu in der untersuchten Pflanzengattung. [60] Im Vergleich dazu, wurde die Secologaninsäure bis jetzt noch nicht in *Palicourea* nachgewiesen.

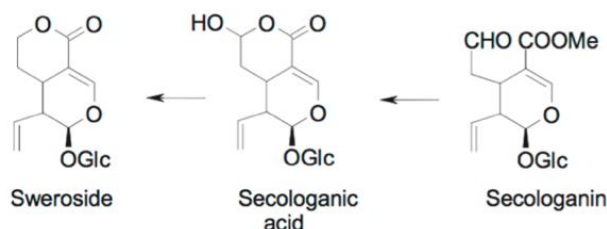


Abbildung 36: Biosynthese von Swerosid aus Secologanin mit der Secologaninsäure als Zwischenprodukt. [59]

Die Kombination aus der sehr reaktiven Aldehydfunktion und der hohen Konzentration an Secologanin lässt das Auftreten eines weiteren Alkaloids erklären. Nämlich dem Secologanin-Dimer (*E*)-Aldosecologanin, welches dazu das größte isolierte Secoiridoidglycosid dieser Arbeit darstellt. Dies könnte durch eine mögliche katalytische Aldolkondensation zweier Secologanine unter Abspaltung von H₂O entstanden sein. Bis dato konnte diese Verbindung noch nicht in der Pflanzenfamilie Rubiaceae nachgewiesen werden.

Das Demethyl-Secologanol stellt ein weiteres Secoiridoidglycosid dar, das bis dato ebenso noch nicht in der Pflanzengattung *Palicourea* gefunden werden konnte. Sowie bei dem zuvor beschriebenen (*E*)-Aldosecologanin besteht die Vermutung, dass es in der Pflanzenzelle aus Secologanin oder einer verwandten Form davon (siehe Abb.36) entstanden ist. Eine mögliche Entstehung könnte durch eine katalytische Ringöffnung der lactonischen Verbindung Swerosid mit H₂O erklärbar sein, da wie zuvor erwähnt, dass Swerosid auch in großen Mengen in *P. luxurians* isoliert wurde. Ebenso sollte H₂O für die Reaktion in der Pflanze verfügbar sein. Dies würde ein Vorkommen dieser Substanz in der Pflanze erklären.

Ebenfalls wurden die isolierten Substanzen Dimethylacetal-Secologanin und Dibutylacetal-Secologanin noch nicht in der Pflanzengattung *Palicourea* nachgewiesen. Bei beiden acetalischen Verbindungen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Artefakte des Secologanin, was die Annahme einer hohen Secologanin-Konzentration in der Pflanze stützt. Diese beiden Secoiridoidglycoside könnten durch saure Katalyse in den für die Aufarbeitung verwendeten Lösungsmitteln MeOH und *n*-BuOH entstanden sein. Der Vergleich der Chromatogramme des Rohextraktes (Abb.9) und des CK-Lux07 (Abb.20)

zeigt gut, dass der Peak bei etwa 14 min im Chromatogramm des Rohextraktes noch nicht sichtbar war und somit erst später während der weiteren Reinigung entstanden sein muss. Weiters wurde das Dibutylacetal-Secologanin ebenso in *Lonicera japonica* gefunden und in dieser wissenschaftlichen Arbeit als Artefakt des Secologanin postuliert. Unter anderem wurde auch das Dimethylacetal-Secologanin in derselben Pflanze gefunden und als natürlich vorkommend beschrieben. Auch wurde in beiden erwähnten Publikation (L. Tomassini et.al., 1995; H. Kawai et.al, 1988) mit MeOH gearbeitet, sowie in dieser Arbeit, was eine *in situ* Acetal-Bildung des Dimethylacetal-Secologanin nicht ausschließen lässt. [53, 46]

5.3 Indolalkaloide (Indol:Secologanin 1:1)

Das Indolalkaloid 5 α -Carboxystrictosidin wirkt auf dem ersten Blick nicht ungewöhnlich, jedoch spielt dieser Fund in Kombination mit den ebenfalls entdeckten Alstroinen eine zentrale Rolle in dieser Arbeit. Die Verbindung gibt einen Einblick über die Stoffwechselwege von *P.luxurians* und daraus lässt sich ableiten, dass die STS-Synthase, welche normalerweise ein wichtiges Enzym in der Indolbiosynthese darstellt, inaktiviert oder modifiziert zu sein scheint, da sonst Strictosidin gefunden werden würde.

Dies hätte zur Folge, dass entweder das L-Tryptophan als Precursor von einer modifizierten Strictosidinsynthase enzymatisch zum 5 α -Carboxystrictosidin umgewandelt wird oder wie üblich Strictosidin gebildet wird, welches anschließend carboxyliert wird. Durchaus interessant ist jedoch, dass in dieser Arbeit weder Strictosidin noch andere Strictosidin-Derivate isoliert werden konnten, was für eine Inaktivierung der eigentlichen STS-Synthase spricht. In einer vergleichbaren wissenschaftlichen Arbeit über diverse *Palicourea*-Arten wurden jedoch sowohl 5 α -Carboxystrictosidin sowie Strictosidin und dessen Derivate gefunden. Der Autor (A. Berger et al., 2017) schließt unter anderem das L-Tryptophan als möglichen Precursor für das 5 α -Carboxystrictosidin nicht aus. [9] Erwähnenswert ist ebenso, dass die STS-Synthase nur primäre Amine für die Pictet-Spengler Reaktion akzeptiert und dadurch als Substrat das L-Tryptophan nicht komplett ausschließbar ist. [61] Eine Studie über die Substratspezifität der STS-Synthase in *Palicourea* gibt es jedoch noch nicht.

Somit bleibt die Frage der eigentlichen Biosynthese des 5 α -Carboxystrictosidin offen und für die vollständige Beantwortung sind weitere Untersuchungen der Pflanzengattung *Palicourea* notwendig.

5.4 Indolalkaloide (Indol:Secologanin 1:2)

Die beiden Monoterpen-Alkaloide Palicouresid und Dehydro-Rudgeifolin konnten in dieser Arbeit erstmals gefunden und charakterisiert werden. Strukturell ähnliche Indolalkaloide wurden bis jetzt nur zweimal in der Literatur beschrieben und zwar in den Pflanzen *Alstonia rostrata* sowie in der Pflanzenfamilie Rubiaceae in den Arten *Chassalia curviflora* und *Rudgea cornifolia*. [18, 44] Somit ist die *Palicourea luxurians* nun die vierte Pflanze in der diese Alstrostine überhaupt nachweisbar waren.

Über die Biosynthese und biologische Aktivität dieser Stoffe ist sehr wenig bekannt. Eine schematische Darstellung der Synthese für das bekannte Alstrostin A ist in Abb.6 zu sehen, welche im Jahr 2011 von einer Arbeitsgruppe aus China ähnlich postuliert wurde. Laut Publikation (X.Cai et al., 2011), greifen beide sekundäre Amine je einen Aldehyd des Secologanin an, wobei zusätzlich durch den Angriff des Aldehyds (C-3) mit der Methylengruppe (C-14') der *N,N*-Heterozyklus geformt wird (Abb.37). [18] Die Synthese des Palicouresids sollte ähnlich, jedoch umgekehrt ablaufen und somit der Ring durch die Reaktion von C-3' mit C-14 gebildet werden. Von dem strukturell ähnlichen Rudgeifolin gibt es noch keine beschriebene Biosynthese, jedoch könnte dieses enzymatisch durch den Einbau eines Säurederivates des Secologanin entstehen oder eine nachfolgende Demethylase demethyliert den Methylester des Secologanin als eine Art Abbaureaktion. Bei dem isolierten Dehydro-Rudgeifolin könnte es sich um ein enzymatisches Abbauprodukt des Rudgeifolin oder des Alstrostin A handeln. In Abb.37 sind die bekannten Alstrostine gegenübergestellt.

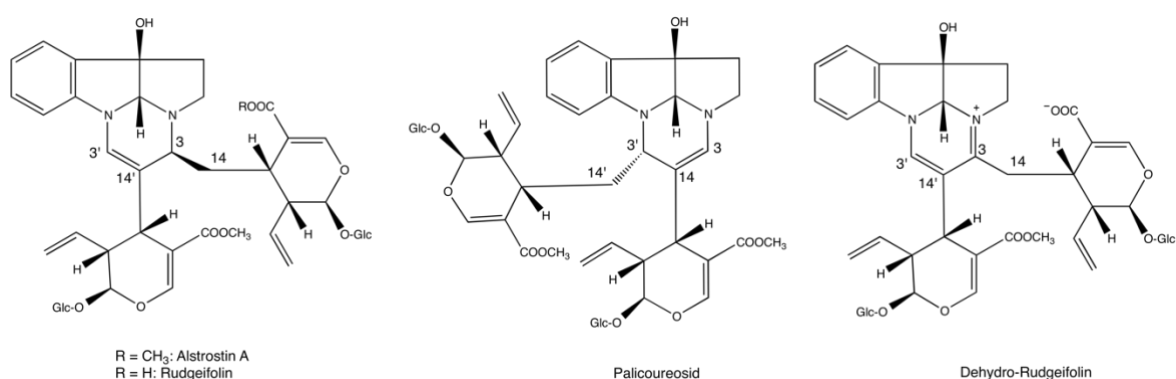


Abbildung 37: Bekannte Alstrostine.

Da für die biologische Synthese zwei Secologanin und eine Tryptamin benötigt werden, untermauern diese Strukturen abermals die Annahme, dass sich eine große Menge an verfügbaren Secologanin in dieser Pflanze befinden muss. Wobei anscheinend ein hoher

Anteil des Secoiridoids für diese enzymatische Synthese verwendet wird, da von der Substanz Palicouresid eine Menge von 33.8 mg, bei einer gesamten Trockenmasse von 113.5 g, isoliert wurde. Ebenfalls wird für diese biologische Synthese das Tryptamin, welches aus dem L-Tryptophan generiert wird, benötigt und somit kann, wie in Kapitel 5.3 erwähnt, eine Aktivität der STS-Synthase in der *P.luxurians* angezweifelt werden, da sonst bei ausreichender Tryptamin-Konzentration Strictosidin gebildet werden würde. Somit bedient sich auch die Pflanze im Fall der Alstroline einen alternativen Stoffwechselweg um die vorhandenen Biomoleküle abbauen zu können, da die Bildung von Strictosidin nicht möglich zu sein scheint.

Weitere wissenschaftliche Studien über die enzymatische Bildung der Alstroline sind jedoch von Nöten um diese neue Form der Tryptamin-Iridoid-Alkaloide besser verstehen zu können.

6 Zusammenfassung

Die Arbeit hat gezeigt, dass mit den angewandten Methoden eine Gesamtanzahl von zehn verschiedenen Sekundärmetaboliten aus den Blättern der bis jetzt noch nicht untersuchten Pflanze *Palicourea luxurians* isoliert werden konnte (Abb.38).

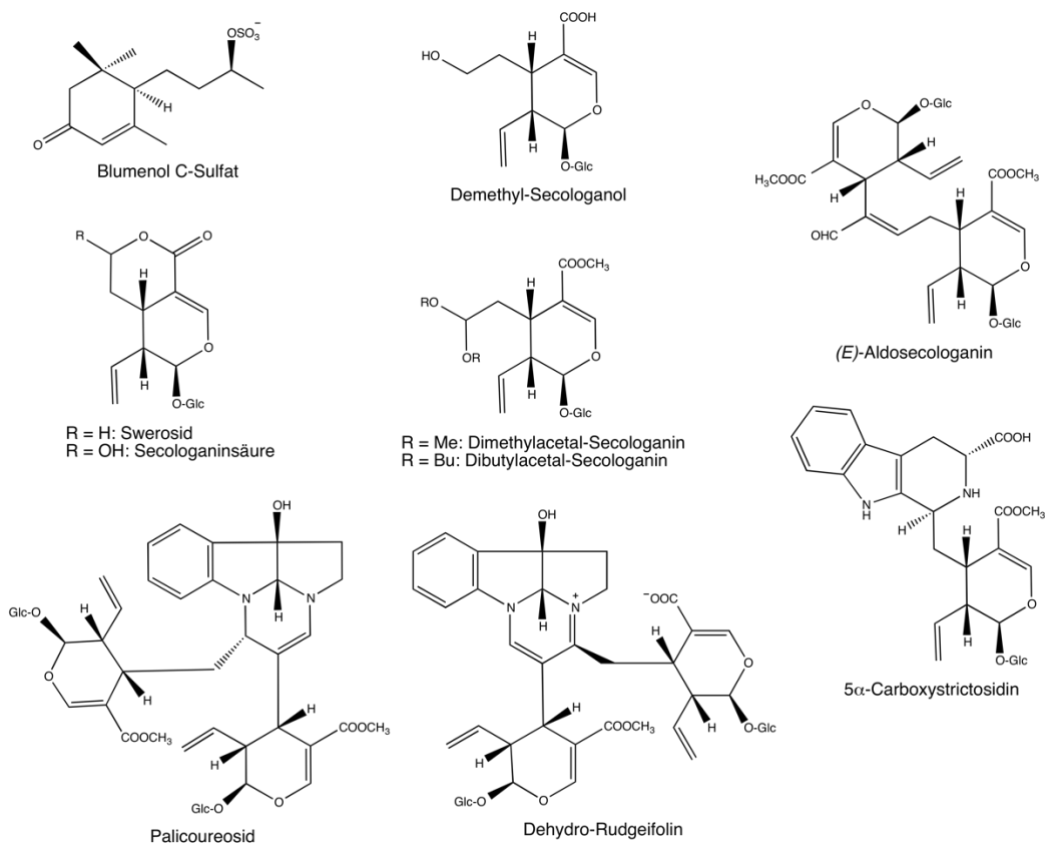


Abbildung 38: Übersicht der Verbindungen.

Dafür wurden verschiedene Extrakte erstellt und diese daraufhin mit mehreren chromatographischen Methoden erfolgreich weiter gereinigt. Hauptsächlich wurde Säulenchromatographie mit diversen mobilen und stationären Phasen für die Trennung eingesetzt. Die Qualität der getrennten Substanzen wurde mit TLC und HPLC überprüft. Für die Strukturaufklärung wurden 1D- und 2D-NMR, Massen-, Infrarot- sowie UV/Vis-Spektroskopie genutzt.

Unter anderem konnte ein neues Terpen namens Blumenol C-Sulfat isoliert werden, bei dem es sich um ein Carotinoid-Abbauprodukt handelt. Dies ist das erste natürlich vorkommende Megastigman mit einem Sulfat als funktionelle Gruppe und eröffnet somit einen neuen Abbauweg für Tetraterpene in Pflanzen.

Weiters konnten sechs Secoiridoidglycoside identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die *in vivo* synthetisierten Verbindungen Demethyl-Secologanol, Swerosid, (E)-Aldosecologanin und der Secologaninsäure sowie den beiden chemisch induzierten Artefakten Dimethyl- und Dibutylacetal-Secologanin.

Zusätzlich dazu konnten verschiedene Indolalkaloide charakterisiert werden, wie das bereits bekannte 5 α -Carboxystrictosidin. Dieses stellt das einzige Indol-Monoterpen-Alkaloid mit einem Verhältnis von 1:1 Indol:Secologanin in dieser Arbeit dar, welches möglicherweise nicht direkt vom Strictosidin abstammt. Des Weiteren konnten die Strukturen von zwei weiteren Tryptamin-Iridoid-Alkaloiden aufgeklärt werden, die der Klasse der erst kürzlich entdeckten Alstroline zuzuordnen sind. Die beiden neuen Naturstoffe wurden Palicoureosid und Dehydro-Rudgeifolin genannt. Für die Biosynthese werden zwei Secologanine benötigt und somit deuten diese beiden Alstroline ebenso wie die zuvor erwähnten Secoiridoidglycoside auf eine hohe Verfügbarkeit an Secologanin in *P.luxurians* hin. Hinzuzufügen ist, dass für die Biosynthese kein Strictosidin benötigt wird und das Strictosidin selbst bzw. Derivate davon in dieser Masterarbeit nicht charakterisiert werden konnten. Dies könnte für eine mögliche modifizierte oder inaktivierte Strictosidin-Synthase sprechen.

Zu guter Letzt lässt sich sagen, dass eine hohe Anzahl sowie eine große Diversität an verschiedenen Naturstoffen in der Pflanze *P.luxurians* spektroskopisch identifiziert werden konnte. Der Großteil der gefunden Naturstoffe reiht sich gut in die Gattung *Palicourea* ein und durch die Entdeckung neuer Verbindungen wurde ein Einblick in weitere unbekannte biologische Synthesewege der Pflanzengattung ermöglicht.

7 Abstract

The investigation of the leaves of the unknown neotropical plant *Palicourea luxurians* led to the purification and identification of ten different secondary metabolites (Abb.38).

Therefore, different extracts were made and afterwards purified with several chromatographic techniques. Mainly column chromatography with several mobile and stationary phases was used for the separation. The quality of the samples was analyzed with TLC and the in-depth measurements were done with HPLC coupled to a UV/Vis detector. For the structure elucidation the purified substances were investigated with 1D/2D-NMR and mass spectrometry. Additionally, UV/Vis- and infrared spectroscopy were performed for the verification.

One new terpenoid was isolated and is called blumenol C sulfate, which is the first described megastigmane with an attached sulfate group. It's the only carotenoid degradation product in this work, all other compounds are secologanin derived.

Furthermore, four known natural occurring secoiridoid glycosides named (*E*)-aldosecolganin, demethylsecologanol, sweroside as well as secolocanic acid were found. In addition, two *in vitro* formed artefacts of the secologanin named secologanin dibutylacetal and secologanin dimethylacetal were isolated.

Additionally, more complex natural products like the monoterpene indol alkaloid 5 α -carboxystrictosidine were characterized. It is the only isolated 1:1 indol:secologanin compound in this thesis. However, no strictosidine as well as other derivatives of it could be identified. This indicates a possible modified or inactive strictosidine synthase in *P.luxurians*. Further on, the two isolated alstroines underline this assumption, because of the lack of strictosidine in their biosynthesis. They two new tryptamine iridoid alkaloids are named palicoureoside and dehydro-rudgeifoline. Taking also the isolated secoiridoid glycosides into account these alstroines suggest a secologanin rich system in the plant, because two secologanin molecules are needed for their biosynthesis.

Overall a large number and great chemodiversity of secondary metabolites was identified in this thesis. Those are in good agreement with other known natural products in the genus *Palicourea*. They also indicate several possible biosynthetic pathways in the plant *P.luxurians*.

8 Literaturverzeichnis

- [1] B. Bremer, 2009. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96 (1), 4-26.
- [2] N. P. Smith, 2004. *Flowering Plants of the Neotropics* (1.Auflage). Princeton: Princeton University Press.
- [3] G. Rimbach, 2015. *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger* (2.Auflage). Berlin: Springer Spektrum.
- [4] P. Jean Marie, 2005. *Die Geheimnisse der Heilpflanzen* (1.Auflage). München: Knesebeck.
- [5] C. W. Hamilton, 1989. A revision of mesoamerican *Psychotria* Subgenus *Psychotria* (Rubiaceae), Part I: Introduction and species 1-16. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79 (1) 167-111.
- [6] C. M. Taylor, 1997. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84 (2), 224-262.
- [7] J. Valverde, 1999. β -Carboline monoterpenoid glucosides from *Palicourea adusta*, *Phytochemistry* 52, 1485–1489.
- [8] A. Berger, 2012. Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminata* (= *Psychotria acuminata*, Rubiaceae). *Phytochemistry Letters* 5, 558-562.
- [9] A. Berger, 2017. Chemodiversity of tryptamine-derived alkaloids in six Costa Rican *Palicourea* species (Rubiaceae-Palicoureeae). *Phytochemistry* 143, 124-131.
- [10] V. C. da Silva, 2008. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae), *Journal of Natural Medicines* 62, 356-357.
- [11] Regenwald der Österreicher. <https://www.regenwald.at/>, 6.5.2018.
- [12] L. Tietze, 1983. Secologanin, eine biogenetische Schlüsselverbindung - Synthese und Biogenese der Iridoid- und Secoiridoidglykoside. *Angewandte Chemie* 95 (11), 840-853.

- [13] M. Rohmer, 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* 16 (5), 565-774.
- [14] S. E. O'Connor, 2006. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Products Report* 23 (4), 532-547.
- [15] F. S. D'Amelio, 1998. *Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference* (1.Auflage). Washington: CRC Press.
- [16] R. Hänsel, 2010. *Pharmakognosie - Phytopharmazie* (9.Auflage). Heidelberg: Springer.
- [17] A. Pictet, 1911. In Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 44 (3), 2030-2036.
- [18] X.-H. Cai, 2011. A new type of monoterpene indole alkaloid precursor from *Alstonia rostrata*. *Organic Letters* 13 (14), 3568-3571.
- [19] G. Armstrong, 1996. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB Journal* 10 (2), 228-237.
- [20] E. Breitmaier, 2012. *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone* (2.Auflage), Tübingen: Wiley-VCH.
- [21] M. M. Mendes-Pinto, 2009. Carotenoid breakdown products the norisoprenoids in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 438, 236-245.
- [22] N. O. Calixto, 2016. The genus *Psychotria*: Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and biological properties. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27 (8), 1355-1378.
- [23] J. Yan, 2017. Nine pairs of megastigmane enantiomers from the leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Journal of Natural Medicines*, 71 (4), 780-790.
- [24] A. T. A. Pimenta, 2011. Alkaloid and other chemical constituents from *Psychotria stachyoides* Benth.. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22 (11), 2216-2219.
- [25] E. Stahl, 1986. *Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen* (1.Auflage).

Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

- [26] E. Breitmaier, 2008. Alkaloide (3.Auflage). Wiesbaden: Vieweg + Teubner.
- [27] G. Otterstätter, 2007. Färbung von Lebensmitteln, Arzneimitteln, Kosmetika (3.Auflage). Hamburg: Behr's Verlag.
- [28] H. R. Horton, 2008. Biochemie (4. Auflage). München: Pearson Studium.
- [29] M. H. Gey, 2017. Instrumentelles und bioanalytisches Praktikum (3.Auflage). Berlin: Springer Spektrum.
- [30] M. H. Gey, 2015. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik (3.Auflage). Berlin: Springer Spektrum.
- [31] K. Hostettmann, 2000. Medium-Pressure Liquid Chromatography. Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science 1, 3296-3303.
- [32] R. Axén, 1966. Chemical coupling of enzymes to cross-linked dextran ('Sephadex'). Nature 141, 367-369.
- [33] B. Spangenberg, 2014. Quantitative Dünnschichtchromatographie (1.Auflage). Berlin: Springer Spektrum.
- [34] H. Perkampus, 1986. UV-Vis-Spektroskopie und ihre Anwendungen. Berlin: Springer.
- [35] H. Günther, 1992. NMR-Spektroskopie (3.Auflage). Stuttgart: Georg Thieme.
- [36] H. Friebolin, 2006. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, eine Einführung (4.Auflage). Weinheim: Wiley-VCH.
- [37] H. Budzikiewicz, 2005. Massenspektrometrie, eine Einführung (4.Auflage). Weinheim: Wiley-VCH.
- [38] H. Günzler, 2003. IR-Spektroskopie: Eine Einführung (4.Auflage). Weinheim: Wiley-VCH.
- [39] V. Schütz, 1997. CSEARCH-STEREO: A new generation of NMR database systems allowing three-dimensional spectrum prediction. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 359 (1), 33-41.

- [40] E. Pretsch, 2010. Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen (5. Auflage). Heidelberg: Springer.
- [41] D. Lin-Vien, 1991. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules (1.Auflage). Boston: Academic Press, Inc..
- [42] B. Boss, 1991. HPLC-ESI-MS/MS analysis of sulfated flavor compounds in plants. *Phytochemistry* 50, 219-225.
- [43] M. Galbraith, 1972. Structures of the natural products blumenols A, B, and C. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 3, 113-114.
- [44] J. Schinnerl, 2012. Alstroines in Rubiaceae: Alstroine A from *Chassalia curviflora* var. *ophioxyloides* and a novel derivative, rudgeifoline from *Rudgea cornifolia*. *Phytochemistry Letters* 5, 586-590.
- [45] Á. Patthy-Lukáts, 1997. First direct and detailed stereochemical analysis of strictosidine. *Journal of Natural Products*, 60, 69-75.
- [46] H. Kawai, 1988. Iridoid glucosides from *Lonicera japonica* THUNB. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 36 (9), 3664-3666.
- [47] K. Nakanishi, 1974. *Natural Products Chemistry* (1.Auflage). New York: Academic Press, Inc.
- [48] J. P. Chapelle, 1976. Vogeloside and secologanic acid, secoiridoidglucosides from *Anthocleista vogelii*. *Planta Medica* 29, 268-274.
- [49] M.-C. Recio-Iglesias, 1992. Xanthones and secoiridoid glucosides of *Halenia campanulata*. *Phytochemistry* 31 (4), 1387-1389.
- [50] K. De Silva, 1971. 5 α -Carboxystrictosidin. *Journal of the Chemical Society*, 908-909.
- [51] F. Ferrari, 1986. Constituents of *Guettarda platypoda*. *Journal of Natural Products* 49 (6), 1150-1151.
- [52] R. A. Costa, 2016. Structural, vibrational, and electronic properties of the glucoalkaloid strictosidine: A combined experimental and theoretical study. *Journal of Chemistry* 9 (16), 16 pages.
- [53] L. Tomassini, 1995. Isolation of secoiridoid artifacts from *Lonicera japonica*. *Journal*

- of Natural Products 58 (11), 1756-1758.
- [54] M. Kitajima, 2005. Camptothecins and two new monoterpene glucosides from *Ophiorrhiza liukuensis*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin 53 (10), 1355-1358.
- [55] H. Inouye, 1966. Structure of sweroside, a new glucoside from *Swertia japonica*. Tetrahedron Letters 43, 5229-5234.
- [56] T. Gruber, 2015. Diplomarbeit: Vergleichende phytochemische Untersuchungen an ausgewählten Arten der Gattung *Psychotria* (Rubiaceae). Universität Wien.
- [57] K. Machida, 2002. Studies on the constituents of *Lonicera* species. XVII. 1) New iridoid glycosides of the stems and leaves of *Lonicera japonica* THUNB. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 50 (8), 1041-1044.
- [58] J. B. Harbourne, 1975. Flavonoid sulphates: A new class of sulphur compounds in higher plants. Phytochemistry 14, 1147-1155.
- [59] C. Gousiadou, 2016. Iridoids in Hydrangeaceae. Biochemical Systematics and Ecology 64, 122-130.
- [60] V. G. Alves, 2016. Acute toxicity, antiedematogenic activity, and chemical constituents of *Palicourea rigida* Kunth. Journal of Biosciences 71 (3-4), 39-43.
- [61] E. McCoy, 2006. Substrate specificity of strictosidine synthase. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 16 (9), 2475-2478.