

**ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND
STEREOCHEMISCHE ANALYSE VON
NAPHTHYLISOCHINOLIN-ALKALOIDEN UND
ANDEREN NATURSTOFFEN**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG**

**vorgelegt von
Michael Dreyer
aus
Göttingen**

Würzburg 2004

Eingereicht am: _____

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

der Dissertation

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2001 bis September 2004
am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt

Herrn Prof. Dr. G. Bringmann danke ich für
die hervorragende Unterstützung dieser Arbeit,
die freundliche Atmosphäre
und die exzellenten Arbeitsbedingungen

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand von
Publikationen^[53,61,72,96,98,100,105-107,123,140,159] sowie von Postern und Vorträgen

Für Claudia

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL.....	1
1 Einleitung	1
2 Online- versus offline-Analytik in der Naturstoffchemie, eine Einschätzung.....	6
3 Isolierung der Inhaltsstoffe aus Blättern von <i>Ancistrocladus heyneanus</i> Wall. (Ancistrocladaceae).....	9
3.1 Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe aus <i>A. heyneanus</i>	9
3.2 Online-Analyse des Blattextrakts mittels HPLC-MS, HPLC-NMR und HPLC-CD.....	10
3.3 Isolierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinolin-Alkaloide	12
3.3.1 Extraktion und Aufreinigung	12
3.3.2 Strukturaufklärung von Ancistrotanzanin C (10).....	13
3.3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von 10	13
3.3.2.2 Die absolute Konfiguration von Ancistrotanzanin C (10)	14
3.3.3 Strukturaufklärung von Ancistroheynin B (11)	16
3.3.3.1 Spektroskopische Charakterisierung von 11	16
3.3.3.2 Die absolute Konfiguration von Ancistroheynin B (11).....	17
3.3.4 Isolierung und Identifizierung von Ancistrocladidin (4)	18
3.4 Testung auf biologische Aktivität	18
4 Isolierung der Naphthylisochinolin-Alkaloide aus Blättern von <i>Ancistrocladus tanzaniensis</i> Cheek & Frimodt-Møller (Ancistrocladaceae).....	20
4.1 <i>Ancistrocladus tanzaniensis</i> Cheek & Frimodt-Møller.....	20
4.2 Isolierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinolin-Alkaloide	21
4.2.1 Extraktion und Aufreinigung	21

4.2.2	Strukturaufklärung von <i>O,N</i> -Dimethylancistrocladin (14).....	22
4.2.2.1	Spektroskopische Charakterisierung von 14	22
4.2.2.2	Die absolute Konfiguration von <i>O,N</i> -Dimethylancistrocladin (14).....	23
4.2.3	Isolierung und Identifizierung von Ancistrotanzanin C (10).....	24
4.2.4	Identifizierung von Ancistrotanzanin B (15).....	25
4.2.5	Isolierung von Ancistrotectorin (9).....	25
4.2.6	Identifizierung von Ancistrocladidin (4).....	26
4.2.7	Strukturaufklärung von Ancistrotanzanin A (16).....	26
4.2.7.1	Spektroskopische Charakterisierung von 16	26
4.2.7.2	Die absolute Konfiguration von Ancistrotanzanin A (16).....	28
4.3	Bioaktivität der Alkaloide.....	30
4.4	Chemotaxonomische Betrachtung.....	32
5	Isolierung der Naphthylisochinolin-Alkaloide aus <i>Ancistrocladus benomensis</i>	
	Rischer & Bringmann (Ancistrocladaceae).....	34
5.1	<i>Ancistrocladus benomensis</i> Rischer & Bringmann.....	34
5.2	Isolierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinolin-Alkaloide aus der Rinde von <i>Ancistrocladus benomensis</i>	35
5.2.1	Extraktion und Aufreinigung.....	35
5.2.2	Strukturaufklärung von Ancistrobenomin A (20).....	35
5.2.2.1	Spektroskopische Charakterisierung von 20	35
5.2.2.2	Die absolute Konfiguration von Ancistrobenomin A (20).....	38
5.2.3	Strukturaufklärung von 6- <i>O</i> -Demethylancistrobenomin A (21).....	39
5.2.3.1	Spektroskopische Charakterisierung von 21	39
5.2.3.2	Die absolute Konfiguration von 6- <i>O</i> -Demethylancistrobenomin A (21).....	41
5.2.4	Strukturaufklärung von 5'- <i>O</i> -Demethylancistroclin (22).....	41
5.2.4.1	Spektroskopische Charakterisierung von 22	41
5.2.4.2	Die absolute Konfiguration von 5'- <i>O</i> -Demethylancistroclin (22).....	43
5.2.5	Testung der Alkaloide auf ihre biologische Aktivität.....	44

5.3	Isolierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinolin-Alkaloide aus den Blättern von <i>Ancistrocladus benomensis</i>	45
5.3.1	Extraktion und Aufreinigung	45
5.3.2	Strukturaufklärung von <i>ent</i> -Dioncophyllein A (29a).....	46
5.3.2.1	Spektroskopische Charakterisierung von 29a	46
5.3.2.2	Die absolute Konfiguration von 29a	48
5.3.3	Strukturaufklärung von Dioncophyllein D (30).....	49
5.3.3.1	Spektroskopische Charakterisierung von 30	49
5.3.3.2	Die absolute Konfiguration von Dioncophyllein D (30).....	52
5.3.4	Strukturaufklärung von 5'- <i>O</i> -Demethyl- <i>ent</i> -dioncophyllein A (31).....	52
5.3.4.1	Spektroskopische Charakterisierung von 31	52
5.3.4.2	Die absolute Konfiguration von 5'- <i>O</i> -Demethyl- <i>ent</i> -dioncophyllein A (31).....	53
5.3.5	Strukturaufklärung der beiden Atrop-Diastereomere von Ancistrocladinium B (32a/b).....	54
5.3.5.1	Spektroskopische Charakterisierung von 32a/b	54
5.3.5.2	Die absolute Konfiguration von 32a/b	54
5.3.6	Testung der isolierten Verbindungen auf Bioaktivität.....	56
5.4	Chemotaxonomische Einordnung.....	57
6	Etablierung neuer Methoden in der NIQ-Analytik.....	58
6.1	Einsatz von Kapillarelektrophorese (CE) und CE/MS zur Analyse eines Wurzelrindenextraktes von <i>Ancistrocladus mudogo</i>	58
6.2	Einführung neuer basenstabiler stationärer HPLC-Phasen zur Analyse und Isolierung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus der Wurzelrinde von <i>A. mudogo</i>	61
7	Untersuchungen von Naturstoffen anderer Substanzklassen mit stereochemischen Problemstellungen.....	63
7.1	Etablierung einer Enantiomeren-Analytik für Isoplagiochin C (45) und D (46).....	64

7.2	Bestimmung der absoluten Achsenkonfiguration von Saludimerin A (47) und B (48)	67
7.3	Bestimmung der absoluten Konfiguration der B ₁ -Phytosterane I (52) und II (53).	70
8	Zusammenfassung	73
9	Summary	79
	EXPERIMENTELLER TEIL	85
1	Allgemeine Methoden.....	85
1.1	Verwendete Messgeräte und Apparaturen	85
1.2	Chromatographische Methoden	87
2	Untersuchung der Blätter von <i>Ancistrocladus heyneanus</i> Wall.	90
2.1	Isolierung der Naphthylisochinolin-Alkaloide.....	90
2.2	Ancistrotanzanin C (10)	90
2.3	Ancistroheynin B (11).....	92
2.4	Ancistrocladidin (4)	93
3	Untersuchung der Blättern von <i>Ancistrocladus tanzaniensis</i> Cheek & Frimodt-Møller	94
3.1	Isolierung der Inhaltsstoffe	94
3.2	<i>O,N</i> -Dimethylancistrocladin (14).....	94
3.3	Ancistrotanzanin C (10)	96
3.4	Ancistrotanzanin B (15)	96
3.5	Ancistrosectorin (9)	97

3.6	Ancistrocladidin (4)	97
3.7	Ancistrotanzanin A (16)	98
4	Untersuchung von <i>Ancistrocladus benomensis</i>.....	100
4.1	Isolierung der Alkaloide aus der Rinde.....	100
4.1.1	Ancistrobenomin A (20)	100
4.1.2	6- <i>O</i> -Demethylancistrobenomin A (21)	102
4.1.3	5'- <i>O</i> -Demethylancistroclin (22)	103
4.2	Isolierung der Naturstoffe aus den Blättern	104
4.2.1	<i>ent</i> -Dioncophyllein A (29a)	105
4.2.1.1	Herstellung eines Racemats von Dioncophyllein A (29b).....	106
4.2.2	Dioncophyllein D (30)	106
4.2.3	5'- <i>O</i> -Demethyl- <i>ent</i> -dioncophyllein A (31).....	107
4.2.4	Ancistrocladinium B (32).....	109
5	Neue Methoden in der NIQ-Analytik	110
5.1	CE und CE/MS-Analyse eines Wurzelrindenextraktes von <i>Ancistrocladus mudogo</i>	110
5.2	Waters XTerra®, eine neue basenstabile RP18-HPLC-Säule	110
6	Untersuchungen von Naturstoffen anderer Substanzklassen mit stereochemischen Problemstellungen.....	111
6.1	Untersuchung von Isoplagiochin C (45) und D (46).....	111
6.2	Untersuchung von Saludimerin A (47) und B (48).....	111
6.3	Untersuchung von B ₁ -Phytoprostan I (52) und II (53).....	112
	LITERATUR UND ANMERKUNGEN.....	113

ALLGEMEINER TEIL

1 Einleitung

Die Behandlung von Erkrankungen mit biogenen Arzneimitteln, besonders mit Pflanzen, ist die älteste Methode der Therapie.^[1] Schon unsere frühen Vorfahren beobachteten bei der Erprobung der Genießbarkeit von Pflanzen oder beim Bedecken von Wunden mit Blättern oder Blattbrei auffallende Wirkungen, z.B. abführende, anthelminthische (gegen Würmer wirksame) oder die Wundheilung fördernde Effekte, die sie zur Behandlung von Erkrankungen nutzen lernten. Eine Konservierung der erforderlichen Pflanzenteile für permanente Verfügbarkeit zu Behandlungszwecken wurde durch Trocknung erreicht.^[2] Später wurde durch Heilkundige, z.B. Medizinmänner, bei den Kulturvölkern durch Ärzte, gezielt nach Arzneipflanzen gesucht. Der griechische Arzt Pedanius Dioskurides verfasste im ersten Jahrhundert nach Christus als erster eine Arzneimittellehre in fünf Büchern, die Heilmittel aus der Natur umfasste und für nahezu eineinhalb Jahrtausende das maßgebende Buch der Pharmakologie und die wichtigste Quelle über die Drogenkunde im Altertum war.^[3] Auf derartigen Erkenntnissen basiert die Disziplin der Ethnobotanik, die bis heute einen wichtigen Beitrag zur Auswahl von Pflanzen liefert, um diese auf ihre Wirkstoffe hin zu untersuchen.^[4]

Die Begründung der chemischen Heilkunst (Iatrochemie) von Paracelsus (1493-1541) mit seiner Forderung, die Wirkstoffe von Arzneipflanzen zu isolieren, führte zu einer Intensivierung der schon früheren Bemühungen, das wirksame Prinzip aus der Droge zu extrahieren und anzureichern. Vor allem die Destillierkunst wurde in den Dienst der Stoffisolierung gestellt. Viele flüchtige Stoffe und Stoffgemische, z.B. ätherische Öle, Bernsteinsäure, Benzoesäure, Kampfer und Thymol wurden erhalten.

Die Isolierung von reinen nicht flüchtigen Wirkstoffen aus Drogen gelang allerdings erst zu Beginn des 19. Jahrhunderts mit der fortschreitenden Entwicklung der Chemie. Einen entscheidenden Durchbruch brachte im Jahr 1806 die Gewinnung des Morphins aus Opium durch den Apotheker Sertürner (1783-1841).^[5]

Standen früher nur solche Methoden der Stofftrennung zur Verfügung, bei denen man die Unterschiede der Stoffe in der Flüchtigkeit, der Löslichkeit und der chemischen Reaktivität nutzen konnte, werden seit der Mitte unseres Jahrhunderts besonders chromatographische Verfahren angewendet.^[6,7] Sie basieren auf der Verteilung zwischen einer mobilen und einer stationären oder gasförmigen Phase, auf der Adsorption und dem Ionenaustausch. Die Säulenchromatographie, durchgeführt mit flüssiger mobiler Phase (Flüssigchromatographie), besonders die mit hohen Drücken betriebene präparative HPLC (High Performance Liquid Chromatography), erlaubt eine schnelle und effiziente Trennung und liefert in der Regel für die Strukturaufklärung und pharmakologische Testung ausreichende Mengen an

Reinsubstanzen. Die Verteilung zwischen nicht mischbaren Flüssigkeiten wird bei der modernen Centrifugal Partition Chromatography (z.B. FCPC, Fast Centrifugal Partition Chromatography) genutzt.

Eine ebenso rasante Entwicklung zeigten die Methoden der Strukturaufklärung. Diese erfolgte bis vor ca. 90 Jahren zunächst nur mit chemischen Methoden, d.h. durch Elementaranalyse, durch Untersuchung des chemischen Verhaltens zur Ermittlung der funktionellen Gruppen und durch partiellen Abbau zu bereits bekannten Verbindungen. Anschließend wurde oft eine Strukturabsicherung mit Hilfe der Synthese durchgeführt. Diese Art der Strukturaufklärung war sehr zeitaufwendig. Häufig lag zwischen der Isolierung des Wirkstoffes und der Strukturaufklärung mehr als ein halbes Jahrhundert. Digitoxin wurde 1869 von Nativelle isoliert.^[1] Erst 1945, nach fast 80jähriger Forschungsarbeit, lag die Formel des Digitoxins komplett vor (siehe Abb. 1).

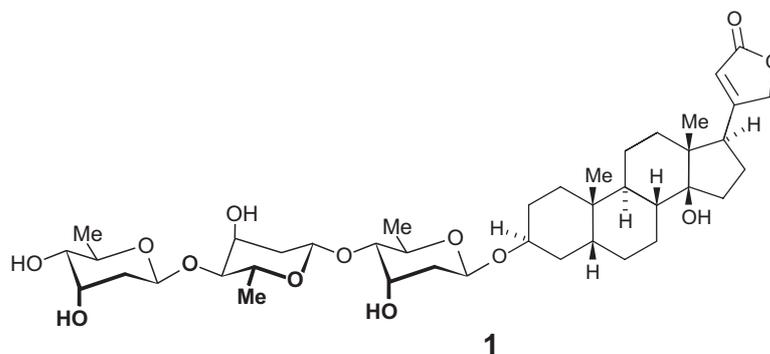


Abb. 1. Vollständige Stereostruktur von Digitoxin (1).

Erst die Nutzung physikalischer Verfahren in der analytischen Chemie führte im 20. Jahrhundert zu einer enormen Weiterentwicklung des methodischen Repertoires zur Strukturaufklärung. Die Entwicklung und Anwendung der Ultraviolett- (ab 1911), Infrarot- (ab 1939), Circular dichroismus- (ab 1960) und Kernresonanzspektroskopie (ab 1946) sowie der Massenspektrometrie (ab 1910) und der Röntgenstrukturanalyse (ab 1912) ermöglicht eine schnelle Ermittlung der Strukturformel mit allen stereochemischen Details jedes isolierten Stoffes.^[8]

Grundvoraussetzung bei der Auffindung neuer Wirkstoffe aus biologischem Material ist die pharmakologische Testung. Bereits bei der Isolierung sollte die Bioaktivitätskontrolle jedes Trennschrittes Auskunft darüber geben, welche Fraktion den Wirkstoff enthält (bioassay-guided fractionation). In heutiger Zeit erlauben High Throughput Screenings (HTS) und Ultra High Throughput Screenings (UHTS) enorme Probendurchsätze.

Nun ist aber nicht jede in Screening-Untersuchungen aktive Substanz gleich ein neuer Arzneistoff. Sie muss erst in einem oft langwierigen klinischen Zulassungsprozess beweisen,

dass sie die Resorptionsschranken und Detoxifikationsmechanismen des menschlichen Körpers überwinden kann, auch *in vivo* die gleiche Aktivität zeigt und eine ausreichend große therapeutische Breite besitzt.

Dennoch ist die Suche nach biologisch aktiven Naturstoffen, die in einem Jahrmillionen dauernden Wechselspiel zwischen Angreifer und Angegriffenen auf Wirkungen an biologischen Systemen optimiert sind (biochemische Koevolution), bis heute lohnender als die Suche unter Stoffen, die durch kombinatorische Chemie ungezielt synthetisiert wurden.^[9] So waren über die Hälfte der im Zeitraum 1981-2002 zugelassenen Wirkstoffe Naturstoffe oder Naturstoffderivate,^[10] wohingegen noch kein einziger Wirkstoff aus der Kombinatorischen Chemie hervorgegangen ist.^[11] Auch bei vielen gezielten Synthesen von Arzneistoffen haben Wirkstoffe aus biologischen Materialien die entscheidenden Anreize gegeben und Leitstrukturen aufgezeigt. Das bekannteste Beispiel ist mit Sicherheit die Synthese von Acetylsalicylsäure, für die der Naturstoff Salicylsäure aus der Weidenrinde Pate stand.^[12]

Unter den biologisch aktiven Naturstoffen zeichnen sich die Alkaloide nicht nur aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt, sondern vor allem auch wegen ihrer pharmakologischen Wirksamkeiten aus.^[1,13,14] Naphthylisochinolin-Alkaloide^[15] wie Ancistrocladin (**2**) stellen diesbezüglich eine interessante Substanzklasse dar.

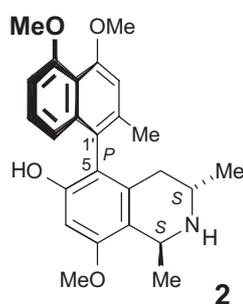


Abb. 2. Struktur des Naphthylisochinolin-Alkaloids Ancistrocladin (**2**).

Sie kommen ausschließlich in den beiden eng verwandten^[16] paläotropischen Pflanzenfamilien der Dioncophyllaceen und Ancistrocladaceen vor. Ihre Strukturen bestehen aus einer Naphthalin- und einer Isochinolin-Einheit, die über eine meist rotationsgehinderte Biarylachse miteinander verbunden sind. Die Anknüpfungsstellen dieser Achse variieren in beiden Molekülhälften, so dass zahlreiche Kupplungstypen resultieren, die zusammen mit zwei weiteren Stereozentren zu der breiten strukturellen Diversität der Naphthylisochinoline führt (siehe Abb. 3, Seite 9). Bemerkenswert ist auch die untypische Biosynthese ausgehend von Acetat, die zur Bildung dieser acetogeninen Alkaloide führt.^[17] Viele der über 100 bisher bekannten Verbindungen besitzen viel versprechende biologische Aktivitäten, so z.B.

antiplasmodiale Wirkung *in vitro*^[18-22] und *in vivo*,^[23] spasmolytische Aktivität,^[24] anticytopathogene Wirkung gegen HIV,^[18,25-27] antileishmaniale Aktivität,^[28] antitrypanosomale Wirkung,^[29] molluskizide Aktivität,^[30,31] larvizide Wirkung,^[32] insektizide Aktivität^[33-36] und fungizide Wirkung.^[37]

Diese vielfältigen und aussichtsreichen biologischen Aktivitäten der Naphthylisochinolin-Alkaloide machen es zu einer lohnenden Aufgabe, weiterhin in bekannten und vor allem neuen, zum Teil botanisch noch gar nicht beschriebenen *Ancistrocladus*-Arten nach neuartigen Vertretern dieser ungewöhnlichen Naturstoffklasse zu suchen. Dazu ist eine schnelle und effiziente Analytik erforderlich, um die Alkaloidzusammensetzung in oft nur geringsten Mengen an Pflanzenmaterial zu analysieren sowie auch vergleichende chemotaxonomische Untersuchungen bekannter und neuer Spezies von unterschiedlichen Fundorten bezüglich ihrer Alkaloid-Muster durchführen zu können. Mittels so genannter online-Kopplungstechniken gelingt das gezielte Auffinden mit anschließender *In-situ*-Strukturaufklärung neuer Verbindungen, wohingegen bereits bekannte Strukturen im Vorfeld der präparativen Arbeit erkannt (Dereplikation) und aussortiert werden können. Die bislang etablierten Techniken der HPLC-NMR^[38] und HPLC-MS wurden in unserem Arbeitskreis maßgeblich für die Analyse von Naphthylisochinolin-Alkaloiden weiterentwickelt.^[39,40] Mit ihnen lassen sich Aussagen über die Konnektivität und die relative Konfiguration treffen. Informationen über die chiroptischen Eigenschaften und somit die absolute Konfiguration sind mittels HPLC-CD möglich, einer Technik, die erstmalig in unserer Gruppe etabliert wurde.^[41] Damit lässt sich in der Regel nun schnell entscheiden, bei welcher Pflanze es sich lohnt, den zeitintensiveren klassischen Weg der offline-Isolierung und Strukturaufklärung jeder einzelnen Substanz zu wählen, um am Ende Reinsubstanzen für biologische Testungen in Händen zu haben.

Da es sich bei der Isolierung von Naturstoffen, der Auslotung ihrer biologischen Aktivitäten und dem Versuch, ihre produzierenden Pflanzen chemotaxonomisch im Einklang mit genetischen und morphologischen Befunden zu klassifizieren, um ein Arbeitsgebiet an der Schnittstelle zwischen Chemie und Biologie handelt, beruht die vorliegende Arbeit auf zahlreichen Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen, nicht zuletzt auch wegen der vielen Anfragen um Hilfestellung bei der stereochemischen Analyse von Naturstoffen.

Im Einzelnen ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Aufgabenstellungen:

I. Phytochemische und chemotaxonomische Untersuchungen von *Ancistrocladus*-Arten:

- Anwendung der gekoppelten Analyseverfahren HPLC-UV, -MS/MS, -NMR und -CD zur schnellen Identifizierung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden in den bislang noch nicht untersuchten Blättern der bekannten indischen Lianenart *Ancistrocladus heyneanus* und Isolierung und Charakterisierung neuartiger Verbindungen.
 - Phytochemische Untersuchung der Blätter der neuen ostafrikanischen Art *A. tanzaniensis* auf Naphthylisochinolin-Alkaloide.
 - Isolierung und Charakterisierung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus der neuen asiatischen Art *A. benomensis*.
 - Identifizierung bestimmter struktureller Merkmale als signifikante Marker für eine chemotaxonomische Differenzierung, um die beiden neuen Spezies bezüglich ihrer Phytochemie in die ca. 25 bereits bearbeiteten Vertreter der Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen einzuordnen.
- II. Erweiterung und Verbesserung des Methodenrepertoires zur Isolierung und Analyse von Naphthylisochinolin-Alkaloiden an einem konkreten Fallbeispiel.
- III. Einsatz dieser vorgenannten Analytik, insbesondere der stereochemischen Untersuchung, auch für Naturstoffe anderer Substanzklassen, um schwierige Problemstellungen mit Hilfe dieser Methodik zu lösen:
- Etablierung einer chiralen online-Analytik mit Hilfe der LC-CD zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses bei den Isoplagiochinen C und D, die von der Arbeitsgruppe Speicher aus Lebermoosen isoliert wurden.
 - Aufklärung der absoluten axialen Konfiguration der dimeren Morphinandienon-Alkaloide Saludimerine A und B, die von der Arbeitsgruppe Bracher aus *Croton flavens* isoliert wurden.
 - Anwendung der chiralen online-Analytik mittels LC-CD zur Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Enantiomere der neuartigen Pflanzenhormone Phytoprostan B₁ Typ I und II, die von der Arbeitsgruppe Müller erforscht werden und Zuordnung ihrer absoluten Konfiguration.

2 Online- versus offline-Analytik in der Naturstoffchemie, eine Einschätzung

Die Analytik hat schon immer eine wichtige Rolle in der Chemie gespielt, unabhängig von der fachspezifischen Ausrichtung. So müssen z.B. in der Anorganischen und in der Organischen Chemie Syntheseprodukte charakterisiert oder in der Physikalischen Chemie bestimmte Eigenschaften von Molekülen untersucht werden. Vor allem die Naturstoffchemie kommt nicht ohne eine hochsensitive und vor allem schnelle instrumentelle Analytik aus. Bei dem riesigen Potenzial an möglichen Wirkstoffen, welche uns die Natur im Zuge der Evolution bereitgestellt hat, bleibt wenig Zeit für umfangreiche chemische Derivatisierungen und Synthesen, um einzelne beliebige Substanzen zu charakterisieren. Hier bedarf es moderner Auswahlverfahren, um interessante Sekundärmetabolite schnell zu identifizieren und sich auf deren Strukturaufklärung zu konzentrieren.

Im Bereich der Voruntersuchungen auf biologische Aktivität wurden Ultra High Throughput Screenings (UHTS) entwickelt mit einem Probendurchsatz von mehreren 10000 Verbindungen. Um nun aber auch nur einen kleinen Anteil derartig bioaktiver Substanzen, so genannter Targets, vollständig in ihrer Struktur zu beschreiben, braucht man effiziente analytische Methoden. Die Verwendung von HPLC-MS mit entsprechenden Substanzdatenbanken ist heute eine Standardmethode für die schnelle Identifizierung von Verbindungen.

Bei einer *De-novo*-Strukturaufklärung unbekannter Naturstoffe wird man aber nicht ohne die NMR-Spektroskopie auskommen. Gerade in der universitären Forschung, insbesondere in der Naturstoffchemie, ist die Anwendung dieser Methodik neben der Isolierung der Reinsubstanzen am zeitintensivsten. Für das Messen aller standardmäßig zur Strukturaufklärung notwendigen Spektren (^1H , COSY, ROESY, evtl. TOCSY, HMBC, HMQC, ^{13}C und DEPT135) von einer Probe von wenigen Milligramm werden an einem Hochfeldspektrometer (600 MHz) ca. 72 Stunden benötigt. In der Industrie wäre ein solcher Zeitbedarf für jede einzelne Substanz unvorstellbar!

In unserer Gruppe wurde seit 1999 neben der HPLC-MS und HPLC-CD die noch junge Kopplungstechnik HPLC-NMR für eine schnellere und effizientere Naturstoffanalytik angewendet und weiterentwickelt.^[39] Dadurch war es möglich, ohne präparative Trennung NMR-Spektren von den Bestandteilen komplexer Gemische zu erhalten. So elegant und zeitsparend diese neuartige online-Analytik auf den ersten Blick ist, so muss man doch beachten, dass diese Technik noch in den 'Kinderschuhen' steckt und demzufolge auch einige Einschränkungen mit sich bringt. Bisher war es nämlich nur möglich, homonukleare NMR-Experimente wie ^1H , COSY, TOCSY und ROESY, welches unsere Arbeitsgruppe erstmalig

in der Naturstoffchemie einsetzte,^[39] mit einem zufrieden stellenden Signal-Rausch-Verhältnis in angemessenen Messzeiten zu erhalten. Erst der heutige technische Stand der LC-NMR mit der neuartigen Kryoprobenkopf-Technik, immer größeren Magnetfeldstärken und der zunehmenden Miniaturisierung der LC-NMR-Hardware (z.B. durch verringertes Probenvolumen im LC-Kopf und verringerten Spulendurchmessern) lässt zu, dass auch heteronukleare NMR-Experimente wie HMBC und HMQC sowie auch gänzlich direkt detektierte Experimente wie ^{13}C und INADEQUATE bei einer derartigen online-Analytik überhaupt erst möglich werden.

Ein weiterer Nachteil ist, dass man oftmals nur auf ein Eluentensystem, bestehend aus D_2O und undeutertem Acetonitril, und dabei zusätzlich noch auf einen bestimmten Mischungsbereich beschränkt ist. Bei einem zu hohen Acetonitrilanteil (>80%) wird das Lock-Signal vom D_2O zu schwach, wodurch eine Messung unmöglich wird. Die effektive Unterdrückung der Lösungsmittelsignale ist von grundlegender Bedeutung und führt dazu, dass die starken Signale der Acetonitril-Protonen, aber auch das Signal der Restprotonen im D_2O , welche die schwachen Signale des Analyten überdecken, verschmälert und in ihrer Intensität minimiert werden. Dies geschieht z.B. durch die sog. 'WET-Sequenz'^[42] oder durch Vorsättigung. Trotz dieser sehr guten Methoden sind Signale, die in genau diesem Bereich liegen (ca. zwischen 1.9 und 2.4 ppm) nicht zu erkennen. Die Möglichkeiten einer Weiterentwicklung sind aber durchaus gegeben, so z.B. die Miniaturisierung der Chromatographie durch Kapillar-HPLC und Verwendung von ausschließlich deuterierten Lösungsmitteln.

Die klassische Isolierung von Inhaltsstoffen hat den entscheidenden Vorteil, dass man eine Reinsubstanz in einer bestimmaren Menge vorliegen hat. Dadurch ist es oft erst möglich, quantitative Messungen durchzuführen, bei denen man eine definierte Konzentration benötigt (z.B. beim Drehwert oder zur Bestimmung der molaren Elliptizitäten bei der CD-Spektroskopie). Die offline-Strukturaufklärung bietet überdies immer noch ein wesentlich größeres Methodenrepertoire, so z.B. die Bestimmung der exakten Masse, die Verbrennungsanalyse, chemische Abbauverfahren, um absolute Konfigurationen von Stereozentren zu ermitteln (siehe Schema 1, Seite 15), die Infrarotspektroskopie, die Messung des Schmelzpunktes und nicht zuletzt auch die Röntgenkristallstrukturanalyse. Ein weiterer großer Vorteil besteht darin, dass man die Reinsubstanzen biologischen Testsystemen zuführen kann, da die Suche nach wirksamen Naturstoffen die Arbeit unserer Gruppe maßgeblich prägt.

Bei der Analyse von Extrakten sowohl neuer als auch bekannter Pflanzen erweist es sich trotz der kritischen Betrachtung als äußerst effizient und hilfreich, eine schnelle erste Charakterisierung der einzelnen Peaks einer HPLC-Analyse ohne vorherige Isolierung der

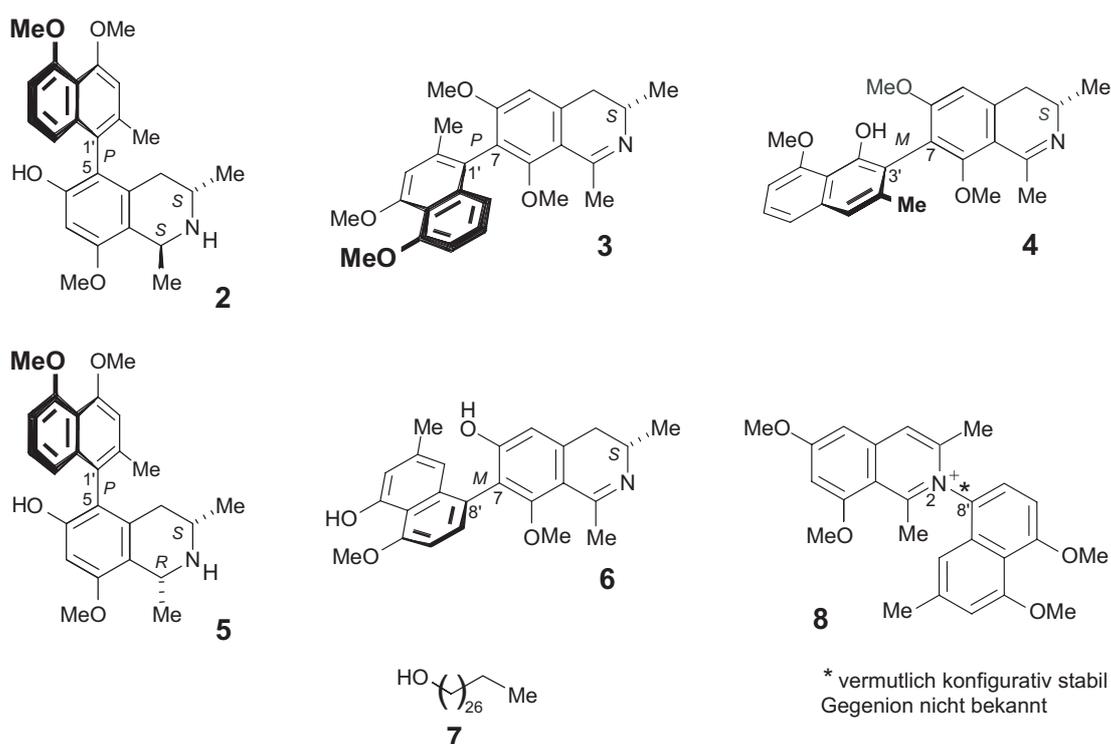
einzelnen Substanzen durchführen zu können. Mit der analytischen HPLC-MS/MS-NMR-CD,^[40,41] einer Technik weit über die LC-UV-Analytik hinaus, steht unserer Gruppe eine moderne und entwicklungsfähige Technik zur Verfügung, mit der durch gekoppelte Methoden von HPLC mit MS/MS, NMR und CD Informationen über das UV-Spektrum, die Molekülmasse inklusive Fragmentierung, die Konstitution und relative Konfiguration mittels homonuklearer NMR-Experimente (¹H, COSY, ROESY) und die absolute Konfiguration anhand von Circular dichroismus-Spektren online gewonnen werden können. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, z.B. in Pflanzenrohextrakten vorab möglichst viele strukturelle Daten in kurzer Zeit zu ermitteln, um dann gezielt die unbekanntes bzw. unklaren Strukturen zu isolieren und vollständig zu charakterisieren. Wenn zudem noch die Strukturklasse bekannt ist, z.B. die der Naphthylisochinolin-Alkaloide, reicht diese online-Analytik zur Strukturaufklärung von Derivaten meist völlig aus.

Eine präparative Aufarbeitung der einzelnen Substanzen aus neuen Arten oder Pflanzenorganen, bei denen sich eine große Anzahl interessanter neuartiger Verbindungen nach ersten online-'Screening'-Untersuchungen erkennen lässt, ist aber bis heute noch nach wie vor das Mittel der Wahl. Ein entsprechendes Beispiel ist im folgenden Kapitel (3.2) beschrieben.

3 Isolierung der Inhaltsstoffe aus Blättern von *Ancistrocladus heyneanus* Wall. (Ancistrocladaceae)

3.1 Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe aus *A. heyneanus*

Erste Untersuchungen von Wurzelmaterial der in Indien beheimateten tropischen Liane *Ancistrocladus heyneanus*,^[43] der ersten phytochemisch bearbeiteten Art dieser Pflanzenfamilie durch Govindachari *et al.* in den frühen siebziger Jahren, führten zur Isolierung der ersten Naphthylisochinolin-Alkaloide, nämlich des 5,1'-gekoppelten Ancistrocladins (**2**),^[44] des Ancistrocladisins (**3**),^[45] dessen Naphthalin- und Isochinolin-Hälften zwischen C-7 und C-1' gekuppelt sind, und des Ancistrocladidins (**4**),^[46] das eine 7,3'-Achse besitzt. In späteren Arbeiten von unserer Gruppe wurde Isoancistrocladin (**5**)^[47] isoliert und die hauptsächlich stress-induzierte Bildung des 7,8'-gekoppelten Ancistroheynins A (**6**) in alternden Pflanzensprossen beobachtet.^[48]



* vermutlich konfiguratv stabil
Gegenion nicht bekannt

Abb. 3. Bekannte Inhaltsstoffe aus Blättern von *A. heyneanus*: Ancistrocladin (**2**), Ancistrocladinin (**3**), Ancistrocladidin (**4**), Isoancistrocladin (**5**), Ancistroheynin A (**6**), Octacosanol (**7**) und Ancisheynin (**8**).

Bis zum Beginn der vorliegenden Untersuchung der Blätter von *A. heyneanus* auf Naphthylisochinolin-Alkaloide im Jahr 2001 hatte während der letzten 31 Jahre niemand zuvor die Blätter im Bezug auf Alkaloide bearbeitet. Lediglich die Arbeitsgruppe von

Govindachari analysierte einen Hexan-Blattextrakt, beschrieb aber nur das Vorhandensein von Octacosanol (**7**).^[49]

Erst im Jahr 2003 erschien eine Publikation von der Arbeitsgruppe von Butler über ein neuartiges, *C,N*-gekoppeltes Naphthylisochinolin-Alkaloid, Ancisheynin (**8**),^[50] das aus überirdischen Teilen von *A. heyneanus* isoliert worden war. Dieses wurde jedoch nur 'flach', d.h. ohne Angaben zur Stereochemie, publiziert, so dass bisher keine Zuordnung der absoluten Konfiguration an der vermutlich konfigurativen stabilen Biarylachse des Naturstoffs erfolgen konnte. Zur Klärung dieser Problematik wurden mittlerweile beide Atropenantiomere von Ancisheynin (**8**) von T. Gronauer in unserem Arbeitskreis synthetisiert und in den Blättern von *A. heyneanus* mittels Koelution und LC-MS identifiziert.

3.2 Online-Analyse des Blattextrakts mittels HPLC-MS, HPLC-NMR und HPLC-CD

Der methanolische Blattextrakt von *A. heyneanus* zeigte im HPLC-UV-Chromatogramm (Standardgradient s. Kap.1.2) drei Hauptkomponenten (Peaks A, B und C bei 20.2, 21.4 und 24.7 min, siehe Abb. 4), deren UV-Spektren (Photodiodenarray) die für Naphthylisochinolin-Alkaloide typischen Maxima bei 233 nm und 306 nm aufwiesen. Diesen Peaks konnten durch Auswertung der HPLC-MS-Daten die Molekülmassen m/z 407, 391 und 405 zugeordnet werden. Anhand dieser Massedaten ließen sich schon erste Aussagen über den Dehydrierungsgrad der Isochinolin-Hälfte treffen; so ist eine Masse von m/z 407 charakteristisch für ein Tetrahydroisochinolin, während m/z 391 und 405 ein Dihydroisochinolin anzeigen.

Diese Vermutungen fanden ihre Bestätigung in den jeweiligen ¹H-NMR-Spektren. Bei Peak A lagen die Signale der beiden Methylgruppen des Isochinolin-Teils im Hochfeld bei 1.5 und 1.7 ppm, das Signal für H-1 bei 4.6 ppm und das für H-3 bei 3.3 ppm. All diese charakteristischen chemischen Verschiebungen wiesen auf das Vorhandensein eines Tetrahydroisochinolin-Alkaloids hin (siehe Abb. 4). Bei den Peaks B und C fehlte hingegen das Signal für H-1, während eine Methylgruppe auf 2.7 ppm und H-3 auf 3.9 ppm Tieffeldverschoben wurden, verursacht durch die *C-N*-Doppelbindung.^[15]

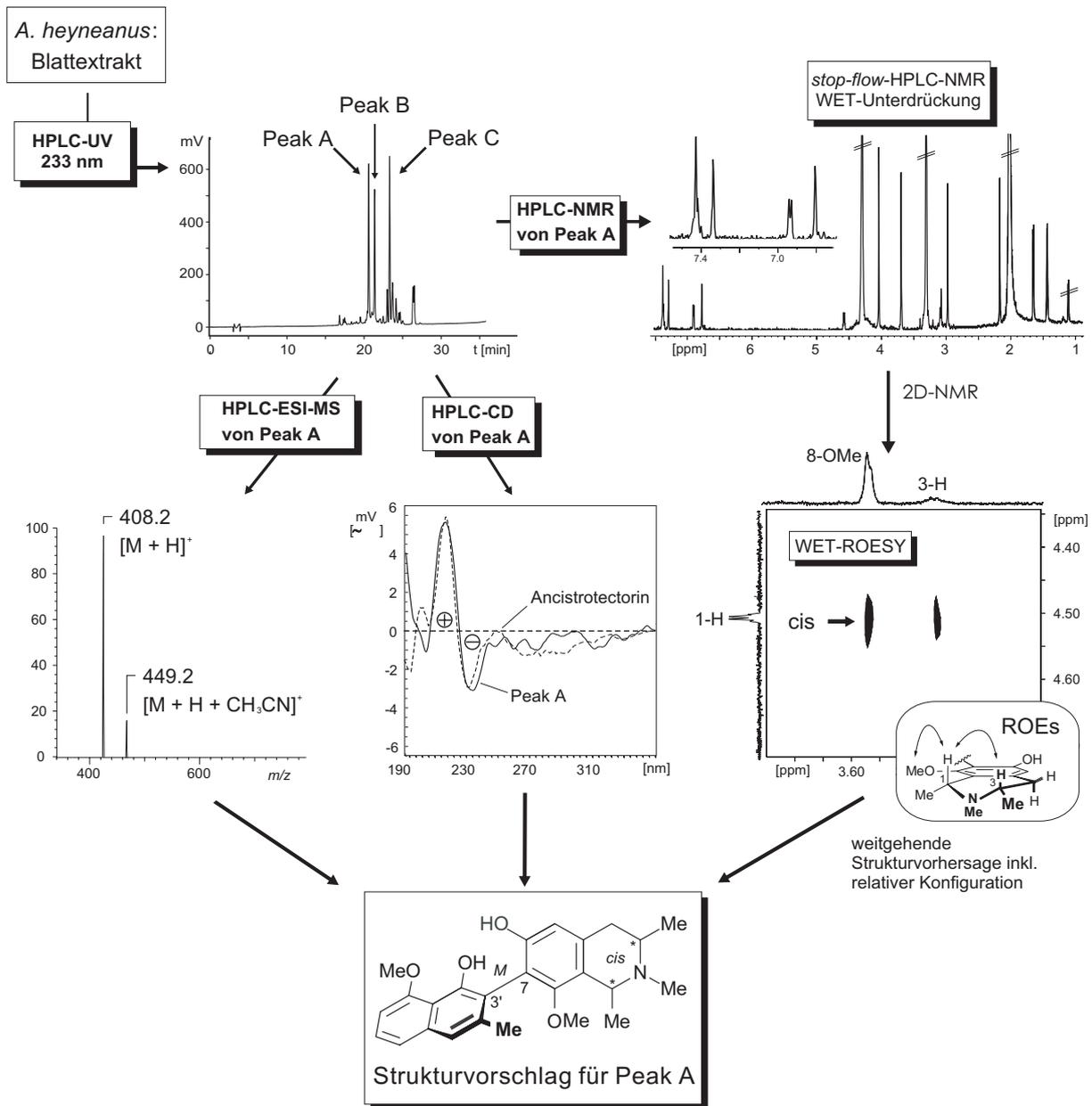


Abb. 4. Online-Analytik eines Blattextraktes von *A. heyneanus* mittels der 'Triade' LC-MS/NMR/CD exemplarisch für Peak A.

Anhand des Spinkopplungsmusters der aromatischen Protonen ließen sich erste Schlüsse auf den Kupplungstyp des jeweiligen Naphthylisochinolin-Alkaloids ziehen. Die fünf aromatischen Protonen von Peak A zeigten ein Triplett, zwei Dubletts und zwei Singulets, wodurch die mögliche Kupplungsposition der Biarylachse auf C-1' oder C-3' des Naphthalin-Teils eingeschränkt werden konnte. Auch bei den Peaks B und C fand sich das gleiche Muster, so dass von einer engen strukturellen Verwandtschaft der drei Substanzen ausgegangen werden konnte.

Das Methylsignals bei 2.9 ppm deutete auf das Vorhandensein einer *N*-Methylgruppe hin.^[51] Zusätzlich konnten zwei Methoxygruppen bei 3.7 und 4.0 ppm identifiziert werden.

Die Auswertung des ROESY-Spektrums von Peak A führte zur Konstitution eines 7,3'-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloids, das große Ähnlichkeiten mit dem bekannten Ancistrosectorin (**9**) aufwies, aber aufgrund des Substitutionsmusters ein neuer Naturstoff war.

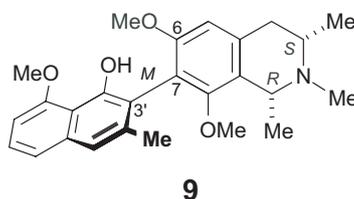


Abb. 5. Struktur des bekannten Naphthylisochinolin-Alkaloids Ancistrosectorin (**9**).

Die online gemessenen CD-Spektren der Peaks A, B und C zeigten alle ein negatives Couplet bei 227 nm, welches im Vergleich mit dem gleichen CD-Verlauf von Ancistrosectorin (**9**) auf eine *M*-Konfiguration an der Achse schließen ließ.

In gleicher Weise konnte auch Peak B keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden, so dass sich der Blattextrakt von *A. heyneanus* bezüglich neuer Naphthylisochinolin-Alkaloide durchaus als lohnend erwies und eine Isolierung der einzelnen Komponenten zur Strukturabsicherung und biologischen Testung sinnvoll erschien.

3.3 Isolierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinolin-Alkaloide

3.3.1 Extraktion und Aufreinigung

Frisches Blattmaterial von *A. heyneanus* aus dem Botanischen Garten der Universität Würzburg wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gefriergetrocknet. Nach anschließender Zerkleinerung der Blätter in einer Schlagmühle wurden diese nacheinander mit Lösungsmitteln steigender Polarität (Petrolether, Dichlormethan, Methanol) jeweils über Nacht mazeriert. Parallel dazu isolierte man eine kleine Menge getrockneter Blätter von *A. heyneanus* aus Indien unter gleichen Bedingungen. Beide Pflanzenextrakte zeigten gleiche HPLC-Chromatogramme, so dass eine mögliche Artefakt-Bildung der Substanzen aus der 'Frisch-Pflanze', durch die Gewächshausbedingungen induziert oder durch den Isolierungsprozess, ausgeschlossen werden konnte.

Im Dichlormethan-Extrakt waren die Alkaloide nach Auswertung der HPLC-DAD-Spektren am stärksten konzentriert und gut voneinander getrennt, so dass eine Isolierung und Aufreinigung der drei Hauptkomponenten **4**, **10** und **11** mittels präparativer HPLC erfolgte. Dazu wurde der Dichlormethan-Extrakt zur Trockene eingengt, in Methanol aufgenommen

und nach verschiedenen Filtrationsschritten (RP-18, PTFE) in mehreren Läufen per präparativer HPLC getrennt.

3.3.2 Strukturaufklärung von Ancistrotanzanin C (10)

3.3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von 10

Von der Anzahl der Signale des ^{13}C -NMR-Spektrums sowie durch hochauflösende Massenspektrometrie (HREIMS) wurde die Summenformel $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ ermittelt.

Bereits das UV-Spektrum mit zwei Maxima bei 231 nm und 307 nm und das Massenfragmentierungsmuster mit einem M^+ -Peak von 407 u sowie den charakteristischen Masseverlusten von 15 u (CH_3) und 31 u (OCH_3) deuteten auf ein Naphthylisochinolin-Alkaloid hin.

Auch das ^1H -NMR-Spektrum zeigte alle Signale eines Naphthyltetrahydroisochinolin-Alkaloids, nämlich Methylgruppen an C-1 (1.45 ppm), C-3 (1.26 ppm), C-2' (2.18 ppm) und zusätzlich noch eine *N*-Methylgruppe bei 2.49 ppm, zwei Methoxygruppen (3.33 und 4.03 ppm) und fünf aromatische Protonen. Letztere ließen sich in zwei Singulets (6.58 und 7.29 ppm) und drei Doppeldoublets gliedern (siehe Abb. 6a). Die beiden diastereotopen Protonen an C-4 wiesen eine 'normale' chemische Verschiebung auf (2.63 und 2.73 ppm), was auf eine Kupplung der Naphthalin-Hälfte an C-7 hindeutete.^[52] Andernfalls wäre durch den Ringstromeffekt des an C-5 gekuppelten, räumlich deutlich näheren Naphthalin-Teils eine Hochfeld-Verschiebung der oben genannten Protonen zu erwarten.

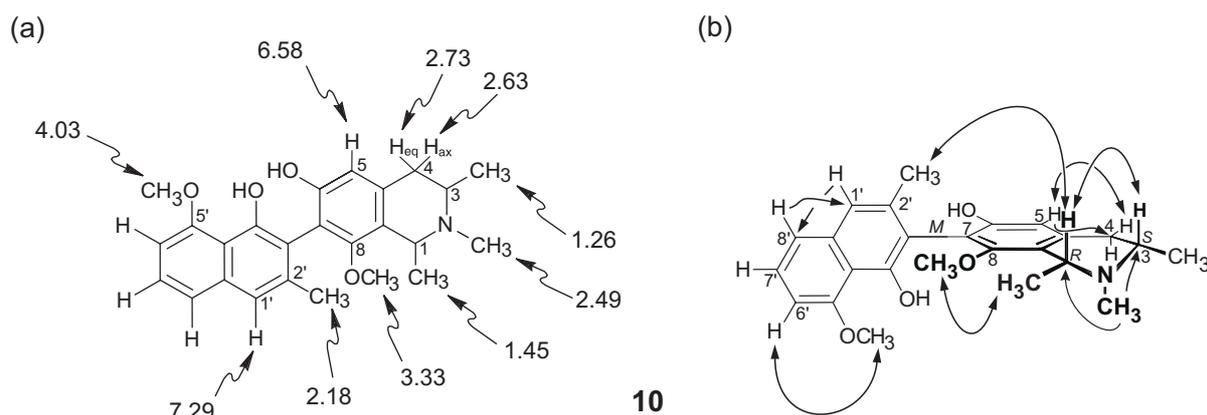


Abb. 6. Zur Strukturaufklärung von Ancistrotanzanin C (10) ausgewählte (a) chemische Verschiebungen [ppm] und (b) HMBC- (einfache Pfeile) und NOESY-Wechselwirkungen (Doppelpfeile).

Eine derartige Hochfeld-Verschiebung war aber bei einer der beiden aromatischen Methoxygruppen (3.33 ppm), deren Position durch die NOESY-Wechselwirkung mit 1-CH₃ an C-8 bestimmt wurde, zu erkennen, welche die Kupplung der Biarylachse an C-7 bestätigte (siehe Abb. 6b). Zudem bewiesen die NOESY-Korrelationen von beiden Protonen an C-4, H-4_{ax} und H-4_{eq}, mit H-5 und die HMBC-Wechselwirkung von H-5 mit C-4, dass C-5 nicht die Kupplungsposition sein konnte.

Die andere Methoxygruppe war durch ihre NOESY-Interaktion mit H-6' an C-5' lokalisiert. Die übrigen zwei der insgesamt vier Sauerstofffunktionen wurden als Hydroxygruppen den Positionen 6 und 4' aufgrund der signifikanten chemischen Verschiebung im Tiefen Feld der entsprechenden Kohlenstoffatome zugeordnet. Die Zuordnung der *N*-Substitution mit der bei 2.49 ppm auftretenden Methylgruppe war durch die long-range-*C-H*-Korrelation mit C-1 und C-3 sicher möglich.

Die Kupplungsposition im Naphthalin-Teil ließ sich durch das Aufspaltungsmuster (Doppeldubletts) dreier benachbarter Protonen (H-6', H-7' und H-8') auf die Positionen 1' oder 3' einschränken. Dafür sprach auch, dass die aromatische Methylgruppe an C-2' durch die räumliche 'Nähe' der Isochinolin-Hälfte Hochfeld-verschoben war (2.18 ppm).^[15] Diese Methylgruppe zeigte eine NOESY-Wechselwirkung mit H-1', das seinerseits mit H-8' im NOESY-Spektrum korrelierte, so dass C-1' als Kupplungsposition ausgeschlossen werden konnte. Eine letzte Bestätigung waren die kreuzweisen HMBC-Wechselwirkungen von H-8' mit C-1' und H-1' mit C-8' (siehe Abb. 6b).

Die relative Konfiguration der beiden Methylgruppen bzw. Protonen des Isochinolin-Teils an C-1 und C-3 konnte anhand von NOESY-Wechselwirkungen von H-1 und H-3 als *cis* zueinander bestimmt werden.

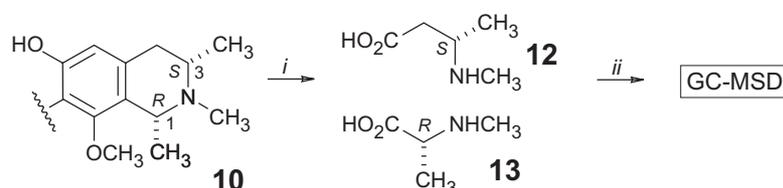
Die eindeutige Zuordnung aller ¹³C-Signale erfolgte durch Auswertung der HMBC-, HMQC- und DEPT135-Spektren.

Somit handelte es sich um ein neues Naphthylisochinolin-Alkaloid mit der Konstitution **10** des bisher seltenen^[53] 7,3'-Kupplungstyps.

3.3.2.2 Die absolute Konfiguration von Ancistrotanzanin C (**10**)

Die absolute Konfiguration der beiden Stereozentren an C-1 und C-3 ließ sich mit Hilfe eines in unserem Arbeitskreis entwickelten^[54,55] chemischen Abbauprozesses aufklären. Hierbei wird Ruthenium-katalysiert der aromatische Ring des Isochinolin-Teils unter Erhalt der Stereozentren oxidativ zu den Fragmenten 3(*N*-Methylamino)buttersäure (**12**) und 2-*N*-Methylalanin (**13**) gespalten (siehe Schema 1, Seite 15). Die entstehenden Säuren werden

nach methanolischer Veresterung und anschließender Derivatisierung mit *R*-Mosher-Chlorid gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert. Durch den Vergleich mit enantiomerenreinen bekannten Referenzsubstanzen konnte die absolute Konfiguration an C-1 zu *R* und an C-3 zu *S* bestimmt werden.^[56]



Schema 1. Oxidativer Abbau zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von Naphthylisochinolin-Alkaloiden nach Veresterung und Derivatisierung; (i) RuCl₃, NaIO₄ (ii) MeOH, SOCl₂ (MSD: Massen-sensitive Detektion)

Die absolute Konfiguration an der Biarylachse wurde anhand einer NOESY-Wechselwirkung der 2'-Methylgruppe des Naphthalin-Teils mit H-1 der Isochinolin-Hälfte als *M*^[57] bestimmt, da durch diese Interaktion die Stellung der beiden Chromophore zueinander ausgehend von der bekannten absoluten Konfiguration an C-1 festgestellt werden konnte (siehe Abb. 6b, Seite 13). Zusätzlich ließ sich die Achsenkonfiguration mittels CD-Spektroskopie ermitteln. Das CD-Spektrum von **10** stimmte gut mit dem des strukturell verwandten, ebenfalls 7,3'-gekuppelten bekannten Ancistrosectorins (**9**) überein, welches eine *M*-Konfiguration an der Biarylachse besitzt (siehe Abb. 7).

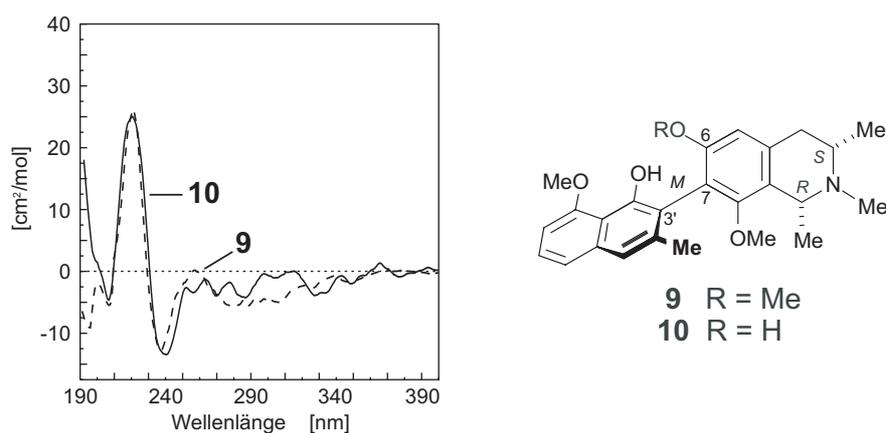


Abb. 7. CD-Spektrum des neuen Alkaloids Ancistrotanzanin C (**10**) im Vergleich mit dem des bekannten Ancistrosectorins (**9**).

Somit handelte es sich bei der neuen Verbindung **10** um ein 6-*O*-Demethyl-Derivat von Ancistrosectorin (**9**), das später auch in den Blättern von *A. tanzaniensis* gefunden (siehe Kap.

4.2.3), aber aufgrund der Erstveröffentlichung in Anlehnung an jene Pflanzenart Ancistrotanin C genannt wurde.^[53]

3.3.3 Strukturaufklärung von Ancistroheynin B (11)

3.3.3.1 Spektroskopische Charakterisierung von 11

Für die zweite, etwas weniger polare Hauptkomponente (Peak B in Abb. 4, Seite 11) wurde, ausgehend von der hochauflösenden Masse von m/z 391.1781, die Summenformel $C_{24}H_{25}NO_4$ ermittelt. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte typische Signale eines Naphthyldihydroisochinolin-Alkaloids, zu denen sowohl eine Tieffeld-verschobene Methylgruppe an C-1 (2.73 ppm) und das Multiplett für H-3 (3.95 ppm) als auch das Fehlen des charakteristischen Quartetts für H-1 bei ca. 4.20 ppm gehörten (siehe Abb. 8a).^[15] Zudem war die chemische Verschiebung von C-1 bei 174.2 ppm signifikant für ein Dihydroisochinolin. Zwei der vier Sauerstofffunktionen konnten zweifelsfrei als Methoxygruppen mit Signalen bei 4.00 und 3.38 ppm zugeordnet werden, wobei letztere eine NOESY-Wechselwirkung mit der Methylgruppe an C-1 zeigte, wodurch sie an C-8 lokalisiert werden konnte (siehe Abb. 8b). Die Hochfeld-Verschiebung dieser OCH_3 -Gruppe an C-8 ließ sich wiederum durch den Einfluss des räumlich nahen Naphthalin-Teils erklären, dessen Anknüpfungsstelle an der Isochinolin-Hälfte somit am benachbarten C-7 festgelegt werden konnte. Dafür sprach auch eine NOESY-Interaktion der Methoxygruppe an C-8 mit der aromatischen Methylgruppe an C-2'.

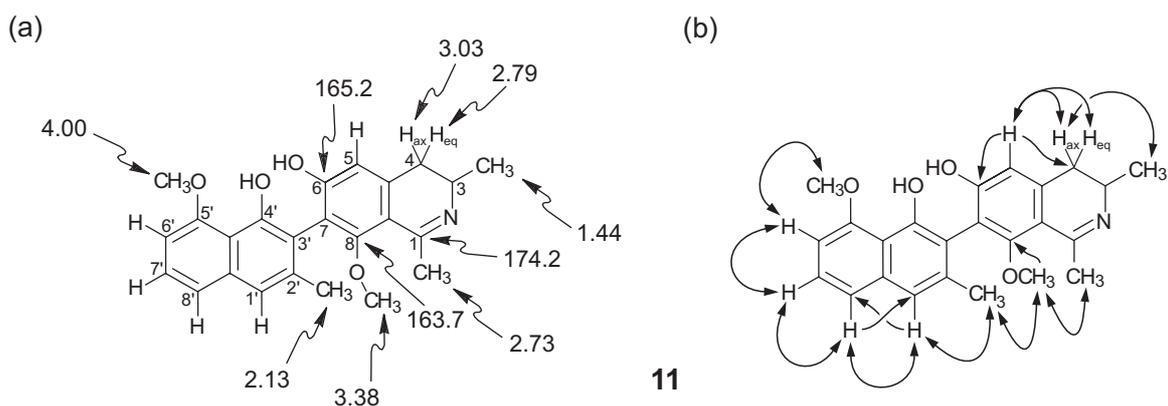


Abb. 8. (a) Ausgewählte ^1H - und ^{13}C -NMR-Verschiebungen [ppm] zur Bestimmung der Konstitution von Ancistroheynin B (11) und (b) HMBC- (einfache Pfeile) und NOESY-Wechselwirkungen (Doppelpfeile).

Eine mögliche Kupplung an C-5 konnte durch die NOESY-Korrelationssequenz $\text{CH}_3\text{-}3 \leftrightarrow \text{H}_{\text{ax}}\text{-}4 \leftrightarrow \text{H-}5$ und durch die HMBC-Wechselwirkung von H-5 mit C-4 ausgeschlossen werden. Das Proton an C-5 zeigte ebenfalls eine HMBC-Korrelation mit einem

Kohlenstoffatom bei 165.2 ppm, dessen Tieffeld-Verschiebung typisch für eine Sauerstoff-Substitution ist. Dieses Signal war aber von dem von C-8 verschieden, welches seinerseits durch eine HMBC-Interaktion mit der entsprechenden 8-Methoxygruppe dem Signal bei 163.7 ppm zugeordnet wurde. Demzufolge musste es sich um eine Hydroxygruppe handeln, die nun an Position 6 lokalisiert wurde.

Eine 'normale' chemische Verschiebung von 4.00 ppm wies die zweite Methoxygruppe auf, die somit 'achsenfern' liegen musste. Da die Sauerstofffunktionen im Naphthalin-Teil normalerweise an den Positionen 4' und 5' zu finden sind, konnte die genaue Position dieser Methoxygruppe anhand einer NOESY-Wechselwirkung mit H-6' an C-5' bestimmt werden. Durch weitere NOESY-Korrelationen von H-6' mit H-7', von H-7' mit H-8', von H-8' mit H-1' und von H-1' mit Me-2' blieb am Ende nur eine Kupplungsposition an C-3' übrig. Dies wurde durch die Hochfeld-Verschiebung der zur Biarylachse benachbarten CH₃-2'-Gruppe (2.13 ppm) bestätigt. Die ebenfalls mögliche Kupplungsposition an C-1' konnte durch die kreuzweisen HMBC-Wechselwirkungen von H-8' mit C-1' und umgekehrt von H-1' mit C-8' eindeutig ausgeschlossen werden.

Die verbleibende Hydroxygruppe zeigte ein scharfes Singulett bei 9.68 ppm, was gleichermaßen auf eine Entschirmung durch ein benachbartes Sauerstoffatom und eine Stabilisierung durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen schließen ließ.^[58] Somit wurde diese Gruppe an C-4' lokalisiert.

Zusammenfassend handelte es sich bei der Verbindung um ein neues 7,3'-gekuppeltes Naphthyldihydroisochinolin-Alkaloid mit der Konstitution **11** (siehe Abb. 8).

3.3.3.2 Die absolute Konfiguration von Ancistroheynin B (**11**)

Die absolute Konfiguration an C-3 von **11** wurde mit Hilfe des oxidativen Ruthenium-katalysierten chemischen Abbaus^[54] zu *S* bestimmt, da als Hauptprodukt (*S*)-3-Aminobuttersäure identifiziert wurde (siehe Schema 1, Seite 15).^[56]

Die Zuordnung der absoluten Konfiguration an der Biarylachse von **11** gelang anhand eines CD-Vergleiches mit dem bekannten, strukturell sehr ähnlichen Ancistrocladidin^[46] (**4**). Obwohl die Achsenkonfiguration von **4** als *M* durch eine Röntgenkristallstruktur eindeutig belegt war,^[59] konnten in der Literatur keine CD-Daten gefunden werden, nur die des entsprechenden Dehydrierungsproduktes.^[60] Durch eine eigens hierfür vorgenommene Isolierung von Ancistrocladidin (**4**) aus den Blättern von *A. heyneanus* (siehe Kap. 3.3.4) konnte schließlich ein CD-Spektrum aufgenommen werden, das sehr gute Übereinstimmung mit dem von **11** zeigte und eine *M*-Konfiguration an der Achse des neuen Alkaloids bewies (siehe Abb. 9).

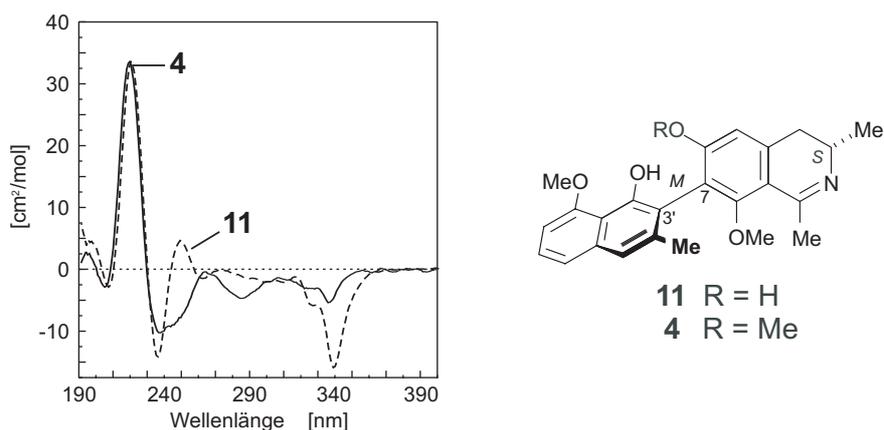


Abb. 9. CD-Spektren von Ancistroheynin B (11) und Ancistrocladidin (4).

Ausgehend von diesen Ergebnissen handelte es sich bei **11** um ein neues 6-*O*-Demethyl-Derivat von Ancistrocladidin (**4**), das entsprechend der Pflanze, aus der es isoliert wurde, Ancistroheynin B genannt wurde.^[61]

3.3.4 Isolierung und Identifizierung von Ancistrocladidin (4)

Die am wenigsten polare Hauptkomponente des Blattextraktes (Peak C in Abb. 4, Seite 11) ließ sich nach Auswertung der spektroskopischen Daten als das literaturbekannte^[46,62] Naphthylidihydroisochinolin-Alkaloid Ancistrocladidin (**4**, Abb. 9) identifizieren.

Die in der Literatur bislang fehlenden CD-Daten von **4** konnten nach Isolierung der Substanz und CD-spektroskopischen Vermessung (siehe Abb. 9) ergänzt werden.^[61]

3.4 Testung auf biologische Aktivität

Aufgrund der guten antiprotozoischen Aktivitäten^[18-23,28,29,63] der Naphthylisochinolin-Alkaloide wurden die isolierten Verbindungen **4**, **10** und **11** von Prof. Brun im Schweizerischen Tropeninstitut auf ihre biologische Wirksamkeit gegen Pathogene der Gattungen *Plasmodium*, *Leishmania* und *Trypanosoma* in einem standardisierten Verfahren^[28] untersucht.

Ancistrocladidin (**4**), Ancistrocladidin C (**10**) und Ancistroheynin B (**11**) zeigten mittlere antiplasmodiale Aktivitäten (ca. 10-fach geringer als der Standard) gegen den K1-Stamm von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria Tropica (siehe Tabelle 1).^[61] Obwohl sie damit nicht die hervorragende Wirksamkeit anderer Naphthylisochinolin-Alkaloide erreichten, lieferten diese Daten einen wichtigen Beitrag zur derzeitigen Untersuchung der Quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR).^[64,65]

Tabelle 1. Biologische Aktivität in IC₅₀-Werten der Verbindungen **4**, **10** und **11** [µg/mL] im Vergleich zum Standard des jeweiligen Testsystems.

	4	10	11
<i>Plasmodium falciparum</i> (Stamm: K1) Standard: Chloroquin 0.041	0.3	0.1	0.5
<i>Trypanosoma cruzi</i> Standard: Benznidazol 0.53	23.4	14	47.5
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> Standard: Melarsoprol 0.00046	2	1.3	2.9
<i>Leishmania donovani</i> Standard: Miltefosin 0.31	2.9	-- ^a	22.3

^a Bestimmung nicht möglich

Gegen die Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit (*T. b. rhodesiense*) und der Chagas-Krankheit (*T. cruzi*) waren alle drei Verbindungen schwach bis gar nicht aktiv. Ancistrocladidin (**4**) zeigte eine gute Wirksamkeit gegen *L. donovani*, das Pathogen der visceralen Leishmaniose, die neue Verbindung **11** hingegen nur eine sehr geringe.

4 Isolierung der Naphthylisochinolin-Alkaloide aus Blättern von *Ancistrocladus tanzaniensis* Cheek & Frimodt-Møller (Ancistrocladaceae)

4.1 *Ancistrocladus tanzaniensis* Cheek & Frimodt-Møller

Ancistrocladus tanzaniensis Cheek & Frimodt-Møller wurde im Jahr 1997 in den Uzungwa-Bergen in Tansania, Ost-Afrika, in einer Höhe von 1100 m ü. NN entdeckt. Die botanische Erstbeschreibung erfolgte im Jahr 2000.^[66] Bei dieser kürzlich beschriebenen tropischen Liane handelt es sich um den ersten afrikanischen submontanen^[67] Vertreter der bisher ca. 20 bekannten *Ancistrocladus*-Arten^[68] und neben *A. robertsoniorum*^[69] aus Kenia um die zweite ostafrikanische Spezies überhaupt.

Die Pflanze wird ca. 3 m hoch. Ihre eiförmig-elliptischen, ledrigen Blätter sind 9-24 cm lang und 2.5-5.8 cm breit (siehe Abb. 10). Blüten konnten bisher nicht gefunden werden, aber die (verblühte) Infloreszenz ist 3-5-fach dichotom verzweigt, 6-11 cm breit und 6-10 cm lang. Wie alle anderen Repräsentanten der Ancistrocladaceen bildet auch *A. tanzaniensis* an den Seitentrieben die namensgebenden Haken (umgeformte Sprossenden), mit denen sie sich in Bäumen emporhangelt. Die Früchte sind durch Auswachsen der fünf Kelchblätter auf eine Länge von 3-4.5 cm 'geflügelt', wobei drei länger und zwei kürzer sind und insgesamt die Gestalt eines (unregelmäßigen) Propellers haben (siehe Abb. 10 C,D).

Da bis *dato* noch keine phytochemischen Untersuchungen von *A. tanzaniensis* vorlagen, war diese Pflanze nicht zuletzt auch wegen ihrer exponierten Höhenlage ein viel versprechendes Forschungsobjekt auf der Suche nach strukturell neuartigen und biologisch aktiven Naphthylisochinolin-Alkaloiden.

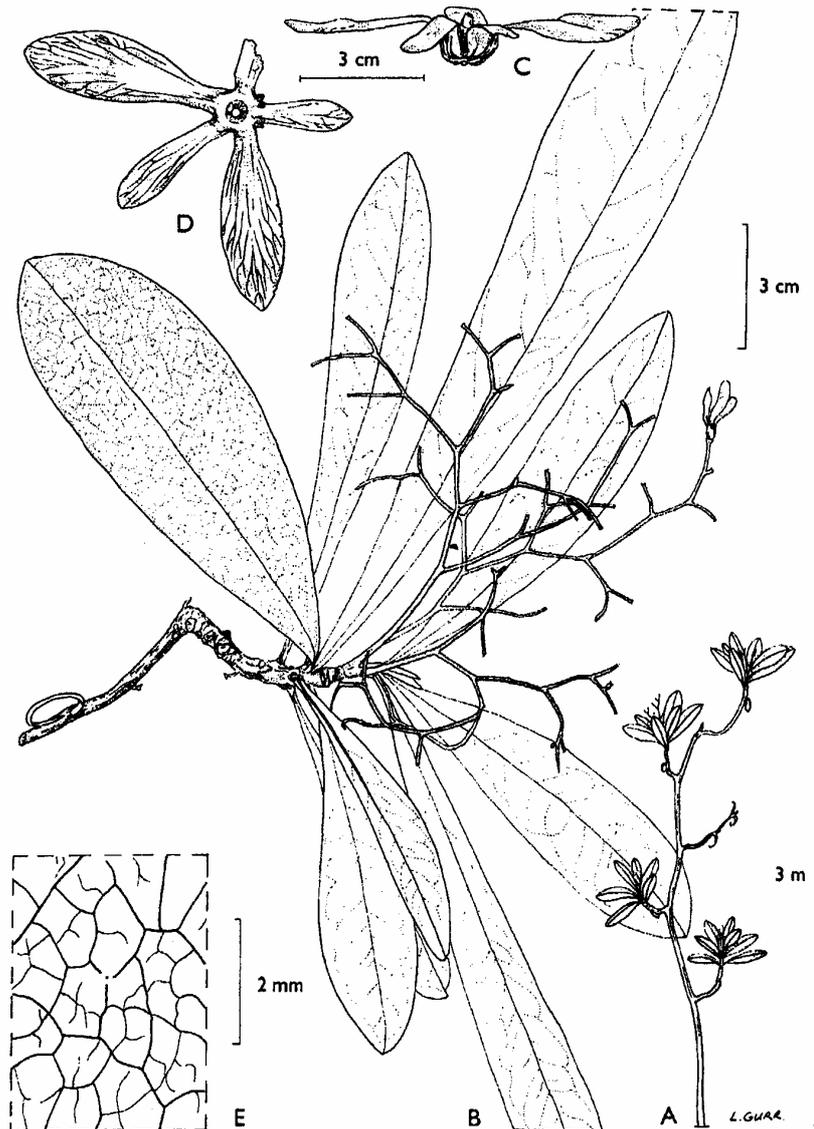


Abb. 10. *Ancistrocladus tanzaniensis* (Ancistrocladaceae): Habitus (A); Seitentrieb mit (verblühter) Infloreszenz (B); Frucht in der Seitansicht (C); Frucht in der Aufsicht (D); Blattnervatur im Detail (E) (Abb. Nach Frimodt-Møller).^[66]

4.2 Isolierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinolin-Alkaloide

4.2.1 Extraktion und Aufreinigung

Luftgetrocknete Blätter von *A. tanzaniensis* wurden gemahlen und anschließend jeweils über Nacht mit Lösungsmitteln steigender Polarität (Petrolether, Dichlormethan, Methanol) mazeriert. Der Dichlormethan-Extrakt enthielt nach HPLC-Kontrolle (Retentionszeit und UV-Spektrum) die meisten Alkaloide, so dass dieser zur Trockene eingeengt und anschließend in Methanol wieder aufgenommen wurde. Nach verschiedenen Filtrationsschritten (RP-18,

PTFE) konnten die Verbindungen **4**, **9**, **10**, **14**, **15** und **16** in mehreren Läufen an der präparativen HPLC rein isoliert werden.

4.2.2 Strukturaufklärung von *O,N*-Dimethylancistrocladin (**14**)

4.2.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von **14**

Der polarsten der sechs isolierten Substanzen konnte anhand der hochauflösenden Massenspektrometrie eine Summenformel von $C_{27}H_{33}NO_4$ zugeordnet werden. Sowohl die Molekülmasse von m/z 435 als auch das 1H -NMR-Spektrum mit vier Signalen für Methoxygruppen (4.03, 3.98, 3.96 und 3.67 ppm) und vier für Methylgruppen (1.36, 1.78, 2.12 und 2.96 ppm) ließen auf ein vollständig *O*- und *N*-methyliertes Naphthyltetrahydroisochinolin-Alkaloid schließen (siehe Abb. 11a).

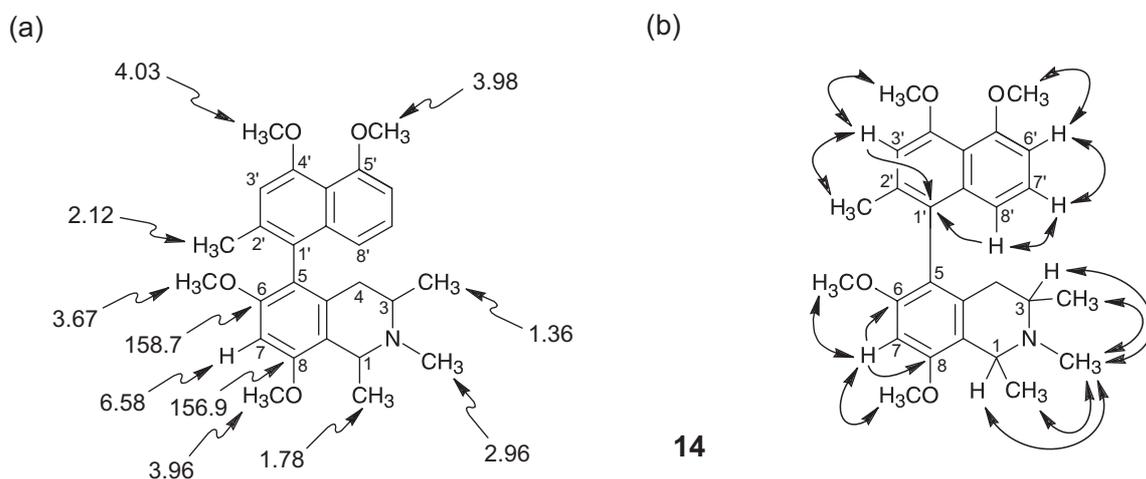


Abb. 11. Für die Strukturaufklärung von *O,N*-Dimethylancistrocladin (**9**) ausgewählte (a) 1H - und ^{13}C -NMR-Daten [ppm] und (b) NOESY- (Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (einfache Pfeile).

Eine *N*-Methylierung wurde zum einen durch die charakteristische^[51] chemische Verschiebung des Methylsignals (2.96 ppm) und zum anderen durch dessen NOESY-Wechselwirkungen mit allen benachbarten Protonen (H-1, H-3, Me-1 und Me-3) bestätigt (siehe Abb. 11b).

Die Kupplungsposition der beiden Molekülhälften an C-3' oder C-6' des Naphthalin-Teils konnte aufgrund der 'normalen' chemischen Verschiebungen der beiden Methoxygruppen an C-4' (4.03 ppm) und C-5' (3.98 ppm) sowie ihren NOESY-Interaktionen mit H-3' bzw. H-6' zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Das Aufspaltungsmuster dreier benachbarter Protonen (drei Doppeldoublets für H-6', H-7' und H-8') und die NOESY-Korrelationssequenzen $CH_3O-5' \leftrightarrow H-6' \leftrightarrow H-7' \leftrightarrow H-8'$ sowie $CH_3O-4' \leftrightarrow H-3' \leftrightarrow CH_3-2'$ wiesen auf C-1' als Kupplungsstelle

hin. Dies wurde durch die 3J -HMBC-Korrelationen von H-3' und H-8' zum selben quartären Kohlenstoffatom, nämlich C-1', untermauert.

Von den übrigen zwei Methoxygruppensignalen war nur jenes bei 3.67 ppm signifikant zu hohem Feld verschoben, was bei einer Anknüpfung der Naphthalin-Hälfte an C-5 des Isochinolins zu erwarten war. Zudem korrelierte das aromatische Proton H-7 im NOESY-Spektrum mit zwei *O*-Methylgruppen und im HMBC-Spektrum mit zwei Tieffeldverschobenen (und deshalb Sauerstoff-substituierten) Kohlenstoffatomen, C-6 (158.7 ppm) und C-8 (156.9 ppm).

Die isolierte Verbindung hatte somit die Konstitution **14** eines *O*- und *N*-methylierten Naphthyltetrahydroisochinolin-Alkaloids des 5,1'-Kupplungstyps.

4.2.2.2 Die absolute Konfiguration von *O,N*-Dimethylancistrocladin (**14**)

Die absolute Konfiguration an C-3 ließ sich wiederum durch den oxidativen Abbau^[54] zu *S* bestimmen (siehe Schema 1, Seite 15).^[56] Anhand einer NOESY-Wechselwirkung der Methylgruppe an C-3 mit H-1 wurde die relative Konfiguration dieser beiden Stereozentren als *trans* und demzufolge die absolute Konfiguration an C-1 ebenfalls als *S* bestimmt (siehe Abb. 12).

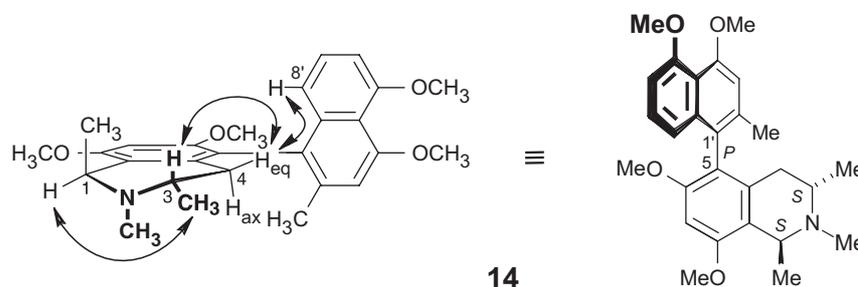


Abb. 12. Relevante NOESY-Wechselwirkungen für die Bestimmung der absoluten Konfiguration von *O,N*-Dimethylancistrocladin (**14**) ausgehend von der gegebenen *S*-Konfiguration an C-3.

Die Achsenkonfiguration von **14** konnte durch CD-Vergleich mit dem strukturell eng verwandten, 5,1'-gekuppelten bekannten *O*-Methylancistroclin (**17**)^[70] ermittelt werden (siehe Abb. 13, Seite 24). Beide CD-Spektren zeigten einen fast identischen Verlauf mit einem positiven Cotton-Effekt bei 240 nm und einem negativen bei 226 nm, so dass an der Biarylachse von **14** ebenfalls *P*-Konfiguration vorlag. Dieses Ergebnis wurde auch durch eine NOESY-Korrelation über die Achse von H_{eq}-4 mit H-8' bestätigt (siehe Abb. 12).

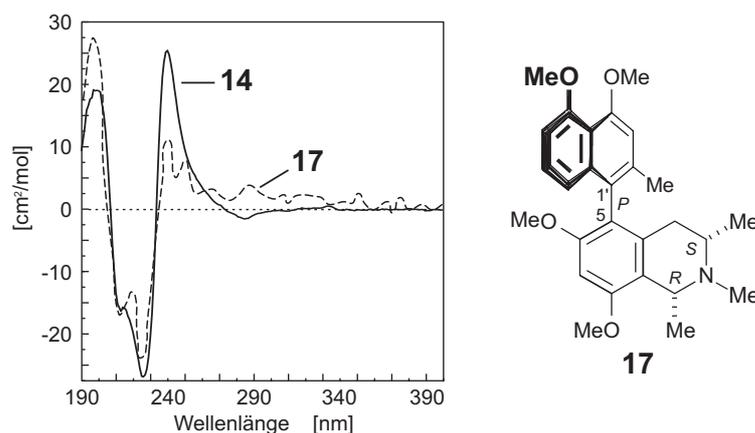


Abb. 13. Vergleich der CD-Spektren von *O,N*-Dimethylancistrocladin (**14**) und dem bekannten *O*-Methylancistroclin (**17**) zur Bestimmung der Achsenkonfiguration von **14**.

Alkaloid **14** war somit das 1-Epimer des *O*-Methylancistroclins (**17**), wurde aber *O,N*-Dimethylancistrocladin benannt, da diese Verbindung schon einmal im Jahr 1971 partialsynthetisch^[71] hergestellt, als Naturstoff jedoch noch nie zuvor isoliert worden war.^[53]

4.2.3 Isolierung und Identifizierung von Ancistrotanzanin C (**10**)

Das zweitpolarste Hauptalkaloid im HPLC-Chromatogramm konnte nach Auswertung aller spektroskopischen, spektrometrischen und physikalischen Daten als 6-*O*-Demethyl-Analogon des Ancistrosectorins (**9**) identifiziert werden (siehe Abb. 14), welches auch schon in den Blättern von *A. heyneanus* gefunden worden war (siehe Kap. 3.3, Seite 12).^[61] Da diese aus den Blättern von *A. tanzaniensis* isolierte Verbindung zuerst veröffentlicht worden war, bekam sie gemäß der Pflanzenart den Namen Ancistrotanzanin C (**10**). Eine ausführliche Strukturaufklärung dieses Alkaloids ist in Kap. 3.3.2 beschrieben.^[53]

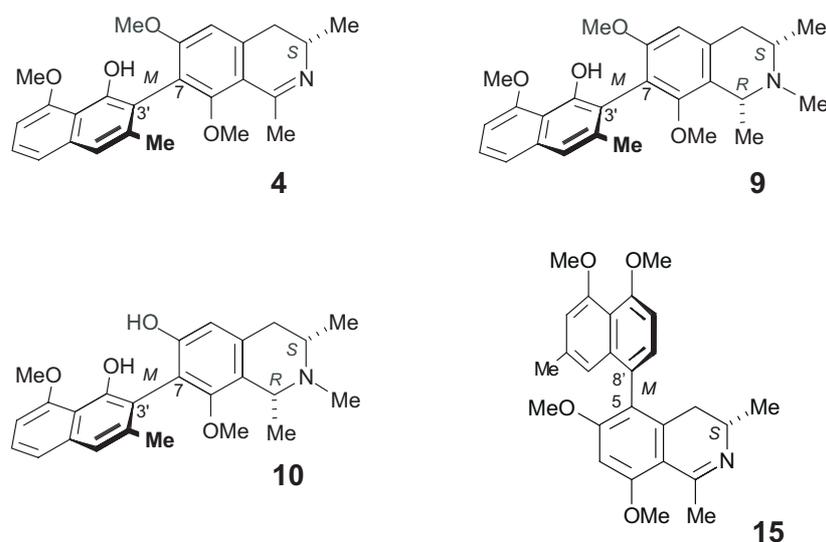


Abb. 14. Naphthylisochinolin-Alkaloide aus den Blättern von *A. tanzaniensis*: Ancistrocladidin (**4**), Ancistrotectorin (**9**), Ancistrotanzanin C (**10**) und Ancistrotanzanin B (**15**).

4.2.4 Identifizierung von Ancistrotanzanin B (15)

Nach Auswertung der HPLC-DAD-UV- und HPLC-MS-Daten wurde vermutet, dass es sich bei dem dritten Peak im mittleren Polaritätsbereich um ein Naphthyldihydroisochinolin-Alkaloid mit einem Molekulargewicht von m/z 419 handelte. Letzteres ließ auf eine vierfache *O*-Methylierung schließen. Dankenswerterweise wurde von J. Faber aus unserer Arbeitsgruppe eine Probe eines 5,8'-gekuppelten Alkaloids mit dem gleichen Molekulargewicht für eine Koelution zur Verfügung gestellt, das er gleichzeitig ebenfalls aus Blättern von *A. tanzaniensis* isoliert und als den neuen Naturstoff Ancistrotanzanin B (**15**, Abb. 14)^[72] aufgeklärt hatte. Aufgrund des gleichen chromatographischen Verhaltens und eines für die axiale *M*-Konfiguration typischen negativen Signals bei 245 nm in der LC-CD-Spur konnte Ancistrotanzanin B (**15**) im vorliegenden Blattextrakt eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich wurde eine geringe Menge dieser Substanz isoliert, um zum einen die Struktur durch weitere Messungen eindeutig abzusichern und zum anderen eine Reinsubstanz für biologische Testungen zur Verfügung zu haben.

4.2.5 Isolierung von Ancistrotectorin (9)

Als vierte Verbindung konnte das literaturbekannte^[73,74] Alkaloid Ancistrotectorin (**9**) isoliert werden (siehe Abb. 14).^[53] Dieses entsprach dem ersten von drei Peaks im unpolaren Bereich des HPLC-Spektrums, der im UV-Spektrum das für Ancistrotectorin und seine

Derivate typische^[75] abgeflachte, plateauartige zweite Maximum bei 307 nm zeigte (siehe Abb. 15).

Obwohl das Alkaloid schon bekannt war, fehlte in der Literatur bisher eine Beschreibung von Bioaktivitäten des Ancistrosectorins (**9**), was eine erneute Isolierung dieses Alkaloids rechtfertigte, um es auf antiprotozoische Aktivitäten untersuchen zu können.

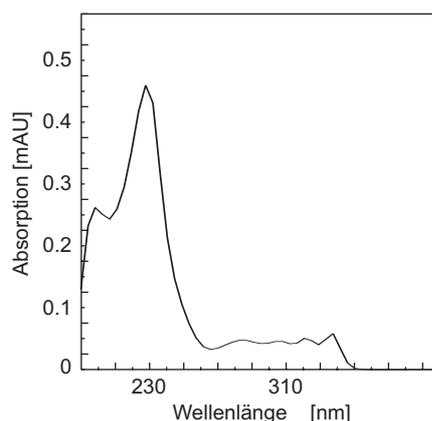


Abb. 15. UV-Spektrum von Ancistrosectorin (**9**) mit dem charakteristischen abgeflachten zweiten Maximum um 307 nm.

4.2.6 Identifizierung von Ancistrocladidin (**4**)

Aufgrund des unpolaren Laufverhaltens in der HPLC, einer Molekülmasse von m/z 405 und Auswertung der spektroskopischen Daten konnte die fünfte Hauptkomponente dem ebenfalls literaturbekanntem^[46,62] Ancistrocladidin (**4**) zugeordnet werden (siehe Abb. 14, Seite 25).

4.2.7 Strukturaufklärung von Ancistroanzanin A (**16**)

4.2.7.1 Spektroskopische Charakterisierung von **16**

Die sechste und letzte Hauptkomponente war im Vergleich zu Ancistrocladidin (**4**), welches im HPLC-Spektrum bisher die lipophilste Verbindung gewesen war, noch unpolarer, was auf besondere strukturelle Merkmale schließen ließ. Eine Masse von m/z 405 und eine Summenformel von $C_{25}H_{27}NO_4$, ermittelt durch HREIMS, deuteten jedoch 'nur' auf das Vorhandensein eines Naphthyldihydroisochinolin-Alkaloids hin, welches durch das Fehlen des Signals für H-1 bei ca. 4 ppm und die Tieffeld-Verschiebung des CH_3 -1-Signals (2.81

ppm) im $^1\text{H-NMR}$ - sowie von C-1 (175.6 ppm) im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zusätzlich bestätigt wurde (siehe Abb. 16a).

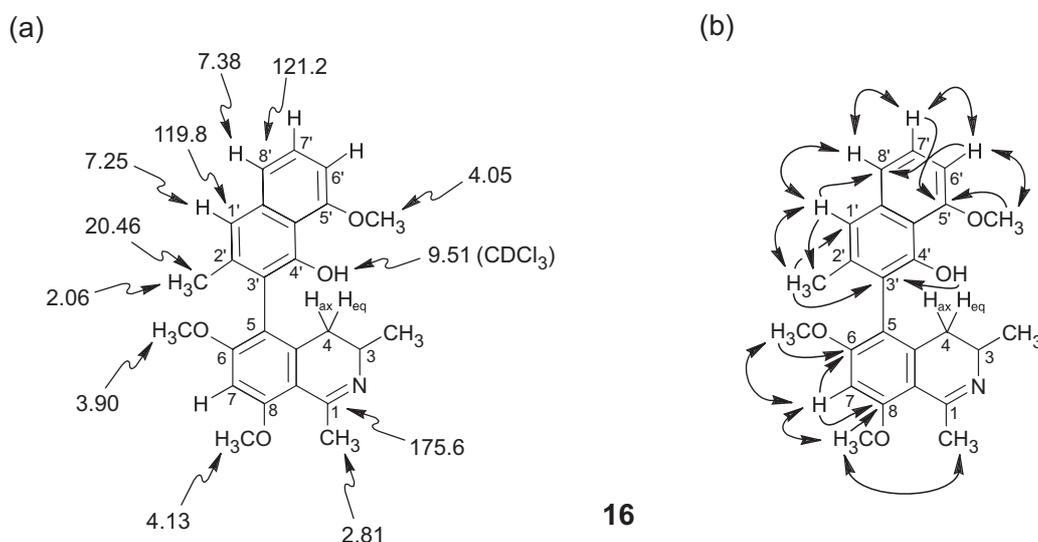


Abb. 16. (a) Ausgewählte ^1H - und ^{13}C -NMR chemische Verschiebungen [ppm] und (b) NOESY- (Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (einfache Pfeile) für die Strukturaufklärung von Ancistrotanin A (**16**).

Zwei der drei Methoxygruppen (3.90 und 4.13 ppm) wurden durch ihre NOESY-Korrelationen mit demselben Proton, H-7, den Positionen 6 und 8 in der Isochinolin-Hälfte zugewiesen, wobei letztere noch eine NOESY-Interaktion mit CH₃-1 zeigte (siehe Abb. 16b). Diese Annahme konnte durch HMBC-Wechselwirkungen von OCH₃-8 mit C-8, OCH₃-6 mit C-6 und letztendlich von H-7 mit C-6 und C-8 bestätigt werden. Damit blieb im Ausschlussverfahren nur die Position an C-5 für eine Kupplung des Naphthalin-Teils übrig.

Die dritte Methoxygruppe (4.05 ppm) konnte durch die NOESY-Wechselwirkung mit H-6' und einer HMBC-Korrelation mit C-5', das auch mit H-7' im HMBC über eine 3J -Kopplung wechselwirkte, eindeutig an Position 5' lokalisiert werden.

Die Signalüberlappung der beiden Protonen H-7' und H-8' des in MeOH-d₄ aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums ließ kein exaktes Kopplungsmuster der entsprechenden Signale erkennen, so dass eine weitere Messung in CDCl₃ durchgeführt wurde. Dabei konnten die drei Doppeldoublets für die drei benachbarten Protonen H-6', H-7' und H-8' erhalten werden, wodurch eine mögliche Anknüpfungsstelle der Biarylachse an C-6' oder C-8' ausgeschlossen wurde. Zusätzlich war ein scharfes Signal bei 9.51 ppm zu sehen, welches einer Hydroxygruppe an C-4' aufgrund einer HMBC-Korrelation mit C-3', welches seinerseits mit den Protonen der 2'-Methylgruppe interagiert, zugeordnet werden konnte. Entsprechende NOESY-Wechselwirkungen zu einem möglichen H-3' konnten aber nicht beobachtet werden, was für C-3' als Kupplungsposition sprach, da im Gegensatz dazu durch eine NOESY-

Korrelationssequenz von $\text{CH}_3\text{-2}' \leftrightarrow \text{H-1}' \leftrightarrow \text{H-8}' \leftrightarrow \text{H-7}' \leftrightarrow \text{H-6}' \leftrightarrow \text{OCH}_3\text{-5}'$ C-1' als andere denkbare Position der Biarylachse unmöglich war. Zweifelsfrei bewiesen wurde diese Annahme durch HMBC-Wechselwirkungen von H-1' und H-6' mit C-8' sowie von $\text{CH}_3\text{-2}'$ mit dem tertiären Kohlenstoffatom C-1' und umgekehrt, von H-1' mit $\text{CH}_3\text{-2}'$. Die Hochfeld-Verschiebungen der Signale für die aromatische Methylgruppe an C-2' (2.06 ppm) und für die Methoxygruppe an C-6 (3.90 ppm)^[76] gaben letzte Klarheit über das Vorliegen eines bisher noch nie gefundenen neuen 5,3'-Kupplungstyps bei den Naphthylisochinolin-Alkaloiden. Dieses neuartige Alkaloid besaß die Konstitution **16** und wurde Ancistrotanzanin A genannt.

4.2.7.2 Die absolute Konfiguration von Ancistrotanzanin A (**16**)

Mit Hilfe des oxidativen Abbaus von **16** (siehe Schema 1, Seite 15),^[54,55] der in diesem Fall ausschließlich (*S*)-3-Aminobuttersäure ergab, gelang die Bestimmung der absoluten Konfiguration an C-3 zu *S*.^[56]

Bei der Zuordnung der Achsenkonfiguration konnte man bisher meistens auf einen Vergleich des gemessenen CD-Spektrums mit dem einer strukturell ähnlichen Verbindung bekannter Absolutkonfiguration zurückgreifen. Bei Ancistrotanzanin A (**16**) war dies nun aufgrund des neuartigen 5,3'-Kupplungstyps nicht ohne weiteres möglich. Auch die Anwendung empirischer Regeln wie z.B. der Exciton-Chirality-Methode^[77] führte zu keinem Ergebnis, da im CD-Spektrum wegen der zu verschiedenartigen Chromophore kein auswertbares Exitonengesplittetes Couplet vorlag.

Leider konnte man die relative und bei bekannter Absolutkonfiguration des stereogenen Zentrums an C-3 somit auch absolute Konfiguration an der Achse auch nicht durch Atropisomer-spezifische NOESY-Wechselwirkungen, z.B. von $\text{H}_{\text{ax}}\text{-4}$ oder $\text{H}_{\text{eq}}\text{-4}$ zu $\text{CH}_3\text{-2}'$ bestimmen, da die beiden Protonen, obwohl diastereotop, wegen des an Position 5 kuppelnden Naphthalin-Teils isochron waren und ihre Signale im $^1\text{H-NMR}$ somit zusammenfielen.

In einem solchen schwierigen Fall bestand die einzige Möglichkeit, die absolute Konfiguration an der Achse zu bestimmen, darin, quantenchemische Berechnungen der CD-Spektren für die beiden möglichen Diastereomere (*M,S*)-**16** und (*P,S*)-**16** durchzuführen und diese anschließend mit dem gemessenen Spektrum des Naturstoffs zu vergleichen (siehe Abb. 17). Diese in unserer Arbeitsgruppe etablierte und weiterentwickelte Methode wurde schon mehrfach erfolgreich auf verschiedenste Naturstoffe angewandt.^[52,78-80]

Durch eine Konformationsanalyse von der Struktur von Ancistrotanzanin A (**16**), durchgeführt von M. Reichert aus unserer Arbeitsgruppe, konnte ausgehend vom (*M,S*)-Atrop-Diastereomer unter Verwendung eines Tripos-Kraftfeldes und der semiempirischen

AM1-Methode^[81] das unterschiedliche chiroptische Verhalten möglicher Konformere berücksichtigt werden. Aus dieser Untersuchung resultierten 48 Konformere (alle innerhalb von 3 kcal/mol über dem globalen Minimum), für die nun die jeweiligen CD-Spektren unter Anwendung des semiempirischen CNDO/2S-Ansatzes^[82] berechnet wurden. Diese Einzelspektren wurden unter Berücksichtigung der Boltzmann-Verteilung zu einem Gesamt-CD-Spektrum addiert, für welches anschließend eine UV-Korrektur^[83] durchgeführt wurde (siehe Abb. 17 oben). In gleicher Weise erfolgte die Berechnung des CD-Spektrums des (*P,S*)-Atrop-Diastereomers von **16**, welches im Vergleich zum experimentell bestimmten fast vollständig spiegelbildlich war. Das theoretisch vorhergesagte Spektrum für das (*M,S*)-Isomer stimmte hingegen sehr gut mit dem gemessenen überein, so dass Ancistrotanzanin A (**16**) eine *M*-Konfiguration an der Biarylachse zugeordnet werden konnte.^[72,84]

Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden weitere Berechnungen der CD-Spektren unter Anwendung einer 'Molecular-Dynamics'-Methode (MD)^[80,85,86] mit einem MM3-Kraftfeld^[87] bei einer virtuellen Temperatur von 500 K durchgeführt. Hierbei werden die Bewegungen des Moleküls simuliert, wobei alle 500 ps eine Momentaufnahme des Moleküls gemacht wird, für die man jeweils ein CD-Spektrum nach der semiempirischen CNDO/2S-Methode^[82] berechnet. Die Addition der Einzel-CD-Spektren der über einen bestimmten Zeitraum auftretenden Konformere (ca. 1000 Strukturen) ergeben abschließend ein Gesamt-CD-Spektrum (siehe Abb. 17 unten). Wieder zeigte das für (*M,S*)-**16** berechnete Spektrum eine gute Übereinstimmung mit dem Experimentellen, wodurch die Zuordnung der axialen *M*-Konfiguration beim Ancistrotanzanin A (**16**) als gesichert angesehen werden konnte.

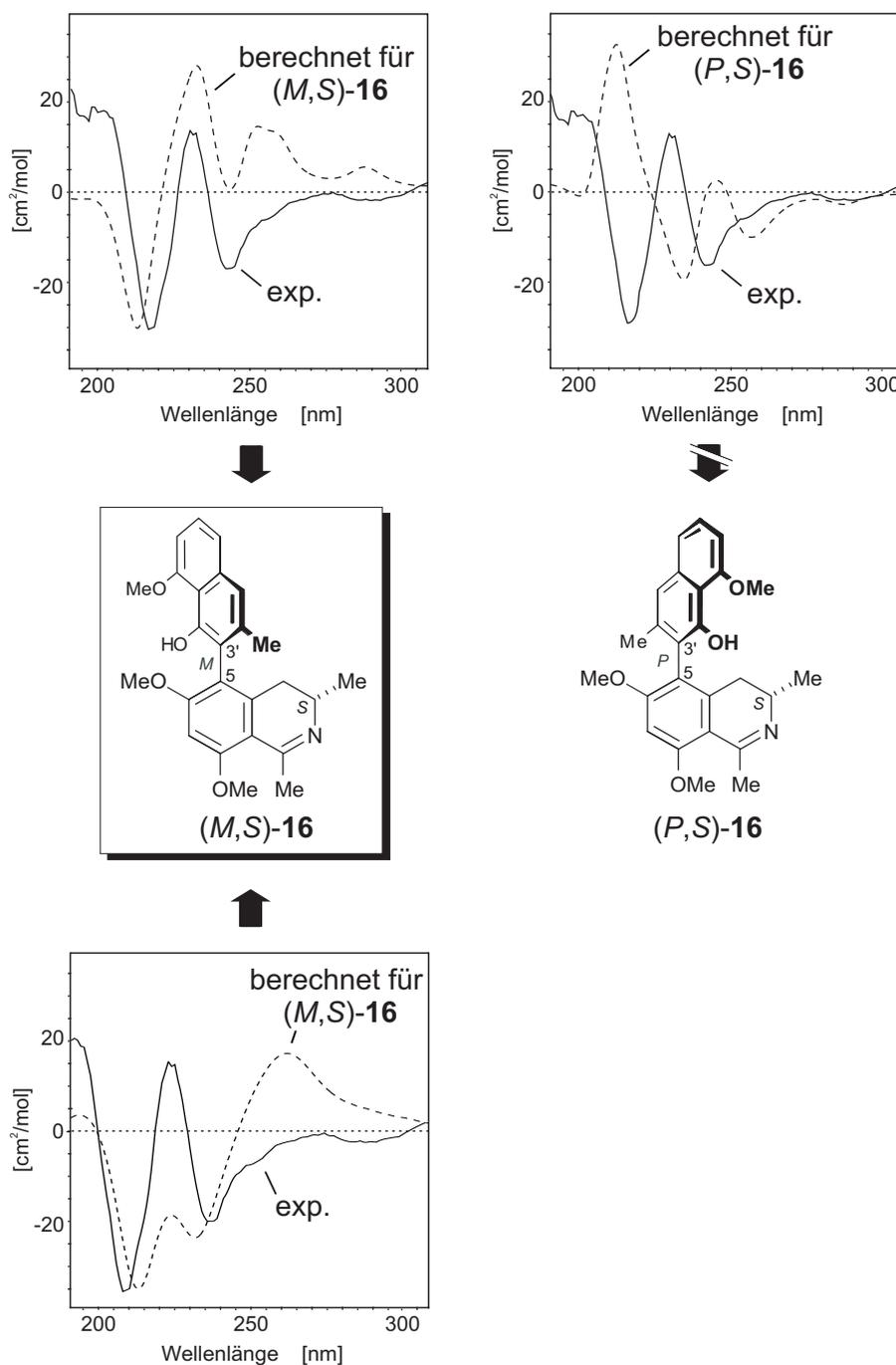


Abb. 17. Bestimmung der axialen Absolutkonfiguration von Ancistrotanin A (**16**) durch Vergleich der für (M,S) -**16** und (P,S) -**16** berechneten CD-Spektren (oben: AM1-Boltzmann; unten: MM3-MD) mit dem Experimentellen.

4.3 Bioaktivität der Alkaloide

Die antiplasmodiale Wirksamkeit der aus den Blättern von *A. tanzaniensis* isolierten Verbindungen **9** und **14-16** lag im mittleren Aktivitätsbereich (siehe Tabelle 2). Die

Ergebnisse für Ancistrotanzanin C (**10**) und Ancistrocladidin (**4**) wurden bereits in Kapitel 3.4, Seite 18 angeführt.

Tabelle 2. Biologische Aktivität in IC₅₀-Werten der Verbindungen **9** und **14-16** [$\mu\text{g/mL}$] im Vergleich zum Standard des jeweiligen Testsystems.

	9	14	15	16
<i>Plasmodium falciparum</i> (Stamm: K1)	0.7	3.6	0.3	0.3
Standard: Chloroquin	0.044	0.044	0.055	0.055
<i>Trypanosoma cruzi</i>	4.3	65.3	1.5	1.7
Standard: Benznidazol	0.29	0.29	0.42	0.42
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	4.3	5.4	0.7	0.7
Standard: Melarsoprol	0.0031	0.0031	0.001	0.001
<i>Leishmania donovani</i>	-- ^a	-- ^a	1.6	1.8
Standard: Miltefosin	0.305	0.305	0.305	0.305
Zytotoxizität L-6 ^b	19.9	42.9	8.1	6.4

^aBestimmung nicht möglich ^bMIC-Werte

Ancistrotanzanin B (**15**) und das neuartige Ancistrotanzanin A (**16**) besaßen beide eine höhere Aktivität gegen *L. donovani*, den Erreger der visceralen Leishmaniose, als das bisher wirksamste bekannte Alkaloid Ancistroealain A (**18**, 4.1 $\mu\text{g/mL}$ ^[28]). Erstaunlicherweise wurde diese Verbesserung der Aktivität von Verbindung **15** um den Faktor 2.5 gegenüber der von **18** nur durch die gegensätzliche Achsenkonfiguration verursacht, da es sich bei den beiden Substanzen um Atrop-Diastereomere handelte. Diese neuen sehr aktiven Strukturen könnten aufgrund ihrer zugleich geringen Zytotoxizität einen wichtigen Beitrag zur Suche nach neuen Wirkstoffen gegen diese Tropenkrankheit liefern.

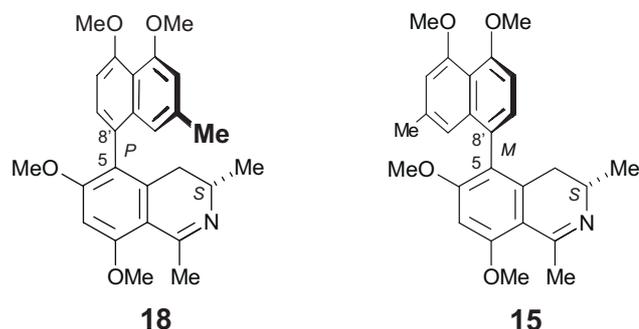


Abb. 18. Strukturen von Ancistroealain A (**18**), dem bisher wirksamsten Alkaloid gegen *L. donovani* und dem neuen, noch wirksameren Ancistrotanzanin B (**15**).

O,N-Dimethylancistrocladin (**14**) und Ancistrosectorin (**9**) zeigten eine schwache Aktivität gegen *T. cruzi* (Chagas-Krankheit), Verbindungen **15** und **16** hingegen eine gute, im Vergleich zum Standard nur 4-fach geringere, Wirksamkeit.

Alle getesteten Alkaloide waren zudem schwach bis nicht aktiv gegen Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, *T. b. rhodesiense*.

Wie bereits in Kapitel 3.4 beschrieben, wurden auch diese Verbindungen in die fortlaufenden QSAR-Untersuchungen miteinbezogen.

4.4 Chemotaxonomische Betrachtung

Alle bisher aus den Blättern von *A. tanzaniensis* isolierten Verbindungen (**4**, **9**, **10**, **14-16**) besitzen eine Sauerstofffunktion an C-6 und eine *S*-Konfiguration an C-3, beides Charakteristika des sog. 'Ancistrocladaceae-Typs'.^[15] Somit gehören die Alkaloide aus *A. tanzaniensis* zur selben Gruppe wie diejenigen der einzig anderen bekannten ostafrikanischen Art *A. robertsonianum*,^[88,89] der indischen Art *A. heyneanus*^[61] und der südostasiatischen Arten, z.B. *A. tectorius*.^[73,90,91] Diese chemotaxonomische Verwandtschaft lässt sich weiterhin durch die Tatsache untermauern, dass sowohl in *A. tanzaniensis* als auch *A. heyneanus* bisher die meisten Vertreter des seltenen 7,3'-Kupplungstyps mit größtenteils sogar identischen Strukturen (Ancistrosectorin, Ancistrocladidin) gefunden wurden. Dies verdeutlichte ein Mischexperiment, bei dem die Blattextrakte beider Arten in einer 1:1-Mischung HPLC-DAD-chromatographisch auf gleiche Verbindungen hin untersucht wurden (siehe Abb. 19).

Im Gegensatz zum 'Ancistrocladaceae-Typ' produzieren zentral- und westafrikanische *Ancistrocladus*-Arten überwiegend Alkaloide des sog. 'Dioncophyllaceae-Typs' (*R*-konfiguriert an C-3 und mit einem Proton anstelle der Sauerstofffunktion an C-6)^[15,92] oder sog. 'Hybrid-Typen' (z.B. mit *R*-Konfiguration an C-3 und einer 6-*O*-Funktion).^[51]

Nicht zuletzt die Tatsache, dass in dieser phytochemisch 'neuen' Pflanzenart ein bisher noch nicht bekannter Kupplungstyp gefunden wurde, und die interessante verwandtschaftliche Beziehung zum südostasiatischen Raum geben *A. tanzaniensis* einen hohen Stellenwert bei der Erforschung dieser einzigartigen Pflanzenfamilie mit ihren ungewöhnlichen Naturstoffen.

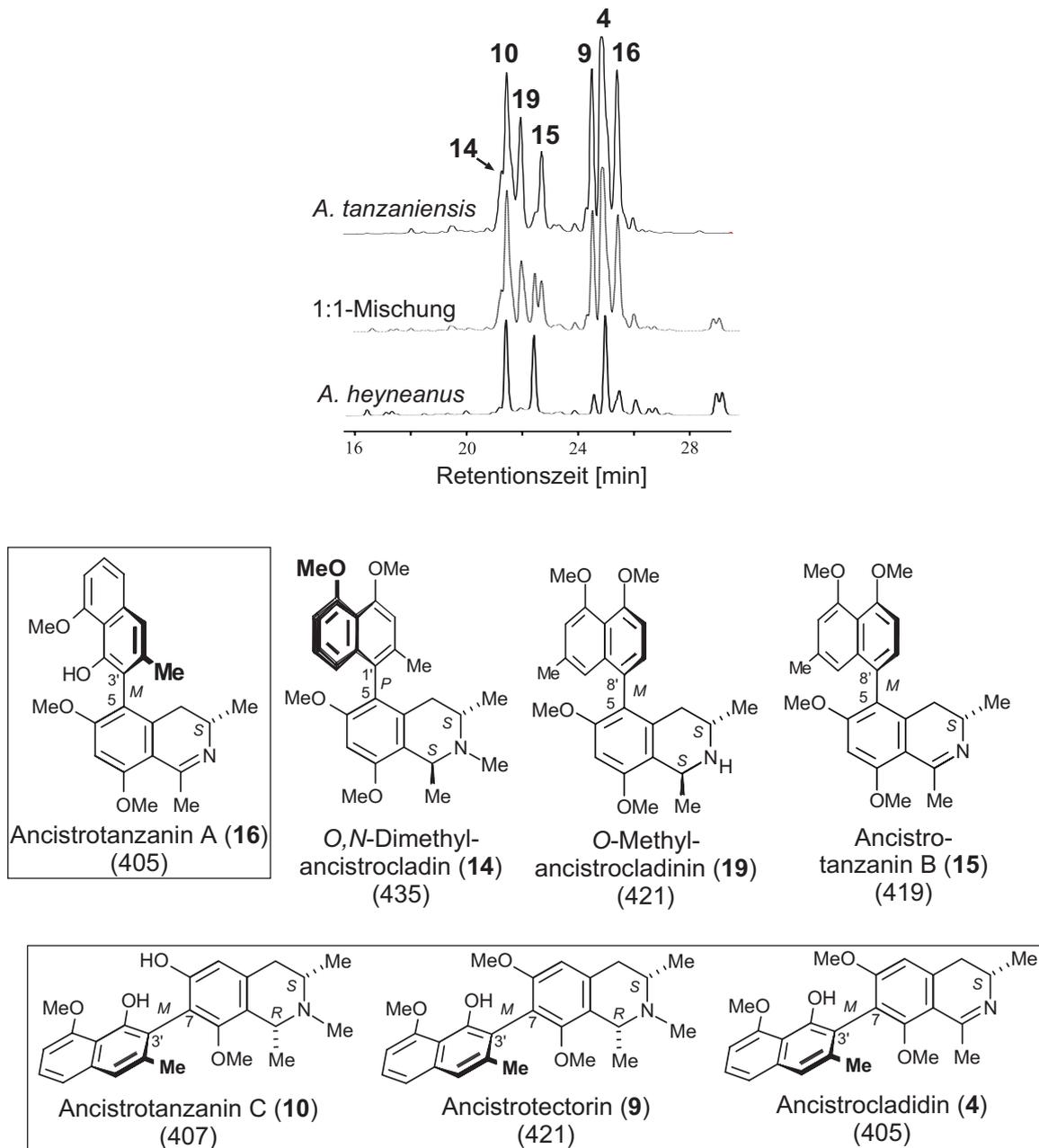


Abb. 19. Untersuchung der chemotaxonomischen Beziehungen von *A. tanzaniensis* und *A. heyneanus* mittels HPLC-Analytik. Das obere und das untere HPLC-Spektrum sind die Reinspektren der jeweiligen Art, das in der Mitte das Mischspektrum. Gleiche Substanzen in beiden Arten bezüglich Retentionszeit, UV-Spektrum und Molekülmasse (Zahl in Klammern) sind als Formeln in Kästen abgebildet. *O*-Methylancistrocladinin (19) und Ancistrotanzanin B (15) wurden von J. Faber aus unserer Arbeitsgruppe isoliert, die übrigen im Rahmen dieser Arbeit.

5 Isolierung der Naphthylisochinolin-Alkaloide aus *Ancistrocladus benomensis* Rischer & Bringmann (Ancistrocladaceae)

5.1 *Ancistrocladus benomensis* Rischer & Bringmann

Bei einer Forschungsexpedition von H. Rischer und M. Wohlfarth aus unserer Arbeitsgruppe im Jahr 1999 nach Malaysia wurde am 2107 m hohen Gunung Benom, Region Pahang, im Kerau Game Reserve gelegen, in einer Höhenregion von 600 bis 1180 m NN eine *Ancistrocladus*-Art gefunden. Das Vorkommen der einzigen in Malaysia bekannten Art *A. tectorius*^[93] war in dieser ungewöhnlich hohen Lage unwahrscheinlich,^[94] so dass eine neue Art vermutet wurde. Ausführliche genetische^[95] Untersuchungen dieser Spezies im Vergleich zu den bekannten *A.-tectorius*-Aufsammlungen aus 24 verschiedenen Lokalitäten in ganz Südostasien bestätigte, dass es sich bei diesem Fund aufgrund abweichender DNA-Sequenzen um eine neue Pflanzenart handelte,^[96] die in Anlehnung an ihren Fundort, den Berg Benom, '*Ancistrocladus benomensis*' benannt werden sollte. Eine botanische Erstbeschreibung war damals wegen fehlender Blüten schwer möglich, es gelang aber, Sämlinge dieser Pflanze im Botanischen Garten der Universität Würzburg zu kultivieren und nach vier Jahren im Frühjahr 2004 erstmalig zum Blühen zu bringen (siehe Abb. 20).^[97]



Abb. 20. Erste Blüten der neuen, botanisch noch nicht beschriebenen Lianenart *A. benomensis* (Botanischer Garten, Würzburg; Foto: Dreyer)

Die Blüten wiesen eine deutliche Zeichnung und Zweifarbigkeit auf, die im Vergleich zu allen bisher bekannten *Ancistrocladus*-Arten einzigartig war und somit auch morphologisch

den Beweis einer neuen Spezies erbrachten, woraufhin nun die wissenschaftliche Beschreibung erfolgen konnte.^[98]

5.2 Isolierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinolin-Alkaloide aus der Rinde von *Ancistrocladus benomensis*

5.2.1 Extraktion und Aufreinigung

Nach einer zweiten Sammelreise nach Malaysia im Jahr 2000 von H. Rischer und K. Wolf stand ausreichendes Blatt- und Rindenmaterial von *A. benomensis* zur ausführlichen phytochemischen Analyse zur Verfügung.

Die luftgetrocknete Rinde wurde zerkleinert und mit Methanol unter Rühren bei Raumtemperatur extrahiert. Der methanolische Extrakt wurde mit Wasser versetzt und gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt, anschließend auf eine geringe verbleibende Methanolmenge eingengt und einer weiteren Flüssig-flüssig-Verteilung mit Dichlormethan unterzogen. Eine kleine Menge des zur Trockene eingedampften Dichlormethan-Extrakts wurde in Methanol gelöst, filtriert und direkt mittels präparativer HPLC unter Verwendung der SymmetryPrep-C-18-Säule und des Standardgradienten (siehe Seite 87) aufgearbeitet. Dabei ließen sich die Verbindungen **20**, **21** und **22** als die drei Hauptkomponenten in reiner Form isolieren.

5.2.2 Strukturaufklärung von Ancistrobenomin A (20)

5.2.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von 20

Das UV-Spektrum der unpolarsten der drei Substanzen überraschte durch ein zusätzliches Maximum bei 363 nm. Die anderen Maxima entsprachen den für Naphthylisochinolin-Alkaloide üblichen Daten. Eine zweite Überraschung brachte die von der hochauflösenden Massenspektrometrie (419.1731 u) abgeleitete Summenformel $C_{25}H_{25}NO_5$, bei der ein Sauerstoffatom mehr vorhanden war als bei den meisten anderen bekannten Alkaloiden. Das gleichzahlige Verhältnis von Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen ließ ein vollständig dehydriertes System vermuten, was durch seine erweiterte Konjugation das neue Maximum im längerwelligen Bereich des UV-Spektrums erklären würde.

Eine dritte Überraschung bot das 1H -NMR-Spektrum. Im aliphatischen Bereich zwischen 1.0 und 1.8 ppm, in dem normalerweise die Signale der Methylgruppen an C-1 und/oder C-3 zu finden sind, konnten keine Resonanzen beobachtet werden. Zudem fehlten das typische Quartett für H-1 bei ca. 4.4 ppm, das 'himbeerförmige', zentrierte Multipllett für H-3 im Bereich von 3.2 bis 4.0 ppm und die beiden Doppeldoublets für die zwei diastereotopen

Protonen an C-4. Im Gegensatz dazu gab es ein zusätzliches sechstes aromatisches Protonensignal (Singulett) bei 6.81 ppm, was die Vermutung einer vollständig dehydrierten Isochinolin-Hälfte bestärkte (siehe Abb. 21a).

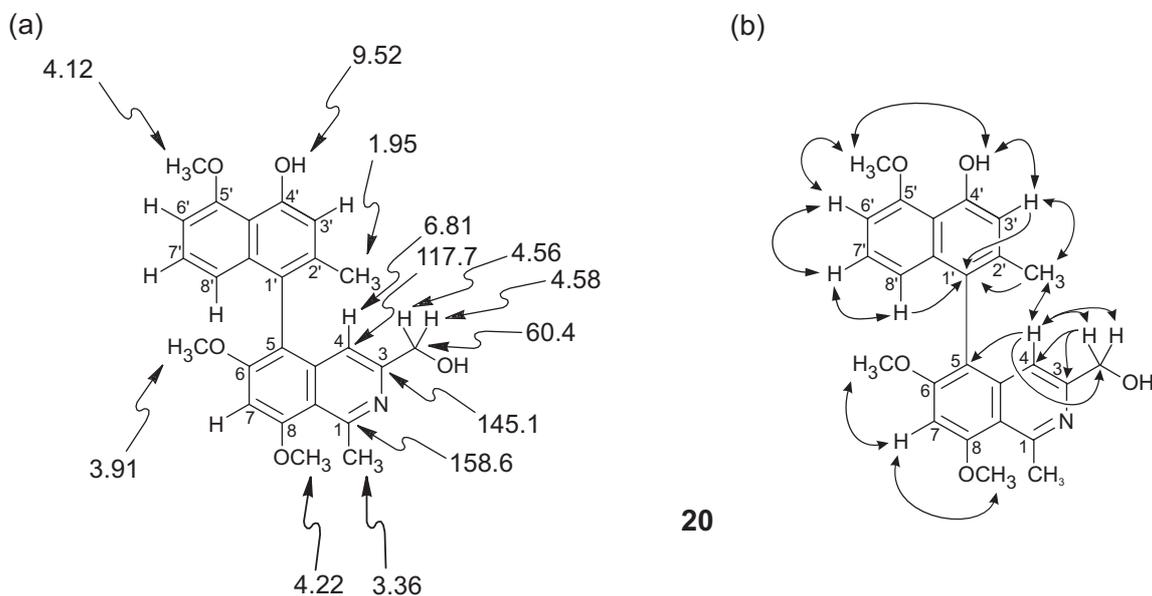


Abb. 21. Für die Strukturaufklärung von Ancistrobenomin A (**20**) (a) ausgewählte chemische ¹H- und ¹³C-NMR-Verschiebungen [ppm] und (b) NOESY- (Doppelpfeil) und HMBC-Wechselwirkungen (einfacher Pfeil).

Signifikante Tieffeld-Verschiebungen der Kohlenstoffsignale von C-1 (158.6 ppm), C-3 (145.1 ppm) und C-4 (117.7 ppm) im ¹³C-NMR-Spektrum, deren eindeutige Zuordnung durch Auswertung der HMQC- und HMBC-Spektren erfolgte, bestätigten die obige Annahme. Das untypische sechste aromatische Proton konnte durch seine HMQC-Korrelation mit C-4 somit dieser Position zugewiesen werden.

Drei der fünf Sauerstofffunktionen konnten als Methoxygruppen identifiziert werden (Singulett bei 3.91, 4.12 und 4.22 ppm). Diese wurden nach Interpretation des NOESY-Spektrums, in dem zwei OMe-Gruppen eine Korrelation zum selben Proton, H-7, und die dritte eine solche zu H-5' zeigten, den Positionen 6, 8 und 5' zugeordnet (siehe Abb. 21b). Bei den verbleibenden zwei Sauerstoffatomen der Summenformel musste es sich demzufolge um Hydroxygruppen handeln, von denen eine anhand des charakteristischen^[58] Signals bei 9.52 ppm und einer NOESY-Wechselwirkung mit H-3' an C-4' lokalisiert wurde. Die zweite (überzählige) OH-Gruppe gehörte zu einer bei Naphthylisochinolin-Alkaloiden zuvor noch nie gefundenen Hydroxymethylengruppe an C-3 des Isochinolin-Teils. Eine solche war vorher nur von dem Naphthalin-freien Isochinolin **23** bekannt, das aus der ebenfalls südostasiatischen Art *A. tectorius* isoliert worden war (siehe Abb. 22).^[93]

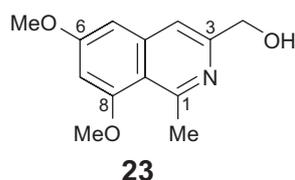


Abb. 22. Struktur von 6,8-Dimethoxy-3-hydroxymethylen-1-methylisochinolin (**23**).

Aus dem Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten des neuen Alkaloids, welches fortan Ancistrobenomin A genannt wurde, mit denen von **23** resultierte eine weitgehende Übereinstimmung bis auf die Multiplizitäten der beiden Methylenprotonen, die bei der hier beschriebenen Verbindung nicht als breites Singulett sondern als zwei Dubletts bei 4.56 und 4.58 ppm mit einer für geminale Protonen typischen Kopplungskonstante von $J = 14.3$ Hz und einem extremen Dacheffekt erschienen. Das Vorhandensein eines Chiralitätselementes, nämlich die rotationsgehinderte Biarylachse, führte zu dieser Veränderung des Signals der nun diastereotopen Protonen. Einen weiteren Beweis für das Vorliegen dieser neuartigen Hydroxymethylgruppe erbrachte sowohl ein negatives Signal bei 60.4 ppm im DEPT135 als auch die durch die Sauerstoff-Substitution bedingte Tieffeld-Verschiebung des entsprechenden Kohlenstoffatoms. Seine Positionierung an C-3 konnte durch eine NOESY-Wechselwirkung der beiden diastereotopen Protonen mit H-4 und durch deren HMBC-Korrelationen mit C-3 und C-4 eindeutig bewiesen werden. H-4 zeigte seinerseits HMBC-Wechselwirkungen mit dem Kohlenstoffatom der CH_2OH -Gruppe (siehe Abb. 21b, Seite 36).

Die Hochfeld-Verschiebung der Methoxygruppe an C-6 (3.91 ppm)^[99] signalisierte die unmittelbare Nähe der Biarylachse, deren Kupplungsposition an C-5 bestimmt wurde, da die andere mögliche Position an C-7 im Isochinolin-Teil durch die oben erwähnten NOESY-Wechselwirkungen von H-7 mit den beiden Methoxygruppen (OMe-6 und OMe-8) eindeutig auszuschließen war.

In der Naphthalin-Hälfte konnte die entsprechende Anknüpfungsstelle zweifelsfrei an C-1' lokalisiert werden, da zum einen die aromatische Methylgruppe an C-2' Hochfeldverschoben^[15] war (1.95 ppm) und zum anderen an allen anderen Positionen Protonen zu finden waren, die im NOESY-Spektrum in folgender Sequenz miteinander korrelierten: $\text{CH}_3\text{-}2' \leftrightarrow \text{H-}3' \leftrightarrow \text{OH-}4' \leftrightarrow \text{OCH}_3\text{-}5' \leftrightarrow \text{H-}6' \leftrightarrow \text{H-}7' \leftrightarrow \text{H-}8'$. Zudem konnten 3J -HMBC-Wechselwirkungen von H-3', H-8' und Me-2' zu ein und demselben quartären Kohlenstoffatom, nämlich C-1', identifiziert werden.

Somit handelte es sich bei Ancistrobenomin A um ein 5,1'-gekoppeltes, vollständig dehydriertes Naphthylisochinolin-Alkaloid mit der Konstitution **20** und einer vorher noch nie nachgewiesenen Hydroxymethylen-Funktionalität an C-3 (siehe Abb. 21, Seite 36).^[100]

5.2.2.2 Die absolute Konfiguration von Ancistrobenomin A (20)

Durch das Fehlen der gewöhnlich an C-1 und/oder C-3 vorhandenen Stereozentren bei Naphthylisochinolin-Alkaloiden blieb die Aufklärung der absoluten Konfiguration an der Biarylachse bei Ancistrobenomin A (**20**), dem einzigen stereogenen Element, übrig. Die Zuordnung zu einem der beiden möglichen Enantiomere erfolgte wieder durch einen CD-Vergleich mit dem bekannten Ancistrocladein^[101,102] (**24**), einem ebenfalls 5,1'-gekuppelten, vollständig dehydrierten, *P*-konfigurierten Alkaloid, das ausgehend von Ancistrocladin (**2**) partialsynthetisch hergestellt worden war (siehe Abb. 23).^[71,103]

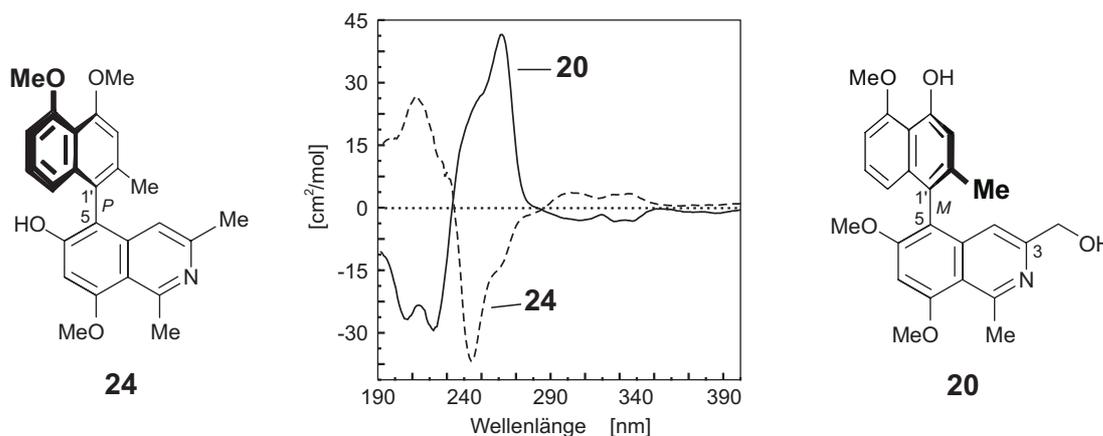


Abb. 23. CD-Spektren von Ancistrocladein (**24**) und dem neu gefundenen Ancistrobenomin A (**20**).

Das CD-Spektrum von Ancistrobenomin A (**20**) war fast völlig spiegelbildlich zu dem von Ancistrocladein (**24**), so dass die Absolute Konfiguration der Biarylachse von **20** klar zu *M* bestimmt werden konnte.

Desweiteren war bemerkenswert, dass Ancistrobenomin A (**20**) überhaupt erst der zweite Vertreter optisch aktiver (CD und $[\alpha]_D \neq 0$), vollständig dehydrierter Naphthylisochinolin-Alkaloide war, der jemals als Naturstoff isoliert worden ist. Bisher war 6-*O*-Methylhamatein (**25**),^[104] isoliert aus *A. cochinchinensis*, der einzige Repräsentant gewesen (siehe Abb. 24), während weitere isolierte Vertreter als racemisch beschrieben worden waren.^[101,110]

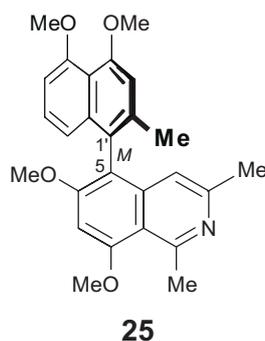


Abb. 24. Struktur von 6-*O*-Methylhamatein (**25**), dem ersten optisch aktiven Naturstoff mit aromatischer Isochinolin-Hälfte.

Einen letzten Beweis über die Richtigkeit der Zuordnung der Axialkonfiguration lieferte erneut der Vergleich der CD-Daten sowie der Drehwerte von Ancistrobenomin A (**20**) mit dem bekannten *M*-konfigurierten 6-*O*-Methylhamatein (**25**). Beide hatten im CD-Spektrum bei 261 nm zuerst einen positiven und dann bei 221 nm einen negativen Cotton-Effekt und einen negativen $[\alpha]_D$ -Wert.

Nachdem nun die Stereostruktur von Ancistrobenomin A (**20**) vollständig aufgeklärt war, ergab sich aber noch die Frage nach der Enantiomerenreinheit dieses Naturstoffs. Jüngste in unserem Arbeitskreis durchgeführte Untersuchungen verschiedenster isolierter Naturstoffe auf ihr natürliches Enantiomerenverhältnis^[105-107] zeigten die Wichtigkeit dieser in der Literatur zum Teil unbeachteten Fragestellung (siehe auch Kap. 7.1, Seite 64). HPLC-Analytik von **20** an chiraler Phase (OD-H) ergab unter verschiedensten chromatographischen Bedingungen (verschiedene Gradienten und Temperaturen) jeweils nur einen Peak, dessen auf- als auch absteigende Flanke mittels LC-CD^[41] im *stop-flow*-Modus das gleiche online-CD-Spektrum zeigte. Demnach scheint Ancistrobenomin A (**20**) in der Pflanze enantiomerenrein vorzuliegen.

5.2.3 Strukturaufklärung von 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**21**)

5.2.3.1 Spektroskopische Charakterisierung von **21**

Das UV-Spektrum der polarsten Hauptkomponente zeigte abermals das für ein vollständig dehydriertes Naphthylisochinolin typische dritte Maximum. Wie schon beim Ancistrobenomin A (**20**) resultierte aus der hochauflösenden Masse von m/z 405.1574 eine Summenformel mit fünf Sauerstoffatomen, $C_{24}H_{23}NO_5$, diesmal aber im Vergleich zu **20** mit einer CH_2 -Einheit (14 u) weniger, was auf ein *O*-Demethyl-Analogon schließen ließ. In der Tat stimmten die 1H -NMR-Spektren von Ancistrobenomin A (**20**) und diesem isolierten Alkaloid bis auf das Fehlen des Hochfeld-verschobenen Methoxygruppensignals und einigen

geringen Abweichungen der chemischen Verschiebungen, bedingt durch MeOH- d_4 anstelle von $CDCl_3$, gut überein. Die anderen beiden OCH_3 -Funktionen (4.01 und 4.06 ppm) konnten mittels NOESY-Wechselwirkungen mit H-6' bzw. H-7 den Positionen 5' bzw. 8 zugeordnet werden (siehe Abb. 25).

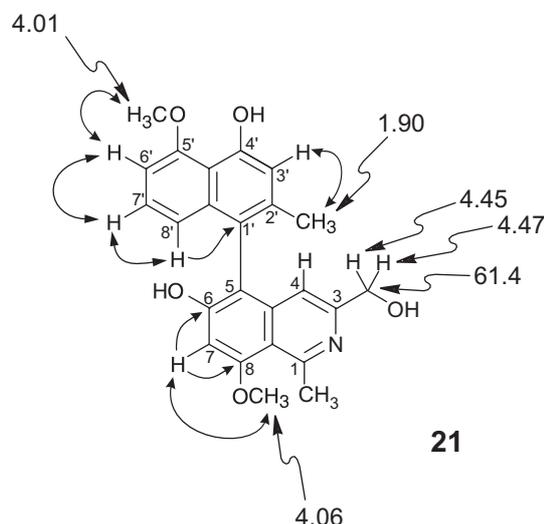


Abb. 25. Relevante 1H - und ^{13}C -NMR-Daten [ppm] sowie NOESY- (Doppelpfeile) und HMBC-Korrelationen zur Bestimmung der Konstitution von 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**21**).

Obwohl H-7 nur eine NOESY-Wechselwirkung mit einer Methoxygruppe erkennen ließ, zeigte es aber, wie auch schon beim Ancistrobenomin A (**20**), zwei HMBC-Korrelationen zu zwei Tieffeld-verschobenen Kohlenstoffatomen, eines davon C-8 wegen der Methoxysubstitution, das andere, C-6, ebenfalls Sauerstoff-substituiert, hier aber nur mit einer OH-Gruppe.

Aufgrund der guten Übereinstimmung im 1H -NMR mit Ancistrobenomin A (**20**) wurde bei dem isolierten Alkaloid ebenfalls eine 5,1'-Kupplungsposition vermutet. Dies ließ sich durch das Spin-Kopplungs-Muster dreier benachbarter Protonen (H-6', H-7' und H-8'), die Hochfeld-verschobene Methylgruppe an C-2' (1.90 ppm), die NOESY-Korrelation von CH_3 -2' mit H-3' und die HMBC-Interaktion von H-8' mit dem quartären Kohlenstoffatom C-1' für die Naphthalin-Hälfte beweisen. Die 5-Position im Isochinolin-Teil wurde durch die oben erwähnten Korrelationen von H-7 bestätigt.

Auch die neuartige Hydroxymethylen-Funktionalität mit den zwei Dubletts bei 4.45 und 4.47 ppm und der ^{13}C -Verschiebung von 61.4 ppm konnte an C-3 identifiziert werden (siehe Abb. 25).

Somit hatte diese Verbindung die Konstitution **21** und war demnach ein neues 6-*O*-Demethyl-Analogon von Ancistrobenomin A (**20**).

5.2.3.2 Die absolute Konfiguration von 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**21**)

Da es sich bei **21** wieder um ein vollständig dehydriertes Naphthylisochinolin-Alkaloid handelte, blieben die Fragen nach der absoluten axialen Konfiguration und der Enantiomerenreinheit zu beantworten. Erstere konnte leicht durch einen Vergleich der CD-Spektren von **21** mit Ancistrobenomin A (**20**, s.o.) geklärt werden. Beide Spektren verliefen gleich, so dass auch bei dem 6-*O*-Demethyl-Derivat von **20** eine *M*-Konfiguration vorlag und das Alkaloid **21** demzufolge 6-*O*-Demethylancistrobenomin A benannt wurde (siehe Abb. 26).

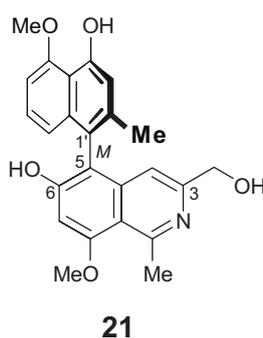


Abb. 26. Struktur von 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**21**).

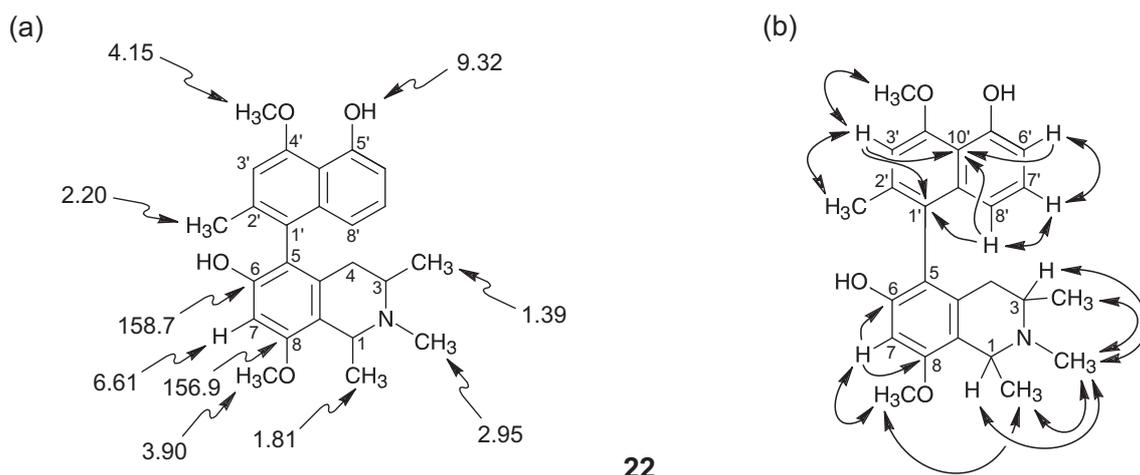
Die Untersuchung der Enantiomerenreinheit von 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**21**) resultierte wie auch schon bei **20** in dem Ergebnis, dass **21** in der Natur bis zur Nachweisgrenze vollständig *M*-konfiguriert vorliegt.

5.2.4 Strukturaufklärung von 5'-*O*-Demethylancistroclin (**22**)

5.2.4.1 Spektroskopische Charakterisierung von **22**

Die dritte Verbindung, deren Polarität zwischen der von **20** und **21** lag, konnte anhand der Summenformel von $C_{25}H_{29}NO_4$ und dem UV-Spektrum einem 'gewöhnlichen' Naphthylisochinolin-Alkaloid zugeordnet werden.

Im 1H -NMR-Spektrum waren alle Signale eines *N*-methylierten Tetrahydroisochinolins zu erkennen: die Methylgruppen an C-1 (1.81 ppm), an C-3 (1.39 ppm) und die charakteristische^[51] *N*-CH₃-Gruppe bei 2.95 ppm (siehe Abb. 27a). Letztere wurde zusätzlich durch NOESY-Wechselwirkungen mit allen vier benachbarten Protonen (H-1, CH₃-1, H-3, CH₃) eindeutig lokalisiert (siehe Abb. 27b).



22

Abb. 27. Für die Strukturaufklärung von 5'-O-Demethylancistroclin (**22**) ausgewählte (a) chemische ¹H- und ¹³C-NMR-Verschiebungen [ppm] und (b) NOESY- (Doppelpfeile) und HMBC-Korrelationen (einfache Pfeile).

In der Naphthalin-Hälfte konnte die Kupplungsposition der Biarylachse nur an C-1' oder C-3' platziert sein, da die aromatische Methylgruppe (CH₃-2') Hochfeld-verschoben (2.20 ppm) und somit nahe der Achse war und die anderen möglichen Anknüpfungsstellen an C-6' und C-8' mit Protonen besetzt waren, die das typische Spin-Kopplungs-Muster von drei benachbarten Protonen zeigten (je ein Doppeldublett für H-6', H-7' und H-8'). Von den beiden übrigen zur Auswahl stehenden Positionen, 1' oder 3', konnte letztere ausgeschlossen werden, da von einem Proton an diesem Kohlenstoffatom NOESY-Interaktionen sowohl zu CH₃-2' als auch zu einer Methoxygruppe bei 4.15 ppm, die demzufolge an C-4' lokalisiert war, zu beobachten waren. ³J-HMBC-Korrelationen von H-8' und H-3' zu dem quartären C-1' bestätigten diese Annahme. Eine Verwechslung mit dem ebenfalls quartären C-10', das auch mit den beiden Protonen korrelierte, konnte ausgeschlossen werden, da in diesem Fall noch eine zusätzliche HMBC-Wechselwirkung mit H-6' zu sehen wäre.

Das verbleibende aromatische Singulett bei 6.61 ppm konnte als H-7 in der Isochinolin-Hälfte identifiziert werden, da es HMBC-Wechselwirkungen mit zwei Tieffeld-verschobenen Kohlenstoffatomen (158.7 und 156.9 ppm) zeigte, die typischerweise Sauerstofffunktionen besaßen und den Positionen 6 und 8 zugeordnet wurden. Von H-7 ging auch eine NOESY-Korrelation zu einer Methoxygruppe bei 3.90 ppm aus, die ihrerseits mit CH₃-1 korrelierte und somit eindeutig an C-8 gelegen war.

Somit besitzt dieses 5,1'-gekuppelte *N*-methylierte Naphthyltetrahydroisochinolin-Alkaloid mit Methoxygruppen an C-4' und C-8 und Hydroxygruppen an den beiden übrigen durch Oxygenierung Tieffeld-verschobenen Kohlenstoffatomen C-5' und C-6 die Konstitution **22**. Mit Ausnahme der OH-5'-Gruppe stimmten die spektroskopischen Daten dieses neuen

Naturstoffs gut mit denen des bekannten Alkaloids Ancistroclin (**26**)^[108,109] überein (siehe Abb. 28).

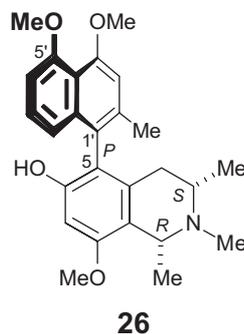


Abb. 28. Struktur des bekannten Alkaloids Ancistroclin (**26**).

5.2.4.2 Die absolute Konfiguration von 5'-*O*-Demethylancistroclin (**22**)

Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung der räumlichen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (NOESY) zeigte sich ein Signal zwischen den Protonen H-1 und H-3, welches auf eine relative *cis*-Konfiguration hinwies, über die absolute Konfiguration beider Stereozentren jedoch noch keine Aussage treffen ließ (siehe Abb. 29). Dies gelang erst mit der Bestimmung der absoluten Konfiguration an C-3 mit Hilfe des oxidativen Ruthenium-katalysierten chemischen Abbaus,^[54] der anhand des Abbauprodukts von 3*S*-(*N*-Methylamino)buttersäure (**12**) eine *S*-Konfiguration ergab. In Folge der relativen *cis*-Konfiguration von H-1 und H-3 war C-1 entsprechend *R*-konfiguriert (siehe Schema 1, Seite 15).^[56]

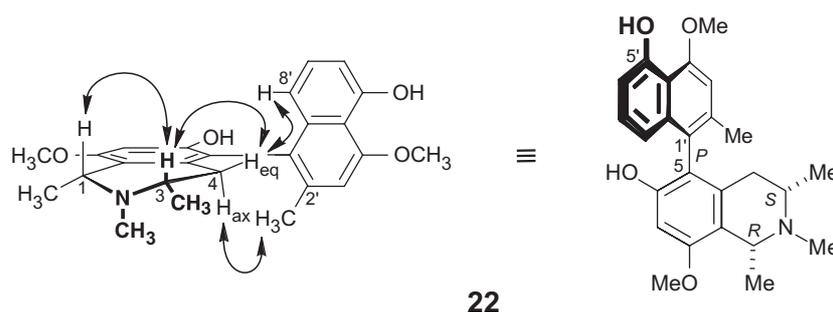


Abb. 29. Für die Bestimmung der relativen und absoluten Konfiguration von 5'-*O*-Demethylancistroclin (**22**) wichtige NOESY-Wechselwirkungen.

Ausgehend von der bekannten absoluten Konfiguration an C-3 konnte eines der beiden diastereotopen Protonen an C-4 zur äquatorialen Stellung durch die NOESY-Interaktion mit H-3 und anhand der kleinen Kopplungskonstanten von 3.3 Hz im ¹H-NMR-Spektrum eindeutig zugeordnet werden. Dadurch war es nun auch möglich, die absolute Konfiguration

an der Biarylachse durch NOESY-Korrelationen von H_{eq-4} mit $H-8'$ und H_{ax-4} mit CH_3-2' zu P zu bestimmen (siehe Abb. 29).

Zusätzlich wurde die P -Konfiguration noch durch einen Vergleich der CD-Daten mit denen des bekannten, P -konfigurierten O -Methylancistroclins^[70] (**17**, siehe Abb. 13, Seite 24), einem 5',6- O -Dimethyl-Derivat dieser Verbindung, bestätigt.

Das neue Alkaloid hatte somit die Stereostruktur **22** (siehe Abb. 29) und wurde 5'- O -Demethylancistroclin genannt.^[100]

5.2.5 Testung der Alkaloide auf ihre biologische Aktivität

Über die antiprotozoische Aktivität von vollständig dehydrierten Naphthylisochinolin-Alkaloiden war bisher so gut wie nichts bekannt, da die bis *dato* literaturbekanntesten^[101,102,104,110-113] Verbindungen nie getestet worden waren. Ancistrobenomin A (**20**) und sein 6- O -Demethyl-Derivat **21**, die ersten Testkandidaten derartiger Alkaloide, zeigten aber leider keine herausragenden Bioaktivitäten (siehe Tabelle 3). Die antiplasmodiale Wirksamkeit von **20** und 5'- O -Demethylancistroclin (**22**) war im mittleren Bereich (ca. 12-18-fach schlechter als der Standard). Auch die neuartige Hydroxymethylengruppe und dadurch das Vorhandensein einer weiteren Hydroxyfunktion im Molekül bei **20** und **21** konnte keine verbesserte Aktivität gegen *P. falciparum* bewirken, obwohl die bisherigen Bioaktivitäts-Studien^[23,114,115] gezeigt hatten, dass die aktivsten Vertreter wie Dioncopeltin A (**27**)^[116] und Dioncophyllin C (**28**)^[117] mehr Hydroxy- als Methoxygruppen besitzen (siehe Abb. 30).

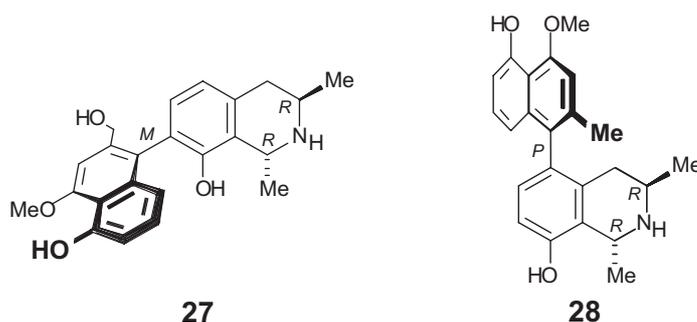


Abb. 30. Strukturen von Dioncopeltin A (**27**, 0.005 $\mu\text{g/mL}$) und Dioncophyllin C (**28**, 0.006 $\mu\text{g/mL}$), zwei hochaktiven Alkaloiden gegen Erreger der Gattung *Plasmodium* (Standard Choloquin: 0.005 $\mu\text{g/mL}$).

Gegen Erreger der Chagas-Krankheit (*T. cruzi*) war Ancistrobenomin A (**20**) nur neunmal weniger aktiv als der Standard, die Verbindungen **21** und **22** waren hingegen deutlich weniger aktiv. Schwache bis keine Wirksamkeit besaßen alle drei Substanzen gegen *L. donovani* und *T. b. rhodesiense*.

Tabelle 3. Biologische Aktivität in IC₅₀-Werten der Verbindungen **20-22** [$\mu\text{g/mL}$] im Vergleich zum Standard des jeweiligen Testsystems.

	20	21	22
<i>Plasmodium falciparum</i> (Stamm: K1) Standard: Chloroquin 0.041	0.76	2.18	0.51
<i>Trypanosoma cruzi</i> Standard: Benznidazol 0.55	4.8	23.4	36.4
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> Standard: Melarsoprol 0.00095	1.3	14.7	2.2
<i>Leishmania donovani</i> Standard: Miltefosin 0.305	>10	>30	18.8
Zytotoxizität L-6 ^a	12.3	59.9	15.5

^aMIC-Werte

5.3 Isolierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinolin-Alkaloide aus den Blättern von *Ancistrocladus benomensis*

5.3.1 Extraktion und Aufreinigung

Das luftgetrocknete Blattmaterial wurde gemahlen und mit einem 1:1-Gemisch aus Methanol und Dichlormethan über Nacht mazeriert. Nach Filtration und Eindampfen des Blatthextrakts wurde dieser in einer geringen Menge Methanol erneut gelöst und das Chlorophyll und andere lipophile Komponenten mittels FCPC^[118] (Fast Centrifugal Partition Chromatography), einer neuartigen flüssig-flüssig-chromatographischen Methode, in größerem Maßstab abgetrennt. Wie bei anderen derartigen Methoden, wie z.B. der High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC),^[119] wird auch bei der FCPC ein zweiphasiges Lösungsmittelgemisch eingesetzt, wobei wahlweise die obere oder die untere Phase als stationäre Phase dient. Im Aufbau unterscheidet sich die FCPC aber deutlich von der HSCCC, da es sich um einen Rotor mit zentraler Achse handelt, in dem sich mehrere Hundert hintereinander geschaltete diskrete Kammern befinden, in denen die Verteilung der Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase stattfindet. Das ganze System wird dafür in schnelle Rotation (bis 1200 rpm) versetzt, wodurch die stationäre Phase zurückgehalten wird. Diese Methode fand bereits sehr erfolgreiche Anwendung in der Naturstoffisolierung.^[120]

Aus dem 'entfetteten' Extrakt wurden dann mittels präparativer HPLC die Reinsubstanzen **29a**, **30**, **31** und **32** isoliert.

5.3.2 Strukturaufklärung von *ent*-Dioncophyllin A (29a)

5.3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von 29a

Das UV-Spektrum der polarsten Hauptkomponente zeigte abermals, wie schon bei den aromatischen Alkaloiden **20** und **21** aus der Rinde von *A. benomensis* (siehe Kap. 5.2, Seite 35), ein drittes Maximum im längerwelligen Bereich, was auch in diesem Fall ein vollständig dehydriertes Naphthylisochinolin vermuten ließ. Die Molekülmasse von m/z 373 war aber für ein Naphthylisochinolin-Alkaloid des für Südostasien zu erwartenden Ancistrocladaceae-Typs^[15] sehr niedrig. Auch die Summenformel $C_{24}H_{23}NO_3$, ermittelt durch HREIMS, überraschte, da derartige Naturstoffe mit nur drei Sauerstofffunktionen bisher nur aus Pflanzen, die in West- und Zentralafrika vorkommen, gefunden wurden. So z.B. das Dioncophyllin A (**33**)^[121] aus *Triphyophyllum peltatum*, welches dem Dioncophyllaceae-Typ angehört bzw. das Dioncolin A (**34**)^[122] aus *A. abbreviatus*, das dem inversen Hybrid-Typ zugeschrieben wird (siehe Abb. 31).

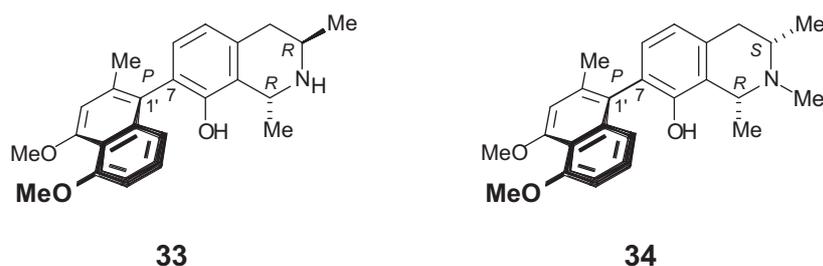


Abb. 31. Strukturen von Dioncophyllin A (**33**) und Dioncolin A (**34**), zwei Alkaloiden aus afrikanischen Lianen mit 'nur' drei Sauerstofffunktionen.

Da im aliphatischen Signalbereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums zwischen 1.10 und 1.80 ppm die beiden charakteristischen Dubletts der Methylgruppen an C-1 und C-3 nicht vorhanden waren, bestätigte das Vorliegen dreier Singulettts bei 2.13 (Singulett der Methylgruppe des Naphthalin-Bausteins), 2.72 und 3.29 ppm die Vermutung, dass es sich um ein voll dehydriertes Naphthylisochinolin-Alkaloid handelte, wodurch die Signale der beiden Methylgruppen ($\text{CH}_3\text{-3}$ und $\text{CH}_3\text{-1}$) des Isochinolin-Bausteins Tieffeld-verschoben waren (siehe Abb. 32a).

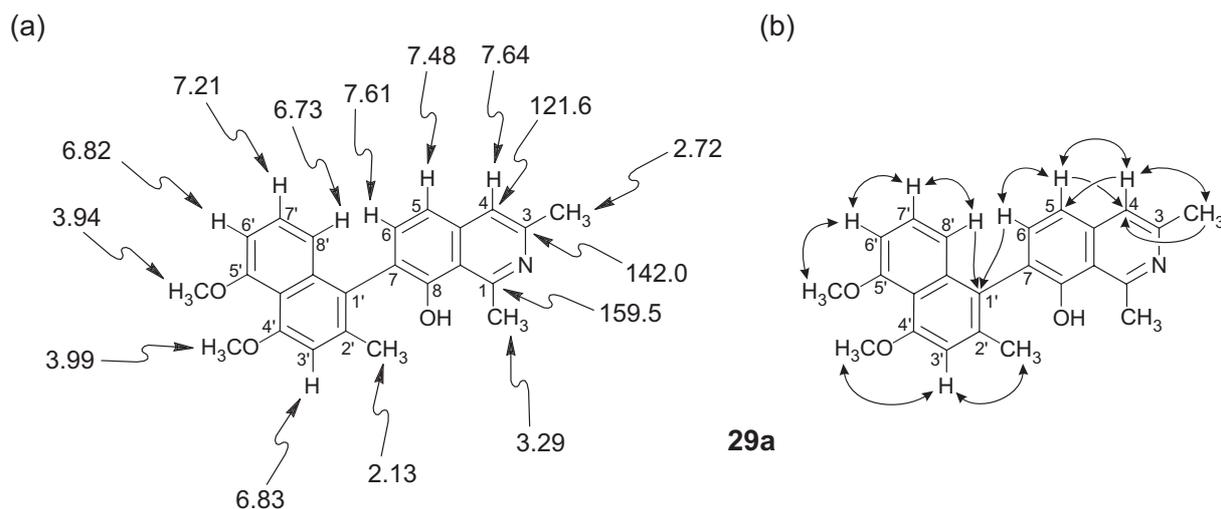


Abb. 32. (a) Darstellung ausgewählter chemischer Verschiebungen des ¹H-NMR- und des ¹³C-NMR-Spektrums [ppm] von *ent*-Dioncophyllein A (**29a**); (b) strukturelevante ROESY- (Doppelpfeile) und HMBC-Korrelationen (einfache Pfeile).

Die beiden Singulets bei 3.94 und 3.99 ppm konnten zwei Methoxygruppen zugeordnet werden. Im aromatischen Bereich waren sieben anstatt der 'üblichen' fünf Protonensignale vorhanden, was zum einen die Aromatizität der Isochinolin-Hälfte durch das Singulett von H-4 bei 7.64 ppm bestätigte, zum anderen aber auf eine Konstitution des Dioncophyllaceae-Typs mit einem Proton an C-6 anstelle einer Sauerstofffunktion hinwies. Zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von jeweils $J = 8.2$ Hz ließen sich den beiden *ortho*-ständigen Protonen H-5 und H-6 im Isochinolin-Teil zuordnen. Im COSY-Spektrum war eine skalare Kopplung zwischen drei benachbarten Protonen sichtbar, die demzufolge als H-6' (6.82 ppm), H-7' (7.21 ppm) und H-8' (6.73 ppm) identifiziert wurden. Aus diesem Grund konnte eine 1'- oder 3'-Kupplung des Naphthalin-Bausteins mit der Isochinolin-Hälfte angenommen werden. Darüber hinaus waren die Protonen des Singulets bei 2.13 ppm (CH₃-2') abgeschirmt, was für eine 'achsennahe' Position der Methylgruppe sprach. Die Positionen der beiden Methoxygruppen und der Anknüpfungsstelle der Biarylachse im Naphthalin-Teil wurden durch die ROESY-Korrelationssequenzen CH₃-2' (2.13 ppm) ↔ H-3' (6.83 ppm) ↔ OCH₃-4' (3.99 ppm) und H-8' (6.73 ppm) ↔ H-7' (7.21 ppm) ↔ H-6' (6.82 ppm) ↔ OCH₃-5' (3.94 ppm) lokalisiert (siehe Abb. 32b). Somit wurden die Methoxygruppen eindeutig den Positionen an C-4' und C-5' zugeordnet und C-1' als einzig übrig bleibende Kupplungsposition des Naphthalin-Bausteins festgelegt.

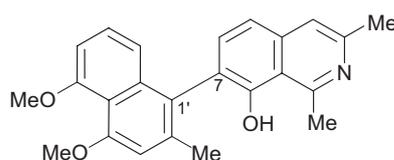
Durch eine weitere ROESY-Korrelationssequenz CH₃-3 (2.72 ppm) ↔ H-4 (7.64 ppm) ↔ H-5 (7.48 ppm) ↔ H-6 (7.61 ppm) wurde die 7-Position der Isochinolin-Hälfte als Anknüpfungsstelle des Naphthalin-Teils bestimmt.

Somit besaß die isolierte Verbindung die Konstitution **29a** (siehe Abb. 32). Dieses 7,1'-gekoppelte, vollständig dehydrierte Naphthylisochinolin-Alkaloid mit zwei Methoxygruppen an C-4' und C-5' und einer Hydroxygruppe (der dritten Sauerstofffunktion) an C-8 war mit dem Proton an C-6 anstelle einer Sauerstofffunktion der erste Vertreter eines Dioncophyllaceen-Alkaloids^[15] in Asien.^[123]

Die Konstitution wurde weiterhin durch eine Reihe von ³J-HMBC-Korrelationen zu den beiden quartären Brückenkopfatom C-7 (127.7 ppm) und C-1' (122.2 ppm) zweifelsfrei bestätigt, wie zum Beispiel von H-8' (6.73 ppm) und H-6 (7.61 ppm) zu C-1' und von H-5 (7.48 ppm) zu C-7 und C-4, welches auch mit den Protonen der Methylgruppe an C-3 wechselwirkte (siehe Abb. 32b). H-4 zeigte zudem eine HMBC-Wechselwirkung mit dem tertiären C-5, was die 7-Kupplungsposition der Isochinolin-Hälfte endgültig bewies.

5.3.2.2 Die absolute Konfiguration von **29a**

Da es sich bei dem Alkaloid **29a** um ein vollständig dehydriertes Naphthylisochinolin-Alkaloid handelte, wies das Molekül nur ein stereogenes Element, die rotationsgehinderte Biarylachse, auf, dessen absolute Konfiguration zu bestimmen war. Die Suche nach strukturell nahe verwandten Verbindungen mit bekannter Absolutkonfiguration führte zuerst zum partial- und totalsynthetisch dargestellten Tetradehydrotriphyphyllin (**35**, siehe Abb. 33),^[110] welches sogar die gleiche Konstitution wie das Alkaloid **29a** besaß, in der Literatur aber nur als Racemat beschrieben war. Demzufolge standen keine chiroptischen Vergleichsdaten zur Verfügung.



35

Abb. 33. Struktur von Tetradehydrotriphyphyllin (**35**).

Ausgehend von Dioncophyllin A (**33**, Abb. 31), das bis auf den Hydrierungsgrad des Isochinolin-Teils ebenfalls die gleiche Konstitution wie **29a** hatte, erhielt man durch eine 'milde' Dehydrierung unter Beibehaltung der absoluten Achsenkonfiguration das *P*-konfigurierte Tetradehydrodioncophyllin A, welches Dioncophyllin A (**29b**) genannt wurde.^[124] Dessen Absolutkonfiguration konnte durch CD-Berechnungen eindeutig belegt werden, so dass das CD-Spektrum von **29b** eine hervorragende Vergleichsmöglichkeit mit dem von **29a** bot (siehe Abb. 34).

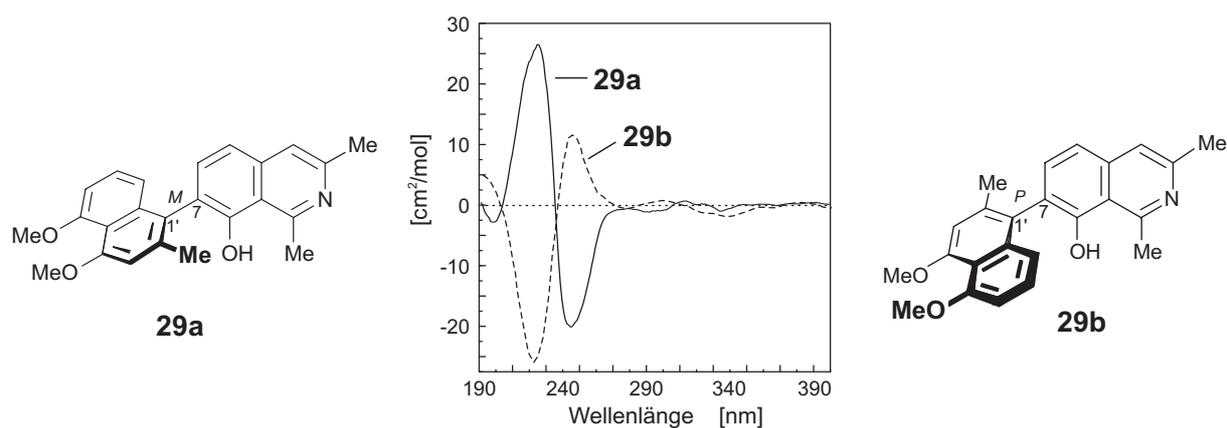


Abb. 34. CD-Spektren von *ent*-Dioncophyllein A (**29a**) und des bekannten Dioncophylleins A (**29b**) im Vergleich.

Aus dem spiegelbildlichen Verlauf des CD-Spektrums von **29a** konnte die (zumindest überwiegende) absolute Konfiguration an der Achse leicht zu *M* bestimmt werden. Somit war der neue isolierte Naturstoff **29a** das Enantiomer von Dioncophyllein A (**29b**) und wurde *ent*-Dioncophyllein A genannt.

Wie auch schon beim Ancistrobenomin A (**20**, Kap. 5.2.2.2) ergab sich beim *ent*-Dioncophyllein A (**29a**) die Frage nach der Enantiomerenreinheit. Dazu war die Etablierung einer entsprechenden Enantiomerenanalytik an chiraler Phase nötig. Zur Testung des Systems wurde ein Racemat von **29b** verwendet, welches Frau Hartner nach Literaturangaben^[125] hergestellt hatte. Beide Enantiomere konnten in zwei basisliniengetretenen Peaks im Verhältnis 1:1 detektiert werden. Mittels LC-CD erfolgte sogar noch die Zuordnung der beiden Peaks zum entsprechenden Enantiomer. Anschließend wurde nun der isolierte Naturstoff **29a** mittels dieser Analytik untersucht. Er zeigte im HPLC-CD-Experiment bei 225 nm ein Verhältnis von *M* zu *P* von 93 zu 7. Somit war *ent*-Dioncophyllein A (**29a**) das erste Naphthylisochinolin-Alkaloid, welches weder als Racemat noch enantiomerenrein in der Natur vorkommt.

5.3.3 Strukturaufklärung von Dioncophyllein D (**30**)

5.3.3.1 Spektroskopische Charakterisierung von **30**

Das UV-Spektrum mit drei Maxima, die Molekülmasse von m/z 373 und sogar die Summenformel C₂₄H₂₃NO₃ war mit den Daten von **29a** identisch, nur eluierte diese zweite Hauptkomponente geringfügig später in der HPLC, so dass ein strukturell sehr ähnliches Isomer von **29a** vermutet wurde. Auch im ¹H-NMR-Spektrum waren im aliphatischen Signalbereich zwischen 1.10 und 1.80 ppm, wie schon bei **29a**, die beiden charakteristischen Dubletts der Methylgruppen an C-1 und C-3 nicht vorhanden. Das Vorliegen dreier Singulett

bei 2.30 (Singulett der Methylgruppe des Naphthalin-Bausteins), 2.75 und 3.35 ppm bestätigte die Vermutung, dass es sich wieder um ein vollständig dehydriertes Naphthylisochinolin-Alkaloid handelte, wodurch die Signale der beiden Methylgruppen ($\text{CH}_3\text{-3}$ und $\text{CH}_3\text{-1}$) des Isochinolin-Bausteins im Vergleich zu Tetrahydroisochinolinien Tieffeld-verschoben waren (siehe Abb. 35a).

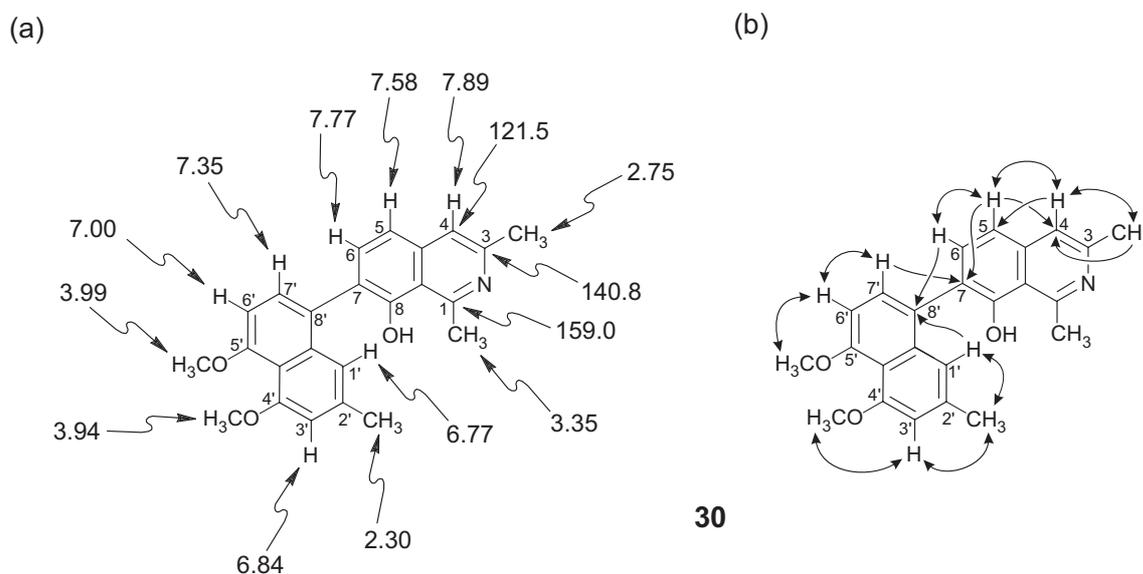


Abb. 35. Für die Strukturaufklärung von Dioncophyllin D (**30**) (a) ausgewählte ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Verschiebungen [ppm] und (b) strukturrelevante ROESY- (Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (einfache Pfeile).

Diesmal ließ aber das auf 2.30 ppm in Richtung des tieferen Feldes verschobene Signal der Methylgruppe des Naphthalin-Teils auf eine 'achsenferne' Kupplungsposition an C-6' oder C-8' schließen. Die beiden Singulets bei 3.94 und 3.99 ppm konnten zwei ebenfalls von der Biarylachse entfernt liegenden Methoxygruppen zugeordnet werden. Im aromatischen Bereich traten wieder sieben anstatt der 'üblichen' fünf Protonensignale auf, was zum einen die Aromatizität der Isochinolin-Hälfte durch das Singulett von H-4 bei 7.89 ppm bestätigte, zum anderen aber auf eine Struktur des Dioncophyllaceae-Typs mit einem Proton an C-6 anstelle einer Sauerstofffunktion hinwies. Die zwei Dubletts bei 7.58 und 7.77 ppm mit einer Kopplungskonstante von jeweils $J = 8.1$ Hz wurden den beiden *ortho*-ständigen Protonen H-5 und H-6 im Isochinolin-Teil zugeordnet. Anstelle des pseudo-Tripletts von H-7' beim *ent*-Dioncophyllin A (**29a**) war ein weiteres Dublett und ein Singulett im Aromatenbereich vorhanden, was die Vermutung eines anderen Kupplungstyps als 7,1' bei Verbindung **29a** bestärkte. Im COSY-Spektrum konnten zwei Paare von Kreuzpeaks zugeordnet werden; das eine aufgrund einer skalaren Kopplung zwischen den beiden benachbarten Protonen H-5 (7.58 ppm) und H-6 (7.77 ppm), das andere aufgrund einer skalaren Kopplung zwischen den beiden

benachbarten Protonen H-6' (7.00 ppm) und H-7' (7.35 ppm). Diese Befunde waren im Einklang mit der obigen Vermutung, dass eine 8'- oder 6'-Kupplung des Naphthalin-Bausteins mit der Isochinolin-Hälfte vorlag. Die Frage nach der Position der beiden Methoxygruppen und der Kupplungsstelle im Naphthalin-Teil wurde durch die ROESY-Korrelationssequenzen H-1' (6.77 ppm) \leftrightarrow CH₃-2' (2.30 ppm) \leftrightarrow H-3' (6.84 ppm) \leftrightarrow OCH₃-4' (3.94 ppm) und H-7' (7.35 ppm) \leftrightarrow H-6' (7.00 ppm) \leftrightarrow OCH₃-5' (3.99 ppm) beantwortet (siehe Abb. 35b). Somit wurden die Methoxygruppen eindeutig den Positionen an C-4' und C-5' zugeordnet und C-8' als einzig übrig bleibende Kupplungsposition des Naphthalin-Bausteins festgelegt.

Die Anknüpfungsstelle der Naphthalin-Hälfte an den Isochinolin-Baustein ließ sich durch eine weitere ROESY-Korrelationssequenz CH₃-3 (2.75 ppm) \leftrightarrow H-4 (7.89 ppm) \leftrightarrow H-5 (7.58 ppm) \leftrightarrow H-6 (7.77 ppm) an Position 7 lokalisieren. Somit besaß das neue Alkaloid die Konstitution **30** mit den gleichen Substituenten wie bei **29a**, nämlich zwei Methoxygruppen an C-4' und C-5' und einer Hydroxyfunktion an C-8. Allerdings handelte es sich um ein 7,8'-gekuppeltes Isomer.

Eine Reihe von ³J-HMBC-Korrelationen zu den beiden Brückenkopfatom C-7 (126.5 ppm) und C-8' (124.7 ppm) bewiesen diese Konstitution, so zum Beispiel von H-1' (6.77 ppm) und H-6 (7.77 ppm) zu C-8' und insbesondere von H-5 (7.58 ppm) und H-7' (7.35 ppm) zu C-7, wodurch die 7,8'-Kupplungsposition eindeutig bestätigt wurde (siehe Abb. 35b).

Somit handelte es sich bei dem isolierten Naturstoff **30** um das neuartige 5'-*O*-Methyltetrahydro-Derivat von Dioncophyllin D (**36**), welches vormals durch Totalsynthese dargestellt worden war.^[126]

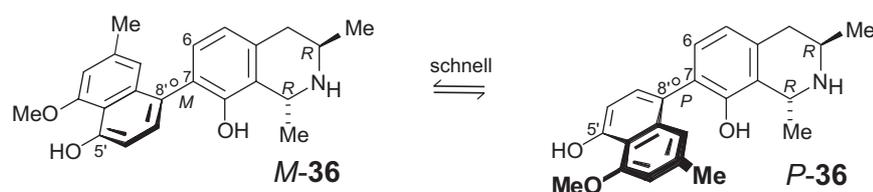


Abb. 36. Struktur von Dioncophyllin D (**36**).

Dieses Alkaloid **30** wurde Dioncophyllin D^[123] genannt und gehörte ebenfalls dem Dioncophyllaceae-Typus^[15] bezüglich der fehlenden *O*-Funktion an C-6 an. Es unterschied sich von *ent*-Dioncophyllin A (**29a**) nur durch die Kupplungsposition in der Naphthalin-Hälfte (8' statt 1').

5.3.3.2 Die absolute Konfiguration von Dioncophyllein D (30)

Da im CD-Spektrum von Verbindung **30** kein Cotton-Effekt beobachtet und ein Drehwert von null gemessen wurde, kam die Frage auf, ob es sich um ein Racemat konfigurativer stabiler Enantiomere handelte oder ob die Achse konfigurativer labil war. Ersteres konnte ausgeschlossen werden, da eine Trennung an chiraler Phase unter verschiedensten chromatographischen Bedingungen ausblieb und auch die Analyse der LC-CD-Spur am auf- und im absteigenden Schenkel des Peaks keine unterschiedlichen online-CD-Spektren hervorbrachte. Durch das Fehlen von Substituenten an C-6 und C-7' ist die Rotationsbarriere sehr klein, so dass das Molekül bei Raumtemperatur leicht durchdreht (siehe Abb. 37).

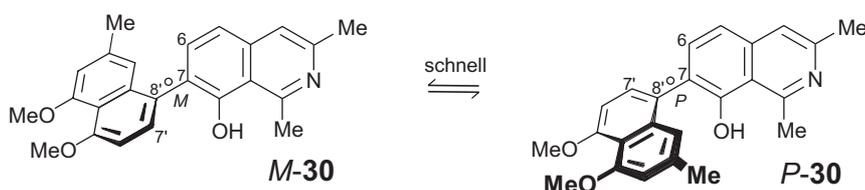


Abb. 37. Strukturen der beiden Atrop-Enantiomere von Dioncophyllein D (**M-30** und **P-30**).

Im Vergleich zum konfigurativer stabilen Isomer *ent*-Dioncophyllein A (**29a**, Abb. 34) besitzt **30** keine Methylgruppe *ortho*-ständig zur Achse, die als dritter Substituent ein schnelles Durchdrehen des Moleküls an der Biarylachse bei Raumtemperatur verhindert.

5.3.4 Strukturaufklärung von 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (31)

5.3.4.1 Spektroskopische Charakterisierung von 31

Das UV-Spektrum der dritt-polarsten Hauptkomponente zeigte abermals, wie schon bei den aromatischen Alkaloiden **29a** und **30**, ein drittes Maximum im längerwelligen Bereich, was auch in diesem Fall ein vollständig dehydriertes Naphthylisochinolin vermuten ließ.

Die Molekülmasse m/z 359 war um 14 u kleiner als die der anderen beiden Verbindungen **29a** und **30** und deutete auf den Verlust einer CH_2 -Einheit hin, wie es bei *O*-Demethyl-Derivaten zu beobachten ist. Die durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelte Summenformel $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ bestätigte diese Vermutung.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum fehlte dann auch erwartungsgemäß das Signal einer Methoxygruppe. Alle weiteren Signale stimmten sehr gut mit denen von *ent*-Dioncophyllein A (**29a**, Abb. 32) überein. Auch in den 2D-NMR-Spektren (NOESY, COSY, HMBC, HMQC) waren bis auf das Fehlen der NOESY-Wechselwirkung von H-6' zu der

Methoxygruppe an C-5' alle strukturelevanten Korrelationen vorhanden (siehe Abb. 38). Die verbleibende OCH₃-Gruppe wurde durch ihre NOESY-Interaktion mit H-3' und ihrer HMBC-Korrelation zu C-4', welches im HMBC auch eine Wechselwirkung mit H-3' zeigte, der Position 4' zugeordnet. Somit konnte zum einen das Vorliegen eines 7,1'-gekoppelten vollständig dehydrierten Naphthylisochinolin-Alkaloids mit einer Methoxygruppe an C-4' bewiesen, zum anderen die Stelle der *O*-Demethylierung und somit eine neue OH-Gruppe an C-5' lokalisiert werden.

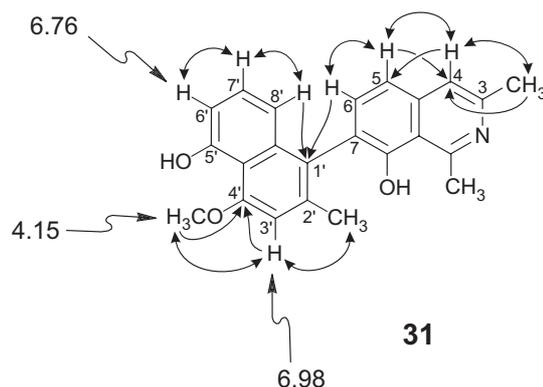


Abb. 38. Relevante ¹H-NMR-Verschiebungen [ppm] und NOESY- (Doppelpfeile) und HMBC-Korrelationen (einfache Pfeile) für die Strukturaufklärung von 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (**31**).

Dieses bisher unbekannte 5'-*O*-Demethyl-Derivat von *ent*-Dioncophyllein A (**29a**) besaß die Konstitution **31**.^[123]

5.3.4.2 Die absolute Konfiguration von 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (**31**)

Auch bei dieser Verbindung galt es, die absolute Konfiguration an der Biarylachse zu bestimmen und die Substanz auf Enantiomerenreinheit zu prüfen. Ersteres konnte sehr einfach anhand eines CD-Vergleichs mit dem strukturell sehr ähnlichen Alkaloid *ent*-Dioncophyllein A (**29a**) erfolgen. Da beide CD-Spektren annähernd identisch waren, ergab sich für **31** somit ebenfalls eine *M*-Konfiguration (siehe Abb. 39). Damit war Verbindung **31** in der Tat das 5'-*O*-Demethyl-Derivat von **29a** und wurde demzufolge 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A genannt.

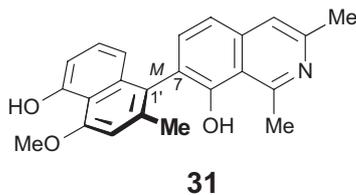


Abb. 39. Struktur von 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (**31**).

Auch in diesem Fall, wie auch schon beim *ent*-Dioncophyllein A (**29a**), wurde das 5'-*O*-Demethyl-Analogon **31** auf seine Enantiomerenreinheit hin untersucht. Dazu verwendete man wiederum das für **29a** etablierte System und variierte anschließend die chromatographischen Bedingungen. Bei keinem der zahlreichen HPLC-CD-Experimente an chiraler Phase konnte eine Trennung von 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (**31**) in seine möglichen Enantiomere erzielt werden, so dass dieses Alkaloid in der Pflanze zumindest bis zur Nachweisgrenze vollständig *M*-konfiguriert vorlag und somit enantiomerenrein schien.

5.3.5 Strukturaufklärung der beiden Atrop-Diastereomere von *Ancistrocladinium* B (**32a/b**)

5.3.5.1 Spektroskopische Charakterisierung von **32a/b**

Weit im unpolaren Bereich des HPLC-Spektrums konnten zwei nicht vollständig basisliniengetrennte Peaks im Verhältnis 1:1 identifiziert werden, bei denen es sich nach Auswertung des UV-Spektrums und eines LC-MS-Laufs (ESI-positiv: m/z 406) um Naphthylisochinolin-Alkaloide handeln konnte, obwohl derartig unpolare Vertreter dieser Naturstoffklasse bisher nicht bekannt waren.

Die Charakterisierung dieser Verbindungen **32a/b** erfolgte in enger Zusammenarbeit mit S. Pedersen und J. Faber aus unserer Arbeitsgruppe, denen es gelang, die gleichen Substanzen zeitgleich und unabhängig aus einer anderen *Ancistrocladus*-Art in größerer Menge zu isolieren und in ihren Konstitutionen aufzuklären. Die ausführliche spektroskopische Charakterisierung von *Ancistrocladinium* B (**32**) wird in Kürze in der Masterarbeit von S. Pedersen aus unserer Gruppe beschrieben werden.

5.3.5.2 Die absolute Konfiguration von **32a/b**

Die absolute Konfiguration des Stereozentrums an C-3 ließ sich mit Hilfe des oxidativen Abbaus^[54] zu *S* bestimmen (siehe Schema 1, Seite 15).^[127]

Der Versuch, die beiden Atrop-Diastereomere getrennt zu isolieren, um die jeweiligen (reinen) spektroskopischen und chiroptischen Daten zu erheben, schlug fehl, da von der Aufarbeitung bis zur Messung immer wieder beide Spezies in unterschiedlichen Verhältnissen vorlagen. Dieses Phänomen konnte auf die bei Raumtemperatur semi-stabile Biarylachse zurückgeführt werden. Nur mittels LC-CD war es möglich, von den beiden unter RP-Bedingungen angetrennten Peaks zumindest qualitative Momentaufnahme-CD-Spektren im *stop-flow*-Modus zu erhalten, die dann auch erwartungsgemäß in etwa spiegelbildlich zueinander verliefen, da die entgegengesetzte Konfiguration an der Achse den stärksten Einfluss auf das CD-Verhalten hatte (siehe Abb. 40).

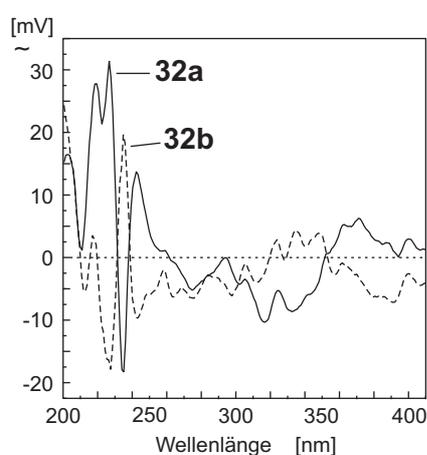


Abb. 40. LC-CD-Spektren der beiden Atrop-Diastereomere (**32a** = vorderer Peak und **32b** = hinterer Peak) von Ancistrocladinium B (**32**).

Eine Zuordnung der Absolutkonfiguration der beiden Peaks an der Achse konnte schließlich erfolgen, da bei einer Isolierung der vordere Peak (Verbindung **32a**) in einem 4:1-Überschuss zum hinteren (Verbindung **32b**) vorlag. Ausgehend von der bekannten absoluten *S*-Konfiguration an C-3 (s.o.) konnten nun anhand von Atropisomer-spezifischen NOESY-Wechselwirkungen Aussagen über die absolute Konfiguration an der Biarylachse getroffen werden. Eine solche konfigurationsbestimmende Interaktion war im NOESY-Spektrum von H-3 zu H-7' zu sehen. Die räumliche Nähe dieser beiden Protonen determinierte die Stellung der Naphthalin- und Isochinolin-Hälfte zueinander, so dass durch Anwenden der *P/M*-Nomenklatur^[57] auf das schneller eluierende Atrop-Diastereomer **32a** eine *P*-Konfiguration an der Biarylachse bestimmt wurde. Das langsamere Atrop-Diastereomer **32b** zeigte eine NOESY-Wechselwirkung von Me-3 mit H-7' und war demzufolge *M*-konfiguriert an der Achse (siehe Abb. 41). Zur Bestimmung der Halbwertszeit werden zur Zeit von S. Pedersen Versuche durchgeführt.

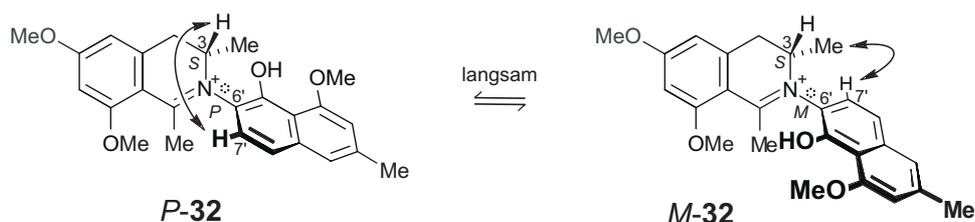


Abb. 41. Struktur der beiden Atrop-Diastereomere von Ancistrocladinium B (**32a/b**) mit den Atropisomer-spezifischen NOESY-Wechselwirkungen (Doppelpfeile).

5.3.6 Testung der isolierten Verbindungen auf Bioaktivität

Ent-Dioncophyllein A (**29a**), Dioncophyllein D (**30**) und 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (**31**) waren weitere Vertreter vollständig dehydrierter Naphthylisoquinolin-Alkaloide, über deren Bioaktivitäten bisher wenig bekannt war (siehe Kapitel 5.2.5, Seite 44). Leider zeigten alle drei Alkaloide lediglich äußerst schwache Aktivitäten gegen *P. falciparum*, *T. cruzi* und *T. b. rhodesiense* (siehe Tabelle 4). Ancistrocladinium B (**32**) befindet sich noch in der Testphase.

Tabelle 4. Biologische Aktivität in IC₅₀-Werten der Verbindungen **29a**, **30** und **31** [µg/mL] im Vergleich zum Standard des jeweiligen Testsystems.

	29a	30	31
<i>Plasmodium falciparum</i> (Stamm: K1)	3.9	0.5	3.1
Standard: Chloroquin 0.0016			
<i>Trypanosoma cruzi</i>	54.0	24.3	21.8
Standard: Benznidazol 0.55			
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	5.6	4.7	1.4
Standard: Melarsoprol 0.00095			
<i>Leishmania donovani</i>	-- ^a	-- ^a	-- ^a
Standard: Miltefosin 0.305			
Zytotoxizität L-6 ^b	-- ^a	-- ^a	20.6

^anicht bestimmbar ^bMIC-Werte

5.4 Chemotaxonomische Einordnung

Betrachtet man die isolierten Alkaloide aus der Rinde und den Blättern von *A. benomensis*, lässt sich ohne Zweifel feststellen, dass es sich bei dieser Art auch in phytochemischer und somit chemotaxonomischer Sicht um eine neue Spezies handelt, die mit zahlreichen Superlativen aufwartet und einige bisherige empirisch manifestierte Aussagen in Frage stellt. So wurde z.B. die Annahme, dass in Asien nur Alkaloide des Ancistrocladaceae-Typs^[15] vorkommen, durch die Isolierung von *ent*-Dioncophyllein A (**29a**), Dioncophyllein D (**30**) und 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (**31**) gleich dreimal widerlegt. Diese Verbindungen gehören alle dem Dioncophyllaceae-Typ^[15] an, besitzen also keine Sauerstofffunktion an C-6 (das andere signifikante Kriterium diese Typs, die *R*-Konfiguration an C-3, konnte ja aufgrund der vollständig dehydrierten Isochinolin-Hälften nicht herangezogen werden).

Im Vergleich zu allen anderen bekannten asiatischen *Ancistrocladus*-Arten besitzt *A. benomensis* die größte Anzahl vollständig dehydrierter Naphthylisochinolin-Alkaloide. Dies stellt für diese Pflanze einen besonderen chemotaxonomischen Marker dar.

Auch die Vielzahl an einzigartigen, vorher noch nie beobachteten strukturellen Besonderheiten wie z.B. die Hydroxymethylenfunktion an C-3 bei Ancistrobenomin A (**20**), der neue N,6'-Kupplungstyp bei Ancistrocladinium B (**32**), das Vorhandensein des ersten optisch aktiven, vollständig dehydrierten Dioncophyllaceae-Typ-Alkaloids *ent*-Dioncophyllein A (**29a**) und des ersten natürlichen 7,8'-gekuppelten Dioncophyllaceae-Typ-Alkaloids Dioncophyllein D (**30**) unterstreicht die herausragende Stellung von *A. benomensis* und zeigt ganz klar eine phytochemische Abgrenzung zu allen anderen Arten.

6 Etablierung neuer Methoden in der NIQ-Analytik

6.1 Einsatz von Kapillarelektrophorese (CE) und CE/MS zur Analyse eines Wurzelrindenextraktes von *Ancistrocladus mudogo*

Bei der Analyse einer bisher botanisch unbeschriebenen zentralafrikanischen *Ancistrocladus*-Art^[128] in Zusammenarbeit mit Sven Specker^[129] aus unserer Gruppe ergaben sich Probleme bezüglich der Trennung der Alkaloide eines Wurzelrindenextraktes mittels HPLC. Die Anwendung des in dieser Arbeit beschriebenen Standardsystems (siehe Kap. 1.2, Seite 87), welches bei der Analyse von Rohextrakten verschiedenster *Ancistrocladus*-Arten und Pflanzenorganen stets hervorragende Ergebnisse erzielt hatte,^[53,61,72,100] ergab nur eine sehr unvollständige und in keiner Weise zufrieden stellende Trennung der einzelnen Komponenten (siehe Abb. 42A).

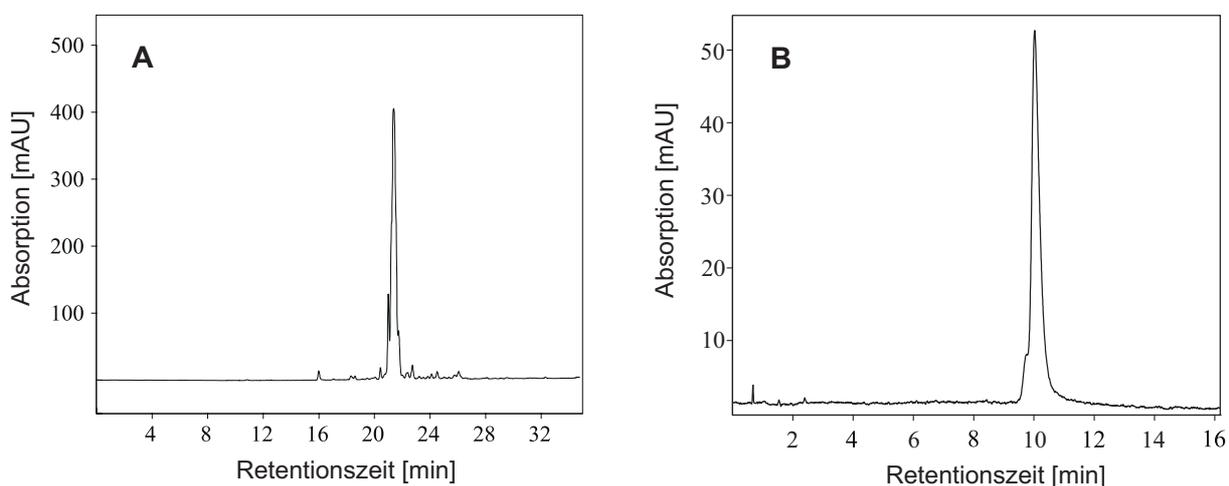


Abb. 42. (A) HPLC-Spektrum (saure Umkehrphase-Bedingungen) und (B) Kapillarelektropherogramm (wässrig-saures Ammoniumacetat-Puffer-System) des Wurzelrindenextraktes von *A. mudogo*.

Eine umfangreiche Optimierung des Gradienten konnte die Trennung ebensowenig verbessern, so dass eine komplementäre analytische Methode, die Kapillarelektrophorese (CE) und zusätzlich noch CE in Kopplung mit Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometrie (CE-ESI-MS/MS), zum Einsatz kommen sollte. In Zusammenarbeit mit Dr. M. Unger, Institut für Pharmazie der Universität Würzburg, wurde diese Technik erstmalig im Bereich der Naturstoffanalytik für Naphthylisochinolin-Alkaloide angewandt. Da die CE und CE/MS in der pharmazeutischen Forschung besonders bei der analytischen Charakterisierung von Alkaloiden,^[130,131] Medikamenten^[132] und endogenen Metaboliten^[133] breite Anwendung findet, wurden erste Testläufe mit einem standardmäßig verwendeten wässrig-sauren Puffersystem durchgeführt.^[134] Leider zeigten auch diese Bemühungen trotz vielfältiger

Optimierungsversuche kein verbessertes Trennverhalten bei dem Extrakt (siehe Abb. 42B). Von Vorteil war lediglich die kürzere Analysedauer. Aufgrund von Untersuchungen des Einflusses alkaloidaler Strukturen auf die elektrophoretische Mobilität^[135] und basierend auf Literaturangaben^[136-139] über die effiziente Auftrennung von Pflanzenextrakten, wurde nun ein wasserfreies Puffersystem verwendet, das zu einer wesentlichen Steigerung der Selektivität und demzufolge zu einer Trennung der Alkaloide des Wurzelrindenextraktes von *A. mudogo* führte (siehe Abb. 43).^[140]

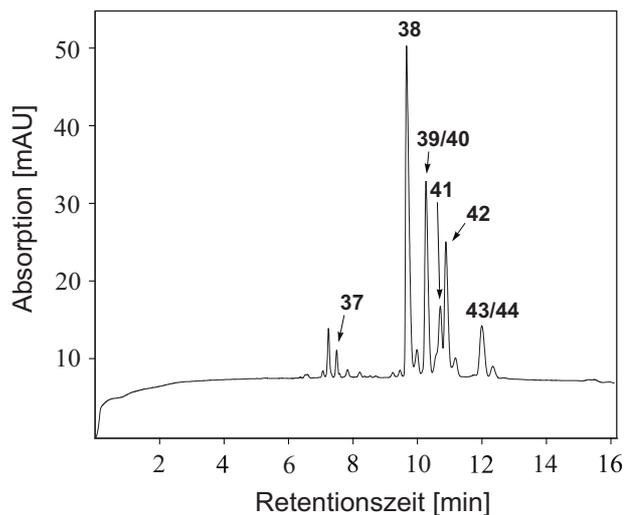


Abb. 43. Kapillarelektropherogramm desselben Wurzelrindenextraktes von *A. mudogo* wie in Abb. 42, jedoch unter Verwendung eines nicht-wässrigen Ammoniumacetat-Puffersystems.

Die Zuordnung der Peaks zu den Verbindungen **37-44** (siehe Abb. 44) erfolgte durch Koelution (sog. Spiken) mit den Reinsubstanzen, die zeitgleich mittels eines neu entwickelten präparativen Aufschlusses isoliert werden konnten (siehe Kap. 6.2). Die Alkaloide **38** und **39** lagen als Gemisch vor und waren bisher weder getrennt noch strukturell aufgeklärt worden. Das gleiche galt für die Verbindungen **41** und **44**, für die aber jeweils ein Strukturvorschlag inklusive relativer Konfiguration angegeben worden war.

Die verbesserte Trennung des Extraktes mittels CE in einem nicht-wässrigen Puffersystem lässt sich auf die niedrigere Dielektrizitätskonstante solcher Puffer im Vergleich zu wässrigen Lösungsmitteln zurückführen, durch die die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Ionen verstärkt werden.^[141] Ausgehend von der Annahme, dass durch den hohen Anteil von Essigsäure im Puffer alle Naphthylisochinoline vollständig protoniert vorliegen, lassen sich nun die Retentionszeitunterschiede durch verschieden starke ionische Interaktionen mit den Acetat-Anionen des Puffers, die zur Anode wandern und die protonierten Alkaloide als Ionenpaar mitführen, erklären.

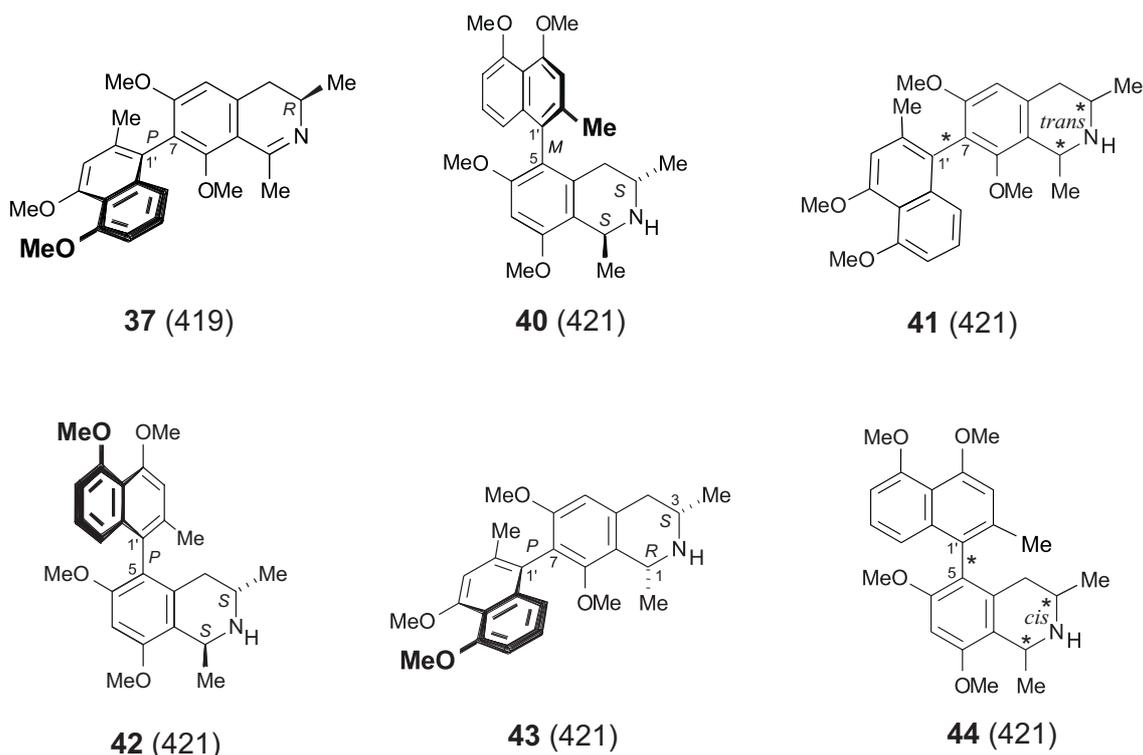


Abb. 44. Isolierte Naphthylisochinolin-Alkaloide mit Molekulargewichten aus dem Wurzelrindenextrakt von *A. mudogo*: 3-*epi*-Ancistrocladisin (**37**), 6-*O*-Methylhamatin (**40**), 6-*O*-Methylancistrocladin (**42**), *cis*-Dihydroancistrocladisin (**43**). Die absolute Konfiguration der mit Stern* gekennzeichneten Verbindungen (**41** und **44**) ist bisher noch unbekannt. Für die Verbindungen **38** und **39** besteht noch kein Strukturvorschlag.

Die Kopplung der CE mit Elektrospray-Massenspektrometrie ergab das überraschende Ergebnis, dass fünf der acht Verbindungen die gleiche Masse von m/z 421 haben ($[M+H]^+ = 422$), was auch ihr anfänglich sehr ähnliches chromatographisches Verhalten erklären könnte. Die Fragmentierung der einzelnen Peaks in der Ionenfalle zeigte bei allen Substanzen mit dem Molekulargewicht m/z 421 Fragmentationen von 405 u (Verlust von Ammoniak), 390 u (Verlust einer Methylgruppe) und 379 u (Verlust von C_2H_5N aufgrund einer Retro-Diels-Alder-Reaktion^[142]).

Die Verwendung der Kapillarelektrophorese ist demnach als komplementäre Analysemethode zur HPLC hervorragend geeignet, um komplexe Pflanzenextrakte, insbesondere hier erstmalig auf dem Gebiet der Naphthylisochinolin-Alkaloide, zu analysieren. Durch DAD- und MS-Detektion lassen sich wichtige strukturelle Daten ermitteln, für die Isolierung der Substanzen in größerem Maßstab ist die CE jedoch nach wie vor nicht geeignet.

6.2 Einführung neuer basenstabiler stationärer HPLC-Phasen zur Analyse und Isolierung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus der Wurzelrinde von *A. mudogo*

Die bereits in Kapitel 6.1 geschilderte Problematik der schlechten Trennung eines Wurzelrindenextraktes von *A. mudogo* mittels üblicher HPLC-Analytik führte zu Überlegungen, nicht nur den Gradienten und die Temperatur zu variieren, sondern auch andere stationäre Phasen und Laufmittel zu verwenden. Bisher standen dem Arbeitskreis aber nur die 'üblichen' C18-Phasen zur Verfügung, die mit sauren Modifikatoren, z.B. TFA (Trifluoressigsäure), bei einem pH-Wert von 2 betrieben wurden. Basenstabile Phasen, die bei einem pH > 8 verwendet werden konnten, lagen bis *dato* nur als Polymerphasen vor, mit denen in diesem Fall aber keine gute Trennung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden erreicht werden konnte. Auch Aminophasen, die in der NIQ-Analytik teilweise einen Selektivitätsgewinn brachten, führten hier zu keiner signifikanten Verbesserung der Trennung. Inspiriert durch einen Review von He *et al.*,^[143] der eine Abhandlung verschiedenster Laufmittel, Gradienten und stationärer Phasen für die HPLC auch im Bezug auf Alkaloide darstellte, und aufgrund neuer Entwicklungen im Bereich basenstabiler C18-Phasen bestand die Aussicht, eine gute Trennung, wie sie schon bei der CE vorlag (siehe Abb. 43), auch mit der HPLC zu erzielen. Dazu wurde eine neuartige C18-Phase verwendet, die bis zu einem pH-Wert von 12 betrieben werden konnte. Es wurden vier verschiedene basische Additive zum Laufmittelgemisch bestehend aus Acetonitril und Wasser getestet. Beste Ergebnisse wurden durch Zugabe einer 8mM Ammoniak-Lösung erreicht. Der Extrakt (vormals nur einen Peak in der HPLC zeigend, siehe Abb. 42A, Seite 58) konnte so in sechs Hauptkomponenten aufgetrennt werden (siehe Abb. 45).

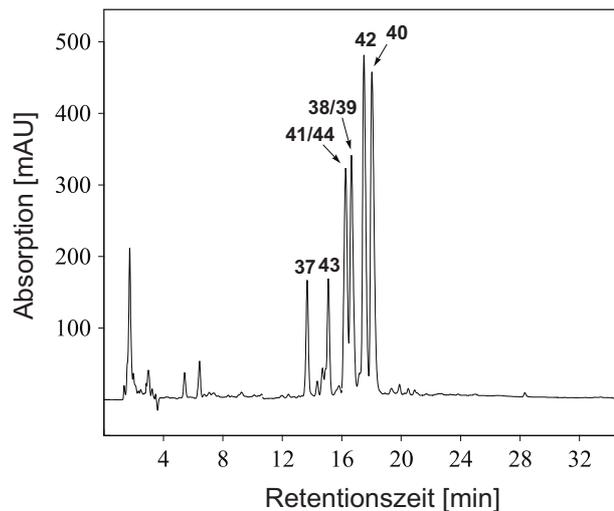


Abb. 45. HPLC-Spektrum des Wurzelrindenextraktes von *A. mudogo* unter Verwendung basischer Umkehrphasen-Bedingungen. Die Strukturen **37-44** sind in Abb. 44 dargestellt.

Dieses basische Lösungsmittelsystem war ebenfalls sehr gut für LC-MS-Untersuchungen geeignet, welche die Ergebnisse der CE-MS-Analysen bestätigten. Der größte Vorteil dieser Methodik bestand darin, dass mit entsprechend größer dimensionierten Säulen ein direktes 'upscaling' und somit die Gewinnung der einzelnen Alkaloide im präparativen Maßstab möglich war. Die Substanzen **37**, **40**, **42** und **43** konnten somit rein isoliert und ihre Strukturen aufgeklärt werden.^[129] Zwei der sechs Peaks zeigten in den NMR-Spektren ein 1:1-Gemisch, von denen für zwei Alkaloide, **41** und **44**, direkt aus den Mischspektren jeweils ein Strukturvorschlag gemacht werden konnte (siehe Abb. 44).

Die HPLC an der neuen basenstabilen C18-Phase mit basischen Laufmittelsystemen führte in diesem Fall zur Lösung des Trennproblems durch eine erheblich verbesserte Trennleistung, da die Naphthylisochinolin-Alkaloide diesmal nicht am Stickstoff protoniert vorlagen, sondern als Basen, und dadurch vermutlich eine größere Affinität zur stationären C18-Phase erreicht wurde.^[138]

7 Untersuchungen von Naturstoffen anderer Substanzklassen mit stereochemischen Problemstellungen

Mit fortschreitender Entwicklung der technischen Analysemöglichkeiten spielt im Bereich der Naturstoffchemie heute nicht nur die Aufklärung der Konstitution pflanzlicher oder mikrobieller Inhaltsstoffe eine wichtige Rolle, sondern besonders auch ihre stereochemische Analyse. Darunter versteht man die Aufklärung der relativen und absoluten Konfigurationen aller im Molekül vorkommenden stereogenen Zentren und Elemente. Die Chiralität ist eine dominierende Eigenschaft der Moleküle lebender Organismen. So zeigen zueinander enantiomere Verbindungen in einer achiralen Umgebung absolut identische Eigenschaften und sind nicht zu unterscheiden. In einer chiralen Umwelt allerdings, wie z.B. in biologischen Systemen, tritt die Verschiedenartigkeit der Stereostrukturen hervor, die Moleküle verhalten sich gegenüber ihrer chiralen Umgebung wie Diastereomere und können nun völlig unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen. Traurige Berühmtheit erlangte in den 60ern aufgrund dieser Tatsache das Medikament Contergan® mit dem Wirkstoff Thalidomid, welches als nebenwirkungsarmes Beruhigungsmittel besonders für schwangere Frauen angepriesen wurde. Erst Jahre später erkannte man eine Korrelation zwischen den vielen schweren Missbildungen neugeborener Kinder und der Einnahme von Contergan®. Ursache des Skandals war, dass Thalidomid als Racemat vorlag. Während das (*R*)-Enantiomer die gewünschte beruhigende Wirkung zeigte,^[144] hinderte das (*S*)-Enantiomer das Wachstum von Geweben und Blutgefäßen.^[145,146]

Die Unterscheidung und Charakterisierung chiraler Verbindungen mittels einer zuverlässigen Analytik, zu der Drehwertbestimmung, CD-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse und auch die NMR-Spektroskopie zählt, ist somit eine notwendige und interessante Herausforderung. Eine große Hilfe bietet die in unserem Arbeitskreis durchgeführte quantenchemische Berechnung von CD-Spektren,^[72,80,83] anhand derer im Vergleich mit experimentell erfassten Daten oftmals Zuordnungen der absoluten Konfigurationen möglich sind.

Aber auch die Untersuchung von Naturstoffen auf ihre Enantiomerenreinheit und gegebenenfalls die Elutionsreihenfolge der entsprechenden Enantiomere an chiraler Phase (wie im Nachfolgenden beschreiben), die Beobachtung von Racemisierungsprozessen^[52] und die effiziente Aufnahme von CD-Spektren direkt aus Gemischen mittels der in unserem Arbeitskreis etablierten LC-CD-Kopplung^[41] sind weitere wichtige Bestandteile der stereochemischen Analyse.

7.1 Etablierung einer Enantiomeren-Analytik für Isoplagiochin C (45) und D (46)

Isoplagiochin C (45) und D (46) sind makrocyclische Bisbibenzyl-Naturstoffe (siehe Abb. 46), die aus Bryophyten (Moosen) isoliert wurden^[147-149] und bemerkenswerte antitumorale, antibakterielle und antimykotische Aktivitäten besitzen.^[150]

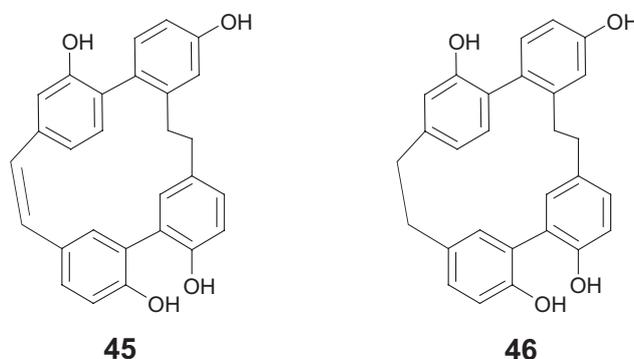


Abb. 46. Strukturen von Isoplagiochin C (45) und D (46).

Beide Strukturen warfen interessante Fragestellungen bezüglich ihrer absoluten Konfigurationen auf, da sie auf den ersten Blick achiral erschienen, obwohl zwei Biarylachsen im Molekül vorhanden waren, die aber als konfiguratив labil angesehen wurden. Dies war anfangs auch im Einklang mit ersten Drehwertmessungen von 45 und 46, isoliert aus *Plagiochilla fruticosa*, die für beide Verbindungen einen Wert von null ergaben, also optisch inaktiv schienen.^[151] Isolate von 45 und 46 aus anderen Lebermoosen, z.B. aus *Herbertus sakurarii*, waren im Gegensatz dazu optisch aktiv.^[152] Eine Zuordnung der absoluten Konfiguration von Isoplagiochin C (45) aus *Plagiochila deflexa*,^[153] wie in Abb. 46 angegeben, ließ sich erst nach ausführlichen stereochemischen Analysen von J. Mühlbacher und M. Reichert aus unserem Arbeitskreis treffen.^[106,107] Dazu wurden eine umfangreiche Konformationsanalyse, quantenchemische CD-Berechnungen mittels Simulation der Moleküldynamik und CD-Messungen durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass Isoplagiochin C (45) nur eine konfiguratив stabile *P*-konfigurierte Biarylachse, nämlich die 'nördliche', besitzt.

Aufgrund der Tatsache, dass Isoplagiochin C (45), isoliert aus unterschiedlichen Lebermoosen, in der Literatur einmal mit einem positiven,^[152] einmal mit einem negativen^[106] und ein anderes mal mit einem Drehwert von null beschrieben wurde,^[151] stellte sich die Frage nach der Enantiomerenreinheit des Naturstoffs.

Für eine effektive Methodenentwicklung einer LC-CD-Analytik an chiraler Phase, die das erste Mal für derartige Naturstoffe in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde, verwendete man ein Racemat von Isoplagiochin C (45), das durch nichtenantioselektive Totalsynthese

hergestellt worden war.^[154,155] Beste Ergebnisse erzielte man an einer Chiralcel-OD-H-Phase, bei der das Racemat von **45** in zwei Basislinien-getrennte, zu gleichen Flächen integrierende HPLC-Peaks aufgetrennt wurde (siehe Abb. 47a).

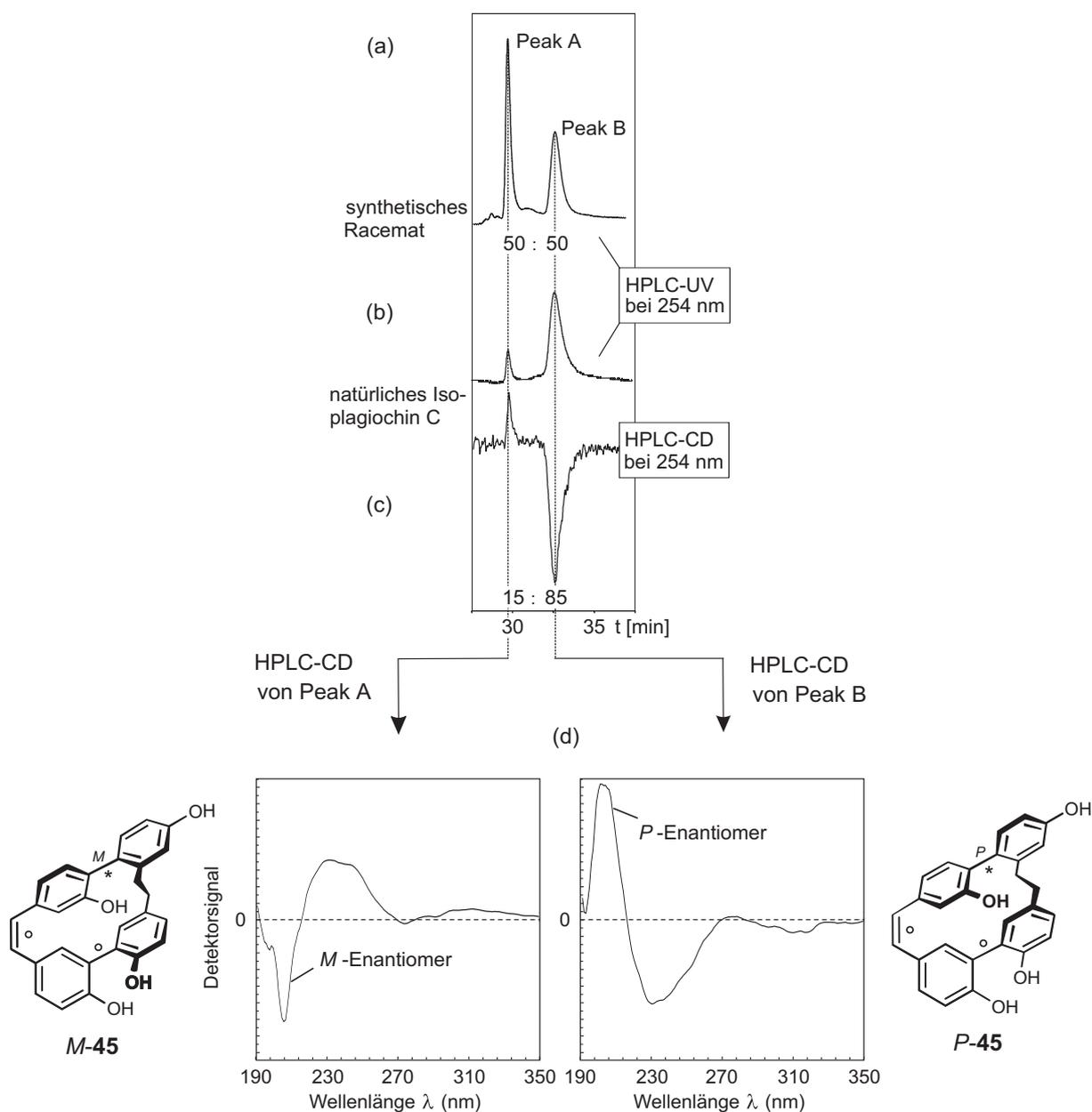


Abb. 47. LC-CD-Analytik von Isoplagiochin C (**45**) an chiraler Phase: (a) Trennung des synthetischen Racemats von **45** zur Methodvalidierung, (b) Bestimmung des Enantiomerenverhältnis von **45**, isoliert aus *Plagiochila deflexa*, (c) CD-Spur bei 254 nm und (d) vollständige online-CD-Spektren der beiden Peaks.

Das linksdrehende natürliche Isolagiochin C (**45**) aus *P. deflexa* zeigte ein 15:85-Verhältnis zugunsten des *P*-Enantiomers (siehe Abb. 47b).^[106] Dass es sich bei den beiden Peaks auch wirklich um die beiden Enantiomere *M*-**45** und *P*-**45** handelte, konnte sowohl durch die entgegengesetzten Ausschläge der CD-Spur bei einer Wellenlänge (Abb. 47c) als

auch durch im *stop-flow*-Modus aufgenommene online-CD-Spektren (Abb. 47d) eindeutig bewiesen werden. In der Arbeitsgruppe von Dr. A. Speicher, Universität Saarbrücken, werden mittels dieser etablierten Analytik die anderen in der Literatur beschriebenen Isolate von **45** aus den verschiedenen Lebermoosen auf ihre Enantiomerenverhältnisse überprüft und somit eine Korrelation zu den unterschiedlichen Drehwertangaben hergestellt.

Diese Analytik ließ sich auch auf weitere optisch aktive cyclische Bisbibenzyle anwenden, so z.B. auf das Dihydro-Analogon von Isoplagiochin C (**45**), Isoplagiochin D (**46**, Abb. 46), welches aus *Bazzania trilobata* isoliert worden war. Da die online gemessenen CD-Spektren der beiden Enantiomere (Peaks A und B, siehe Abb. 48) von Isoplagiochin D (**46**) deutlich anders aussahen als die von **45**, wurden zur sicheren Zuordnung ihrer absoluten Konfigurationen erneute CD-Berechnungen, diesmal von K. Maksimenka aus unserer Arbeitsgruppe, durchgeführt. Durch Übereinstimmung des für das *P*-Enantiomer von Isoplagiochin D (**46**) berechneten CD-Spektrums mit dem online-CD-Spektrum von Peak B und entsprechend *M* für Peak A konnte für diese Verbindung ein Enantiomerenverhältnis von 48:52 zugunsten des *P*-Enantiomers bestimmt werden.^[107] Eine zusätzliche Absicherung der richtigen Konfigurationszuordnung brachte die Hydrierung der beiden Enantiomere des Isoplagiochins C (*M*-**45** und *P*-**45**) zu den entsprechenden Enantiomeren des Isoplagiochins D (*M*-**46** und *P*-**46**), die, als Referenzsubstanzen in der chiralen HPLC-Analytik eingesetzt, die oben getroffenen Aussagen bestätigen.^[107]

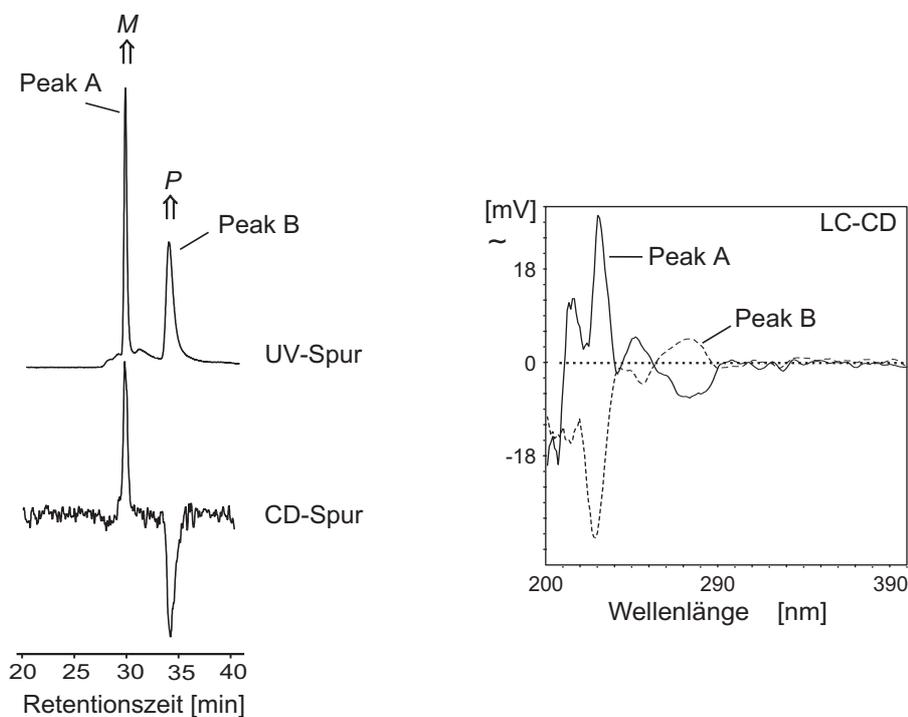


Abb. 48. LC-CD-Analytik von Isoplagiochin D (**46**) an chiraler Phase.

7.2 Bestimmung der absoluten Achsenkonfiguration von Saludimerin A (47) und B (48)

Die Arbeitsgruppe von Prof. F. Bracher, Universität München, untersucht seit einiger Zeit die Inhaltsstoffe der Blätter von *Croton flavens* (Euphorbiaceae) aus Barbados. Neben anderen Strukturen konnten die Morphinandienon-Alkaloide Salutaridin (49) und Norsinoacutin (50) isoliert werden (siehe Abb. 49).^[156] Von diesen Substanzen war bekannt, dass sie in unterschiedlichen Enantiomerenverhältnissen in den verschiedenen *Croton*-Arten vorkamen.^[157,158]

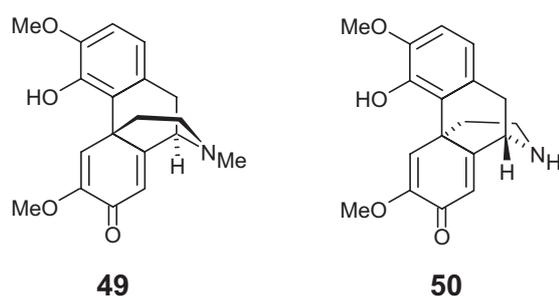


Abb. 49. Strukturen von Salutaridin (49) und Norsinoacutin (50).

In jüngsten Untersuchungen wurden zwei neuartige Alkaloide, Saludimerin A (47) und B (48) aus den Blättern von *C. flavens* isoliert, bei denen es sich um die ersten axialchiralen biarylischen Morphinandienon-'Dimere' handelte (siehe Abb. 50).^[159]

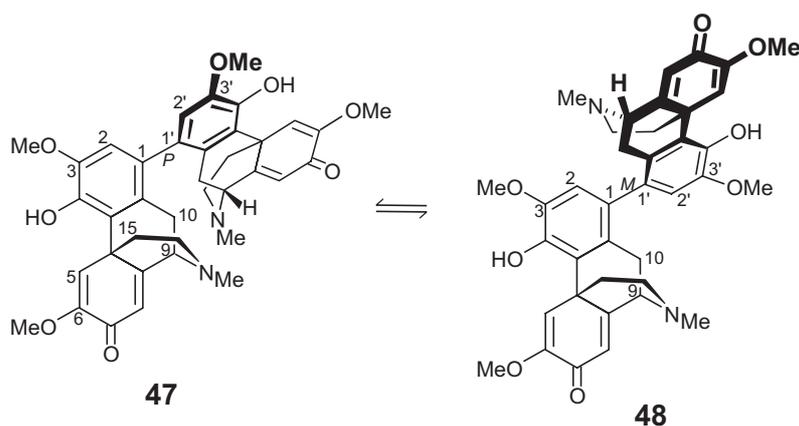


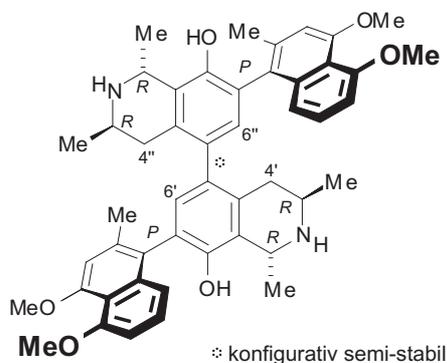
Abb. 50. Struktur der Saludimerine A (47) und B (48).

Eine C_2 -Symmetrie dieser Moleküle wurde ersichtlich, da im $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum nur genau halb so viele Signale gesehen wurden, wie die Summenformel aufgrund hochauflösender Massenspektrometrie vorgab. Somit musste es sich bei 47 und 48 im Bezug auf Konstitution und Konfiguration um konstitutiv und stereochemisch symmetrische Dimere basierend auf dem bekannten 'Monomer' Salutaridin (49, Abb. 49) handeln. Die reinen

Verbindungen **47** und **48** ergaben beim Erhitzen über den Schmelzpunkt jeweils ein 1:1-Gemisch beider Atrop-Diastereomere, was darauf hinwies, dass die Achsen konfiguratativ semi-stabil sind.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration an der Biarylachse von Saludimerin A (**47**) und B (**48**) mittels CD-Spektroskopie erwies sich als nicht trivial, da die beiden Verbindungen einen gleichen CD-Verlauf zeigten. Normalerweise hätte man annähernd entgegengesetzte Spektren von **47** und **48** erwartet,^[72] da der Einfluss der Biarylachse gegenüber den anderen vier Stereozentren klar den CD-Verlauf dominieren sollte, was in diesem Fall aber gerade nicht der Fall war. Auch quantenchemische Berechnungen der CD-Spektren von J. Mühlbacher in unserer Arbeitsgruppe mittels 'Molecular-Dynamics'-Simulation stimmten mit den experimentell erhobenen Daten sehr gut überein, ließen jedoch immer noch keine differenzierte Aussage über die Achsenkonfigurationen treffen. Erst durch eine Subtraktion der CD-Spektren von **47** und **48** voneinander konnte der in diesem Fall dominierende zentrochirale Chromophor eliminiert und das resultierende CD-Spektrum nach der Exciton-Chirality-Methode^[77] interpretiert werden. Somit konnte Saludimerin A (**47**) eine *P*-Konfiguration an der Achse zugewiesen werden, während Saludimerin B (**48**) *M*-konfiguriert war (siehe Abb. 50).^[159]

Es galt nun, diese Ergebnisse anhand einer weiteren spektroskopischen Methode zu bestätigen. Dies sollte mit Hilfe von 2D-ROESY-NMR-Spektroskopie geschehen, da die absolute Konfiguration der Stereozentren der monomeren Einheiten schon bekannt war. Ähnlich wie beim Jozimin A (**51**),^[160] einem ebenfalls konstitutiv und stereochemisch symmetrischen Dimer, dessen zentrale Biarylachse konfiguratativ semi-stabil ist, musste man nach einem geeigneten Proton der einen Hälfte suchen (z.B. H_{ax}-4' oder H_{äq}-4' beim Jozimin A, siehe Abb. 51), das eine Atropisomer-spezifische Wechselwirkung mit einem Proton der anderen Molekülhälfte zeigte (z.B. H-6'' beim Jozimin A, siehe Abb. 51), welche bei dem Monomer unmöglich auftreten konnten (z.B. H_{ax}-4' mit H-6').



51

Abb. 51. Struktur von Jozimin A (**51**).

Bei der gegebenen Lage der Biarylachse zwischen den Kohlenstoffatomen C-1 und C-1' boten sich bei den Saludimerinen A (**47**) und B (**48**) die beiden diastereotopen Protonen H_α-10 und H_β-10 in der einen Hälfte und H-2' in der anderen als räumlich benachbarte Interaktionspartner an. Je nach Konfiguration der Achse sollte eine ROESY-Wechselwirkung von H-2' entweder mit H_α-10 im Falle von *M* oder mit H_β-10 bei einer *P*-Konfiguration zu beobachten sein (siehe Abb. 52).

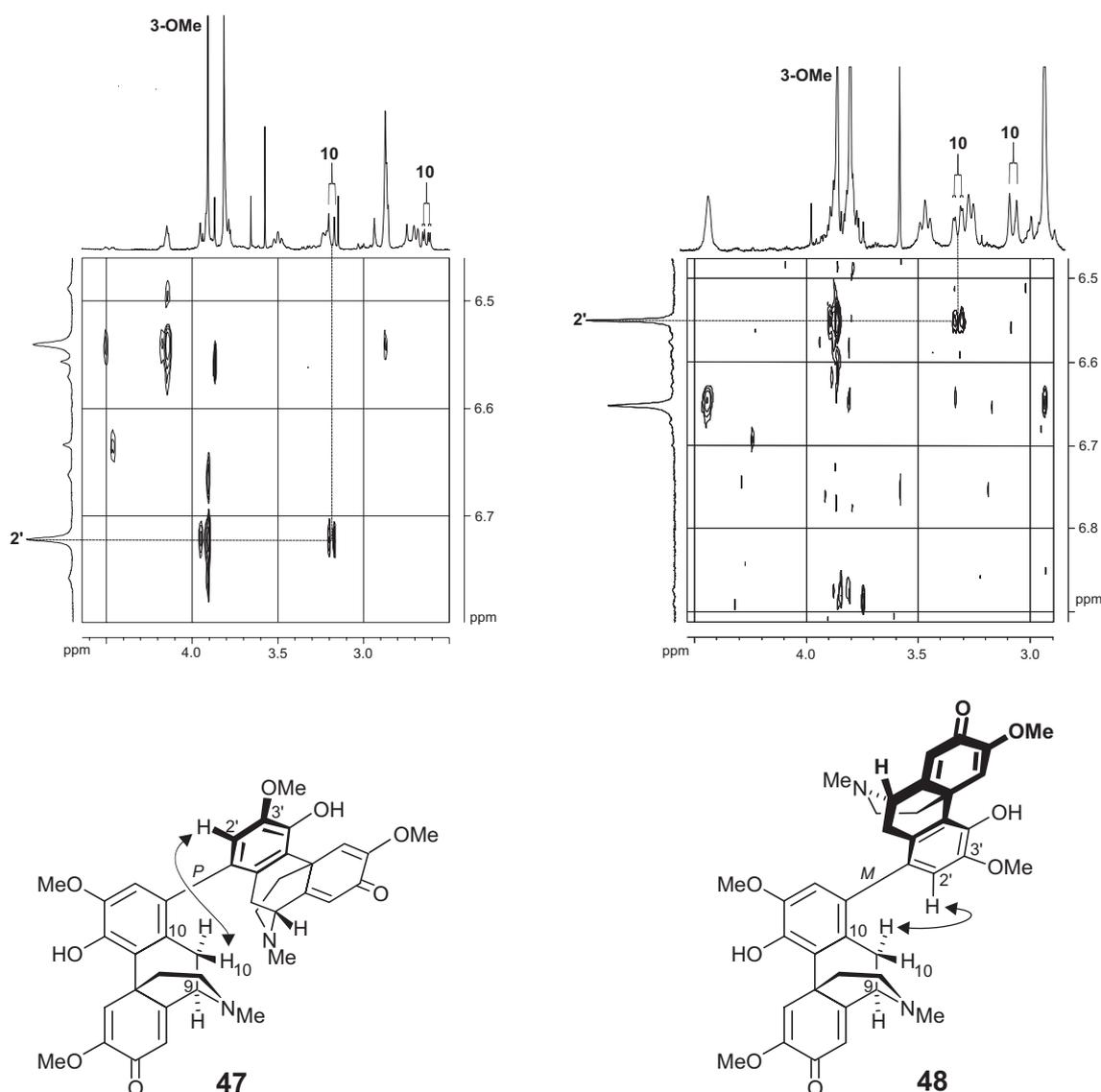


Abb. 52. Signifikante ROESY-Wechselwirkungen für die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Achse von Saludimerin A (**47**) und B (**48**) bei gegebener Absolutkonfiguration der übrigen stereogenen Zentren.

Bei der praktischen Durchführung dieses 'Gedankenexperiments' stellte sich die schlechte Auflösung und teilweise Überlappung der Protonensignale im ¹H-NMR als problematisch dar. Eine genaue und zweifelsfreie Zuordnung der beiden Signale für H_α-10 und H_β-10 war jedoch die Grundbedingung für ein erfolgreiches Experiment. Leider fielen die beiden Signale

aufgrund ihres isochronen Charakters zusammen. Erst die Zugabe von deuteriertem TFA zur NMR-Probe von Saludimerin A (**47**) und B (**48**) führte durch Protonierung oder Deuterierung des basischen Stickstoffatoms zur gewünschten Differenzierung der beiden Protonensignale. Die exakte Bestimmung, welches der beiden Protonen an C-10 α - und welches β -ständig war, erfolgte durch COSY-, 1D-NOE- und Homoentkopplungs- ^1H -NMR-Messungen. $\text{H}_{\beta-10}$ erschien als ein Dublett mit einer für geminale Protonen typischen Kopplungskonstante von $J = 19.55$ Hz. $\text{H}_{\alpha-10}$ zeigte als Doppeldublett zusätzlich noch eine Kopplung zu H-9 ($J = 6.7$ Hz) aufgrund eines Diederwinkels von 36° zwischen den beiden Protonen. Dieser wurde durch AM1-Berechnungen^[161] der Minimumstruktur von **47** und **48** erhalten. Der Winkel zwischen H-9 und $\text{H}_{\beta-10}$ betrug 80° und führte im ^1H -NMR-Spektrum zu keiner Aufspaltung.

Nachdem nun die Protonen $\text{H}_{\alpha-10}$ und $\text{H}_{\beta-10}$ eindeutig identifiziert waren, erfolgten die ROESY-Messungen von **47** und **48**, bei denen die postulierten Wechselwirkungen klar zu erkennen waren (siehe Abb. 52). Das ROESY-Spektrum von Saludimerin A (**47**) zeigte die Korrelation von $\text{H}_{\beta-10}$ mit H-2', die die *P*-Konfiguration an der Biarylachse bestätigte. Beim entsprechend *M*-konfigurierten Saludimerin B (**48**) war es die Interaktion von $\text{H}_{\alpha-10}$ mit H-2'.^[159]

7.3 Bestimmung der absoluten Konfiguration der B_1 -Phytoprostane I (**52**) und II (**53**)

Ein klassisches Anwendungsgebiet der LC-CD-Analytik an chiraler Phase ist die Trennung von Enantiomeren, die Bestimmung ihrer Elutionsreihenfolge und die jeweilige Zuordnung der absoluten Konfiguration. Diese Analytik wurde bei den B_1 -Phytoprostanen des Typs I (**52**) und II (**53**), zwei Regioisomeren, die jeweils in beiden Enantiomeren vorkommen und in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Müller, Universität Würzburg, erforscht werden, eingesetzt (siehe Abb. 53).

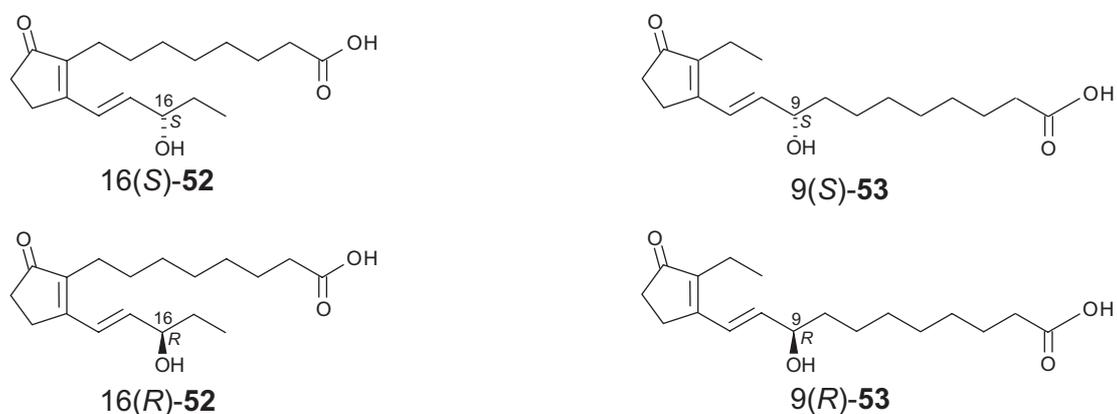


Abb. 53. Strukturen der beiden Enantiomere von Phytoprostan B_1 -I (**52**) und Phytoprostan B_1 -II (**53**).

Phytoprostane gehören zu einer neuartigen Gruppe von Phytohormonen, die nicht-enzymatisch durch einen Radikal-katalysierten biochemischen Mechanismus aus α -Linolensäure in racemischer Form gebildet werden. Sie liegen in Pflanzen in verschiedenen Klassen mit unterschiedlichen Konzentrationen vor und zeigen einen vorübergehenden Anstieg unter Einwirkung von oxidativem Stress.^[162,163]

Es bestand die Vermutung, dass die Enantiomere der beiden Regioisomere des Phytoprostans B₁, 16(*S*)-**52**, 16(*R*)-**52**, 9(*S*)-**53** und 9(*R*)-**53**, unterschiedliche qualitative und quantitative biologische Aktivitätsprofile zeigen könnten.^[163] In einer aktuellen Arbeit^[164] wurden die Methylester aller vier Isomere von Phytoprostan B₁ hergestellt und ihr Einfluss auf den Sekundärmetabolismus im Vergleich zu Jasmonsäuremethylester (**54**, Abb. 54) *in vivo* an Zellkulturen von drei verschiedenen Pflanzen untersucht.

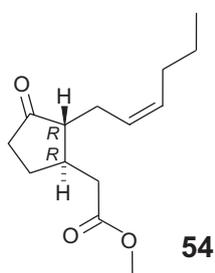


Abb. 54. Struktur von Jasmonsäuremethylester (**54**).

Die Regioisomere (Typ I und II) von Phytoprostan B₁ wurden mittels RP-HPLC getrennt^[165] und anschließend mit Diazomethan in die Methylester umgewandelt. Eine Basislinientrennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC an chiraler Phase mit einer Chiralpak-AD-Säule. Zur Zuordnung der Peaks diente ein Vergleichs-CD-Spektrum von 15(*S*)-Prostaglandin-B₁-methylester (**55**, Abb. 55).

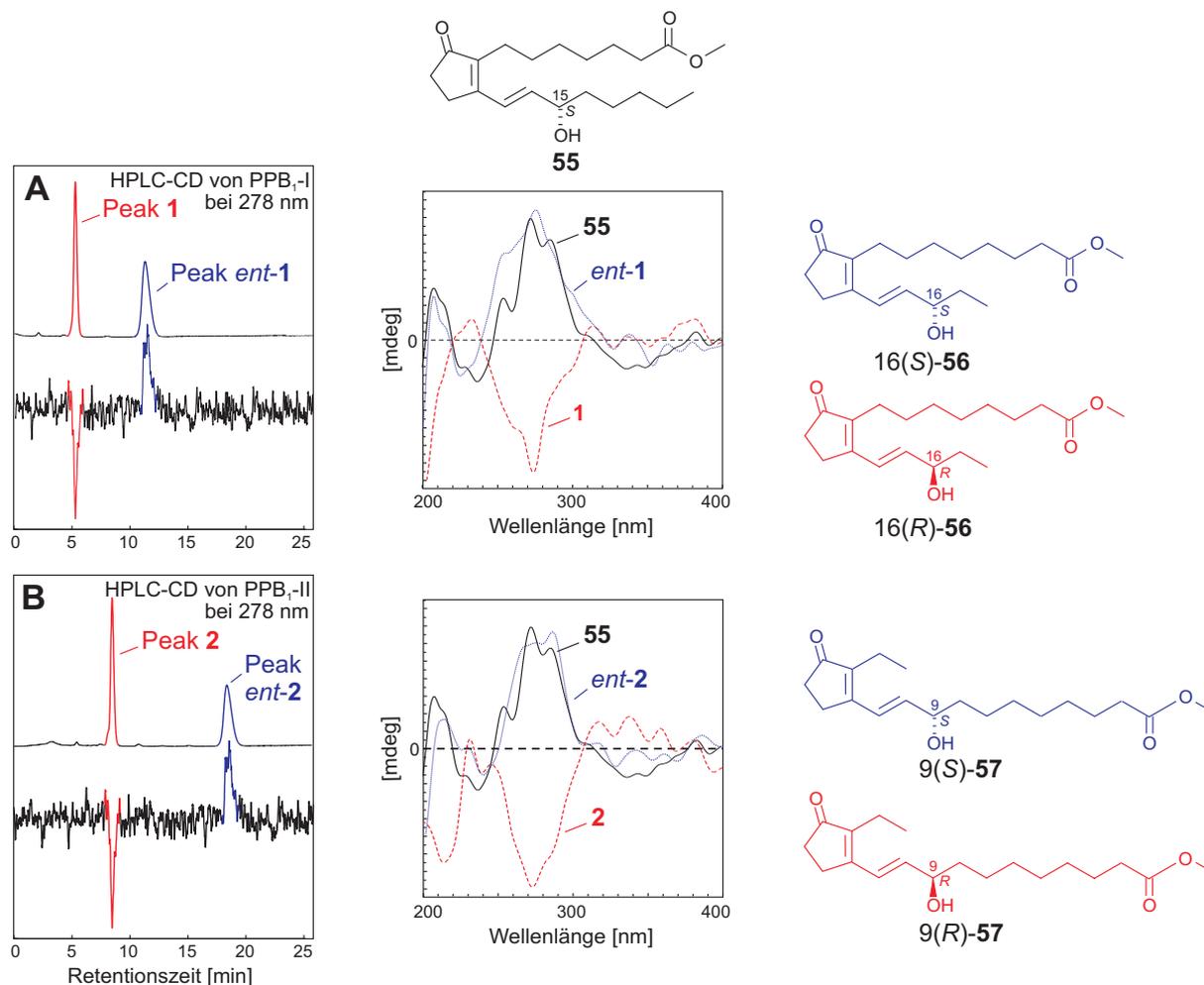


Abb. 55. LC-CD-Analyse der Enantiomere der methylierten B₁-Phytoprostane I (A, PPB₁-I) und II (B, PPB₁-II) an chiraler Phase und CD-Vergleich mit 15(*S*)-Prostaglandin-B₁-methylester (**55**).

Peak 1 (Abb. 55A) bzw. 2 (Abb. 55B) waren die jeweils schneller eluierenden methylierten Enantiomere von PPB₁-I bzw. PPB₁-II, die beide in der CD-Spur bei 278 nm, dem CD-Maximum der Vergleichssubstanz **55**, einen negativen Ausschlag zeigten. Beide online-CD-Spektren, aufgenommen im *stop-flow*-Modus, waren im Verlauf sehr ähnlich und dem des 15(*S*)-Prostaglandin-B₁-methylesters (**55**) entgegengesetzt, so dass Peak 1 und 2 jeweils die (*R*)-Enantiomere des entsprechenden Phytoprostan-B₁-methylesters-I (16(*R*)-**56**) und Phytoprostan-B₁-methylesters-II (9(*S*)-**57**) waren (siehe Abb. 55). Peak *ent*-1 (Abb. 55A) bzw. *ent*-2 (Abb. 55B) zeigten einen positiven Ausschlag in der LC-CD-Spur. Ihre online-CD-Spektren, die mit demjenigen von **55** gut übereinstimmten, ließen eine eindeutige Zuordnung als die entsprechenden (*S*)-Enantiomere, 16(*S*)-**56** und 9(*S*)-**57**, zu.^[164] Durch entsprechendes 'upscaling' konnte unter LC-CD-Kontrolle eine Reinisolierung aller vier Isomere erfolgen.

8 Zusammenfassung

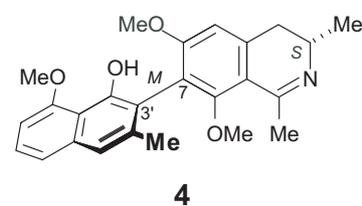
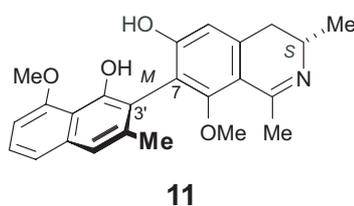
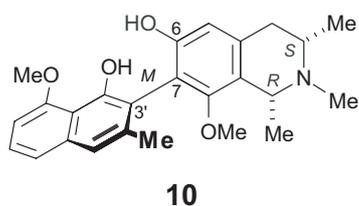
Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind nach wie vor eine wichtige und fast unerschöpfliche Quelle von potenziellen Arzneistoffen mit einem breiten Wirkspektrum.

Naphthylisochinolin-Alkaloide stellen eine Klasse pharmakologisch, biogenetisch und chemotaxonomisch interessanter Sekundärmetabolite dar, die ausschließlich in den beiden tropischen Pflanzenfamilien Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae vorkommen. Diese Biaryl-naturstoffe zeigen viel versprechende Wirksamkeiten gegen zahlreiche Pathogene und sind somit ein lohnendes Ziel zur Isolierung.

In der vorliegenden Dissertation wurden zwei neue *Ancistrocladus*-Arten aus Ostafrika und Malaysia sowie die bekannte indische Art *Ancistrocladus heyneanus* phytochemisch und chemotaxonomisch untersucht. Es wurden insgesamt zehn neue und fünf bekannte Naphthylisochinolin-Alkaloide isoliert, die einer breit angelegten biologischen Testung zugeführt wurden. Weitere Zielsetzungen bestanden in der stereochemischen Analyse von Naturstoffen unserer Kooperationspartner und in der methodischen Erweiterung der phytochemischen Analytik.

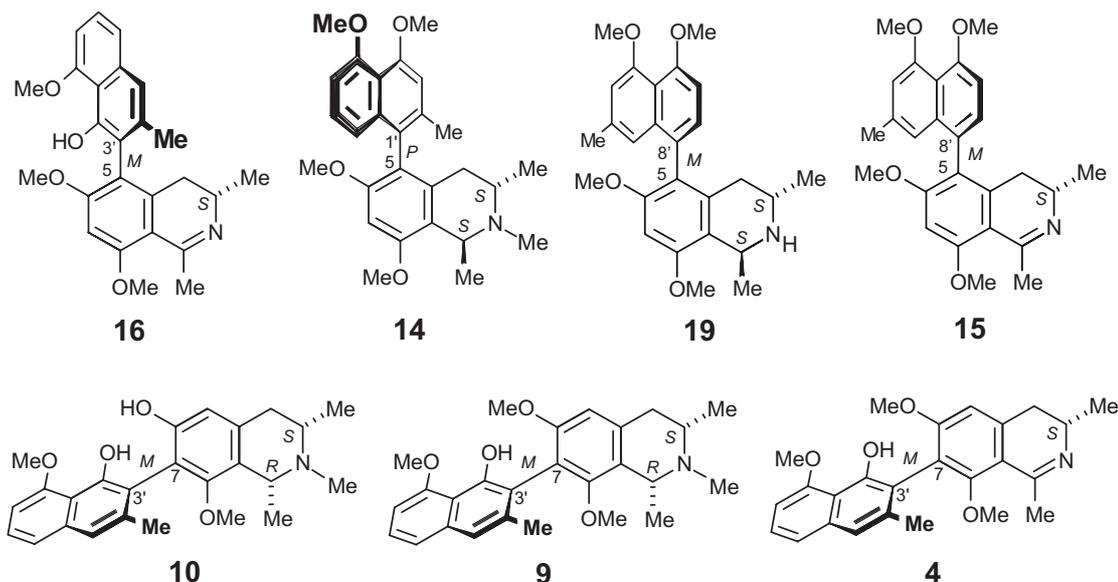
Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Von der ansonsten gut untersuchten indischen Liane *Ancistrocladus heyneanus* wurden erstmals die Blätter auf Naphthylisochinolin-Alkaloide untersucht. Zwei der drei Hauptkomponenten konnten anhand von gekoppelten online-HPLC-Methoden wie HPLC-UV, -MS, -NMR und -CD als neuartige Alkaloide identifiziert werden. Durch 'klassische' Isolierung dieser drei Komponenten durch präparative HPLC konnten sie biologischen Testsystemen zugeführt und ihre Stereostrukturen durch ein umfangreicheres 'offline'-Methodenrepertoire abgesichert werden. Die beiden neuen Naphthylisochinoline Ancistrotanzanin C (**10**) und Ancistroheynin B (**11**) sowie das bekannte, aber auf seine biologische Aktivität noch nicht untersuchte Ancistrocladidin (**4**), gehören alle dem seltenen 7,3'-Kupplungstyp an.



- Aus Blättern der ostafrikanischen Lianenart *Ancistrocladus tanzaniensis* wurden sieben Naphthylisochinolin-Alkaloide isoliert, darunter die fünf bereits bekannten Verbindungen Ancistrotanzanin B (**15**), Ancistrotanzanin C (**10**), *O*-Methylancistrocladinin (**19**), Ancistrocladidin (**4**) und Ancistrotectorin (**9**). *O,N*-

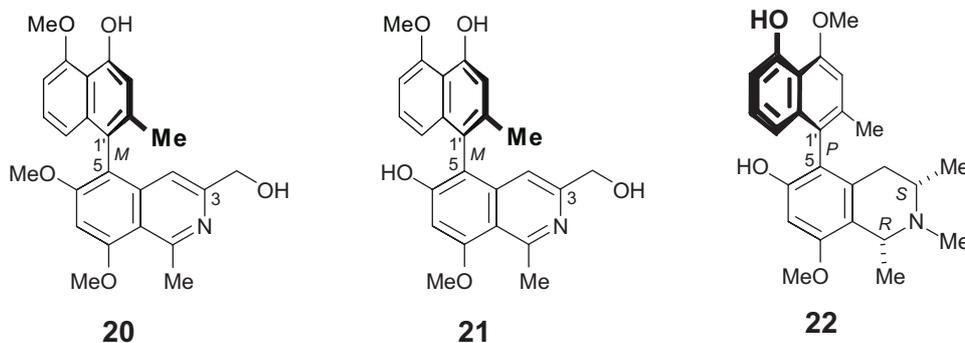
Dimethylancistrocladin (**14**) war bisher nur durch Partialsynthese dargestellt und konnte in dieser Pflanze erstmalig als Naturstoff isoliert werden. Ancistrotaninan A (**16**) ist das erste Naphthylisochinolin-Alkaloid des vorher noch nie nachgewiesenen 5,3'-Kupplungstyps. Zur Aufklärung seiner absoluten Konfiguration an der Biarylachse wurden parallel von M. Reichert umfangreiche quantenchemische Berechnungen durchgeführt, da für einen CD-Vergleich kein bekannter Vertreter derartiger Konstitution existierte.



Hervorragende antileishmaniale Wirkungen konnten für die Verbindungen **15** und **16** festgestellt werden, die das bisher aktivste Alkaloid, Ancistroalain A, um den Faktor drei übertrafen. Die phytochemischen Befunde ließen interessante chemotaxonomische Aussagen zu. So zeigten alle aus *A. tanzaniensis* isolierten Verbindungen die typischen Merkmale des sog. 'Ancistrocladaceae-Typs' (*S*-Konfiguration an C-3 und Sauerstofffunktion an C-6), die bisher bei sämtlichen asiatischen und der einzig anderen ostafrikanischen Art, *A. robertsoniorum*, gefunden worden waren. Erstaunlich war hingegen die enge Verwandtschaft zur indischen Art *A. heyneanus*, da die beiden Arten im HPLC-Vergleich vier gleiche Strukturen enthielten. Auch besaßen beide die bisher höchste Anzahl von 7,3'-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloiden, so dass hier deutlich eine engere Verwandtschaft zu den asiatischen als zu den räumlich näher gelegenen zentral- und westafrikanischen Vertretern bestand. Die einzigartig exponierte Höhenlage dieser Pflanze (1200 m) zusammen mit dem Vorhandensein des neuen Kupplungstyps grenzen *A. tanzaniensis* klar als eigenständige Art ab.

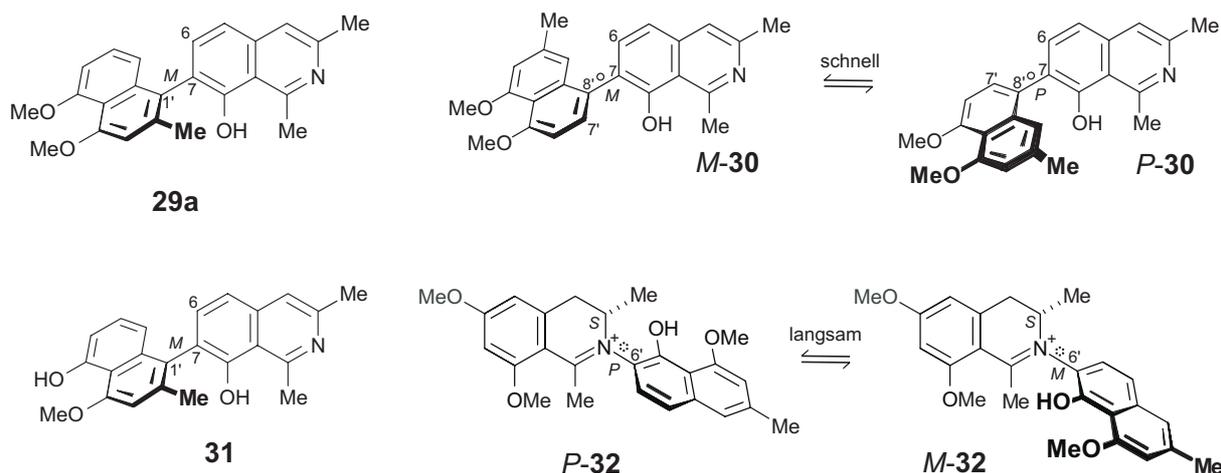
- Von einer Sammelreise nach Malaysia im Jahr 2000 stand eine vermutlich neue Lianenart für phytochemische Untersuchungen zur Verfügung. Erste genetische

Sequenzanalysen in der Arbeitsgruppe von Prof. Heubl hatten bereits die Neuartigkeit dieser Pflanze bestätigt, die ebenfalls in einer exponierten Höhenlage gefunden worden war. Erstmals konnte die Spezies im Botanischen Garten der Universität Würzburg zum Blühen gebracht werden und aufgrund der genetischen, morphologischen und phytochemischen Befunde als neue Art, *Ancistrocladus benomensis*, wissenschaftlich beschrieben werden. Aus der Rinde dieser ungewöhnlichen Lianenart wurden drei neue 5,1'-gekuppelte Naphthylisochinolin-Alkaloide isoliert und strukturell aufgeklärt (**20-22**). Ancistrobenomin A (**20**) und 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**21**) waren der zweite und dritte natürliche Vertreter optisch aktiver, vollständig dehydrierter Naphthylisochinolin-Alkaloide überhaupt. Zudem besitzen beide Verbindungen eine vorher noch nie nachgewiesene Hydroxymethylen-Funktionalität an C-3. Das Alkaloid **22** ist ein neues 5'-*O*-Demethyl-Derivat von Ancistroclin.



Die Verbindungen **20** und **21** zeigten im HPLC-DAD-Spektrum ein zusätzliches, drittes Maximum bei 363 nm, ein in zukünftigen Untersuchungen nützlicher Marker für eine schnelle Identifizierung von vollständig dehydrierten Naphthylisochinolin-Alkaloiden.

- Mittels Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC), einer neuen flüssig-flüssig-chromatographischen Methode, konnte bei der Analyse des Blattmaterials von *A. benomensis* das störende Chlorophyll viel effizienter und zeitsparender als mit herkömmlichem Ausschütteln und zudem noch quantitativ abgetrennt werden. Aus dem verbleibenden Blattextrakt wurden drei neue Naphthylisochinolin-Alkaloide, *ent*-Dioncophyllein A (**29a**), Dioncophyllein D (**30**) und 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (**31**), isoliert. Ein viertes neues Alkaloid, Ancistrocladinium B (**32**) war von S. Pedersen aus unserer Arbeitsgruppe fast zeitgleich auch aus einer anderen *Ancistrocladus*-Art in unserem Arbeitskreis isoliert und strukturell aufgeklärt worden. In Zusammenarbeit mit S. Pedersen wurde die absolute Konfiguration bestimmt.

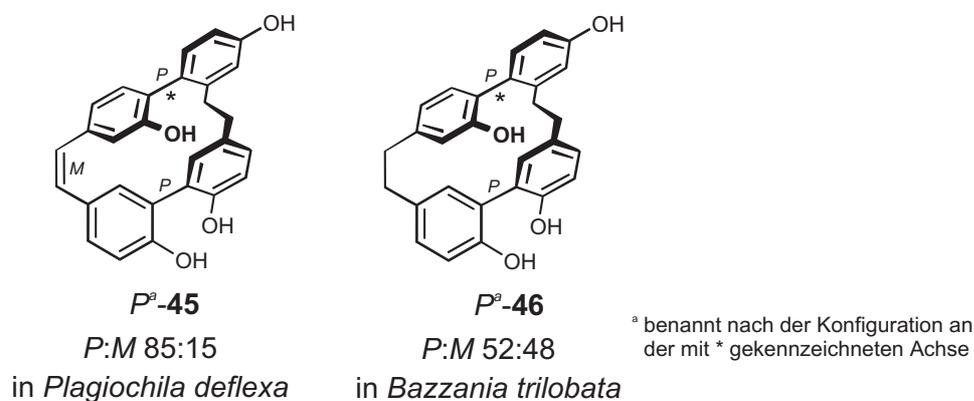


Verbindungen **29a**, **30** und **31** sind, wie schon **20** und **21**, welche aus der Rinde stammen, wieder vollständig dehydrierte Naphthylisochinoline, als erste zudem optisch aktiv, womit *A. benomensis* eine absolute Sonderstellung einnimmt. Die größte Überraschung war jedoch, dass diese Alkaloide dem 'Dioncophyllaceae-Typ' angehören (keine Sauerstofffunktion an C-6 und *R*-Konfiguration an C-3, wobei letzteres Kriterium aufgrund des Dehydrierungsgrades der Isochinolin-Hälfte nicht relevant ist). Eine derartige Zugehörigkeit war bisher ausschließlich Naphthylisochinolin-Alkaloiden von zentral- und westafrikanischen *Ancistrocladus*-Arten vorbehalten, so dass es sich bei den Verbindungen **29a**, **30** und **31** um die ersten asiatischen Vertreter dieses Typs handelte. Dioncophyllein D (**30**) ist darüber hinaus noch das erste natürliche 7,8'-gekoppelte Dioncophyllaceen-Alkaloid und das bekannte *Ancistrocladinium* B (**32**) das erste *N*-gekoppelte Alkaloid im südostasiatischen Verbreitungsgebiet. Die absolute Konfiguration an der konfigurativen semi-stabilen Biarylachse der beiden Atrop-Diastereomere wurde mittels LC-CD-Messungen und Atropisomer-spezifischen NOESY-Wechselwirkungen zugeordnet. Aus phytochemischer und chemotaxonomischer Sicht lässt sich *A. benomensis* zweifelsfrei als neue Art definieren. Alle Naphthylisochinolin-Alkaloide aus *A. benomensis* zeigten nur schwache antiprotozoische Wirksamkeiten.

- Bei der HPLC-DAD-MS-NMR-Analyse eines Wurzelrindenextrakts von *Ancistrocladus mudogo* bestand das Problem, mehrere Naphthylisochinolin-Alkaloide chromatographisch und anschließend auch präparativ zu trennen, die alle unter einem Peak in der HPLC zusammenfielen. In Kooperation mit Prof. U. Holzgrabe führte die erstmalig für derartige Naturstoffe angewendete Methode der Kapillarelektrophorese mit einem nicht-wässrigen Puffersystem zu einer analytischen Lösung. Der Extrakt wurde in sechs Haupt- und zahlreiche Nebenkomponenten aufgetrennt, wobei erstere mittels DAD-Detektion und CE-MS/MS-Untersuchungen als Naphthylisochinolin-Alkaloide identifiziert werden konnten. Parallel dazu konnte mit dem Erscheinen

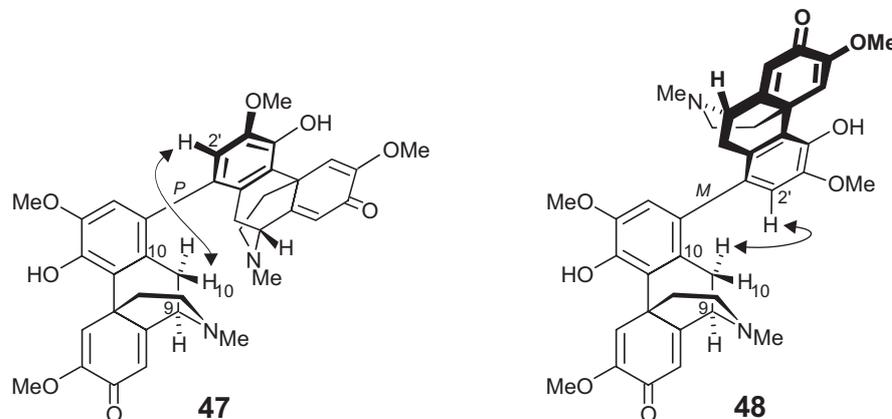
neuer basenstabiler RP18-HPLC-Säulen auch die HPLC-Analytik unter Verwendung eines basischen Laufmittelgemisches mit 8 mM Ammoniaklösung weiterentwickelt werden, die ebenfalls zu sechs gut getrennten Peaks führte. Diese Methode hatte den Vorteil, dass durch ein direktes 'upscaling' die Verbindungen in präparativem Maßstab zur Strukturaufklärung und zur biologischen Testung gewonnen werden konnten.

- Für die von der Arbeitsgruppe Speicher (Universität Saarbrücken) aus Lebermoosen isolierten makrocyclischen Bisbibenzyl-Naturstoffe Isoplagiochin C (**45**) und D (**46**), deren absolute Konfiguration und konformatives Verhalten J. Mühlbacher und M. Reichert aus unserem Arbeitskreis aufgeklärt hatten, wurde eine Enantiomeren-Analytik an chiraler Phase (Chiralcel OD-H) mittels HPLC-CD etabliert. Zur Methodenentwicklung für die HPLC an chiraler Phase wurden jeweils synthetisch hergestellte Racemate verwendet. Da von den drei stereogenen Elementen der aus unterschiedlichen Lebermoosen isolierten Isoplagiochine nur die 'nördliche' (mit Stern gekennzeichnete) Biarylachse konfiguratativ stabil war, konnten diese Naturstoffe entweder enantiomerenrein oder in einem bestimmten Enantiomerenverhältnis von *P*:*M* (siehe Abbildung) vorliegen. Für Isoplagiochin C (**45**) wurde mit der oben genannten Analytik ein Enantiomerenverhältnis *P*:*M* von 85:15, für Isoplagiochin D (**46**) eines von 52:48 festgestellt.

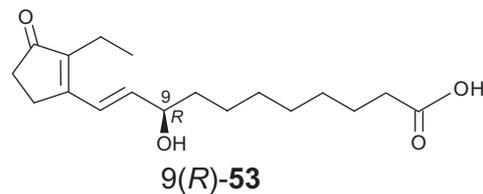
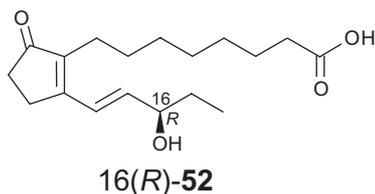
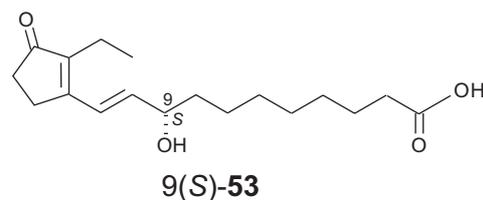
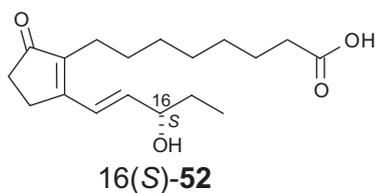


- Für die ersten chiralen biarylischen Morphinandienon-Dimere Saludimerin A (**47**) und B (**48**), isoliert aus *Croton flavens* von der Arbeitsgruppe Bracher (Universität München), konnte die absolute Konfiguration an der Biarylachse mittels NMR-Spektroskopie, insbesondere mit ROESY-Experimenten über Atropisomer-spezifische Wechselwirkungen bestimmt werden (Pfeile in Abbildung), da die absolute Konfiguration der Stereozentren der monomeren Einheiten bereits bekannt war. Dazu mussten zuerst die Signale der beteiligten Protonen $H_{\alpha-10}$ und $H_{\beta-10}$ in den NMR-Spektren aufgrund von Kopplungskonstanten, COSY und Homoentkopplungsexperimenten eindeutig zugeordnet werden. Anschließend ließ sich Saludimerin A (**47**) eine *P*-Konfiguration an der Achse durch die ROESY-

Wechselwirkung von H-2' mit H_β-10 zuweisen und Saludimerin B (**48**) durch die ROESY-Interaktion von H-2' mit H_α-10 entsprechend eine *M*-Konfiguration. Diese Ergebnisse bestätigten die CD-Untersuchungen der Atrop-Diastereomere **47** und **48** von J. Mühlbacher aus unserer Arbeitsgruppe.



- Die neuartigen, in der Arbeitsgruppe Müller (Universität Würzburg) untersuchten Pflanzenhormone Phytoprostan B₁ Typ I und II, **52** und **53**, kommen in der Natur aufgrund einer nicht-enzymatischen Biosynthese in jeweils racemischer Form vor. Für die Trennung der Enantiomere wurde eine geeignete Analytik an chiraler Phase etabliert. Die Bestimmung der jeweiligen absoluten Konfiguration und Elutionsreihenfolge erfolgte mit Hilfe der LC-CD. Als Vergleichs-CD-Spektrum diente 15(*S*)-Prostaglandin-B₁-methylester. Alle Verbindungen wurden vor der HPLC-Analyse in die entsprechenden Methylester umgewandelt.



Die in dieser Arbeit angeführten Beispiele zeigen, dass die gezielte Anwendung gekoppelter online-Methoden von LC-MS/MS-NMR-CD zu einer effizienten und eleganten Lösung verschiedenster Problemstellungen führen kann. Besonders das noch unausgeschöpfte Entwicklungspotential der LC-NMR mit der 'jungen' Kryoprobekopf-Technik wird zusammen mit der stetigen Verbesserung der anderen online-Methoden dazu beitragen, diese Analytik zu einem unerlässlichen 'Werkzeug' in der Naturstoffanalytik zu machen.

9 Summary

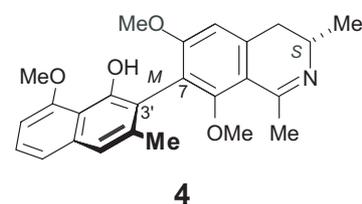
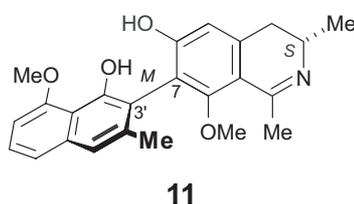
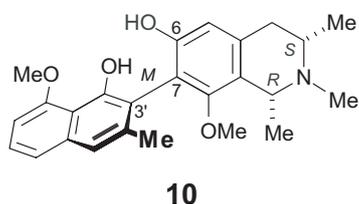
Nowadays plant-derived secondary metabolites are still an important source of potential drugs with a broad range of biological activities.

Naphthylisoquinoline alkaloids represent a class of pharmacologically, biosynthetically, and chemotaxonomically exciting natural products, which occur in the two phylogenetically related plant families Ancistrocladaceae and Dioncophyllaceae. These exceptional biaryl products possess promising biological activities against different pathogens, which make them a worthwhile target for isolation.

This thesis deals with the phytochemical and chemotaxonomical investigation of two new species of *Ancistrocladus* from East Africa and Malaysia. Furthermore, the leaves of the well-known liana *A. heyneanus* were analyzed for their alkaloid pattern for the first time. Thus, a total of ten new and five known naphthylisoquinoline alkaloids were isolated, structurally elucidated and tested for biological activity. Further aims were the stereochemical analysis of selected natural products for our cooperation partners and the development of methods for the phytochemical analysis established in our research group.

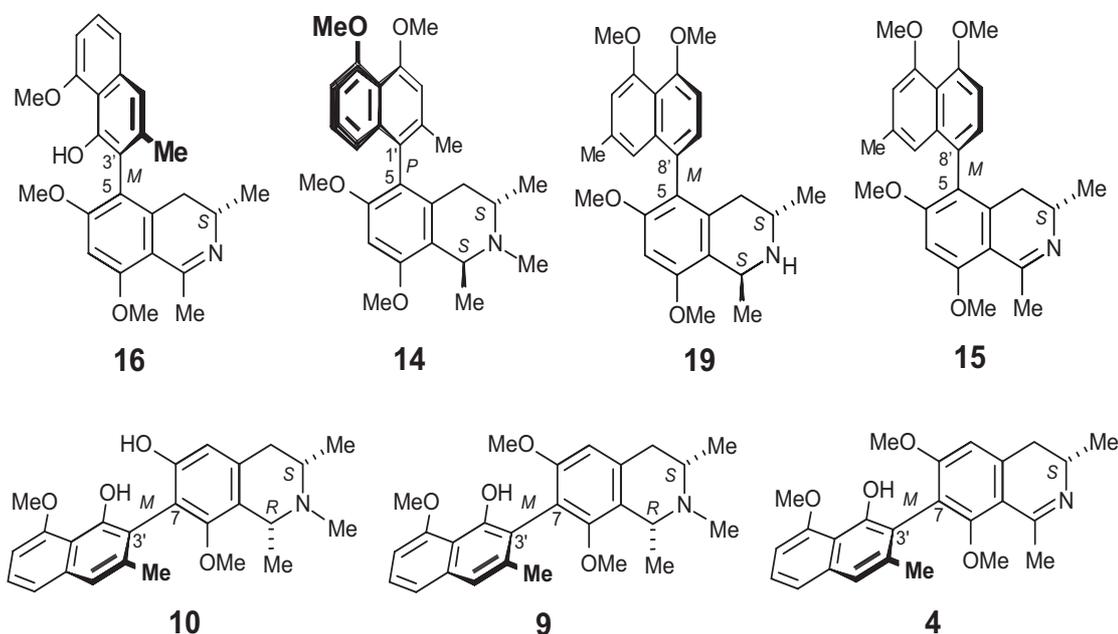
In detail, the following results were obtained:

- The leaves of the well-known Indian liana *Ancistrocladus heyneanus* were analyzed for naphthylisoquinoline alkaloids for the first time. Two of the three main compounds were found to be new alkaloids using the coupled HPLC techniques HPLC-UV, -MS, -NMR, and -CD. 'Classical' isolation of these three substances was performed by preparative HPLC to corroborate the structural assignments and to supply the pure alkaloids for biological tests. The two novel naphthylisoquinolines ancistrotanzanine C (**10**) and ancistroheynine B (**11**), and the known ancistrocladidine (**4**), belong to the as yet rare 7,3'-coupling type.



- From the leaves of the recently discovered East African liana *Ancistrocladus tanzaniensis* seven naphthylisoquinoline alkaloids were isolated, among them the already known compounds ancistrotanzanine B (**15**), ancistrotanzanine C (**10**), *O*-methylancistrocladinine (**19**), ancistrocladidine (**4**), and ancistrotectorine (**9**). *O,N*-dimethylancistrocladidine (**14**), which had previously been known only as a semi-synthetic compound, was obtained from this plant as a natural product for the first time.

The novel ancistrotanzanine A (**16**) represents a hitherto unprecedented 5,3'-coupling type; the absolute configuration at the axis was determined to be *M* by M. Reichert, who performed extensive quantum chemical CD calculations.

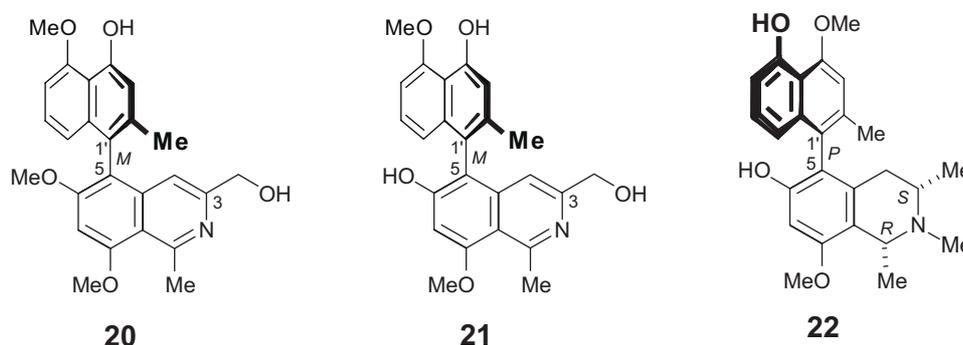


Compounds **15** and **16** showed good activities against the pathogens of leishmaniasis, even higher (by a factor of three) than the formerly most active alkaloid ancistrocaline A. The phytochemical results led to interesting chemotaxonomical conclusions. Thus, all naphthylisoquinoline alkaloids isolated from *A. tanzaniensis* belong to the so-called 'Ancistrocladaceae type' (*S*-configuration at C-3 and an oxygen function at C-6), typical of all Asian representatives and those of the only other known East African species *A. robertsoniorum*. Astonishingly, the alkaloids of *A. tanzaniensis* showed a close relationship to those of the Indian liana *A. heyneanus*. A comparison of the two HPLC spectra showed four equivalent compounds. Furthermore, both species possess the highest number of 7,3'-coupled alkaloids. This underlines the different character of *A. tanzaniensis* compared to the more closely located Central and West African representatives, many of which produce typical 'Dioncophyllaceae-type' alkaloids (*R*-configured at C-3 and devoid of an oxygen function at C-6).

The discovery of *A. tanzaniensis* in an exposed position at 1200 m above sea level, in contrast to all the other known *Ancistrocladus* species, and its previously unknown 5,3'-linked alkaloid clearly assign it to be a new species.

- On an expedition in Malaysia in 2000 an *Ancistrocladus* species was found, also at a high altitude (900-1180 m), which was presumed to be new and for which the name *A. benomensis* was suggested. First genetic investigations in the research group of Prof. Heubl using comparative sequencing of the ITS region of nuclear rDNA and *trnK*

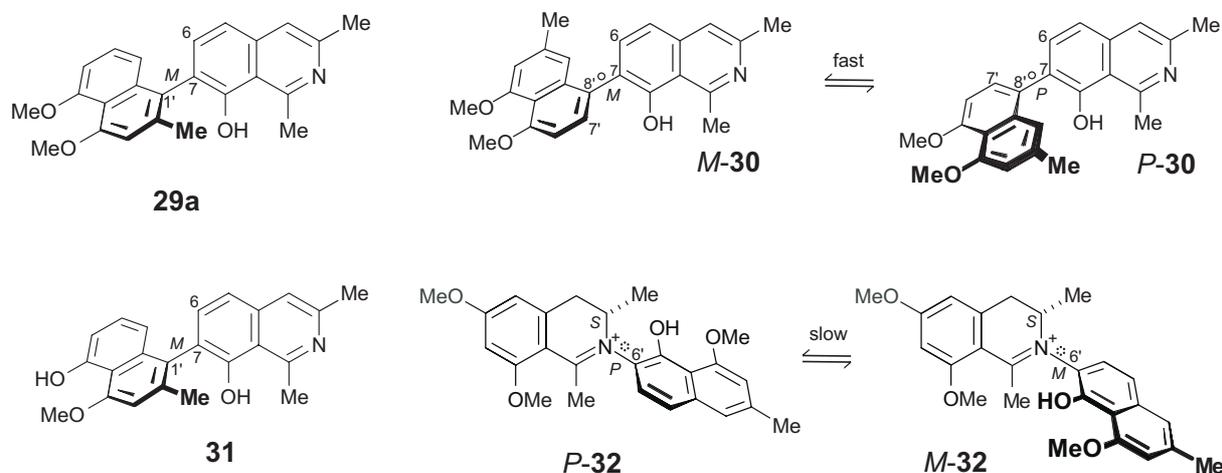
intron of cpDNA confirmed *A. benomensis* to be a distinct species. For the first time this plant, cultivated in the botanical garden of the university of Würzburg, was observed to flower, which permitted its scientific description together with the phytochemical, genetical and morphological results. Three new 5,1'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids were isolated from the stem bark of this unusual highland liana (**20-22**). Ancistrobenomine A (**20**) and 6-*O*-demethylancistrobenomine A (**21**) are the second and third optically active fully dehydrogenated naphthylisoquinoline alkaloids ever isolated as natural products. Furthermore, these alkaloids possess a novel functionality at C-3, a hydroxymethylene group. Compound **22** is a new 5'-*O*-demethyl derivative of ancistrocline.



The fully dehydrogenated alkaloids **20** and **21** share an additional third maximum at 363 nm in the HPLC-DAD spectrum, which is, in common, a significant hint at this structural feature for following investigations.

- When analyzing the leaves of *Ancistrocladus benomensis*, the new liquid-liquid chromatographic method, Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC), was used. This separated out the chlorophyll in a quantitative manner, and was more efficient and time-saving compared to the conventional liquid-liquid separating funnel techniques. The remaining leaf extract afforded three new naphthylisoquinoline alkaloids, *ent*-dioncophylleine A (**29a**), dioncophylleine D (**30**), and 5'-*O*-demethyl-*ent*-dioncophylleine A (**31**). A fourth entirely novel alkaloid, ancistrocladinium B (**32**), was isolated; it was simultaneously discovered and structurally elucidated from a different *Ancistrocladus* species by S. Pedersen in our research group. The absolute configuration of the atropo-diastereomers of ancistrocladinium B (**32**) was determined in cooperation with her. Compounds **29a**, **30**, and **31** are again fully dehydrogenated naphthylisoquinolines and, moreover, the first optically active representatives of their 7,1'- and 7,8'-coupling types, which underline the exceptional position of *A. benomensis*. Surprisingly, most of the alkaloids isolated from the leaves belong to the 'Dioncophyllaceae type' (devoid of an oxygen function at C-6; the criterion of an *R*-configuration at C-3 was not relevant due to the lack of stereogenic centers); the

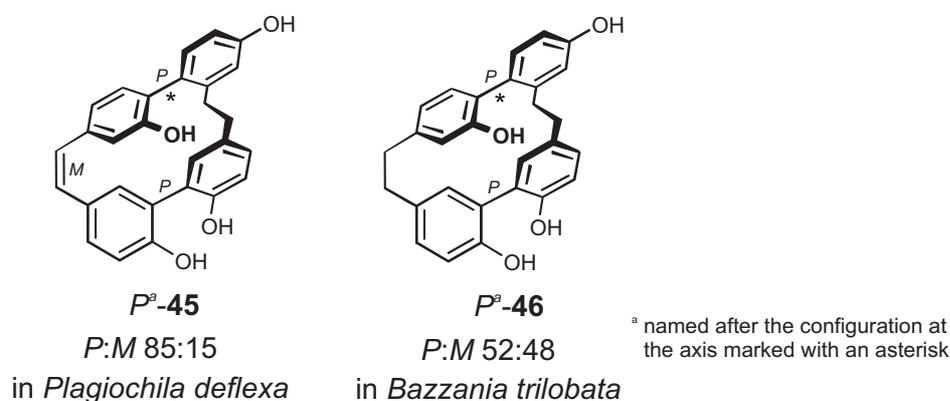
structural affiliation to this type had previously been reserved only to West and Central African naphthylisoquinoline alkaloids. Thus, the compounds **29a**, **30**, and **31** are the first Asian representatives of this type.



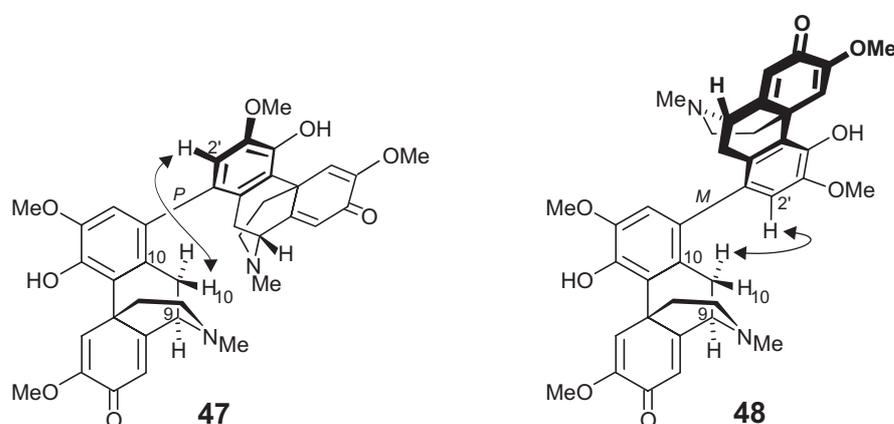
In addition, dioncophylleine D (**30**) is the first naturally occurring 7,8'-coupled 'Dioncophyllaceae-type' alkaloid. Ancistrocladinium B (**32**) with its entirely novel N,6'-coupling type is the first N-linked alkaloid from the South East Asian area. The absolute configurations at the semi-stable axis of both atropo-diastereomers were determined by LC-CD measurements and atropisomer-specific NOESY correlations. Due to the presence of these unprecedented alkaloids in this plant, *A. benomensis* is, from the phytochemical and chemotaxonomic point of view, unequivocally different from all other *Ancistrocladus* species and thus new. All compounds exhibited only weak antiprotozoal activities.

- The HPLC-DAD-MS-NMR investigation of a root bark extract of *Ancistrocladus mudogo* gave an insufficient separation of several naphthylisoquinoline alkaloids, all eluting at the same retention time. In cooperation with Prof. Holzgrabe, the method of capillary electrophoresis with a non-aqueous buffer system was applied to these natural products for the first time, whereby a good analytical separation of six main and various minor components was achieved. These compounds were identified as naphthylisoquinoline alkaloids by DAD detection and CE-MS/MS investigations. In parallel with the development of new RP18 stationary phases for the HPLC which are stable under basic conditions, the HPLC analysis of this root bark extract was improved by addition of ammonia to the solvents (8 mM). Thus, six separated peaks were obtained. The advantage of this method was the possibility of a direct 'upscaling' for isolating these compounds in preparative amounts for structural elucidation and biological tests.

- The macrocyclic bisbibenzyls isoplagiochines C (**45**) and D (**46**) had previously been isolated from liverworts by Dr. Speicher and co-workers. J. Mühlbacher and M. Reichert from our group had investigated their absolute configuration and their conformational behavior. In this thesis, the establishment of an enantiomeric analysis on a chiral phase (Chiracel OD-H) using LC-CD is described. For the development of the analytical method on a chiral phase, synthetic racemates were used. As only one of the three stereogenic elements, the 'Northern' biaryl axis (marked with an asterisk) was configurationally stable, these natural products, isolated from different liverworts, could either occur enantiomerically pure or with an enantiomeric ratio *P*:*M* in the plant (see figure). This investigation of isoplagiochines C (**45**) and D (**46**) by the above mentioned analytical method resulted in a *P*:*M* ratio of 85:15 and 52:48, respectively.



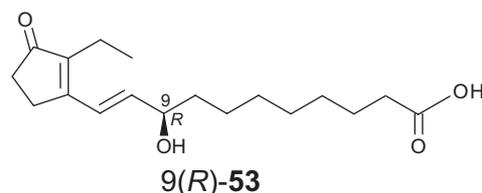
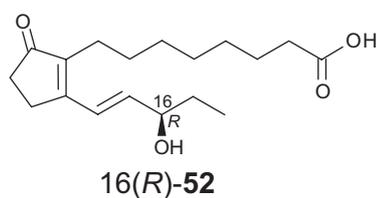
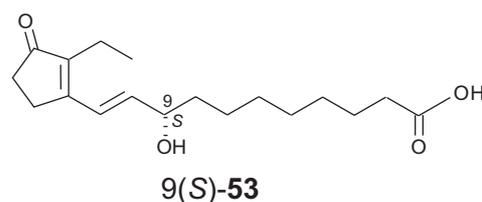
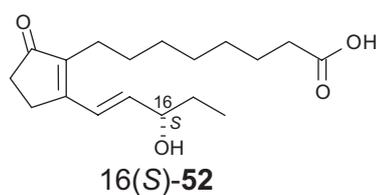
- The first biaryllic bis-morphinanedienone alkaloids, saludimerines A (**47**) and B (**48**), had been isolated from *Croton flavens* by the research group of Prof. Bracher. Their relative and (given the known configuration at the stereogenic centers) thus absolute configurations at the biaryl axes were determined using NMR techniques, especially ROESY experiments, which showed atropisomer-specific correlations (see the arrows in the figure).



Therefore, an unambiguous assignment of the proton signals of H_α-10 and H_β-10 was required; this was achieved using homodecoupling experiments, COSY, and analysis

of their coupling constants. Thus, saludimerine A (**47**) was found to be *P*-configured at the axis by the ROESY interaction of H-2' and H_β-10, while the *M*-configuration of saludimerine B (**48**) was deduced from the ROESY correlation of H-2' with H_α-10. These results corroborated the overall assignment of the atropo-diastereomers **47** and **48**, which had previously been done by extensive CD investigations by J. Mühlbacher from our group.

- In the research group of Prof. Müller, novel plant effectors had been found, which occur in racemic form due to a non-enzymatic free radical catalyzed biochemical mechanism. An analytical method on a chiral phase was established for the separation of the enantiomers of the two phytoprostane B₁ regioisomers (type I and II, 16(*S*)-**52**, 16(*R*)-**52**, 9(*S*)-**53**, and 9(*R*)-**53**). With the aid of LC-CD on a chiral phase the absolute configuration of each enantiomer, peak by peak trapped in the flow cell of the CD spectropolarimeter, and the order in which they elute from the column, was determined. The CD spectrum of 15(*S*)-prostaglandine B₁ methyl ester was used as the reference. For a better analytical handling all compounds had first been converted into their methyl esters.



The presented results have shown that the selected use of hyphenated techniques like LC-MS/MS-NMR-CD contributes to the solution of various, e.g., stereochemical problems in an efficient and elegant manner. Especially the not yet fully utilized potential for development of LC-NMR with its cryoprobe technique together with the continuous improvement of the other coupled online methods will lead to powerful and indispensable analytical tools, especially in the field of natural products chemistry.

EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeine Methoden

1.1 Verwendete Messgeräte und Apparaturen

Zerkleinerung des Pflanzenmaterials: Das luftgetrocknete Pflanzenmaterial wurde in einer Schlagmühle SM1 der Fa. *Retsch* mit einem Maschendrahteinsatz von 1 mm Lochweite gemahlen.

Gefrieretrocknung: Die wässrigen Proben wurden mit dem Gerät Alpha 1-4 der Fa. *Christ*, angeschlossen an eine vacUUbrand-RD-8-Pumpe der Fa. *Brand*, vom Lösungsmittel befreit.

Schmelzpunkte (Schmp.): Die Schmelzpunkte wurden an einem Thermovar-Kofler-Heiztisch-Mikroskop der Fa. *Reichert-Jung* bestimmt. Die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Ultravioletspektren (UV): Die Messung der UV-Spektren wurde an einem CARY-50-Conc-UV-vis-Spektrophotometer der Fa. *Varian* in dem angegebenen Lösungsmittel durchgeführt. Die Wellenlängen (λ) und Intensitäten ($\log \epsilon$) der Absorptionsmaxima sind angegeben.

Infrarotspektren (IR): Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem *Jasco-FT-410*-Spektrometer. $\tilde{\nu}$ bezeichnet die Wellenzahl. Die Intensitäten der Absorptionsbanden sind gekennzeichnet durch: s = stark, m = mittel, w = schwach und br. = breit.

Kernresonanzspektren ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$): Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an den Spektrometern Avance 400 und DMX 600 (400 und 600 MHz bzw. 100 und 150 MHz) der Firma *Bruker* bei Raumtemperatur aufgenommen. Zur Akquisition der HPLC-NMR-Spektren wurde ein 60- μL -Durchflussprobenkopf verwendet, der mit einer z-Gradientenspule ausgestattet war. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala angegeben und beziehen sich auf $\delta_{\text{TMS}} = 0$. Zur Eichung der ^1H -NMR-Spektren dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard [z.B. $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$; $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 3.31$, $\delta\text{-Aceton-d}_6 = 2.05$] und bei den ^{13}C -NMR-Spektren die ^{13}C -Resonanzsignale der verwendeten Lösungsmittel [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.0$; $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.15$, $\delta\text{-Aceton-d}_6 = 29.8$]. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der XWIN-NMR-Software (*Bruker*). Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: Singulett = s, Dublett = d, doppeltes Dublett = dd, Triplett = t, doppeltes Triplett = dt, Quartett = q, doppeltes Quartett = dq, Quintett = qui, doppeltes Quintett = dquin, Septett = sep, Multiplett = m, zentriertes Multiplett

= m_c . Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgte in Hertz (Hz). In der Schreibweise nJ gibt n die Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen wieder.

Massenspektren (MS): Elektronenstoß-Massenspektren (EI) und hochauflösende Elektronenstoß-Massenspektren (HREIMS) wurden mit dem Spektrometer MAT-8200 der Firma *Finnigan* bei einem Ionisationspotential von 70 eV aufgenommen. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Intensität bezogen auf den Basispeak ($I = 100\%$) an. Die Messung der CI-, DCI- und FAB-Spektren erfolgte mit Hilfe des Geräts *Finnigan* MAT-90, unter Verwendung von *i*Butan, Methan oder Ammoniak als Ionisationsgas. Elektrospray-Massenspektren (ESIMS) wurden, sowohl in Kopplung mit der HPLC (HPLC-MS) als auch im stand-alone-Betrieb, mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer TSQ 7000 der Firma *Finnigan* aufgenommen (Kapillarentemperatur: 210 °C; ESI-Spannung: 3.5 kV; N_2 als Hilfsgas). Einige der ESI-Massenspektren wurden mit einer Ionenfalle 1100SL der Firma *Agilent* (Kapillarentemperatur: 350 °C; ESI-Spannung: 3.5 kV; N_2 als Hilfsgas) in Kopplung mit einem *Agilent*-1100-HPLC-System gemessen.

Drehwerte: Zur Ermittlung der optischen Aktivitäten diente ein Polarimeter der Fa. *Perkin-Elmer*. Bei einer Spaltbreite von 1 mm wurden die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D$ bei den Wellenlängen $\lambda = 546$ nm und $\lambda = 579$ nm der Quecksilberdampfampe bestimmt. Dann wurde mit Hilfe der Drude-Gleichung^[166] auf die Natrium-D-Line ($\lambda = 589$ nm) extrapoliert:

$$\alpha_{589} = \frac{\alpha_{579} \times 3.199}{4.199 - \frac{\alpha_{579}}{\alpha_{546}}} \quad [\alpha] = \frac{\alpha \times 100}{c \times d}$$

α : gemessener Drehwert; c : Konzentration [g/100 mL]; d : Schichtdicke [dm].

Die Angabe der ermittelten Drehwerte erfolgt in °.

Ein Teil der Drehwerte wurde auf einem P-1020-Polarimeter der Fa. *Jasco* direkt bei der Natrium-D-Line ($\lambda = 589$ nm) gemessen.

Circulardichroismus (CD): CD-Spektren wurden an einem *Jasco*-J-715-Spectropolarimeter (Fa. *Jasco*) aufgenommen und mit der dazugehörigen Software verarbeitet. Die Scangeschwindigkeit betrug 200 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm. Die differentiellen Absorptionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ [cm²/mol] bei einer bestimmten Wellenlänge λ [nm] wurden im angegebenen Lösungsmittel bestimmt. Von den gemessenen Spektren wurde jeweils das Lösungsmittelspektrum abgezogen.

1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Als Fließmittel wurde ein System Dichlormethan/Methanol 90:10 verwendet. Zur Detektion der Substanzen wurde die Fluoreszenzlösung bei 254 nm, die Anregung der Eigenfluoreszenz bei 366 nm sowie das Färbeverhalten gegenüber Iod, 5proz. Schwefelsäure in Methanol oder Dragendorff-Reagenz genutzt.

Säulenchromatographie (SC): Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 0.063-0.2 mm der Firma *Merck* benutzt. Die Säulen wurden nass befüllt, und die Angabe des Fließmittelzusammensetzung erfolgt in allen Fällen in Volumenprozent. Zur Gelchromatographie wurde Sephadex LH-20 eingesetzt.

Präparative Schichtchromatographie (PSC): Es wurden 20x20-cm-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. *Merck* mit Konzentrierungszone und einer Schichtdicke von 1 oder 2 mm benutzt.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC): Analytische HPLC mit DAD-Detektion wurde auf einer computergesteuerten Anlage der Firma *Jasco* durchgeführt (Entgasungseinheit DG-1580, Mischer LG-1580, Pumpe PU-1580, Säulenofen CO-1560, Probenwechsler AS-1555, Diodenarraydetektor MD-1510). Zusätzlich waren ein Fluoreszenzdetektor RF-535 der Fa. *Shimadzu* und ein Lichtstreuendetektor (ELSD) Sedex 75 der Fa. *Sedere* in Serie geschaltet. Die verwendete Software bestand aus dem Borwin-Programmpaket der Fa. *Jasco*.

Falls nicht anders angegeben wurden für die HPLC-UV- und HPLC-MS-Läufe eine Symmetry-C₁₈-Säule (*Waters*; 4.6 x 250 mm, 5 µm) und der folgende Lösungsmittelgradient verwendet: Wasser + 0.05 % TFA (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss: 1 mL/min; 0 min 5 % B, 30 min 70 % B, 35 min 100 % B, 40 min 100 % B, 41 min 5 % B, 46 min 5 % B. Zur Ermittlung der Anzahl austauschender Protonen wurde dieser Gradient in der HPLC-MS auch mit D₂O an Stelle von H₂O eingesetzt.

Für die HPLC-NMR-Experimente wurde ebenfalls eine Symmetry-C₁₈-Säule (*Waters*; 4.6 x 250 mm, 5 µm) und folgendes Lösungsmittelsystem verwendet: D₂O + 0.05 % TFA (A), MeCN + 0.05 % TFA (B).

Für die präparative HPLC wurde eine Anlage bestehend aus einer *Waters*-600E-Pumpe, einem *Rheodyne*-7125i-Injektor und einem *Waters*-996-Diodenarraydetektor eingesetzt. Die Steuerung der Geräte und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels PC mit Millennium Software Version 2.15 der Fa. *Waters*. Als Säule für die präparativen HPLC-

Trennungen wurde eine SymmetryPrep-C₁₈-Säule (*Waters*; 19 x 300 mm, 7 µm) und der folgende Lösungsmittelgradient verwendet: Wasser + 0.05 % TFA (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss: 11 mL/min; 0 min 20 % B, 20 min 55 % B, 25 min 100 % B, 30 min 100 % B, 31 min 20 % B, 35 min 20 % B. Die produktthaltigen Fraktionen aus der präparativen HPLC wurden vereinigt und der Acetonitrilanteil im Vakuum abgedampft. Zur Abtrennung der Trifluoressigsäure aus dem HPLC-Eluens wurde die Lösung anschließend durch eine mit Methanol und Wasser vorkonditionierte RP-18-Kartusche (*Merck*, mit 500 mg RP-18-Material) gesaugt. Nach Waschen mit etwas Wasser wurden die am Adsorbens gebundenen Substanzen mit Methanol eluiert.

HPLC-CD-Kopplung: Das chromatographische System bestand aus einer HPLC-Pumpe der Fa. *Jasco* (PU-1580), einem Entgaser Gastorr 153 der Fa. *Flow*, einem Gradientenmischer LG-980-02S (Fa. *Jasco*), einem Säulenofen Jetstream 2 Plus (Fa. *Beckmann*) und einem UV-Detektor 7215 der Firma *ERC*. Als CD-Detektor wurde ein J-715-Spectropolarimeter (*Jasco*) verwendet, das mit einer über ein Motorventil 7010 (Fa. *Besta*) angesprochenen 5-mm-Standard-Flusszelle der Fa. *Jasco* betrieben wurde. Falls nicht anders angegeben wurden für die HPLC-CD-Läufe eine Chiralcel-OD-H-Säule (*Daicel*; 4.6 x 250 mm, 5 µm) und der folgende Lösungsmittelgradient verwendet: *n*-Hexan + 0.05 % TFA (A), *iso*-PrOH + 0.05 % TFA (B); Fluss: 0.5 mL/min; 0 min 10 % B, 10 min 10 % B, 30 min 50 % B, 40 min 50 % B, 41 min 10 % B.

Die Messung der online-CD-Spektren erfolgte im *stop-flow*-Modus mit drei Akkumulationen von 200 bis 400 nm bei einer Scangeschwindigkeit von 500 nm/min, einer Antwortzeit von 0.5 sec und einer Bandweite von 0.5 nm. Die Spektren wurden anschließend durch Messung und Subtraktion des Laufmittelspektrums basislinienkorrigiert und leicht geglättet (Smooth = 5). Die Werte sind in Milligrad (Φ) angegeben.

HPLC-NMR-Kopplung: Das HPLC-System bestand aus einer Niederdruckgradientenpumpe LC22 (Fa. *Bruker*), einem *Rheodyne*-Injektor 7725i mit 250-µL-Probenschleife und einem Lambda-1000-UV-Detektor (Fa. *Bischoff*). Die UV-Messzelle (0.01 cm Strahlengang) war über eine ca. 3 m lange Kapillarleitung (0.25 mm I.D.) direkt über das Interface BPSU (*Bruker* Peak Sampling Unit) mit dem NMR-Durchflussprobenkopf verbunden. Die Programme ChromStar und BPSU-12 (Fa. *Bruker*) steuerten das HPLC-System und das BPSU-Interface. Alle HPLC-NMR-Experimente wurden an einem DMX-600-Spektrometer ($B_0 = 14.09$ T) durchgeführt. Als Probenkopf diente bei allen Gradientenexperimenten ein invers konstruierter (¹H, ¹³C)-Kopf mit einer 60-µL-Durchflusszelle (Innendurchmesser 3 mm) und *z*-Gradientenspule. Datenaufnahme und Prozessierung erfolgten mit der Software XWinNMR von *Bruker*. Es wurden überwiegend die Standard-Pulsprogramme und

Automationsroutinen der Fa. *Bruker* verwendet, die mit einer WET-Lösungsmittelunterdrückung^[42] arbeiten. Bei zweidimensionalen Experimenten wurden teilweise eigens modifizierte Pulsprogramme eingesetzt.

Kapillarelektrophorese (CE): Die CE-Messungen wurden an einem P/ACE-MDQ-Gerät der Fa. *Beckmann* durchgeführt, das mit einer Quarzkapillare der Fa. *Polymicro Technologies* ausgestattet war (21 cm lang, 75 µm innerer Durchmesser). Verbesserte Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten wurde mit einer Polyacrylamidkapillare der Fa. *Beckmann* erreicht (21 cm lang, 50 µm innerer Durchmesser).

CE-MS/MS-Kopplung: Eine HP-3D-Kapillarelektrophorese der Fa. *Agilent Technologies* mit einer Quarzkapillare (57 cm lang, 50 µm innerer Durchmesser) der Fa. *Polymicro Technologies* wurde an ein Esquire-3000plus-Ionenfallen-Massenspektrometer der Fa. *Bruker* gekoppelt. Die Kapillarspannung wurde auf 30000 V und die Kapillarentemperatur auf 20 °C eingestellt. Vollscan- und Auto-MS/MS-Experimente wurden im ESI-positiv-Modus (Kapillarentemperatur: 300 °C, ESI-Spannung: 4000 V, N₂ als Hilfsgas) einem Massenbereich von *m/z* 50-500 durchgeführt.

Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC): Für die Flüssig-flüssig-Chromatographie wurde ein FCPC-System der Fa. *Kromaton*^[118] eingesetzt, welches mit einem 200-mL-Rotor ausgestattet war. Als Pumpe wurde eine P-400 (*Latek*) benutzt, als UV-Detektor ein Pro Star 320 (*Varian*) mit einer SuperPrep-Dualflusszelle (4 mm und 0.15 mm). Die Probe wurde über ein 3725i-Probenventil (*Rheodyne*) mit 20-ml-Probenschleife aufgegeben und die Fraktionen mit einem Fraktionssammler FC-1 (*Dynamax*) gesammelt.

Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (MPLC): Hier wurden die Pumpe HD2-200 der Fa. *Besta* und ein *Rheodyne-5020*-Low-Pressure-Probenaufgabeventil mit 10-ml-Probenschleife verwendet. Zur Trennung benutzte man eine Lobar-Fertigsäule (25 x 310 mm; LiChrorep RP-18, 40-63 µm, Größe B) der Fa. *Merck*. Die Detektion erfolgte mit einem *Latek*-UV-Detektor.

Lösungsmittel: Wasser (H₂O) für die HPLC wurde über eine Milli-Q-Anlage der Fa. *Millipore* gereinigt und entionisiert. Acetonitril für die HPLC (MeCN, HPLC gradient grade), Methanol (MeOH, Uvasolv) und Ethanol (EtOH, Uvasolv) für UV, CD, und Drehwertbestimmung sowie Trifluoressigsäure (TFA) wurden käuflich erworben und ohne weitere Reinigung verwendet. Dichlormethan (CH₂Cl₂), Chloroform (CHCl₃), Isopropanol (*iso*-PrOH) und *n*-Hexan wurden vor Verwendung destilliert.

2 Untersuchung der Blätter von *Ancistrocladus heyneanus* Wall.

2.1 Isolierung der Naphthylisochinolin-Alkaloide

Das Pflanzenmaterial von *A. heyneanus* wurde 2001 im Botanischen Garten der Universität Würzburg gesammelt. Ein Herbarexemplar wurde im Herbarium Bringmann unter der Nummer 4.3 hinterlegt.

200 g frische Blätter wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Material wurde nach Zerkleinerung sukzessive mit Lösungsmitteln steigender Polarität (PE, CH₂Cl₂, MeOH) kalt extrahiert. 3 g des vom Lösungsmittel befreiten Dichlormethan-Extrakts (11.3 g) löste man in 10 mL MeOH, filtrierte über eine mit MeOH und Wasser vorkonditionierte RP-18-Kartusche und einen 0.2- μ m-PTFE-Spritzenvorsatzfilter und injizierte dann in 800- μ L-Injektionen in die präparative HPLC. Unter Verwendung des Standardgradienten und der SymmetryPrep-C-18-Säule (siehe Kap. 1.2) konnten die Verbindungen **10** (8.4 mg, $t_R = 18.8$ min), **11** (11.2 mg, $t_R = 19.8$ min) und **4** (7.1 mg, $t_R = 23.0$ min) rein isoliert werden. Das Acetonitril der jeweiligen Fraktion wurde unter vermindertem Druck abgezogen und die Reinsubstanz mittels Lyophilisation getrocknet.

2.2 Ancistrotanzanin C (**10**)

Gelbe ölige Substanz (8.4 mg).

$[\alpha]_D^{20} = -76.0$ ($c = 0.01$ in CHCl₃).

UV (MeOH): λ_{231} 0.74, λ_{307} 0.07.

CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{205}$ -4.0, $\Delta\epsilon_{219}$ 22.9, $\Delta\epsilon_{239}$ -12.0.

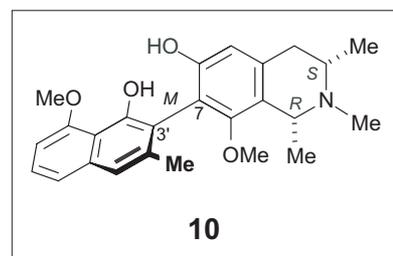


Tabelle 5. NMR-Daten von Ancistrotanzanin C (**10**) in CDCl₃.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	ROESY	COSY (J _{HH} [Hz])
1	57.0	3.84 <i>q</i>	8, 9, 10, 1-Me, N-Me	3, N-Me, 8-OMe, 1-Me	1-Me (6.5)
3	55.5	2.56 <i>m</i>		1, 4, 3-Me, N-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	37.9	2.63 <i>dd</i>	3, 5, 9, 10, 3-Me	3, 5, 1-Me, 3-Me	3 (10.2), 4 _{eq} (15.5)
4 _{eq}	37.9	2.73 <i>dd</i>	3, 5, 9, 10, 3-Me	3, 5, 3-Me	3 (3.3), 4 _{ax} (15.5)
5	109.7	6.58 <i>s</i>	3', 4, 6, 7, 9	4 _{ax} , 4 _{eq}	
6	155.7				
7	114.7				
8	152.1				
9	124.2				
10	137.4				
1'	119.8	7.29 <i>s</i>	3', 5', 8', 9', 10', 2'-Me	8', 2'-Me	
2'	138.6				
3'	115.0				
4'	152.0				
5'	156.1				
6'	103.7	6.67 <i>dd</i>	5', 8', 10'	7', 5'-OMe	7' (7.5), 8' (1.4)
7'	126.5	7.34 <i>dd</i> ^a	5', 6', 9'	6', 8'	6' (7.3), 8' (8.3)
8'	121.2	7.38 <i>dd</i>	1', 6', 9', 10'	1', 7'	7' (8.3), 6' (1.4)
9'	136.6				
10'	113.4				
1-Me	23.4	1.45 <i>d</i>	1, 9	1, 4 _{ax} , N-Me, 8-OMe	1 (6.5)
2'-Me	20.3	2.18 <i>s</i>	1', 2', 3'	1, 1', 8-OMe	
3-Me	21.4	1.26 <i>d</i>	3, 4	3, 4 _{ax} , 4 _{eq} , N-Me	3 (6.2)
N-Me	41.8	2.49 <i>s</i>	1, 3	1, 3, 1-Me, 3-Me	
4'-OH		9.68 <i>s</i>			
5'-OMe	56.1	4.03 <i>s</i>	5'	6'	
8-OMe	60.2	3.33 <i>s</i>	8	1, 1-Me, 2'-Me	

^a Das Doppeldublett überlagert oft zu einem pseudo-Triplett, deshalb können die Kopplungskonstanten ungenau sein.

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3381$ (br.), 2965 (m), 1607 (s), 1579 (s), 1362 (s), 1204 (m), 1091 (s) cm⁻¹.

MS (EI): m/z (%): 407 [M]⁺ (2), 392 (100), 377 (10), 376 (11), 203.5 (7).

MS (CI positiv, NH₃): m/z 408 [M+H]⁺.

MS (ESI positiv): m/z 408 [M+H]⁺.

C₂₅H₂₉NO₄:

Ber. 407.2097;

Gef. 407.2094

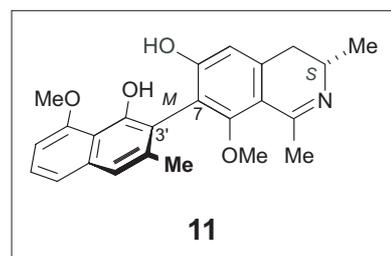
(EIMS).

2.3 Ancistroheynin B (11)

Gelbe ölige Substanz (11.2 mg).

$[\alpha]_D^{20} = -194.9$ ($c = 0.025$ in MeOH).

UV (MeOH): λ_{231} 0.13, λ_{319} 0.07, λ_{335} 0.06.



CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{206}$ -3.2, $\Delta\epsilon_{219}$ +32.1, $\Delta\epsilon_{235}$ -14.0, $\Delta\epsilon_{248}$ 4.1, $\Delta\epsilon_{338}$ -15.7.

Tabelle 6. NMR-Daten von Ancistroheynin B (11) in CDCl_3 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	174.2				
3	49.0	3.95 <i>m</i>		4 _{eq} , 3-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	34.3	2.79 <i>dd</i>	3, 9, 10, 3-Me	4 _{eq} , 5, 3-Me	3 (10.4), 4 _{eq} (16.7)
4 _{eq}	34.3	3.03 <i>dd</i>	3, 9, 10, 3-Me	3, 4 _{ax} , 5, 3-Me	3 (5.3), 4 _{ax} (16.7)
5	111.6	6.66 <i>s</i>	4, 6, 7	4 _{ax} , 4 _{eq}	
6	165.2				
7	117.8				
8	163.7				
9	111.1				
10	140.2				
1'	119.6	7.24 <i>s</i>	4', 7, 8', 9', 10', 2'-Me	8', 2'-Me	
2'	137.4				
3'	114.4				
4'					
5'	156.2				
6'	103.8	6.75 <i>dd</i>	5', 8', 10'	7', 5'-OMe	7' (7.2), 8' (1.3)
7'	126.6	7.30 <i>dd</i> ^a	5', 6', 9'	6', 8'	6' (7.2), 8' (8.3)
8'	121.2	7.34 <i>dd</i>	1', 6', 9', 10'	1', 7'	7' (8.3), 6' (1.3)
9'	136.7				
10'	113.2				
1-Me	23.5	2.73 <i>s</i>	1, 9	8-OMe	
2'-Me	20.1	2.13 <i>s</i>	1', 2', 3'	1', 8-OMe	
3-Me	17.5	1.44 <i>d</i>	3, 4	3, 4 _{ax} , 4 _{eq}	3 (6.6)
4'-OH		9.68 <i>s</i>			
5'-OMe	56.1	4.00 <i>s</i>	5'	6'	
6-OH		13.61 <i>s</i>			
8-OMe	60.4	3.38 <i>s</i>	8	1-Me, 2'-Me	

^a Das Doppeldublett überlagert oft zu einem pseudo-Triplett, deshalb können die Kopplungskonstanten ungenau sein.

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3381$ (m), 3213 (m), 2926 (m), 2853 (m), 1580 (s), 1503 (m), 1455 (m), 1407 (s), 1359 (s), 1321 (s), 1272 (s), 1166 (m), 1089 (m) cm^{-1} .

MS (EI): m/z (%): 391 $[\text{M}]^+$ (100), 376 (69), 360 (18).

MS (ESI positiv): m/z 392 $[M+H]^+$.

$C_{24}H_{25}NO_4$: Ber. 391.1783; Gef. 391.1781 (EIMS).

2.4 Ancistrocladidin (4)

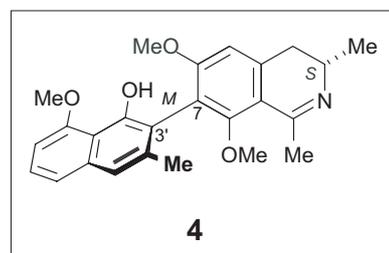
Gelber amorpher Feststoff (7.1 mg).

Schmp. 251 °C (zers.; MeOH);

Lit.: 255-258 °C (zers.).^[62]

$[\alpha]_D^{20} = -122.3$ ($c = 0.05$ in MeOH);

Lit.: -129.7 ($c = 0.06$ in $CHCl_3$).^[62]



CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{204} -2.5$, $\Delta\epsilon_{219} +29.8$, $\Delta\epsilon_{236} -9.1$, $\Delta\epsilon_{263} -0.3$, $\Delta\epsilon_{284} -4.1$, $\Delta\epsilon_{336} -4.8$.

1H -NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 1.40$ (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 3- CH_3), 2.01 (s, 3 H, 2'- CH_3), 2.71 (s, 3 H, 1- CH_3), 2.82 (dd, $J = 10.4, 16.6$ Hz, 1 H, 4- H_{ax}), 3.06 (dd, $J = 5.6, 16.6$ Hz, 1 H, 4- H_{eq}), 3.31 (s, 3 H, 8- OCH_3), 3.73 (s, 3 H, 6- OCH_3), 3.94 (s, 3 H, 5'- OCH_3), 3.95 (m, 1 H, 3-H), 6.63 (s, 1 H, 5-H), 6.68 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.16 (s, 1H, 1'-H), 7.23 (dd, $J = 7.3, 8.1$ Hz, 1 H, 7'-H), 7.27 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, 8'-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 17.1$ (3-Me), 19.9 (2'-Me), 23.2 (1-Me), 34.3 (C-4), 49 (C-3), 55.8 (5'-OMe), 56.3 (6-OMe), 60.3 (8-OMe), 103.5 (C-6'), 106.6 (C-5), 109.8 (C-3'), 112.2 (C-9), 114.4 (C-10'), 119.0 (C-1'), 119.4 (C-7), 121.0 (C-8'), 126.1 (C-7'), 136.3 (C-9'), 136.8 (C-2'), 140.4 (C-10), 151.2 (C-4'), 155.9 (C-5'), 162.3 (C-8), 165.4 (C-6), 174.3 (C-1).

MS (ESI positiv): m/z 406 $[M+H]^+$.

Die spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen aus der Literatur überein.^[46,62]

3 Untersuchung der Blättern von *Ancistrocladus tanzaniensis* Cheek & Frimodt-Møller

3.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Das Pflanzenmaterial von *A. tanzaniensis* wurde im Jahr 2000 in den Uzungwa-Bergen in Tansania gesammelt. Ein Herbarexemplar wurde im Herbarium Bringmann unter der Nummer 42 hinterlegt.

Luftgetrocknete Blätter (500 g) wurden zerkleinert und sukzessive mit Petrolether, Dichlormethan und Methanol kalt extrahiert. 2 g des vom Lösungsmittel befreiten Dichlormethan-Extrakts (29.6 g) löste man in 10 mL MeOH, filtrierte über eine mit MeOH und Wasser vorkonditionierte RP-18-Kartusche, einen 0.2- μ m-PTFE-Spritzenvorsatzfilter und injizierte dann in 800- μ L-Injektionen in die präparative HPLC. Unter Verwendung des Standardgradienten und der SymmetryPrep-C-18-Säule (siehe Kap. 1.2) konnten die Verbindungen **14** (2.6 mg, t_R = 18.8 min), **10** (3.6 mg, t_R = 19.8 min), **15** (3.2 mg, t_R = 20.7 min), **9** (2.1 mg, t_R = 22.5 min), **4** (3.8 mg, t_R = 23.0 min) und **16** (4.3 mg, t_R = 23.5 min) rein isoliert werden. Das Acetonitril der jeweiligen Fraktion wurde unter vermindertem Druck abgezogen und die Reinsubstanz mittels Lyophilisation getrocknet.

3.2 *O,N*-Dimethylancistrocladin (**14**)

Weißer amorpher Substanz (2.6 mg).

Schmp. 163 °C (zers.; MeOH);

Lit.: 183-185 °C (Ether).^[71]

$[\alpha]_D^{20} = -17.3$ ($c = 0.03$ in MeOH);

Lit.: -21.0 ($c = 2.55$ in CHCl_3).^[71]

UV (MeOH): λ_{235} 1.86, λ_{303} 1.32.

CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{199}$ 19.6, $\Delta\epsilon_{226}$ -27.6, $\Delta\epsilon_{240}$ 26.2, $\Delta\epsilon_{285}$ -1.5.

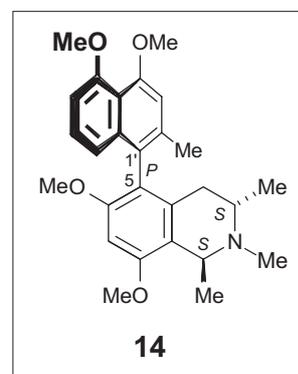


Tabelle 7. NMR-Daten von *O,N*-Dimethylancistrocladin (**14**) in CDCl₃.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J _{HH} [Hz])
1	60.4	4.60 <i>q</i>		4 _{ax} , 1-Me, 3-Me, N-Me, 8-OMe	1-Me (6.8)
3	59.9	3.02 <i>m</i>		4 _{eq} , 1-Me, 3-Me, N-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	30.8	2.59 <i>dd</i>	9	1, 3-Me, 2'-Me	3 (9.5), 4 _{eq} (17.3)
4 _{eq}	30.8	2.22 <i>dd</i>	9	3, 8'	3 (4.1), 4 _{ax} (17.3)
5	120.0				
6	158.7				
7	94.8	6.58 <i>s</i>	5, 6, 8, 9	6-OMe, 8-OMe	
8	156.9				
9	113.7				
10	133.5				
1'	123.7				
2'	136.6				
3'	109.3	6.83 <i>s</i>	1', 10'	2'-Me, 4'-OMe	
4'	156.6				
5'	158.1				
6'	105.9	6.79 <i>dd</i>	10'	7', 5'-OMe	7' (8.0), 8' (0.7)
7'	127.0	7.18 <i>dd</i> ^a	9'	6', 8'	6' (7.8), 8' (8.4)
8'	117.5	6.63 <i>dd</i>	1', 6', 10'	4 _{eq} , 7'	7' (8.5), 6' (1.0)
9'	136.6				
10'	116.8				
1-Me	19.7	1.78 <i>d</i>	9	3, N-Me, 8-OMe	1 (6.8)
2'-Me	20.8	2.12 <i>s</i>	1', 2', 3'	3', 4 _{ax}	
3-Me	18.7	1.36 <i>d</i>		1, 3, 4 _{ax} , N-Me	3 (6.7)
N-Me	43.2	2.96 <i>s</i>	1, 3	1, 3, 1-Me, 3-Me	
4'-OMe	56.7	4.03 <i>s</i>	4'		
5'-OMe	56.9	3.98 <i>s</i>	5'		
6-OMe	56.4	3.67 <i>s</i>	6		
8-OMe	55.9	3.96 <i>s</i>	8	1, 1-Me	

^a Das Doppeldublett überlagert oft zu einem pseudo-Triplett, deshalb können die Kopplungskonstanten ungenau sein.

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 2925$ (m), 2852 (m), 2359 (m), 1674 (s), 1584 (s), 1261 (s), 1202 (s), 1129 (s) cm⁻¹.

MS (EI): *m/z* (%): 435 [M]⁺ (5), 420 (100), 404 (6).

MS (ESI positiv): *m/z* 436 [M+H]⁺.

C₂₇H₃₃NO₄:

Ber. 435.2409;

Gef. 435.2406

(EIMS).

3.3 Ancistrotanzanin C (10)

Gelbe ölige Substanz (3.6 mg).

$[\alpha]_D^{20} = -75.5$ ($c = 0.01$ in CHCl_3); Lit.: -76.0 ($c = 0.01$ in CHCl_3).^[61]

Die Spektroskopischen Daten wurden bereits in Kapitel 2.2 aufgeführt, da die gleiche Verbindung zuvor aus Blättern von *A. heyneanus* isoliert, aber im Rahmen der Erstveröffentlichung nach der Pflanze *A. tanzaniensis* benannt wurde.^[53,61]

3.4 Ancistrotanzanin B (15)

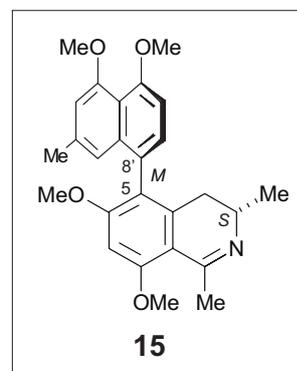
Gelbe ölige Substanz (0.8 mg).

$[\alpha]_D^{20} = +45.3$ ($c = 0.05$ in MeOH);

Lit.: $+44.0$ ($c = 0.01$ in MeOH).^[72]

UV (MeOH): λ_{230} 1.89, λ_{305} 1.42.

CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{216}$ -16.6, $\Delta\epsilon_{230}$ +10.2, $\Delta\epsilon_{259}$ +3.0, $\Delta\epsilon_{320}$ +2.8.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.26$ (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, 3- CH_3), 2.23 (dd, $J = 8.8, 17.1$ Hz, 1 H, 4- H_{ax}), 2.32 (s, 3 H, 2'- CH_3), 2.57 (dd, $J = 5.7, 17.1$ Hz, 1 H, 4- H_{eq}), 2.82 (s, 3 H, 1- CH_3), 3.77 (m, 1 H, 3-H), 3.81 (s, 3 H, 6- OCH_3), 3.98 (s, 3 H, 4'- OCH_3), 3.99 (s, 3 H, 5'- OCH_3), 4.07 (s, 3 H, 8- OCH_3), 6.50 (s, 1 H, 1'-H), 6.55 (s, 1 H, 7-H), 6.72 (s, 1 H, 3'-H), 6.83 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.06 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, 7'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 17.2$ (3-Me), 22.3 (2'-Me), 24.3 (1-Me), 31.9 (C-4), 48.1 (C-3), 56.3 (8-OMe), 56.4 (6-OMe), 56.5 (4'-OMe), 56.7 (5'-OMe), 95.1 (C-7), 104.8 (C-6'), 108.5 (C-9), 109.0 (C-3'), 116.4 (C-8'), 122.5 (C-5), 123.3 (C-10'), 123.5 (C-1'), 129.2 (C-7'), 135.6 (C-9'), 137.5 (C-2'), 140.6 (C-10), 157.6 (C-5'), 157.8 (C-4'), 163.2 (C-8), 166.0 (C-6), 173.7 (C-1).

MS (ESI positiv): m/z 420 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Die spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen aus der Literatur überein.^[72]

$[\alpha]_D^{20} = -132.1$ ($c = 0.05$ in CHCl_3);

Lit.: -129.7 ($c = 0.06$ in CHCl_3).^[62]

Die physikalischen und spektroskopischen Daten wurden bereits in Kapitel 2.4 aufgeführt.

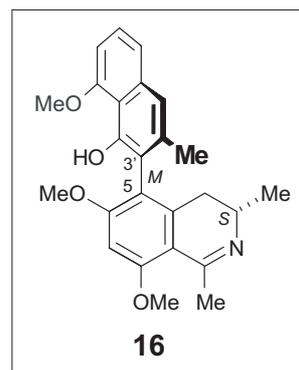
3.7 Ancistrotanzanin A (16)

Blassgelbes Pulver (4.3 mg).

Schmp. 243 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = +69.5$ ($c = 0.2$ in EtOH).

UV (MeOH): λ_{231} 1.87, λ_{307} 1.43.



CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{216}$ -29.7, $\Delta\epsilon_{230}$ 12.9, $\Delta\epsilon_{243}$ -16.6, $\Delta\epsilon_{338}$ 14.4.

Tabelle 8. NMR-Daten von Ancistrotanzanin A (16) in MeOD.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	175.6				
3	48.0	3.82 <i>m</i>		4, 3-Me	
4 _{ax} , 4 _{eq}	29.2	2.62 <i>m</i>	3, 9, 10, 3-Me	1, 3-Me, 2'-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me 3
5	119.3				
6	167.0				
7	95.0	6.81 <i>s</i>	5, 6, 8, 9	6-OMe, 8-OMe	
8	165.1				
9	108.4				
10	141.2				
1'	119.8	7.25 <i>s</i>	2', 3', 8', 9', 10', 2'-Me	8', 2'-Me	
2'	137.7				
3'	117.1				
4'	155.7				
5'	157.1				
6'	105.2	6.91 <i>dd</i>	8'	7', 5'-OMe	7' (6.8), 8' (1.9)
7'	126.8	7.34 <i>dd</i> ^a	5'	6', 8'	6' (6.7), 8' (7.9)
8'	121.2	7.38 <i>dd</i>	6', 9', 10'	1', 7'	7' (7.6), 6' (1.3)
9'	137.2				
10'	113.3				
1-Me	24.9	2.81 <i>s</i>	1, 9	8-OMe	
2'-Me	20.5	2.06 <i>s</i>	1', 2', 3'	3', 4	
3-Me	18.3	1.33 <i>d</i>		3, 4	3 (6.8)
5'-OMe	55.6	4.05 <i>s</i>	5'		
6-OMe	55.3	3.90 <i>s</i>	6		
8-OMe	55.2	4.13 <i>s</i>	8	1-Me	

^a Das Doppeldublett überlagert oft zu einem pseudo-Triplett, deshalb können die Kopplungskonstanten ungenau sein.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.39$ (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, 3- CH_3), 2.06 (s, 3 H, 2'- CH_3), 2.55 (m, 2 H, 4- $\text{H}_{\text{ax+eq}}$), 2.88 (s, 3 H, 1- CH_3), 3.86 (m, 1 H, 3-H), 3.87 (s, 3 H, 6- OCH_3), 4.05 (s, 3 H, 8- OCH_3), 4.05 (s, 3 H, 5'- OCH_3), 6.53 (s, 1 H, 7-H), 6.79 (dd, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.27 (s, 1H, 1'-H), 7.34 (dd, $J = 7.3, 8.3$ Hz, 1 H, 7'-H), 7.40 (dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz, 1 H, 8'-H), 9.51 (s, 1 H, 4'-OH).

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3371$ (br.), 2957 (m), 2924 (s), 2853 (m), 2359 (m), 2335 (m), 1739 (s), 1681 (s), 1201 (s), 1088 (m), 654 (m) cm^{-1} .

MS (EI): m/z (%): 405 $[\text{M}]^+$ (100), 390 (29), 374 (10), 202.6 (9).

MS (ESI positiv): m/z 406 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}_4$:

Ber. 405.1940;

Gef. 405.1937

(EIMS).

4 Untersuchung von *Ancistrocladus benomensis*

4.1 Isolierung der Alkaloide aus der Rinde

Das Pflanzenmaterial von *A. benomensis* wurde im Jahr 2000 am Berg Benom im Kerau Game Reserve in Malaysia gesammelt. Ein Herbarexemplar wurde im Herbarium Bringmann unter der Nummer 61 hinterlegt.

Die getrocknete Rinde (190 g) wurde gemahlen und in 1.5 L Methanol unter Rühren für 24 h kalt extrahiert. Den vom Lösungsmittel befreiten methanolischen Extrakt (11.9 g) entfettete man durch eine Flüssig-flüssig-Verteilung zwischen 90% Methanol und *n*-Hexan. Die Methanolphase wurde auf ca. 10% ihres Volumens am Rotationsverdampfer eingeeengt und mit Dichlormethan extrahiert. Ein Gramm des zur Trockene abgedampften Dichlormethan-Extraktes löste man in 10 mL MeOH, filtrierte über eine mit MeOH und Wasser vorkonditionierte RP-18-Kartusche, einen 0.2- μ m-PTFE-Spritzenvorsatzfilter und injizierte dann in 800- μ L-Injektionen in die präparative HPLC. Unter Verwendung des Standardgradienten und der SymmetryPrep-C-18-Säule (siehe Kap. 1.2) konnten die Verbindungen **20** (3.4 mg, t_R = 21.8 min), **21** (1.1 mg, t_R = 19.3 min) und **22** (2.8 mg, t_R = 20.2 min) rein isoliert werden. Das Acetonitril der jeweiligen Fraktion wurde unter vermindertem Druck abgezogen und die Reinsubstanz mittels Lyophilisation getrocknet.

4.1.1 Ancistrobenomin A (**20**)

Blassgelbes Pulver (3.4 mg).

Schmp. 270 °C (zers.; MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = +21.0$ ($c = 0.1$ in MeOH).

UV (MeOH): λ_{219} 1.79, λ_{235} 2.09, λ_{259} 1.95, λ_{307} 0.85,
 λ_{323} 0.81, λ_{335} 0.85, λ_{363} 0.58.

CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{206}$ -25.2, $\Delta\epsilon_{212}$ -22.0, $\Delta\epsilon_{221}$ -27.6, $\Delta\epsilon_{261}$ 38.0.

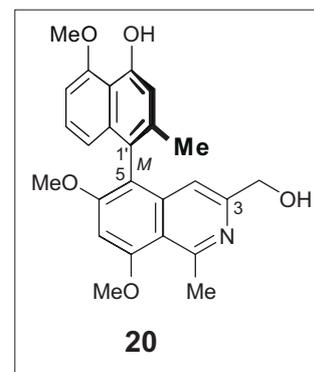


Tabelle 9. NMR-Daten von Ancistrobenomin A (**20**) in CDCl₃.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J _{HH} [Hz])
1	158.6				
3	145.1				
4	117.7	6.81 <i>s</i>	3, 5, 9, 3-CH ₂ OH	3-CH ₂ OH, 2'-Me	
5	115.5				
6	163.9				
7	96.3	6.94 <i>s</i>	5, 6, 8, 9	6-OMe, 8-OMe	
8	162.2				
9	113.9				
10	140.9				
1'	119.4				
2'	138.2				
3'	113.1	6.93 <i>s</i>	1', 4', 2'-Me	2'-Me, 4'-OH	
4'	154.9				
5'	156.7				
6'	103.7	6.76 <i>d</i>	8', 10'	7', 5'-OMe	7' (7.7)
7'	126.6	7.10 <i>dd</i>	5', 9'	6', 8'	6' (7.7), 8' (8.5)
8'	118.6	6.49 <i>d</i>	1', 6', 10'	1', 7'	7' (8.5)
9'	135.8				
10'	114.1				
1-Me	23.4	3.36 <i>s</i>	1, 9	8-OMe	
2'-Me	20.5	1.95 <i>s</i>	1', 2', 3'	3', 4	
3-CH _{2a} OH	60.4	4.56 <i>d</i>	3, 4	4	3-CH _{2b} OH (14.3)
3-CH _{2b} OH		4.58 <i>d</i>	3, 4	4	3-CH _{2a} OH (14.3)
4'-OH		9.52 <i>s</i>	3', 4', 10'	3', 5'-OMe	
5'-OMe	56.3	4.12 <i>s</i>	5'	4'-OH, 6'	
6-OMe	56.6	3.91 <i>s</i>	6	7	
8-OMe	56.4	4.22 <i>s</i>	8	7, 1-Me	

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3385$ (br.), 3008 (m), 2923 (m), 2852 (m), 1669 (s), 1613 (s), 1580 (s), 1345 (m), 1201 (s), 1120 (m), 743 (m) cm⁻¹.

MS (EI): *m/z* (%): 419 [M]⁺ (100), 404 (9), 388 (4).

MS (ESI positiv): *m/z* 420 [M+H]⁺.

C₂₅H₂₅NO₅: Ber. 419.1733; Gef. 419.1731 (EIMS).

4.1.2 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (21)

Blassgelber amorpher Feststoff (1.1 mg).

Schmp. 169 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -34.4$ ($c = 0.05$ in MeOH).

UV (MeOH): λ_{231} 0.44, λ_{259} 0.28, λ_{307} 0.07, λ_{335} 0.08,
 λ_{363} 0.05.

CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{205}$ -24.4, $\Delta\epsilon_{213}$ -21.6, $\Delta\epsilon_{222}$ -27.1, $\Delta\epsilon_{259}$ 36.9.

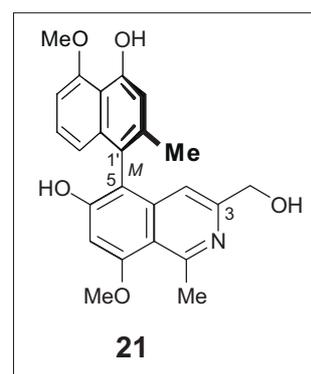
Tabelle 10. NMR-Daten von 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (21) in MeOD.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	158.4				
3	145.2				
4	114.4	6.82 <i>s</i>	3, 5, 9, 3-CH ₂ OH	3-CH _{2a/b} OH, 2'-Me	
5	114.7				
6	164.1				
7	102.8	6.93 <i>s</i>	5, 6, 8, 9	8-OMe	
8	163.6				
9	114.5				
10	141.2				
1'	120.0				
2'	138.9				
3'	114.2	6.79 <i>s</i>	1', 4', 2'-Me	2'-Me, 4'-OH	
4'	155.6				
5'	157.9				
6'	105.3	6.78 <i>d</i>	8', 10'	7', 5'-OMe	7' (7.7)
7'	128.1	7.03 <i>dd</i>	5', 9'	6', 8'	6' (7.7), 8' (8.5)
8'	118.1	6.53 <i>d</i>	1', 6', 10'	1', 7'	7' (8.5)
9'	136.2				
10'	115.1				
1-Me	24.0	3.13 <i>s</i>	1, 9	8-OMe	
2'-Me	20.6	1.90 <i>s</i>	1', 2', 3'	3', 4	
3-CH _{2a} OH	61.4	4.45 <i>d</i>	3, 4	4	3-CH _{2b} OH (14.3)
3-CH _{2b} OH		4.47 <i>d</i>	3, 4	4	3-CH _{2a} OH (14.3)
4'-OH		9.52 <i>s</i> ^a	3', 4', 10'	3', 5'-OMe	
5'-OMe	57.3	4.01 <i>s</i>	6	7	
8-OMe	57.4	4.06 <i>s</i>	8	7, 1-Me	

^a in CDCl₃ gemessen

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3383$ (br.), 2926 (m), 1670 (s), 1630 (s), 1368 (s), 1201 (s), 1111 (m), 753 (m) cm^{-1} .

MS (EI): m/z (%): 405 [M]⁺ (100), 390 (11), 374 (4).



MS (ESI positiv): m/z 406 $[M+H]^+$.

$C_{24}H_{23}NO_5$: Ber. 405.1576; Gef. 405.1574 (EIMS).

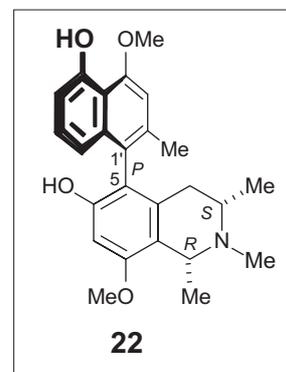
4.1.3 5'-*O*-Demethylancistroclin (**22**)

Amorpher bräunlicher Feststoff (2.8 mg).

Schmp. 213 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = +61.7$ ($c = 0.01$ in MeOH).

UV (MeOH): λ_{203} 0.35, λ_{227} 0.42, λ_{307} 0.07, λ_{319} 0.06,
 λ_{335} 0.05.



CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{197}$ 11.8, $\Delta\epsilon_{210}$ -11.3, $\Delta\epsilon_{219}$ -4.5, $\Delta\epsilon_{225}$ -5.5, $\Delta\epsilon_{239}$ 11.7.

Tabelle 11. NMR-Daten von 5'-*O*-Demethylancistroclin (**22**) in $CDCl_3$.

Position	^{13}C [ppm]	1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	60.6	4.51 <i>q</i>	9, 1-Me	3, 1-Me, N-Me	1-Me (6.7)
3	59.3	3.01 <i>m</i>		1, 4 _{eq} , 3-Me, N-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	31.4	2.15 <i>dd</i>	3	3-Me, 2'-Me	3 (9.6), 4 _{eq} (17.4)
4 _{eq}		2.79 <i>dd</i>	3	3, 8'	3 (3.3), 4 _{ax} (17.4)
5	116.1				
6	154.7				
7	97.8	6.61 <i>s</i>	5, 6, 8, 9	8-OMe	
8	157.1				
9	115.7				
10	140.8				
1'	121.2				
2'	139.4				
3'	107.6	6.82 <i>s</i>	1', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	157.3				
5'	155.6				
6'	111.1	6.87 <i>dd</i>	5', 8', 10'	7'	7' (7.7), 8' (0.8)
7'	129.9	7.24 <i>dd</i>	5', 9'	6', 8'	6' (7.7), 8' (8.4)
8'	115.3	6.63 <i>dd</i>	1', 6', 10'	7'	7' (8.3), 6' (0.8)
9'	136.1				
10'	114.7				
1-Me	19.8	1.81 <i>d</i>	1, 9	1, N-Me	1 (6.7)
2'-Me	21.0	2.20 <i>s</i>	1', 2', 3'	3', 4 _{ax}	
3-Me	18.2	1.39 <i>d</i>	3, 4	3, 4, N-Me	3 (6.7)
N-Me	42.7	2.95 <i>s</i>	1, 3	1, 3, 1-Me, 3-Me	
4'-OMe	56.9	4.15 <i>s</i>	4'	3'	
5'-OH		9.32 <i>s</i>	6'		
8-OMe	56.1	3.90 <i>s</i>	8	7, 1-Me	

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3380$ (br.), 3016 (m), 2948 (m), 2862 (m), 2704 (m), 1675 (s), 1605 (s), 1428 (s), 1203 (s), 1134 (m), 758 (m) cm^{-1} .

MS (EI): m/z (%): 407 $[\text{M}]^+$ (3), 392 (100), 376 (43).

MS (ESI positiv): m/z 408 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_4$: Ber. 407.2097; Gef. 407.2095 (EIMS).

4.2 Isolierung der Naturstoffe aus den Blättern

138 g getrocknetes und gemahlenes Blattmaterial wurde mit je 1 L MeOH/ CH_2Cl_2 (1:1) über Nacht mazeriert. Nach Filtration und Eindampfen des Extraktes (2.07 g) löste man diesen anschließend erneut in 15 mL MeOH. Eine effektive Entfernung des Chlorophylls erfolgte mittels FCPC mit einem Lösungsmittelsystem $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:3:5:3), wobei die organische (untere) Phase als mobile Phase gewählt wurde (8 mL/min, Rotationsgeschwindigkeit 1100 min^{-1}). Die stationäre Phase wurde in umgekehrter Fließrichtung mit MeOH herausgespült, nachdem die mobile Phase keine grüne Farbe mehr zeigte, und ergab nach Abzug des Lösungsmittels 205 mg eines gelblichen Extraktes. Diesen löste man in 10 mL MeOH, filtrierte über eine mit MeOH und Wasser vorkonditionierte RP-18-Kartusche, einen 0.2- μm -PTFE-Spritzenvorsatzfilter und injizierte dann in 800- μL -Injektionen in die präparative HPLC. Unter Verwendung des Standardgradienten und der SymmetryPrep-C-18-Säule (siehe Kap. 1.2) konnten die Verbindungen **29a** (33.7 mg, $t_R = 18.4$ min), **30** (17.6 mg, $t_R = 18.9$ min), **31** (8.2 mg, $t_R = 19.5$ min) und **32a/32b** (1.2 mg, $t_R = 27.6/27.7$ min) rein isoliert werden. Das Acetonitril der jeweiligen Fraktion wurde unter vermindertem Druck abgezogen und die Reinsubstanz mittels Lyophilisation getrocknet.

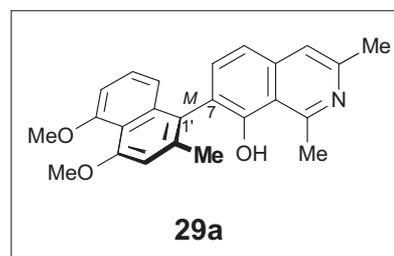
4.2.1 *ent*-Dioncophyllein A (29a)

Weißer Feststoff (33.7 mg).

Schmp. 265 °C (MeOH); Lit.: 272 °C (EtOH).^[110]

$[\alpha]_D^{20} = -29.7$ ($c = 0.08$ in MeOH);

Lit.: 0 ($c = 1.0$ in CHCl₃).^[110]



UV (MeOH): λ_{231} 1.68, λ_{307} 0.39, λ_{371} 0.18.

CD (EtOH): $\Delta\epsilon_{198}$ -2.9, $\Delta\epsilon_{224}$ 26.0, $\Delta\epsilon_{244}$ -20.5.

Tabelle 12. NMR-Daten von *ent*-Dioncophyllein A (29a) in CDCl₃.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J _{HH} [Hz])
1	159.2				
3	142.1				
4	121.8	7.64 <i>s</i>	5, 9, 10, 3-Me	5, 3-Me	
5	118.6	7.48 <i>d</i>	4, 7, 9, 10	4, 6	6 (8.2)
6	140.4	7.62 <i>d</i>	1', 8, 10	5	5 (8.2)
7	125.2				
8	155.7				
9	117.7				
10	140.2				
1'	122.4				
2'	137.4				
3'	108.9	6.83 <i>s</i>	1', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	157.9				
5'	157.6				
6'	106.4	6.82 <i>d</i>	8', 10'	7', 5'-OMe	7' (7.7)
7'	127.7	7.21 <i>dd</i>	5', 9'	6', 8'	6' (7.7), 8' (8.2)
8'	117.8	6.73 <i>d</i>	1', 6', 10'	7'	7' (8.2)
9'	136.7				
10'	116.5				
1-Me	23.7	3.29 <i>s</i>	1, 9		
2'-Me	20.6	2.13 <i>s</i>	1', 2', 3'	3'	
3-Me	18.7	2.72 <i>s</i>	3, 4	4	
4'-OMe	56.5	3.99 <i>s</i>	4'	3'	
5'-OMe	56.6	3.94 <i>s</i>	5'	6'	

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3379$ (br), 3055 (w), 2988 (w), 2924 (w), 2849 (w), 1670 (s), 1617 (s), 1594 (s), 1265 (s), 1199 (s), 1130 (s), 1097 (s), 1078 (s), 896 (w) cm⁻¹.

MS (EI): m/z (%): 373 [M]⁺ (100), 358 (14), 343 (7), 342 (10).

MS (ESI positiv): m/z 374 [M+H]⁺.

$C_{24}H_{23}NO_3$: Ber. 373.1678; Gef. 373.1676 (EIMS).

4.2.1.1 Herstellung eines Racemats von Dioncophyllein A (29b)

Die Reaktion wurde unter Schutzgas durchgeführt. 12.5 mg Dioncophyllin A (**33**) wurden in 2 mL *trans*-Decalin suspendiert und mit 10% Pd/C versetzt. Über Nacht wurde das Reaktionsgemisch im Sandbad auf 190 °C erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Säulenchromatographie an desaktiviertem Kieselgel; dabei wurde zuerst mit Petrolether das Lösungsmittel *trans*-Decalin abgetrennt und anschließend das Reaktionsprodukt mit einer 1:1-Mischung von Dichlormethan und Methanol eluiert. Das Racemat wurde durch PSC gereinigt und die Struktur mittels NMR-Spektroskopie bestätigt. Die Ausbeute betrug 40%.^[168]

4.2.2 Dioncophyllein D (30)

Weißer Feststoff (17.6 mg).

Schmp. 212 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = 0$ ($c = 0.1$ in MeOH).

UV (MeOH): λ_{231} 1.62, λ_{315} 0.41, λ_{375} 0.17.

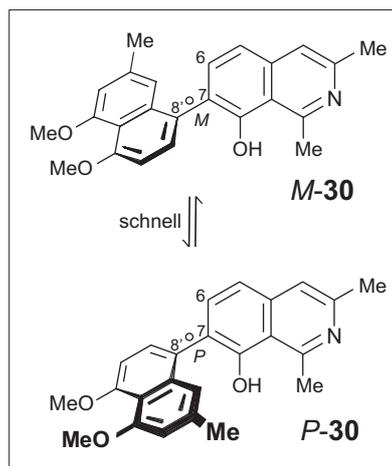


Tabelle 13. NMR-Daten von Dioncophyllein D (**30**) in MeOD.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J _{HH} [Hz])
1	159.7				
3	142.4				
4	126.1	7.89 <i>s</i>	5, 9, 3-Me	5, 3-Me	
5	120.6	7.58 <i>d</i>	4, 7, 9, 10	4, 6	6 (8.4)
6	118.3	7.77 <i>d</i>	8', 8, 10	5	5 (8.4)
7	131.0				
8	151.0				
9	123.4				
10	141.8				
1'	119.1	6.77 <i>s</i>	3', 8', 10', 2'-Me	2'-Me	
2'	138.7				
3'	110.3	6.84 <i>s</i>	1', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	157.3				
5'	159.1				
6'	106.7	7.00 <i>d</i>	5', 8', 10'	7', 5'-OMe	7' (8.0)
7'	116.7	7.35 <i>d</i>	5', 7, 9'	6'	6' (8.0)
8'	128.2				
9'	137.4				
10'	117.9				
1-Me	24.2	3.35 <i>s</i>	1, 9		
2'-Me	22.1	2.30 <i>s</i>	1', 2', 3'	1', 3'	
3-Me	18.6	2.75 <i>s</i>	3, 4	4	
4'-OMe	57.1	3.94 <i>s</i>	4'	3'	
5'-OMe	56.9	3.99 <i>s</i>	5'	6'	

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3381$ (br.), 2959 (w), 2917 (w), 2852 (w), 1668 (s), 1618 (s), 1585 (s), 1268 (s), 1198 (s), 1131 (s), 1100 (s), 1097 (s), 830 (w) cm^{-1} .

MS (EI): m/z (%): 373 [M]⁺ (100), 358 (11), 343 (9), 342 (11).

MS (ESI positiv): m/z 374 [$M+H$]⁺.

$\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_3$: Ber. 373.1678; Gef. 373.1676 (EIMS).

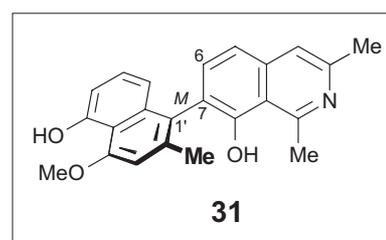
4.2.3 5'-O-Demethyl-ent-dioncophyllein A (**31**)

Weißer Feststoff (8.2 mg).

Schmp. 195 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -27.3$ ($c = 0.05$ in MeOH).

UV (MeOH): λ_{231} 1.69, λ_{307} 0.41, λ_{371} 0.21.



CD (EtOH): $\Delta\epsilon_{201}$ -3.7, $\Delta\epsilon_{229}$ 29.6, $\Delta\epsilon_{250}$ -21.7.

Tabelle 14. NMR-Daten von 5'-*O*-Demethyl-*ent*-dioncophyllein A (**31**) in MeOD.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	160.8				
3	142.5				
4	125.4	7.90 <i>s</i>	5, 9, 10, 3-Me	5, 3-Me	
5	123.4	7.61 <i>d</i>	4, 7, 9, 10	4, 6	6 (8.3)
6	142.2	7.66 <i>d</i>	1', 8, 10	5	5 (8.3)
7	126.8				
8	156.5				
9	119.2				
10	142.0				
1'	126.4				
2'	137.9				
3'	111.1	6.98 <i>s</i>	1', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	158.4				
5'	157.2				
6'	108.2	6.76 <i>d</i>	8', 10'	7'	7' (7.7)
7'	129.3	7.17 <i>dd</i>	5', 9'	6', 8'	6' (7.7), 8' (8.3)
8'	119.6	6.64 <i>d</i>	1', 6', 10'	7'	7' (8.3)
9'	137.7				
10'	117.2				
1-Me	24.1	3.30 <i>s</i>	1, 9		
2'-Me	20.9	2.17 <i>s</i>	1', 2', 3'	3'	
3-Me	18.6	2.75 <i>s</i>	3, 4	4	
4'-OMe	57.0	4.15 <i>s</i>	4'	3'	

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3394 (br.), 3012 (w), 2948 (w), 2851 (w), 1667 (s), 1608 (s), 1524 (s), 1199 (s), 1122 (s), 1082 (s), 1078 (s), 754 (w), 729 (w) cm^{-1} .

MS (EI): m/z (%): 359 $[\text{M}]^+$ (100), 344 (29), 329 (13), 328 (9).

MS (ESI positiv): m/z 360 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_3$:

Ber. 359.1522;

Gef. 359.1514

(EIMS).

4.2.4 Ancistrocladinium B (32)

Gelblicher Feststoff (1.2 mg).

$[\alpha]_D^{20} = -57.8$ ($c = 0.05$ in MeOH).

CD (schnelleres Atropdiastereomer):

$\Phi_{225} +25.1$, $\Phi_{233} -17.4$, $\Phi_{240} +10.8$.

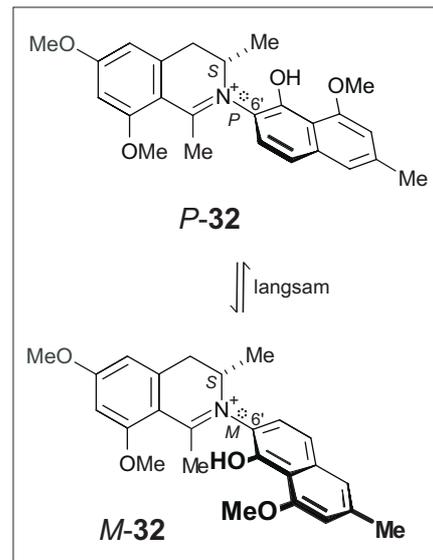
CD (langsames Atropdiastereomer):

$\Phi_{225} -8.7$, $\Phi_{233} +14.2$, $\Phi_{240} -5.1$.

UV (MeOH): $\lambda_{227} 1.82$, $\lambda_{343} 0.83$.

MS (ESI positiv): $m/z 406$ $[M]^+$.

Alle spektroskopischen Daten werden in Kürze von S. Pedersen aus unserer Gruppe in ihrer Masterarbeit angegeben.



5 Neue Methoden in der NIQ-Analytik

5.1 CE und CE/MS-Analyse eines Wurzelrindenextraktes von *Ancistrocladus mudogo*

Für die CE- und CE-MS-Analysen wurden 100 mg gepulvertes Wurzelrindenmaterial mit 10 mL Methanol 30 min bei 40 °C im Ultraschallbad mazeriert und anschließend filtriert.

Für die ersten Messungen wurde ein Puffersystem verwendet, das aus einem 50:50-Gemisch von Ammoniumacetat-Lösung (100 mM, mit Essigsäure auf pH 3.1 eingestellt) und Acetonitril bestand. Dieses System führte allerdings nicht zu der erwünschten Trennung.

Hervorragende Ergebnisse wurden mit einem 60:40-Gemisch von 100 mM Ammoniumacetat in Methanol und Essigsäure erzielt.^[169]

Die mit Polyacrylamid beschichtete Kapillare (21 cm lang, 50 µm innerer Durchmesser) wurde mit einem Injektionsdruck von 34.5 mbar für 5 s mit der gelösten Probe beladen. Die Kapillarspannung betrug 18000 Volt, die Temperatur wurde auf 25 °C eingestellt und die UV-Detektion bei 232 nm durchgeführt.

5.2 Waters XTerra®, eine neue basenstabile RP18-HPLC-Säule

115 g von luftgetrocknetem und gemahlenem Wurzelrindenmaterial von *Ancistrocladus mudogo* wurden nacheinander drei Soxhlet-Extraktionen mit Lösungsmitteln steigender Polarität (Petrolether, Dichlormethan, Methanol) unterzogen. Die Dichlormethanphase wurde anschließend gegen Wasser ausgeschüttelt und ergab nach Abzug der Lösungsmittel 165 mg Extrakt. Dieser wurde in Methanol aufgenommen und sowohl für die analytische als auch präparative HPLC benutzt.

Eine wesentliche Verbesserung der Trennung des Wurzelrindenextraktes brachten zwei Neuerungen. Zum einen der Einsatz der erst kürzlich auf dem Markt befindlichen basenstabilen C18-Phasen mit einer Toleranz bis pH 12, zum anderen die Verwendung eines basischen Laufmittelsystems mit Ammoniak als Additiv.

Folgende HPLC-Säulen kamen zum Einsatz: XTerra® RP₁₈ der Fa. *Waters* (4.6 x 250 mm, 5 µm) für analytische Untersuchungen und XTerra® RP₁₈ der Fa. *Waters* (19 x 300 mm, 7 µm) für die präparative Gewinnung der Alkaloide.

Als Lösungsmittelsystem wurde Wasser (A) und Acetonitril (B) verwendet, das jeweils mit 8 mM Ammoniak-Lösung (25%) versetzt wurde und somit einen pH von 10 hatte. Der Gradient begann bei 40% B und stieg in 36 min auf 100% B an. Der Fluss betrug bei der analytischen Methode 1 mL/min, bei der präparativen 10 mL/min.

6 Untersuchungen von Naturstoffen anderer Substanzklassen mit stereochemischen Problemstellungen

6.1 Untersuchung von Isoplagiochin C (45) und D (46)

Ein Racemat von Isoplagiochin C (45) sowie die beiden isolierten Naturstoffe, 45 und Isoplagiochin D (46) wurden von Dr. Andreas Speicher, Universität Saarbrücken, zur Etablierung und Durchführung einer Enantiomeren-Analytik zur Verfügung gestellt. Beste Trennungen ergaben sich an einer Chiralcel-OD-H-Säule (4.6 x 250 mm, 5 μ m), die mit den Lösungsmitteln *n*-Hexan (A) und Isopropanol (B) und folgendem Stufengradienten bei Raumtemperatur verwendet wurde: 0-16.5 min 10% B, 16.5-36.5 min 50% B, 36.5-50 min 95% B. Der Fluss betrug 0.5 mL/min. Die UV- und CD-Detektion erfolgte bei 254 nm.

M-Enantiomer von Isoplagiochin C (*M*-45):

CD ($t_R = 28.9$ min): $\Phi_{215} -60.1$, $\Phi_{241} +34.3$, $\Phi_{283} -2.8$, $\Phi_{322} +5.7$.

P-Enantiomer von Isoplagiochin C (*P*-45):

CD ($t_R = 31.8$ min): $\Phi_{210} +35.6$, $\Phi_{239} -20.4$, $\Phi_{285} +1.9$, $\Phi_{322} -2.1$.

M-Enantiomer von Isoplagiochin D (*M*-46):

CD ($t_R = 28.5$ min): $\Phi_{224} -33.2$, $\Phi_{240} -0.2$, $\Phi_{250} -4.9$, $\Phi_{280} +3.7$.

P-Enantiomer von Isoplagiochin D (*P*-46):

CD ($t_R = 31.9$ min): $\Phi_{231} +22.3$, $\Phi_{240} -2.6$, $\Phi_{255} +7.9$, $\Phi_{280} -3.5$.

6.2 Untersuchung von Saludimerin A (47) und B (48)

Die Saludimerine A (47) und B (48) wurden im Arbeitskreis von Prof. Bracher, Universität München, isoliert und für die konfigurationsbestimmenden NMR-Messungen unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Die ^1H -NMR-, COSY- und ROESY-Messungen erfolgten an einem DMX600-Spektrometer der Firma *Bruker*. Die Proben wurden jeweils in 700 μL CDCl_3 gelöst und mit 10 μL deuteriertem TFA versetzt.

Bei den Homoentkopplungsversuchen wurde genau auf die Resonanzfrequenz des Protonensignals von H-9 von Saludimerin A (47) und B (48) eingestrahlt, um eine vollständige Sättigung des Signals zu erreichen. Bei der direkt darauf folgenden Messung eines ^1H -NMR-Spektrums konnte für $\text{H}_{\alpha-10}$ nur ein Dublett anstelle des Doppeldubletts identifiziert werden, da die Kopplung mit H-9 ausblieb. Eine Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz von $\text{H}_{\alpha-10}$ führte dazu, dass $\text{H}_{\beta-10}$ nun als Singulett anstelle eines Dubletts

erschien. Damit ließen sich die Signale von H_α-10 und H_β-10 im Bezug auf H-9, dessen absolute Konfiguration und somit räumliche Lage im Molekül bekannt war, eindeutig zuordnen.

6.3 Untersuchung von B₁-Phytoprostan I (52) und II (53)

Die methylierten Proben der racemisch vorliegenden Phytoprostane B₁-I (56) und B₁-II (57) sowie die Vergleichssubstanz 15(*S*)-Prostaglandin-B₁-methylester (55) wurden von der Arbeitsgruppe Müller, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Die HPLC-Analytik an chiraler Phase wurde mit einer Chiralpak-AD-Säule (4.6 x 250 mm, 5 µm) durchgeführt. Es wurde isokratisch mit einem 8:1:1-Gemisch von *n*-Hexan/Methanol/Ethanol bei einem Fluss von 1 mL/min gearbeitet. Sowohl UV- als auch CD-Detektion wurden bei 278 nm durchgeführt.

15(*S*)-Prostaglandin-B₁-methylester (55):

CD (*t_R* = 9.3 min): $\Phi_{206} +1.0$, $\Phi_{238} -0.6$, $\Phi_{274} +1.8$, $\Phi_{336} -0.4$.

16(*R*)-Phytoprostan-B₁-methylester-I (16(*R*)-56):

CD (*t_R* = 5.5 min): $\Phi_{233} +0.3$, $\Phi_{274} -2.1$.

16(*S*)-Phytoprostan-B₁-methylester-I (16(*S*)-56):

CD (*t_R* = 10.9 min): $\Phi_{206} +0.7$, $\Phi_{226} -0.4$, $\Phi_{274} +1.4$.

9(*R*)-Phytoprostan-B₁-methylester-II (9(*R*)-57):

CD (*t_R* = 8.5 min): $\Phi_{215} -1.2$, $\Phi_{232} +0.4$, $\Phi_{274} -1.4$, $\Phi_{336} +0.5$.

9(*S*)-Phytoprostan-B₁-methylester-II (9(*S*)-57):

CD (*t_R* = 18.6 min): $\Phi_{212} +0.4$, $\Phi_{239} -0.4$, $\Phi_{285} +1.6$.

LITERATUR UND ANMERKUNGEN

- [1] E. Teuscher; *Biogene Arzneimittel*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1997**.
- [2] A. Kleemann, H. J. Roth; *Arzneistoffgewinnung*; Thieme-Verlag, Stuttgart, **1983**.
- [3] J. Berendes; *Des Pedanios Dioskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre in fünf Büchern*; Enke-Verlag, Stuttgart, **1902**.
- [4] M. H. Malone; The pharmacological evaluation of natural products – general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals; *J. Ethnopharmacol.* **1983**, 3, 127-147.
- [5] F. W. Sertürner; Darstellung der reinen Mohnsäure nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums; *Journal der Pharmacie* **1806**, 14, 47-93.
- [6] M. Tswett; Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls; *Ber. Dtsch. Botan. Ges.* **1906**, 24, 384-393.
- [7] J. P. Comer, I. Comer; Applications of thin-layer chromatography in pharmaceutical analyses; *J. Pharm. Sci.* **1967**, 56, 413-436.
- [8] G. Schwedt; *Analytische Chemie*; Thieme-Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [9] J.-Y. Ortholand, A. Ganesan; Natural products and combinatorial chemistry: back to the future; *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, 8, 271-280.
- [10] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader; Natural products as sources of new drugs over the period of 1981-2002; *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037.
- [11] Persönliche Mitteilung von Frau Prof. Ulrike Holzgrabe.
- [12] F. Kohl; Ein "Jahrhundertpharmakon" wird Hundert; *Der Schmerz* **1999**, 13, 341-346.
- [13] E. Breitmaier; *Alkaloide*; Teubner, Stuttgart, **1997**.
- [14] W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann; *Römpf Lexikon Naturstoffe*; Thieme-Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [15] G. Bringmann, F. Pokorny; The naphthylisoquinoline alkaloids in *The Alkaloids* (Hrsg. G. A. Cordell); Bd. 46, Academic Press, New York **1995**, 127-271.
- [16] H. Meimberg, P. Dittrich, G. Bringmann, J. Schlauer, G. Heubl; Molecular phylogeny of Caryophyllidae s.l. based on matK sequences with special emphasis on carnivorous taxa; *Plant Biol.* **2000**, 2, 218-228.
- [17] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, J. Schlauer; A new biosynthetic pathway to alkaloids in plants: acetogenic isoquinolines; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1464-1466. *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1523-1525.

- [18] Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J.-R. Dai, J. H. Cardellina, R. J. Gulakowski, J. B. McMahon, M. Schäffer, M. Stahl, K.-P. Gulden, G. Bringmann, G. François, M. R. Boyd; Michellamines D-F, new HIV-inhibitory dimeric naphthylisoquinoline alkaloids, and korupensamine E, a new antimalarial monomer, from *Ancistrocladus korupensis*; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 677-683.
- [19] G. François, G. Bringmann, J. D. Phillipson, L. Aké Assi, C. Dochez, M. Rübenacker, C. Schneider, M. Wéry, D. C. Warhurst, G. C. Kirby; Activity of extracts and naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyphyllum peltatum*, *Ancistrocladus abbreviatus*, and *A. barteri* against *Plasmodium falciparum* in vitro; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1461-1464.
- [20] G. François, G. Timperman, J. Holenz, L. Aké Assi, T. Geuder, L. Maes, J. Dubois, M. Hanocq, G. Bringmann; Naphthylisoquinoline alkaloids exhibit strong growth-inhibiting activities against *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* in vitro; *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1996**, *90*, 115-123.
- [21] G. Bringmann; From tropical lianas to novel antiplasmodial agents: the naphthylisoquinoline alkaloids in *Guidelines and issue for the discovery and drug development against tropical diseases* (Hrsg. H. Vial, A. Fairlamb, R. Ridley); World Health Organisation, Geneva, **2003**, 145-152.
- [22] G. François, B. Chimanuka, W. Timperman, G. Holenz, J. Plaizier-Verdammen, L. Aké Assi, G. Bringmann; Differential sensitivity of erythrocytic stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi* to dioncophylline B, a highly active naphthylisoquinoline alkaloid; *Parasitol. Res.* **1999**, *85*, 935-941.
- [23] G. François, W. Timperman, L. Eling, L. Aké Assi, G. Holenz, G. Bringmann; Naphthylisoquinoline alkaloids against malaria: evaluation of the curative potential of dioncophylline C and dioncopeltine A against *Plasmodium berghei* in vivo; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2533-2539.
- [24] S. C. Sharma, Y. N. Shukla, J. S. Tandon; Alkaloids and terpenoids of *Ancistrocladus heyneanus*, *Sagittaria sagittifolia*, *Lyonia formosa* and *Hedychium spicatum*; *Phytochemistry* **1975**, *14*, 578-579.
- [25] K. P. Manfredi, J. W. Blunt, J. H. Cardellina II, J. B. McMahon, L. L. Pannell, G. M. Cragg, M. R. Boyd; Novel alkaloids from the tropical plant *Ancistrocladus abbreviatus* inhibit cell killing by HIV-1 and HIV-2; *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3402-3405.
- [26] M. R. Boyd, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina, K. P. Manfredi, J. W. Blunt, J. B. McMahon, R. W. Buckheit, G. Bringmann, M. Schäffer, G. M. Cragg, D. W. Thomas, J. G. Jato; Anti-HIV michellamines from *Ancistrocladus korupensis*; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1740-1745.

- [27] J. B. McMahon, M. J. Currens, R. J. Gulakowski, R. W. Buckheit, C. Lackman-Smith, Y. F. Hallock, M. R. Boyd; Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 484-488.
- [28] G. Bringmann, A. Hamm, C. Günther, M. Michel, R. Brun, V. Mudogo; Ancistrocalines A and B, two new bioactive naphthylisoquinolines, and related naphthoic acids from *Ancistrocladus ealaënsis*; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1465-1470.
- [29] G. Bringmann, U. Holzgrabe, V. Hoerr, G. Stich; Antitrypanosomal naphthylisoquinoline alkaloids and related compounds; *Pharmazie* **2003**, *58*, 343-346.
- [30] G. Bringmann, J. Holenz, L. Aké Assi, C. Zhao, K. Hostettmann; Molluscicidal activity of naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyphyllum* and *Ancistrocladus* species; *Planta Med.* **1996**, *62*, 556-557.
- [31] G. Bringmann, J. Holenz, L. Aké Assi, K. Hostettmann; Molluscicidal activity (*Biomphalaria glabrata*) of dioncophylline A – structure activity investigations; *Planta Med.* **1998**, *64*, 485-486.
- [32] G. François, M. van Looveren, G. Timperman, B. Chimanuka, L. Aké Assi, J. Holenz, G. Bringmann; Larvicidal activity of the naphthylisoquinoline alkaloid dioncophylline A against the malaria vector *Anopheles stephensi*; *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *54*, 125-130.
- [33] C. Grimm, P. Proksch, S. Gramatzki, C. Schneider, G. Bringmann; Deleterious effects of naphthylisoquinoline alkaloids on survival and growth of *Spodoptera littoralis*; *Planta med.* **1992**, *58* (Suppl. 1), 630.
- [34] G. Bringmann, S. Gramatzki, C. Grimm, P. Proksch; Feeding deterrence and growth retarding activity of the naphthylisoquinoline alkaloid dioncophylline A against *Spodoptera littoralis*; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3821-3825.
- [35] G. Bringmann, S. Gramatzki, C. Müller, P. Proksch; Structure-activity relationships of naphthylisoquinoline alkaloids: feeding experiments with the herbivorous insect *Spodoptera littoralis*; *Planta Med.* **1993**, *59* (Suppl. 1), 624.
- [36] G. Bringmann, J. Holenz, B. Wiesen, B. W. Nugroho, P. Proksch; Dioncophylline A as a growth-retarding agent against the herbivorous insect *Spodoptera littoralis*: structure-activity relationships; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 342-347.
- [37] G. Bringmann, M. Rübenacker, E. Ammermann, G. Lorenz, L. Aké Assi; Dioncophyllines A and B as fungicides; Europäisches Patent EP 0515 856 A1, Offenlegung 02.12.1992.
- [38] K. Albert; Liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy; *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 199-211.

- [39] G. Bringmann, C. Günther, J. Schlauer, M. Rückert; HPLC-NMR on-line coupling including the ROESY technique: direct characterization of naphthylisoquinoline alkaloids in crude plant extracts; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2805-2811.
- [40] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Heubes, W. Saeb, S. Diem, M. Herderich, J. Schlauer; A photometric screening method for dimeric naphthylisoquinoline alkaloids and complete on-line structural elucidation of a novel-type dimer in crude plant extracts, by the LC-MS/LC-NMR/LC-CD triad; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2571-2577.
- [41] G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert; HPLC-CD-on-line coupling in combination with HPLC-NMR und HPLC-MS/MS for the determination of the full absolute stereostructure of new metabolites in plant extracts; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2678-2686.
- [42] R. J. Ogg, P. B. Kingsley, J. S. Taylor; WET, a T₁- and B₁-insensitive water-suppression method for in vivo ¹H NMR spectroscopy; *J. Magn. Reson., Ser. B* **1994**, *104*, 1-10.
- [43] J. Graham; *Ancistrocladus heyneanus*; *Cat. Pl. Bombay* **1839**, 28.
- [44] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy; Ancistrocladine, A novel isoquinoline alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus*; *Ind. J. Chem.* **1970**, *8*, 567-568.
- [45] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy, H. K. Desai; Chemical investigation of *Ancistrocladus heyneanus*: part VI – isolation & structure of ancistrocladisine, a novel alkaloid; *Ind. J. Chem.* **1972**, *10*, 1117-1119.
- [46] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy, H. K. Desai; Chemical investigation of *Ancistrocladus heyneanus*. Ancistrocladidine, a new isoquinoline alkaloid; *Ind. J. Chem.* **1973**, *11*, 1190-1191.
- [47] G. Bringmann, L. Kinzinger, T. Ortmann, N. J. de Souza; Isoancistrocladine from *Ancistrocladus heyneanus*: the first naturally occurring N-unsubstituted *cis*-configured naphthyltetrahydroisoquinoline alkaloid; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 259-261.
- [48] G. Bringmann, D. Koppler, B. Wiesen, G. Francois, A. S. Sankara Narayanan, M. R. Almeida, H. Schneider, U. Zimmermann; Ancistroheynine A, the first 7,8'-coupled naphthylisoquinoline alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus*; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1405-1410.
- [49] H. K. Desai, D. H. Gawad, T. R. Govindachari, B. S. Joshi, V. N. Kamat, J. D. Modi, P. A. Mohamed, P. C. Parthasarathy, S. J. Patankar, A. R. Sidhaye, N. Viswanathan; Chemical investigation of some Indian plants: part V; *Indian J. Chem.* **1970**, *8*, 851-853.

- [50] L.-K. Yang, R. P. Glover, K. Yoganathan, J. P. Sarnaik, A. J. Godbole, D. D. Soejarto, A. D. Buss, M. S. Butler; Ancisheynein, a novel naphthylisoquinolinium alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus*; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5827-5829.
- [51] G. Bringmann, K. Messer, R. Brun, V. Mudogo; Ancistrocongolines A-D, new naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus congolensis*; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1096-1101.
- [52] G. Bringmann, K. Messer, K. Wolf, J. Mühlbacher, M. Grüne, R. Brun, A. M. Louis; Dioncophylline E from *Dioncophyllum tholonnii*, the first 7,3'-coupled dioncophyllaceous naphthylisoquinoline alkaloid; *Phytochemistry* **2002**, *60*, 389-397.
- [53] G. Bringmann, M. Dreyer, J. H. Faber, P. W. Dalsgaard, D. Stärk, J. W. Jaroszewski, H. Ndangalasi, F. Mbago, R. Brun, S. B. Christensen; Ancistrotanzanine C and related 5,1'- and 7,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus tanzaniensis*; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 743-748.
- [54] G. Bringmann, R. God, M. Schäffer; An improved degradation procedure for determination of the absolute configuration in chiral isoquinoline and β -carboline derivatives; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1393-1403.
- [55] G. Bringmann, T. Geuder, M. Rübenacker, R. Zagst; A facile degradation procedure for determination of absolute configuration in 1,3-dimethyltetra- and dihydroisoquinolines; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2067-2070.
- [56] Ich danke Frau M. Michel (geb. Schäffer) für die Durchführung des oxidativen Abbaus.
- [57] Die *M/P*-Nomenklatur wird zur Klassifizierung von Axialchiralität verwendet, wobei *M* (minus) = *aR* und *P* (plus) = *aS* ist. Die Bestimmung erfolgt durch eine Newman-Projektion entlang der Achse. Nach Festlegung der Prioritäten nach Cahn-Ingold-Prelog geht man nun vom Substituenten höchster Priorität des vorderen Chromophors auf kürzestem Weg zu dem entsprechenden des hinteren Chromophors zu. Geschieht dies im Uhrzeigersinn, so ist die Achsenkonfiguration *P*, während die Anordnung gegen den Uhrzeigersinn *M* genannt wird. Für weitere Informationen siehe V. Prelog, G. Helmchen; Basic principles of the CIP-system and proposals for a revision; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1982**, *21*, 567-583.
- [58] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh; *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Thieme-Verlag, Stuttgart, **1995**, 119-121.
- [59] P. C. Parthasarathy, G. Kartha; Rigorous structural proof for ancistrocladisine and ancistrocladidine, two minor alkaloids of *Ancistrocladus heyneanus* Wall.; *Ind. J. Chem.* **1983**, *22B*, 590-591.

- [60] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy, T. G. Rajagopalan, H. K. Desai, K. S. Ramachandran, E. Lee; Absolute configuration of ancistrocladisine and ancistrocladidine; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1975**, *21*, 2134-2136.
- [61] G. Bringmann, M. Dreyer, M. Michel, F. S. K. Tayman, R. Brun; Ancistroheynin B and two further 7,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus heyneanus* Wall.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2903-2907.
- [62] D. Meksuriyen, N. Ruangrunsi, P. Tantivatana, G. A. Cordell; NMR spectroscopic analysis of ancistrocladidine; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2750-2752.
- [63] G. Bringmann, D. Feineis; Novel antiparasitic biaryl alkaloids from westafrican Dioncophyllaceae plants; *Act. Chim. Thérapeut.* **2000**, *26*, 151-171.
- [64] G. Bringmann, C. Rummey; 3D QSAR investigations on antimalarial naphthylisoquinoline alkaloids, by comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA), based on different alignment approaches; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 304-316.
- [65] N. Stiefl, G. Bringmann, C. Rummey, K. Baumann; Evaluation of extended parameter sets for the 3D-QSAR technique MaP: implications for interpretability and model quality exemplified by antimalarially active naphthylisoquinoline alkaloids; *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2003**, *17*, 347-365.
- [66] M. Cheek, C. Frimodt-Møller, V. Hørlyck; A new submontane species of *Ancistrocladus* from Tanzania; *Kew Bull.* **2000**, *55*, 207-212.
- [67] Als submontan bezeichnet man den Höhenbereich zwischen 900 und 1500 m ü. NN.
- [68] R. E. Gereau; Typification of names in *Ancistrocladus* Wallich (Ancistrocladaceae); *Novon* **1997**, *7*, 242-245.
- [69] J. Léonard; *Ancistrocladus robertsoniorum* J. Léonard (Ancistrocladaceae), Espèce nouvelle du Kenya; *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* **1984**, *54*, 465-470.
- [70] P. Chau, I. R. Czuba, M. A. Rizzacasa, G. Bringmann, K.-P. Gulden, M. Schäffer; Convergent synthesis of naphthylisoquinoline alkaloids: total synthesis of (+)-*O*-methylancistrocline; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7101-7105.
- [71] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy; Ancistrocladine, a new type of isoquinoline alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus*; *Tetrahedron* **1971**, *27*, 1013-1026.
- [72] G. Bringmann, M. Dreyer, J. H. Faber, P. W. Dalsgaard, D. Stærk, J. W. Jaroszewski, H. Ndangalasi, F. Mbago, R. Brun, M. Reichert, K. Maksimenka, S. B. Christensen; Ancistrotanzanine A, the first 5,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloid, and two further, 5,8'-linked related compounds from the newly described species *Ancistrocladus tanzaniensis*; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1159-1165.

- [73] N. Ruangrunsi, V. Wongpanich, P. Tantivantana, H. J. Cowe, P. J. Cox, S. Funyama, G. A. Cordell; Traditional medicinal plants of Thailand, V. Ancistrosectorine, a new naphthalene-isoquinoline alkaloid from *Ancistrocladus tectorius*; *J. Nat. Prod.* **1985**, *63*, 529-535.
- [74] G. Bringmann, C. Günther, S. Busemann, M. Schäffer, J. D. Olowokudejo, B. Alo; Ancistroguineines A and B as well as ancistrosectorine – naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus guineënsis*; *Phytochemistry* **1998**, *47*, 37-43.
- [75] Ein derartiges UV-Spektrum war bei allen untersuchten Naphthylisochinolin-Alkaloiden nur bei Ancistrosectorin und Ancistrotanzanin C zu finden. Somit kann es als Charakteristikum eines 7,3'-gekoppelten *N*-methylierten Naphthyltetrahydroisochinolins angesehen werden.
- [76] Die Hochfeld-Verschiebung für Methoxygruppen neben der Biarylachse fällt bei ¹H-NMR-Messungen in MeOH-d₄ nicht so deutlich aus wie bei Messungen in CDCl₃ (ca. 3.9 anstelle von 3.6 ppm). Zudem nimmt sie mit zunehmendem Dehydrierungsgrad der Isochinolin-Hälfte ab, und der gesamte Bereich der Methoxygruppenresonanzen verschiebt sich leicht zu tieferem Feld.
- [77] N. Harada, K. Nakanishi; Exciton chirality method and its application to configurational and conformational studies of natural products; *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257-263.
- [78] G. Bringmann, K.-P. Gulden, Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J. H. Cardelina II, M. R. Boyd, B. Kramer, J. Fleischhauer; Circular dichroism of michellamines: independent assignment of axial chirality by calculated and experimental CD spectra; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7807-7814.
- [79] G. Bringmann, J. Mühlbacher, K. Messer, M. Dreyer, R. Ebel, B. W. Nugroho, V. Wray, P. Proksch; Cyclorocaglamide, the first bridged cyclopentatetrahydrobenzofuran, and a related 'openchain' rocaglamide derivative from *Aglaia oligophylla*; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 80-85.
- [80] G. Bringmann, J. Mühlbacher, C. Repges, J. Fleischhauer; MD-based CD calculations on the absolute axial configuration of the naphthylisoquinoline alkaloid dioncophylline A; *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 1273-1278.
- [81] M. J. S. Dewar, E. G. Zebisch, E. Healy, J. J. P. Steward; Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902-3909.
- [82] J. Del Bene, H. H. Jaffé; Use of the CNDO method in spectroscopy. I. Benzene, pyridine, and the diazines; *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 1807-1813.
- [83] G. Bringmann, S. Busemann; Quantumchemical calculation of CD spectra: the absolute configuration of biologically active natural products; In *Natural Product Analysis*

- (Hrsg.: P. Schreier, M. Herderich, H. U. Humpf, W. Schwab), Vieweg, Wiesbaden, **1998**, 195-212.
- [84] Ich danke Herrn Dipl.-Chem. Matthias Reichert für die Durchführung der CD-Rechnungen.
- [85] J. Fleischhauer, J. Grötzinger, B. Kramer, P. Krüger, A. Wollmer, R. W. Woody, E. Zobel; Calculation of the circular dichroism spectrum of cyclo-(L-tyr-L-tyr) based on a molecular dynamics simulation; *Biophys. Chem.* **1994**, *49*, 141-152.
- [86] G. Bringmann, C. Günther, J. Mühlbacher, M. D. L. Gunathilake, A. Wickramasinghe; New tropane alkaloids from *Erythroxylum zeylanicum* O.E. Schulz (Erythroxylaceae); *Phytochemistry* **2000**, *53*, 409-416.
- [87] N. L. Allinger, Y. H. Yuh, J.-H. Lii; Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8551-8566.
- [88] G. Bringmann, F. Teltschik, M. Schäffer, R. Haller, S. Bär, M. A. Robertson, M. Isahakia; Ancistrobertsonine A and related naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus robertsoniorum*; *Phytochemistry* **1998**, *47*, 31-35.
- [89] G. Bringmann, F. Teltschik, M. Michel, S. Busemann, M. Rückert, R. Haller, S. Bär, A. Robertson, R. Kaminsky; Ancistrobertsonines B, C, and D as well as 1,2-didehydroancistrobertsonine D from *Ancistrocladus robertsoniorum*; *Phytochemistry* **1999**, *52*, 321-332.
- [90] C.-P. Tang, Y.-P. Yang, Y. Zhong, Q.-X. Zhong, H.-M. Wu, Y. Ye; Four new naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1384-1387.
- [91] K. P. Manfredi, M. Britton, V. Vissieche, L. K. Pannell; Three new naphthyldihydroisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 854-859.
- [92] G. Bringmann, G. François, L. Aké Assi, J. Schlauer; The alkaloids of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae); *Chimia* **1998**, *52*, 18-28.
- [93] A. Montagnac, A. H. Hadi, F. Remy, M. Païs; Isoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*; *Phytochemistry* **1995**, *39*, 701-704.
- [94] Ancistrocladaceen kommen fast ausschließlich in Tieflandregenwäldern bis 500 m ü. NN vor. Der höchstgelegene Vertreter dieser Familie ist die ostafrikanische Art *A. tanzaniensis* (siehe Kapitel 4.1).
- [95] Die genetischen Untersuchungen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. G. Heubl, Universität München, durchgeführt. Besonderer Dank gilt Dr. H. Meimberg für die Durchführung der vergleichenden Sequenzierung der ITS-Region der Kern-rDNA und des *trnK*-Introns der Chloroplasten-DNA der *Ancistrocladus*-Arten.

- [96] H. Meimberg, H. Rischer, M. Dreyer, M. Sommaro, G. Bringmann, G. Heubl; The taxonomy of Ancistrocladaceae in Southeast Asia: A molecular approach; *Plant Sys. Evol.*, eingereicht.
- [97] Ich danke den Herren A. Kreiner und F. Thiele für die Kultivierung von *A. benomensis* im Botanischen Garten.
- [98] H. Rischer, G. Heubl, H. Meimberg, M. Dreyer, H. A. Hadi, G. Bringmann; *Ancistrocladus benomensis* (Ancistrocladaceae): a new species from Peninsular Malaysia; *Blumea* **2004**, im Druck.
- [99] Die Hochfeld-Verschiebung zur Biarylachse *ortho*-ständiger Substituenten fällt bei vollständig dehydrierten Naphthylisochinolin-Alkaloiden nicht so groß aus wie bei Di- oder Tetrahydroisochinolininen, obwohl in CDCl₃ gemessen wurde (siehe dazu auch Lit.^[76]).
- [100] G. Bringmann, M. Dreyer, H. Rischer, K. Wolf, H. A. Hadi, R. Brun, H. Meimberg, G. Heubl; Ancistrobenomin A, the first naphthylisoquinoline oxygenated at Me-3, and related 5,1'-coupled alkaloids, from the "new" plant species *Ancistrocladus benomensis*; *J. Nat. Prod.* **2004**, im Druck.
- [101] J. P. Foucher, J. L. Pousset, A. Cavé, R. R. Paris; Chemotaxonomy of Ancistrocladaceae. III. Alkaloids of *Ancistrocladus congolensis*; *Plantes Méd. Phytothér.* **1975**, *9*, 26-31.
- [102] J. P. Foucher, J. L. Pousset, A. Cavé; Ancistrine, ancistine, ancistrocladeine. Three alkaloids isolated from *Ancistrocladus ealaensis*; *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2699-2702.
- [103] J. Fleischhauer, A. Koslowski, B. Kramer, E. Zobel, G. Bringmann, K. P. Gulden, T. Ortman, B. Peter; Messung und Berechnung der CD-Spektren der Biaryl-Alkaloide Ancistrocladein und Dioncophyllein A; *Z. Naturforsch. B* **1993**, *48*, 140-148.
- [104] N. H. Anh, A. Porzel, H. Ripperger, G. Bringmann, M. Schäffer, R. God, T. V. Sung, G. Adam; Naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus cochinchinensis*; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1287-1291.
- [105] J. Mutanyatta, M. Bezabih, B. M. Abegaz, M. Dreyer, R. Brun, N. Kocher, G. Bringmann; The first 6'-*O*-sulfated phenylanthraquinones: isolation from *Bulbine frutescens*, structural elucidation, enantiomeric purity, and partial synthesis; *Tetrahedron*, eingereicht.
- [106] G. Bringmann, J. Mühlbacher, M. Reichert, M. Dreyer, J. Kolz, A. Speicher; Stereochemistry of isoplagiochin C, a macrocyclic bisbibenzyl from liverworts; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9283-9290.
- [107] J. M. Scher, J. Zapp, H. Becker, N. Kather, J. Kolz, A. Speicher, M. Dreyer, K. Maksimenka, G. Bringmann; Optically active bisbibenzyls from *Bazzania trilobata*:

- isolation and stereochemical analysis by chromatographic, chiroptical, and computational methods; *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9877-9881.
- [108] Z. X. Chen, B. D. Wang, K. W. Qin, B. E. Zhang, Q. L. Su, Q. C. Lin; Isolation and identification of the alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*; *Yaoxue Xuebao* **1981**, *16*, 519-523.
- [109] G. Bringmann, L. Kinzinger; (+)-Ancistrocline, a naphthylisoquinoline alkaloid from *Ancistrocladus*; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3297-3299.
- [110] M. Lavault, J. Bruneton; Sur trois nouveaux alcaloïdes isolés de Dioncophyllacées; *C.R. Acad. Sc. Paris* **1978**, *287*, 129-131.
- [111] G. Bringmann, T. Ortmann, M. Rübenacker, L. Aké Assi; An unusual 4-methoxylated naphthylisoquinoline alkaloid from the leaves of *Triphyophyllum peltatum*; *Planta Med.* (Suppl. 2) **1991**, *57*, 96.
- [112] G. Bringmann, T. Ortmann, R. Zagst, B. Schöner, L. Aké Assi, C. Burschka; (±)-Dioncophyllacine A, a naphthylisoquinoline alkaloid with a 4-methoxy substituent from the leaves of *Triphyophyllum peltatum*; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4015-4018.
- [113] G. Bringmann, T. Ortmann, M. Rübenacker, L. Aké Assi; Dioncophyllacine B: a new 4-methoxylated naphthylisoquinoline alkaloid from the leaves of *Triphyophyllum peltatum*; *Planta Med. (Suppl. 1)* **1992**, *58*, 701-702.
- [114] G. François, G. Bringmann, C. Dochez, C. Schneider, G. Timperman, L. Aké Assi; Activities of extracts and naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum peltatum*, *Ancistrocladus abbreviatus* and *Ancistrocladus barberi* against *Plasmodium berghei* (Anka strain) in vitro; *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *46*, 115-120.
- [115] G. François, G. Bringmann, J. D. Phillipson, L. Aké Assi, C. Dochez, M. Rübenacker, C. Schneider, M. Wéry, D. C. Warhurst, G. C. Kirby; Activity of extracts and naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum peltatum*, *Ancistrocladus abbreviatus* and *A. barberi* against *Plasmodium falciparum* in vitro; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1461-1464.
- [116] G. Bringmann, M. Rübenacker, P. Vogt, H. Busse, L. Aké Assi, K. Peters, H. G. von Schnering; Dioncopeltine A and dioncolactone A: alkaloids from *Triphyophyllum peltatum*; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1691-1696.
- [117] G. Bringmann, M. Rübenacker, R. Weirich, L. Aké Assi; Dioncophylline C from the roots of *Triphyophyllum peltatum*, the first 5,1'-coupled Dioncophyllaceae alkaloid; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4019-4024.
- [118] Die FCPC wird von KROMATON TECHNOLOGIES hergestellt; für weitere Informationen siehe www.kromaton.com.

- [119] Y. Ito; High-speed countercurrent chromatography; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1986**, *17*, 65-143.
- [120] G. Lang, Isolierung und Charakterisierung neuer Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Mikroorganismen, Dissertation, Universität Würzburg, **2004**.
- [121] G. Bringmann, M. Rübenacker, J. R. Jansen, D. Scheutzow, L. Aké Assi; On the structure of the Dioncophyllaceae alkaloids dioncophylline A ("triphyophylline") and "O-methyl-triphyophylline"; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 639-642.
- [122] G. Bringmann, R. Zagst, D. Lisch, L. Aké Assi; Dioncoline A and its atropisomer: "inverse hybrid type" Ancistrocladaceae/Dioncophyllaceae alkaloids from *Ancistrocladus abbreviatus*; *Planta Med.* **1992**, *58 (Suppl. 1)*, 702-703.
- [123] G. Bringmann, M. Dreyer, H. Kopff, H. Rischer, M. Wohlfarth, H. A. Hadi, R. Brun; *Ent*-Dioncophylleine A, and related dehydrogenated isoquinoline alkaloids, the first Asian Dioncophyllaceae-type naphthylisoquinoline alkaloids, from the "new" plant species *Ancistrocladus benomensis*; *J. Nat. Prod.*, eingereicht.
- [124] J. Fleischhauer, A. Koslowski, B. Kramer, E. Zobel, G. Bringmann, K.-P. Gulden, T. Ortman, B. Peter; Messung und Berechnung der CD-Spektren der Biaryl-Alkaloide Ancistrocladein und Dioncophylleine A; *Z. Naturforsch.* **1993**, *48b*, 140-148.
- [125] W. Saeb, Synthese biologisch aktiver mono- und dimerer Naphthylisochinolin-Alkaloide sowie Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen aus tropischen Heilpflanzen, Dissertation, Universität Würzburg, **2001**.
- [126] G. Bringmann, C. Günther, W. Saeb, J. Mies, R. Brun, L. Aké Assi; 8-*O*-Methyldioncophyllinol B and revised structures of other 7,6'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae); *Phytochemistry* **2000**, *54*, 337-346.
- [127] Ich danke Frau Michaela Schraut für die Durchführung des oxidativen Abbaus.
- [128] Diese Art wurde von Prof. Virima Mudogo in der Republik Kongo gesammelt. Nach ersten genetischen Untersuchungen handelt es sich bei der Pflanze um eine neue Art, für die der Arbeitsname *Ancistrocladus mudogo* verwendet wird.
- [129] S. Specker; Phytochemische Untersuchungen an afrikanischen *Ancistrocladus*-Arten; Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2002**.
- [130] J. D. Henion, A. V. Mordehai, J. Cai; Quantitative capillary electrophoresis ion spray mass spectrometry on a bench top ion trap for the determination of isoquinoline alkaloids; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2103-2109.
- [131] J. Stöckigt, M. Unger, D. Stöckigt, D. Belder; Analysis of alkaloids with capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry, in

- Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* (Hrsg. S. W. Pelletier); Vol. 12, Pergamon, New York **1998**, 289-341.
- [132] G. Hopfgartner, C. Husser, M. Zell; High-throughput quantification of drugs and their metabolites in bio-samples by LC-MS/MS and CE-MS/MS: possibilities and limitations; *Ther. Drug Monit.* **2002**, *24*, 134-143.
- [133] K. B. Elgstoen, J. Y. Zhao, J. F. Anacleto, E. Jellum; Potential of capillary electrophoresis, tandem mass spectrometry and coupled capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry as diagnostic tools; *J. Chromatogr. A* **2001**, *914*, 265-275.
- [134] M. Unger, D. Stöckigt, D. Belder, J. Stöckigt; General approach for the analysis of various alkaloid classes using capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry; *J. Chromatogr. A* **1997**, *767*, 263-276.
- [135] M. Unger; Capillary zone electrophoresis of alkaloids-influence of structure on electrophoretic mobility; *J. Chromatogr. A* **1998**, *807*, 81-87.
- [136] S. G. Ji, Y. F. Chai, G. Q. Zhang, Y. T. Wu, X. P. Yin, D. S. Liang, Z. M. Xu; Determination of tetrahydropalmatine in chinese traditional medicine by non-aqueous capillary electrophoresis; *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1904-1906.
- [137] J. Z. Song, H. X. Xu, S. J. Tian, P. P. But; Determination of quinolizidine alkaloids in traditional chinese herbal drugs by non-aqueous capillary electrophoresis; *J. Chromatogr. A* **1999**, *857*, 303-311.
- [138] L. Barthe, J. P. Ribet, M. Péliou, M. J. Degude, J. Fahy, A. Duflos; Optimisation of the separation of *Vinca* alkaloids by non-aqueous capillary electrophoresis; *J. Chromatogr. A* **2002**, *968*, 241-250.
- [139] X. Su, T. Bo, R. Li, K. A. Li, H. Liu; Determination of isoquinoline alkaloids in *Thalictrum* herbal drugs by non-aqueous capillary electrophoresis; *Chromatographia* **2002**, *55*, 63-68.
- [140] M. Unger, M. Dreyer, S. Specker, S. Laug, M. Pelzing, C. Neusüß, U. Holzgrabe, G. Bringmann; Analytical Characterisation of crude extracts from an African *Ancistrocladus* species using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled to ion trap mass spectrometry; *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 21-26.
- [141] C. Reichardt; *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; VCH, Weinheim, **1988**.
- [142] G. Bringmann, M. Rückert, J. Schlauer, M. Herderich; Separation and identification of dimeric naphthylisoquinoline alkaloids by liquid chromatography coupled to electrospray ionisation mass spectrometry; *J. Chromatogr. A* **1998**, *810*, 231-236.

- [143] X.-G. He; On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques; *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 203-232.
- [144] P. Höglund, T. Eriksson, S. Björkman; A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans; *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1998**, *26*, 363-383.
- [145] S. Wnendt, M. Finkam, W. Winter, J. Ossig, G. Raabe, K. Zwingenberger; Enantioselective inhibition of TNF- α release by thalidomide and thalidomide-analogues; *Chirality* **1996**, *8*, 390-396.
- [146] Nähere Informationen über Contergan sind im Internet zu finden unter <http://www.k-factor.com/contergan/>
- [147] H. D. Zinsmeister, H. Becker, T. Eicher; Moss, a source of biologically active natural products?; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 130-147.
- [148] Y. Asakawa; Chemical constituents of the bryophytes; In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Hrsg.: E. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, C. Tamm), Springer, Wien, New York, **1995**, 464-483.
- [149] Y. Asakawa; Chemosystematics of the Hepaticae; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 623-669.
- [150] G. M. Keseru, M. Nógrádi; The chemistry of macrocyclic bis(bibenzyls); *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 69-75.
- [151] T. Hashimoto, S. Kanayama, Y. Kan, M. Tori, Y. Asakawa; Isoplagiochins C and D, new type of macrocyclic bis(bibenzyls), having two biphenyl linkages from the liverwort *Plagiochila fruticosa*; *Chem. Lett.* **1996**, 741-742.
- [152] T. Hashimoto, H. Irita, S. Takaoka, M. Tanaka, Y. Asakawa; New chlorinated cyclic bis(bibenzyls) from the liverworts *Herbertus sakurarii* and *Mastigophora diclados*; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3153-3159.
- [153] J. Heinrichs, H. Groth, I. Holz, D. S. Rycroft, C. Renker, T. Pröschold; The systematic position of *Plagiochila moritziana*, *P. trichostoma*, and *P. deflexa* based on ITS sequence variation of nuclear ribosomal DNA, morphology, and lipophilic secondary metabolites; *The Bryologist* **2002**, *105*, 189-203.
- [154] T. Eicher, S. Fey, W. Puhl, E. Büchel, A. Speicher; Bryophyte constituents. part 9. syntheses of cyclic bis-bibenzyl systems; *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *7*, 877-888.
- [155] Ich danke Dr. Andreas Speicher, Universität Saarbrücken, für die Bereitstellung des Racemats von Isoplagiochin C und den authentischen Naturstoffproben von Isoplagiochin C und D.

- [156] W. J. Eisenreich, G. Höfner, F. Bracher; Alkaloids from *Croton flavens* L. and their affinities to GABA-receptors; *Nat. Prod. Res.* **2003**, *17*, 437-440.
- [157] A. Amaral, R. A. Barnes; A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*; *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1445-1447.
- [158] R. A. Barnes, O. M. Soeiro; The alkaloids of *Croton salutaris*; *Phytochemistry* **1981**, *20*, 543-544.
- [159] F. Bracher, W. J. Eisenreich, J. Mühlbacher, M. Dreyer, G. Bringmann; Saludimerines A and B, novel-type dimeric alkaloids with stereogenic centers and configurationally semi-stable biaryl axes; *J. Org. Chem.* **2004**, im Druck.
- [160] G. Bringmann, W. Saeb, D. Koppler, G. François; Jozimine A ('dimeric' dioncophylline A), a non-natural michellamine analog with high antimalarial activity; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13409-13418.
- [161] Ich danke Dr. Christian Rummey für die AM1-Berechnungen der Saludimerine A und B.
- [162] I. Thoma, M. Krischke, C. Loeffler, M. J. Mueller; The isoprostanoid pathway in plants; *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *128*, 135-148.
- [163] I. Thoma, C. Loeffler, A. K. Sinha, M. Gupta, B. Steffan, M. Krischke, T. Roitsch, M. J. Mueller; Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants; *Plant J.* **2003**, *34*, 363-375.
- [164] C. Loeffler, S. Berger, T. Durand, G. Bringmann, M. Dreyer, U. von Rad, J. Durner, M. J. Mueller; Detoxification and defense gene activation by b₁-phytoprostanes; *Plant Physiol.* **2004**, im Druck.
- [165] S. Parchmann, M. J. Mueller; Evidence for the formation of dinor isoprostanes E₁ from α -linolenic acid in plants; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32650-32655.
- [166] J. Flügge; *Grundlagen der Polarimetrie*; Zeiss Verlag, Oberkochen/Württ., **1965**, S. 62 u. S. 88.
- [167] Ich danke Herrn Dipl.-Pharm. Johan Faber für die Bereitstellung der Vergleichssubstanz Ancistrotanzanin B, die er während seiner Diplomarbeit ebenfalls aus Blättern von *A. tanzaniensis* isoliert und strukturell aufgeklärt hat.
- [168] Ich danke Frau Kristina Hartner für die Durchführung der Partialsynthese.
- [169] Ich danke Frau Stefanie Laug für die Durchführung der CE-Messungen.

Curriculum Vitae

Michael Dreyer

* 02.03.1975 in Göttingen

Familienstand:

verheiratet

Schule

1981 – 1985

Grundschule in Goslar

1985 – 1987

Orientierungsstufe in Goslar

1987 – 1994

Gymnasium mit Abitur in Goslar

Studium

11/1994 – 12/2000

Studium der Fächer Chemie und Biologie für das gymnasiale Lehramt an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

05/1998 – 09/1999

Zulassungsarbeit bei Prof. Dr. P. Proksch am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, Thema: "Isolierung und Strukturaufklärung insektizider Rocaglamid-Derivate aus Zweigen von *Aglaia oligophylla* Miq."

12/2000

Abschluss: Erstes Staatsexamen

Promotion

seit 02/2001

Doktorarbeit bei Prof. Dr. G. Bringmann am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg, Thema: "Isolierung, Charakterisierung und stereochemische Analyse von Naphthylisochinolin-Alkaloiden und anderen Naturstoffen"

Würzburg, den 27.09.2004

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

"Isolierung, Charakterisierung und stereochemische Analyse von Naphthylisochinolin-Alkaloiden und anderen Naturstoffen"

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 27.09.2004