

Phytochemische Untersuchung der vietnamesischen Heilpflanzen Tabernaemontana bovina und Fissistigma bracteolatum

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

> von: Trinh Thi Phuong Lien geb. am: 11. 05. 1971 in Hanoi/Vietnam

Gutachter: Prof. Dr. G. Adam
Gutachter: Prof. Dr. R. Csuk
Gutachter: Prof. Dr. A. Zeeck

Halle (Saale), den 18.10.99

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Untersuchung der Inhaltsstoffe von <i>Tabernaemontana bovina</i> Lour (Apocynaceae)	3
2.1.1	Bisherige Untersuchungen über die Gattung Tabernaemontana und über Tabernaemontana bovina	3
2.1.2	Beschreibung der Pflanze und ihre volksmedizinische Anwendung	5
2.1.3	Eigene Untersuchungen der Blätter und Stengel von Tabernae- montana bovina	5
2.1.3.1	Trennung und Isolierung der Alkaloide	5
2.1.3.2	Strukturaufklärung der monomeren Alkaloide vom Plumeran- Typ	9
2.1.3.3	Strukturaufklärung der monomeren Alkaloide vom Iboga-Typ	21
2.1.3.4	Strukturaufklärung der dimeren Alkaloide	26
2.1.4	Zur Biosynthese der neuen Alkaloiden 2 und 3 sowie 11 und 12	40
2.2	Untersuchungen der Inhaltstoffe von <i>Fissistigma</i> bracteolatum Chatterjee (Annonaceae)	42
2.2.1	Chemische Merkmale der Familie Annonaceae und der Gattung <i>Fissistigma</i>	42
2.2.2	Beschreibung der Pflanzen, ihre bisherige Untersuchung und volksmedizinische Anwendung	42
2.2.3	Eigene Untersuchung über Fissistigma bracteolatum	44

2.2.3.1	Trennung und Isolierung der Verbindungen	44
2.2.3.2 2.2.3.3	Einfache Chalcone Flavene	44 57
2.2.3.4	Sesquiterpen-verknüpfte Flavene	58
2.2.4	Zur Biosynthese der neuen Chalcone und Sesquiterpen- verknüpften Flavene	73
3	Experimenteller Teil	77
3.1	Allgemeine Untersuchungsverfahren	77
3.2	Untersuchung der Inhaltsstoffe von T. bovina	78
3.2.1	Pflanzenmaterial und Isolierung des Rohalkaloids	78
3.2.2	Isolierung und physikalische Daten der Indolalkaloide	79
3.3	Untersuchung der Inhaltsstoffe von Fissistigma bracteolatum	86
3.3.1	Pflanzenmaterial	86
3.3.2	Isolierung und physikalische Daten der Inhaltsstoffe von <i>Fissistigma bracteolatum</i>	86
4	Zusammenfassung	92
5	Literaturverzeichnis	96

1 Einleitung

Die Naturstoffchemie ist ein Zweig der Chemie, der sich vor allem mit der Isolierung, Strukturbestimmung, Synthese und Biosynthese von natürlich vorkommenden organischen Verbindungen befaßt.

Die gegenwärtige Wirkstoffforschung ist weltweit durch Krankheits-, Ernährungs- und zunehmend ökologische Probleme herausgefordert, ständig neue Pharmaka, Pflanzenschutzmittel sowie Mittel zur Optimierung der pflanzlichen und tierischen Produktion zu entwickeln [1, 2]. Ein heute erfolgreich praktizierter Weg besteht in der Suche nach neuen biologisch aktiven pflanzlichen Naturstoffen, insbesondere aus ethnopharmakologisch genutzten, phytochemisch bisher nicht untersuchten Heilpflanzen [3, 4]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, daß 80% der Weltbevölkerung auf traditionelle Heilmittel, die meistens aus Heilpflanzen gewonnen werden, angewiesen sind [5]. Durch deren vertiefte phytochemische Untersuchung werden jährlich einige hundert neue Strukturen entdeckt, von denen viele Anlaß zu weiterführenden pharmakologischen Untersuchungen und zur Auffindung von Struktur-Wirkungsbeziehungen geben und die als Leitstrukturen für neue Pharmaka und Pflanzenschutzmittel dienen können [6, 7].

Die Entwicklung moderner analytischer Methoden hatte in den letzten Jahrzehnten eine Optimierung der naturstoffchemischen Forschungen zur Folge, die wesentlich schnellere und effektivere Isolierung sowie Strukturbestimmung als in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts ermöglicht. Hinzu kommt die Einführung von sich ständig verbessernden biologischen Methoden, durch deren Anwendung eine viel schnellere Bestimmung der biologischen Aktivität und damit eine effektivere Leitstruktursuche erfolgen kann [8, 9].

Trotzdem ist der Anteil der phytochemisch untersuchten höheren Pflanzen im Vergleich zu den bisher nicht erforschten Pflanzenarten noch sehr gering. Von den 250.000-500.000 geschätzten Arten wurden bisher nur ca. 10 % chemisch untersucht, pharmakologisch noch weitaus weniger [10].

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprogrammes zur Erschließung der Strukturdiversität von Pflanzen der vietnamesischen Flora durchgeführt und befaßt sich mit der phytochemischen Analyse der Pflanzen *Tabernaemontana bovina* Lour (Apocynaceae) und *Fissistigma bracteolatum* Chatt. (Annonaceae). Beide Pflanzenarten werden in der vietnamesischen Volksmedizin verwendet [11a, 12, 13], sind jedoch phytochemisch bisher noch nicht untersucht worden.

Die nachfolgend beschriebene Isolierung der Inhaltsstoffe dieser beiden chromatographischer Pflanzenarten erfolgte durch Einsatz Methoden Säulenchromatographie), (Dünnschichtund die Identifizierung bzw. Strukturermittlung mit modernen spektroskopischen Verfahren (IR-, UV-, Massenspektrometrie, Circular Dichroismus und insbesondere 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie) sowie mit Röntgenstrukturanalyse.

Eine umfassende biologische Testung der isolierten Substanzen ist in Arbeit, aber noch nicht abgeschlossen.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Untersuchung der Inhaltsstoffe von *Tabernaemontana bovina* Lour (Apocynaceae)

2.1.1 Bisherige Untersuchungen über die Gattung Tabernaemontana und über Tabernaemontana bovina

Die zur Familie Apocynaceae gehörende Gattung *Tabernaemontana* (*Ervatamia*) besteht aus ca. 120 Species, die in allen tropischen Ländern der Welt verbreitet vorkommen [14a]. In Asien wachsen ca. 110 Arten, 32 davon sind in Vietnam bekannt [15].

Pharmakologisch spielen viele *Tabernaemontana*-Arten eine Rolle als Heilpflanzen [16a, 17], wobei Extrakte der verschiedenen Pflanzenteile gegen viele Arten von Infektionen benutzt werden [14b].

Die Gattung wurde phytochemisch wegen ihrer weiten Verbreitung sowie ihrer Anwendung in der Volksmedizin intensiv untersucht. Seitdem das erste Alkaloid in dieser Gattung 1939 gefunden wurde, sind über 300 verschiedene Alkaloide aus *Tabernaemontana* Species veröffentlicht worden [18]. Es hat sich gezeigt, daß bei *Tabernaemontana* vor allem Indolalkaloide mit einem C₉- oder C₁₀-Monoterpen-Teil auftreten [19]. Sehr oft wurden die drei Alkaloidtypen Ibogain, Plumeran und Corynanthean sowie ihre Dimere gefunden [20]. Außer Indolalkaloiden kommen bei dieser Gattung noch Triterpenalkohole (Lupeol, α -Amyrin, β -Amyrin) sowie Triterpensäuren (Ursolsäure, Oleanolsäure) vor [19].



Die Art *T. bovina* (Abb. 1) ist in Vietnam, Laos und Kambodscha verbreitet [15], wurde phytochemisch bisher jedoch noch nicht untersucht. In *T. bufalina*, einer engen Verwandten von *T. bovina*, hat man bereits 8 Corynanthean- und Ibogain-Alkaloide [21] sowie 3 dimere Alkaloide gefunden [22].



Abb. 1. Tabernaemontana bovina Lour (Apocynaceae)

2.1.2 Beschreibung der Pflanze und ihre volksmedizinische Anwendung

T. bovina ist ein ca. 1m hoher Strauch, der im Urwald von Vietnam wächst (Abb. 1). Die ovalen Blätter sind 8-12 cm lang und gegenständig angeordnet [23]. Die Pflanze blüht von Mai bis Juli und fruchtet von November bis Januar [24].

In Südvietnam wird der Milchsaft von *T. bovina* als Hautschutzmittel benutzt [11a], die Wurzel zur Behandlung von Fieber und Gelbsucht [12].

2.1.3 Eigene Untersuchungen der Blätter und Stengel von *Tabernae*montana bovina

2.1.3.1 Trennung und Isolierung der Alkaloide

Blätter und Stengel von T. bovina wurden mit 95 % igem Methanol extrahiert. Die nach der Methanol-Entfernung zurückbleibende wäßrige Lösung wurde nacheinander mit n-Hexan, Essigester und n-Butanol ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden im Vakuum bis zur Trockene eingeengt und anschließend zur Abtrennung der Rohalkaloide nach dem Extraktionsschema 1 aufgearbeitet. Das verbleibende Rohalkaloidgemisch der Essigester- und n-Butanol-Extrakte zeigten weitgehende Übereinstimmung im Dünnschichtchromatographie, daher wurden beide Rückstände vereinigt. Die Rohalkaloide der n-Hexan- und Essigester-/*n*-Butanol-Extrakte wurden durch säulenoder präparative dünnschichtchromatographisch an Kieselgel oder RP8 mit verschiedenen Laufmitteln aufgetrennt. Die ausführliche Isolierung der einzelnen Verbindung wird in Schema 2 für die aus dem *n*-Hexan-Extrakt Rohalkaloide und in Schema 3 aus dem Essigester-/n-Butanol-Extrakt gezeigt.

Schema 1. Allgemeines Verfahren zur Trennung des Rohalkaloidgemischs von *T. bovina*





Schema 2. Feintrennung der Alkaloide aus dem n-Hexan-Extrakt

- [#]: Sorptionsmittel zur Dünnschicht- bzw. Säulenchromatographie, was in der Seite 77 gezeigt wird.
- *: Ausbeuteberechnung immer bezogen auf Trockengewicht eingesetztes Pflanzenmaterial.



Schema 3. Feintrennung der Alkaloide aus dem Essigester-/n-Butanol-Extrakt





(-)-Mehranin (1)

Die Verbindung **1** wurde aus dem *n*-Hexan-Extrakt isoliert (Schema 2) und nach Umkristallisation aus Aceton als farblose Nadeln mit dem Schmp. 102-104 °C erhalten [$R_f 0.72$ (System 1, S. 78), [α]_D-48.4° (CHCl₃, c 1.02)]. Verbindung **1** zeigt UV-Absorptionen bei 306, 256 und 210 nm, die auf ein *N*-Methylaspidospermidintyp hinweisen [25]. Das Massenspektrum enthält einen Molpeak bei m/z 310 ($C_{20}H_{26}N_2O$) sowie für die *N*-Methylaspidospermidinalkaloide charakteristischen Fragmente. Während die Ionen bei m/z 158 (**a**) und 144 (**b**) einen unsubstituierten Indolteil anzeigen, weisen die Fragmente bei m/z 166 (**c**) und 138 (**d**) auf eine zusätzliche Sauerstoffunktion (Ether- oder Ketogruppe) am Piperidinteil hin [26] (Abb. 2). Im IR-Spektrum findet man eine Bande für eine *N*-Methylgruppe bei 2797 cm⁻¹, jedoch keine Absorptionen für Hydroxy- sowie Carbonyl-Gruppen. Damit liegt der Sauerstoff am Piperidinteil in einer Etherfunktion vor. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt im olefinischen Bereich 4 Signale bei 6.40-7.10 ppm, die dem Indolgerüst zuzuordnen sind. Das Singulett bei 2.75 ppm entspricht der *N*-Methylgruppe. Eine Ethylgruppe wird durch ein Triplett (0.81 ppm, 7.2 Hz) und ein Quartett (1.30 ppm, 7.2 Hz) belegt. Weiterhin erkennt man 4 Dubletts. Das bei 3.56 ppm liegende koppelt mit dem bei 2.36 ppm mit einer Kopplungskonstanten von 12.9 Hz, was eine geminale Kopplung anzeigt. Die benachbarten Protonen bei 3.35 ppm und 2.97 ppm (gemeinsame Kopplungskonstante von 4.0 Hz) sind aufgrund ihrer Verschiebung mit Sauerstoff verknüpft, so daß der Ether-Sauerstoff als Epoxid vorliegen muß. Beim Vergleich der MS- sowie ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von **1** mit den publizierten Daten für (-)-Mehranin [26, 27] erwiesen sich die beiden

Verbindungen als identisch.



	$[\mathbf{M}]^+$	a	b	С	d
1 R_1 - R_2 = O, R_3 = H_2	310	158	144	166	138
2 R_1 - R_2 = O, R_3 = O	324	157^{*}	144	-	-
3 $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H_2$	328	158	144	184	156

$* [a-H]^{+}$

Abb. 2. Massenspektrometrische Fragmentierung von der monomeren Alkaloide **1-3**



Abb. 3. Röntgenkristallstruktur von (-)-Mehranin-monohydrobromid



Abb. 4. Anordnung der Molekül von (-)-Mehranin-monohydrobromid im Kristallgitter

(-)-Mehranin wurde bisher nur in Blättern von *Tabernaemontana divaricata* gefunden [27]. In dieser Arbeit wurde die relative Konfiguration dieses Alkaloids lediglich durch biogenetischen Vergleich mit anderen bekannten strukturähnlichen Verbindungen von derselben Pflanze abgeleitet und die Konfiguration an C-2 nicht angegeben.

Zur Bestimmung der relativen und absoluten Konfiguration haben wir das Hydrobromid der Substanz 1 hergestellt und anschließend eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Die Verbindung kristallisiert aus Methanol/Aceton in der orthorhombischen Raumgruppen $P2_12_12_1$ mit einem Molekül Methanol und einem halben Molekül Wasser. Dessen Ergebnis zeigt, daß HBr-Zugabe zu Mehranin zu einer Protonierung des Stickstoffs N(4) führt, der basischer als der Indolstickstoff N(1) ist. Weiterhin nehmen die beiden 5-gliedrigen Ringe [N(1)-C(2)-C(7)-C(8)-C(13)] und [N(4)-C(5)-C(6)-C(7)-C(21)] eine Briefumschlag-Konformation ein. Der 6-gliedrige Ring [C(2)-C(7)-C(21)-C(20)-C(17)-C(16)] weist eine leicht verzerrte Sessel-Konformation auf. Der andere 6-gliedrige Ring [N(4)-C(21)-C(20)-C(15)-C(14)-C(3)] zeigt wegen des Epoxidrings [C(14)-O(1)-C(15)] eine irreguläre Twist-Konformation (Abb. 3). Außerdem erkennt man eine starke Wasserstoff-Brücke zwischen dem Proton an N(4) und dem Sauerstoff des Lösungsmittels Methanol sowie eine schwache zweite Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe des Methanols und dem Bromidion (Abb. 4) [28].

3-Oxomehranin (2)

Wiederholte Flash-Chromatographie des *n*-Hexan-Extrakts (Schema 2) ergab das Hauptalkaloid **2** [$R_f 0.49$ (System 1, S. 78), [α]_D²⁶-19.1° (CHCl₃, c 0.40)].

Verbindung 2 zeigt eine ähnliche UV-Absorption wie 1 bei 307, 256 und 218 nm, was auf das Dihydroindolgerüst hinweist. Im IR-Spektrum sind die Banden für *N*-Methylgruppe (2801 cm⁻¹) und Carbonylgruppe (1654 cm⁻¹) zu erkennen. Das EI-Massenspektrum enthält neben dem Molpeak bei m/z 324 ($C_{20}H_{24}N_2O_2$) Fragmente bei m/z 157 und 144, die aus dem Indolteil resultieren (Abb. 2).

Einen endgültigen Beweis für das Vorliegen eines *N*-Methylaspidospermidin-Typs lieferten die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren (Tab. 1, 2). Im ¹H-NMR-Spektrum erkennt man analog zu **1** die Signale der 4 aromatischen Protonen, der *N*-Methylgruppe und der Ethylgruppierung. Die Signale für H-14 (3.33 ppm) und H-15 (3.25 ppm), die an ihren charakteristischen Kopplungen erkannt wurden, zeigen wieder die Epoxidgruppe an C-14 und C-15. Die fehlenden Signale von H₂-3 im ¹H-NMR-Spektrum sowie die Anwesenheit eines Carbonylsignals (165.2 ppm) im ¹³C-NMR-Spektrum können durch eine Carbonylgruppe an C-3 erklärt werden. Dementsprechend enthält das Molgewicht von Verbindung **2** 14 Masseneinheiten mehr als Verbindung **1**. Die vollständige Struktur von **2** wurde durch HSQC- und HMBC-Spektren (Abb. 5) aufgeklärt. Man findet alle erwarteten ${}^{1}J_{C,H}$ - und ${}^{2,3}J_{C,H}$ -Korrelationen für die vorgeschlagene Struktur, wobei die Kopplungen zwischen dem Proton H-14 (3.33 ppm) bzw. H-15 (3.25 ppm) und C-3 (165.2 ppm) die Ketogruppe an C-3 bestätigen.

Die relative Konfiguration von 2 ist identisch mit der von 1, was durch ein NOESY-Experiment ermittelt wurde (Abb. 6). Anschließend wurden die ¹H-sowie ¹³C-Signale mit Hilfe des HSQC- und HMBC-Spektrums zugeordnet.

Die fast identischen CD-Spektren von 1 und 2 (Tab. 3) belegen die übereinstimmende absolute Konfiguration beider Alkaloide.

Aus diesen Daten folgt für die Verbindung 2 die Struktur des bisher nicht bekannten 3-Oxomehranins.

С	1	2	3	4
_				
2	73.2	67.0	71.4	140.8
3	53.1	165.2	56.8	58.0
5	53.7	42.3	51.8	53.5
6	41.1	36.2*	39.5 [*]	26.3
7	51.3	53.3	52.4	109.2
8	136.7	131.5	135.4	127.7
9	121.3	121.7	121.6	117.6
10	117.1	117.6	117.2	118.5
11	127.6	128.6	127.6	120.2
12	106.5	107.0	106.6	108.5
13	150.1	150.2	150.6	136.9
14	53.0	49.4	69.3	52.4
15	57.3	59.4	78.5	59.3
16	19.9	20.0	21.1	20.9
17	23.4	20.0	25.5	32.4
18	7.5	7.3	8.1	7.4
19	27.7	27.0	23.1	35.2
20	34.7	36.5*	39.8 [*]	33.7
21	67.7	64.8	66.5	53.7
NMe	31.5	31.3	31.5	30.0

Tabelle 1. ¹³C-NMR-Daten der monomeren Alkaloide 1-4 (75 MHz, δ (ppm), CHCl₃)

^{*} Zuordnung ist austauschbar

1	2	3	4
3.38(d, 4.9)	3.22(d, 5.2)		
2.36(d, 12.9)			2.65(d, 12.4)
3.56 (dd, 1.6/12.9)			3.25(d, 12.4)
	α : 3.82 (dd 12.5/9.5)		
	β: 3 32		
	p: 5.52		
	(4, 1.55)		
702(171)	p: 2.32 (aa, 15.0/0.8)	702(171)	7 45 (1 7 7)
7.02(a, 7.1)	6.98(a, 7.0)	7.03(a, 7.4)	7.45(a, 7.7)
6.64(td, 7.4/0.5)	6.69(t, 7.3)	6.64 (td, 7.4/0.8)	7.06 (<i>td</i> , 7.9/1.1)
7.09 (<i>td</i> , 7.7/1.1)	7.14 (<i>td</i> , 7.6/0.9)	7.08 (<i>td</i> , 7.7/1.1)	7.15 (<i>td</i> , 7.1/1.1)
6.39 (<i>d</i> , 7.7)	6.44 (<i>d</i> ,7.9)	6.38 (<i>d</i> , 7.7)	7.26 (<i>d</i> , 7.9)
3.35(d, 4.0)	3.33 (<i>d</i> , 3.7)	3.88 (td, 9.8/4.9)	3.14(d, 4.0)
2.97(d, 4.0)	3.25(d, 3.7)	3.40(d, 9.9)	2.92(d, 4.0)
	α: 1.20; β: 1.81		4.21 (<i>t</i> , 13.0)
	α: 1.48; β: 1.20		
0.81 (<i>t</i> , 7.2)	0.85(t, 7.4)	0.83(t, 7.4)	0.74(t, 7.4)
1.30(q, 7.2)	1.25; 1.55		1.13(q, 7.4)
2.26(s)	4.13 (s)		
2.75(s)	2.78(s)	2.74(s)	3.70 (<i>s</i>)
	$\begin{array}{c} 1\\ 3.38 \ (d, 4.9)\\ 2.36 \ (d, 12.9)\\ 3.56 \ (dd, 1.6/12.9)\\ 3.56 \ (dd, 1.6/12.9)\\ \end{array}$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $

Tabelle 2. ¹H-NMR-Daten der monomeren Alkaloide **1-4** (300 MHz, δ (ppm), J (Hz), CHCl₃)



Abb. 5. HMBC-Spektrum von 3-Oxomehranin (2) (CDCl₃)



Abb. 6. NOE's von 3-Oxomehranin (2)

Tabelle 3. C	CD-Spektren	der Alkaloide	1-3	(MeOH)
--------------	-------------	---------------	-----	--------

Alkaloid		CD			
1	ε ₃₂₅ =+0.36	ε ₂₉₇ =-0.33	-	ε ₂₅₁ =-2.55	ε ₂₂₆ =+1.63
2	ε ₃₂₈ =+1.25	ε ₂₉₇ =-1.39	ε ₂₆₅ =+2.18	ε ₂₄₈ =-5.93	ε ₂₀₃ =-17.20
3	ε ₃₂₅ =+0.82	-	ε ₂₇₂ =+1.04	ε ₂₄₇ =-1.29	ε ₂₀₂ =-4.27

<u>14 α ,15 β -Dihydroxy-*N*-methylaspidospermidin (3)</u>

Aus dem Essigester-/*n*-Butanol-Extrakt wurde Verbindung **3** als Nebenkomponente isoliert (Schema 3) [R_f 0.09 (System 1, S. 78), [α]_D³⁰ 15.3° (MeOH, c 0.06), Schmp. 200-203 °C (Aceton)].

Im EI-Massenspektrum sind neben dem Molpeak bei m/z 328 ($C_{20}H_{28}N_2O_2$) Fragmente bei m/z 144 und 158 vorhanden, was einen identischen Indolteil wie bei **1** anzeigt (Abb. 2). Dementsprechend zeigt das ¹H-NMR-Spektrum 4 aromatischen Signale bei 6.38-7.08 ppm und ein NCH₃-Signal bei 2.74 ppm (Tab. 2). Im Gegensatz zu **1** sind im EI-MS von **3** die Bruchstücke vom Typ **c** und **d** um 18 Masseneinheiten verschoben, was auf zwei Sauerstoffunktionen am Piperidinring hinweist (Abb. 2). Da man im IR-Spektrum die Bande für OH-Absorption (3355 cm⁻¹, breit) findet sowie im ¹³C-NMR-Spektrum die Signale von C-14 (69.3 ppm) und C-15 (78.5 ppm) im Vergleich zu **1** zu tieferem Feld verschoben sind, kann man davon ausgehen, daß in **3** der Epoxidring geöffnet ist, so daß 2 Hydroxy-Gruppen vorliegen.

Die Röntgenkristallstrukturanalyse von **3** [29] liefert die endgültige Struktur, in der die beiden Hydroxygruppen an C-14 und C-15 äquatorial orientiert sind (Abb. 7). Außerdem besitzen sie schwache Wasserstoffbrücken zum Indolstickstoff bzw. Piperidinstickstoff eines zweiten bzw. dritten Moleküles (Abb. 8). Die Zuordnung der ¹³C- sowie ¹H-Signale (Tab. 1, 2) erfolgte durch Vergleichen mit dem Spektrum des (-)-Mehranin (**1**) und mit Peduncularidin [30], das im Piperidinteil mit Verbindung **3** übereinstimmt.

Das CD-Spektrum von **3** ist nahezu identisch mit dem von **1** und **2** (Tab. 3), die eine übereinstimmende absolute Konfiguration dieser Verbindungen anzunehmen belegen.

Verbindung **3** ist bisher weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt bekannt.

<u>Hecubin (4)</u> (N(1)-Methyl-voaphyllin)

Das Alkaloid **4** wurde aus dem *n*-Hexan-Extrakt isoliert (Schema 2) [R_f 0.8 (System 1, S. 78), [α]_D²⁵ 27^o (CHCl₃, c 0.50), Schmp. 158-160 °C (Aceton)].

Im UV-Spektrum besitzt Verbindung **4** einen Indolchromophor des Voaphyllin-Typs mit Maxima bei 293, 286 und 229 nm [31]. In Übereinstimmung damit liefert das EI-Massenspektrum den Molpeak bei m/z 310 ($C_{20}H_{26}N_2O$) sowie für Voaphyllin typische Fragmentionen, die einen *N*-Methylindolteil (m/z 158, 144) und einen sauerstoffhaltigen Piperidinring (m/z 166, 138) anzeigen [32a].

Im ¹H-NMR-Spektrum (Tab. 2) können 4 typische Signale bei 7.06-7.45 ppm zum Indolring, ein Signal bei 3.70 ppm zur *N*-Methylgruppe sowie die Signale bei 0.74 ppm (t, 7.4 Hz) und 1.13 ppm (q, 7.4 Hz) zur Ethylgruppe zugeordnet werden. Außerdem wurden H₂-3, H-14 und H-15, die zu einem Piperidinteil analog wie im Mehranin gehören, durch ihre charakteristischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten identifiziert. Das ¹³C-NMR-Spektrum (Tab. 1) zeigt ein Indolsystem mit 8 aromatischen Signalen sowie einen Epoxydring mit Signalen bei 59.3 ppm (C-15) und 52.4 ppm (C-14) [33].

Durch Vergleich mit den Massen- und NMR-Daten in der Literatur [34] wurde 4 als Hecubin identifiziert, das bisher in den Blättern von *E. coronaria* und *T. divaricata* gefunden wurde [35].



Abb. 7. Röntgenkristallstruktur von 14α,15β-Dihydroxy-*N*-methylaspidospermidin (**3**) (Die Wasserstoffatome außer OH-Gruppe wurden weggelassen)



Abb. 8. Anordnung der Moleküle von 14α , 15β -Dihydroxy-*N*-methylaspidospermidin (**3**) im Kristallgitter

2.1.3.3 Strukturaufklärung der monomeren Alkaloide vom Iboga-Typ

Aus dem Rohalkaloidgemisch des Essigester-/*n*-Butanol-Extrakts wurden fünf Iboga-Alkaloide (**5**-**9**) durch Chromatographie an Kieselgel isoliert.

Iboga-Alkaloiden liegt das unten dargestellte Grundgerüst mit 4 Assymmetriezentren an C-14, C-16, C-20 und C-21 zugrunde. Wegen der [C(14)-C(3)-N(4)]-Brücke haben alle Iboga-Alkaloide an C-14, C-16 und C-21 übereinstimmende relative Konfiguration [11b]. Die absolute Konfiguration kann aber unterschiedlich sein und wurde durch CD-Spektren untersucht [36].



- 5 $R_1 = OCH_3, R_2 = R_3 = R_4 = H$
- **6** $R_1 = R_2 = OCH_3, R_3 = R_4 = H$
- 7 $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, $R_3 = COOCH_3$; $R_4 = OH$
- 8 $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = COOCH_3, R_4 = OH$

9 $R_1 = R_2 = OCH_3, R_3 = COOCH_3, R_4 = OH$

(-)-Ibogain (5)

Verbindung 5 wurde als Öl durch präp. Dünnsichtchromatographie mit *n*-Hexan/EtOAc/ Diethylamin 9:1:0.6 als Laufmittel isoliert (Schema 3) [$R_f 0.60$ (System 1, S. 78), [a]_D²⁶-35° (CHCl₃, c 2.00)].

Ihr UV-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 288 und 225 nm. Im EI-Massenspektrum erkennt man den Molpeak bei m/z 310 ($C_{20}H_{26}N_2O$) sowie Fragmentionen bei m/z 281 (e), 225 (g), 186 (h), 122 (i), 136 (k) und 149 (l), die für ein Ibogamin mit einer Methoxygruppe im Indolring sprechen [32b] (Abb. 9).

Der vorgeschlagene Strukturtyp wurde durch ¹H-NMR-Untersuchungen abgesichert. Hier findet man drei aromatische Protonensignale, die ein ABX-System bilden (7.13, *d*, 8.8 Hz; 6.91, *d*, 2.2 Hz und 6.77 ppm, *dd*, 8.5/2.5 Hz), und ein aromatisches Methoxysignal (3.85 ppm). Weiterhin erkennt man eine Methylgruppe (0.90 ppm, 3H, *t*, 7.1 Hz), die wegen der Tripplettaufspaltung zu einer CH₂-Gruppe benachbart ist.

Der endgültige Strukturbeweis erfolgte durch Massen- sowie ¹³C-NMR-Messungen (Tab. 4). Die hier gefundenen Daten stimmen gut mit den Vergleichswerten aus der Literatur überein [37, 38]. Damit handelt es sich bei der Verbindung **5** um das bekannte Ibogain.

Die Stereochemie von Ibogain wurde durch CD-Spektren im Vergleich mit (+)-Catharanthin ermittelt, dessen Absolutkonfiguration durch Röntgenstruktuanalyse erkannt wurde [39]. Verbindung **5** besitzt einen Drehwert von -35°, was (-)-Ibogain 16*R*, 20*S*-Konfiguration entspricht.

(-)-Ibogain wurde zuerst aus der Rinde von *Tabernanthe iboga* isoliert, die in Afrika gegen Müdigkeit und Hunger verwendet wurde [40]. Später wurde die Verbindung sehr oft in *Tabernaemontana*-Arten gefunden.

Pharmakologisch besitzt Ibogain halluzinogene Eigenschaften und wirkt stimulierend bei Erschöpfung und Müdigkeit. Im Tierversuchen erzeugt die Verbindung Tremor, Bradykardie und Erniedrigung des Blutdrucks und stimuliert das zentrale Nervensystem [11c].

<u>Ibogalin (6)</u>

Elution mit *n*-Hexan/Aceton/Diethylamin 9:1:0.4 führt zur Isolierung von Verbindung **6** (Schema 3) [R_f 0.51 (System 1, S. 78), $[\alpha]_D^{28}$ -40.9° (MeOH, c 0.255), Schmp. 138-140 °C (Aceton/Methanol)].

Verbindung **6** zeigt ein ähnliches UV-Spektrum wie **5** mit zwei Maxima bei 300 und 228 nm. Im Vergleich zu **5** zeigen im Massenspektrum von **6** sowohl das Molekülion bei m/z 340 als auch die Fragmente vom Typ **g** (m/z 255) und **h** (m/z 216) eine Verschiebung von 30 Masseneinheiten, was auf eine zusätzliche Methoxygruppe am Indolteil hinweist (Abb. 9).

Im Einklang damit steht das ¹H-NMR-Spektrum, das zwei aromatische Protonensinguletts bei 6.91 und 6.78 ppm sowie zwei Methoxysignale bei 3.92 und 3.87 ppm zeigt. Die Verschiebungen des aliphatischen Teils sind im wesentlichen identisch mit denen von **5**. Die vorgeschlagene Struktur von **6** wurde weiterhin durch die ¹³C-NMR-Daten mit den wichtigen Signalen bei 144.7 ppm (C-10), 146.2 ppm (C-11), 94.2 (C-12), 56.4 und 56.3 ppm (OMe) gestützt [41].

Durch Vergleich der UV- und ¹H-NMR-Spektren mit Literaturdaten für Ibogalin [42] erwiesen sich die beiden Verbindungen als identisch. Die ¹³C-Daten, die bisher noch nicht veröffentlicht sind, wurden durch Vergleich mit denen von (-)-Ibogain (5) und bekannten strukturverwandten Verbindungen zugeordnet [41]. Sie wurde zum ersten Mal in *Tabernanthe iboga* gefunden [42]. Pharmakologisch hat es ähnliche Wirkungen wie Ibogain (5) [11c].

<u>19-epi-Voacristin (7)</u>

Elution mit *n*-Hexan/Aceton 4:6 ergab ein Nebenalkaloid (Schema 3) [R_f 0.43 (System 1, S. 78), [α]_D²⁶-42.0° (CHCl₃, c 0.50)].

Das UV-Spektrum von 7 weist zwei Maxima bei 276 und 210 nm auf. Im IR-Spektrum befinden sich Absorptionen bei 3450 (NH), 3400 (OH) und 1712 cm⁻¹ (Carbonyl). Das EI-spektrum enthält neben dem Molpeak bei m/z 384 $(C_{22}H_{28}N_2O_4)$ zwei Schlüsselionen bei m/z 366 ([M-H₂O]⁺) und 307 ([M-H₂O-CO₂Me]⁺), die aus der Abspaltung der Hydroxy- sowie Methylestergruppe entstehen. Weitere Fragmente bei m/z 283 (**g**), 244 (**h**), die im Vergleich zu **6** um 58 Einheiten verschoben sind, zeigen die zusätzliche Methylestergruppe im cyclischen Ibogain-Teil, wobei die Fragmente bei m/z 339 (**e**) und 138 (**i**) auf die Hydroxyfunktion in der Seitenkette hinweisen (Abb. 9). Das EI-Spektrum von **7** stimmt gut mit dem von Voacristin überein [43].

Im ¹H-NMR-Spektrum befinden sich drei aromatische Signale bei 6.83-7.16 ppm, die ein ABX-System bilden und dem Indolring zugeordnet werden können. Zwei Methylsignale im tiefen Feld bei 3.85 ppm und 3.73 ppm sind charakteristisch für einen Methoxysubstituenten am aromatischen Ring bzw. eine Carbomethoxygruppe [44]. Die 1-Hydroxyethylgruppierung erkennt man an den Signalen bei 1.28 ppm (3H, *d*, 6.3 Hz) und 3.93 ppm (1H, *qd*, 6.3/2.8 Hz) [45].

In guter Übereinstimmung mit den ¹³C-NMR-Daten in der Literatur [46] wurde Verbindung **7** als 19-epi-Voacristin identifiziert.

<u>19-epi-Isovoacristin (8)</u>

Weitere Elution mit *n*-Hexan/Aceton 4:6 ergab das Alkaloid **8** (Schema 3) $[R_f 0.44 \text{ (System 1, S. 78), } [\alpha]_D^{26.4}$ -18.9° (CHCl₃, c 0.37)].

Sowohl das IR- als auch das EI-Massenspektrum (Abb. 9) von Verbindung **8** sind dem von 19-epi-Voacristin (**7**) sehr ähnlich, was auf eine Isomerie von **7** und **8** hinweisen kann. Das UV-Spektrum zeigt zwei Absorptionen bei 297 und 226 nm, die nach längeren Wellen verschoben sind.

Im ¹H-NMR-Spektrum findet man nur kleine Änderung in der Verschiebungen von drei aromatischen Protonensignale (δ 7.33, 1H, *d*, 8.8 Hz und 6.77, 2H, *m*). Das ¹³C-NMR-Spektrum liefert Signale auch für 22 C-Atome. Im aliphatischen Bereich sind die Verschiebungen sehr ähnlich mit denen von **7**. Im aromatischen Bereich ist ein aromatisches CH-Signal nach tiefem Feld verschoben (δ 94.0), was typisch für C-12 mit einem benachbarten oxygenierten C-11-Atom ist [47].

Dadurch und im Vergleich mit der ¹³C-NMR-Daten in der Literatur [48] ist **8** als 19-epi-Isovoacristin identifiziert (Tabelle 4).

<u>19-Hydroxyconopharyngin (9)</u>

Elution mit *n*-Hexan/Aceton/Diethylamin 6:4:0.4 liefert das Alkaloid **9** (Schema 3) [$R_f 0.37$ (System 1, S. 78), [α]_D^{23.8}-35.0° (CHCl₃, c 1.00)].

Das IR-Spektrum von Verbindung **9** zeigt analog zu **7** bzw. **8** die Absorptionen für NH-, OH- und Carbonylgruppen. Im Massenspektrum erscheinen die für ein Voacristin-Derivat mit einer zusätzlichen Methoxygruppe am Indolring charakteristischen Fragmente (Abb. 9) [32b]. Im ¹H-NMR-Spektrum erkennt man anstatt der drei aromatischen Signale wie bei **7** nur zwei Singuletts bei 6.89 und 6.79 ppm. Zusammen mit den zwei Methoxygruppen bei 3.89 und 3.92 ppm ergibt sich ein Indolteil mit zwei OMe-Gruppen an C-10 und C-11. Die Struktur von **9** wurde weiterhin durch das ¹³C-NMR-Spektrum (Tab. 4) mit Signalen bei 175.1 (<u>C</u>OOMe), 145.0 (C-10), 147.3 (C-11) und 94.2 ppm (C-12) abgesichert [49]. Die Zuordnung der C-Atome erfolgte mit Hilfe des APT-Experiments, aber auch durch Vergleich mit ¹³C-NMR-Daten von **7** und verwandten Verbindungen [41, 49]. Aufgrund dieser Befunde wurde Alkaloid **9** als 19-Hydroxyconopharyngin identifiziert.



	$[\mathbf{M}]^+$	[M-	[M-HR ₄ -	e	g	h	i	k	l
		$HR_4]^+$	$[R_3]^+$						
5 $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, $R_3 = R_4 = H$	310	-	-	281	225	186	122	136	149
6 $R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = R_4 = H$	340	-	-	-	255	216	122	136	149
7 $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, $R_3 = CO_2CH_3$, $R_4 = OH$	384	366	307	339	283	244	138	152	165
8 $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = CO_2CH_3$, $R_4 = OH$									
9 $R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = CO_2CH_3$, $R_4 = OH$	414	396	337	369	313	274	138	152	165

Abb. 9. Massenspektrometrische Fragmentierung der Iboga-Alkaloide 5-9

С	5	6	7	8	9
2	142.8	140.6	136.4	136.3	134.2
3	49.9	49.8	52.1	52.2	51.9
5	54.3	54.1	50.8	50.8	50.5
6	20.6	20.8	22.2	21.4	21.8
7	109.0	108.8	109.5	109.5	109.5
8	129.8	128.7	128.9	122.8	121.2
9	100.4	100.4	100.7	119.2	100.6
10	153.9	144.7	154.2	109.4	145.0
11	110.9	146.2	112.4	156.9	147.3
12	110.7	94.2	111.3	94.3	94.2
13	130.1	128.7	130.6	134.4	129.7
14	26.4	26.4	26.8	26.8	27.0
15	31.9	32.0	28.5	28.4	28.6
16	41.9	41.9	53.7	53.4	53.8
17	34.1	34.3	36.6	36.5	36.7
18	11.9	11.8	21.5	22.1	22.2
19	27.8	27.7	70.6	70.5	70.8
20	41.3	41.3	40.0	40.0	39.9
21	57.6	57.7	54.3	54.4	54.3
10-OCH3	56.0	56.3 [*]	55.9		56.2^{*}
11-OCH3		56.4*		55.7	56.5 [*]
<u>C</u> OOMe			174.8	174.8	175.1
COO <u>Me</u>			52.8	52.8	52.7

Tabelle 4. ¹³C-NMR-Daten der Iboga-Alkaloide **5-9** (75 MHz, δ (ppm), CHCl₃)

*: Zuordnung austauschbar

2.1.3.4 Strukturaufklärung der dimeren Alkaloide

Im Essigester-/*n*-Butanol-Extrakt konnten durch Chromatographie an Kieselgel fünf dimere Alkaloide (10-14) getrennt wurden. Verbindung 10 ist bereits bekannt, dagegen sind die Verbindungen 11-14 neu.





11



Pedunculin (10)

Chromatographie des Rohalkaloidgemischs ergab acht Fraktionen. Fraktion 6 wurde aus Aceton umkristallisiert und lieferte die Hauptverbindung **10** (Schema 3) [$R_f 0.37$ (System 1, S. 78), [α]_D^{23.8} -119.7° (CHCl₃, c 0.50), Schmp. 195-198 °C (Aceton)].

Verbindung **10** besitzt ein kompliziertes UV-Spektrum mit Maxima bei 338, 307, 265, 238 und 215 nm, was typisch für eine Kombination zwischen Anilinacryl- und Indolchromophor ist [50, 51]. Das IR-Spektrum zeigt Absorptionen bei 3535 (NH), 3392 (OH), 2807 (NCH₃) und 1670 cm⁻¹ (konj. Carbonylgruppe). Im EI-Massenspektrum erscheint der Molpeak bei m/z 736 ($C_{43}H_{52}N_4O_7$), der in Übereinstimmung mit dem ¹³C-NMR-Spektrum (43 Signale, davon 15 olefinische) auf eine Bisindolstruktur hinweist.

Im ¹H-NMR-Spektrum befinden sich zwei Methyltripletts bei 0.79 und 0.75 ppm mit Kopplungskonstanten von 7.4 Hz, die die Anwesenheit von zwei Ethylgruppen in der Seitenkette zeigen, ein N-Me-Signal bei 2.81 ppm, zwei aromatische Methoxysignale bei und 3.88 ppm und 3.85 ein Carbomethoxysignal bei 3.79 ppm. Im tiefen Feld erkennt man die Signale eines ABX-Systems (7.02 ppm, dd, 7.6/1.4 Hz, 6.97 ppm, d, 1.1 Hz und 6.44 ppm, d, 7.9 Hz) und ein Singulett bei 5.66 ppm. Das weist darauf hin, daß bei einem Indolring C-10 oder C-11 einen zusätzlichen Substituenten trägt und bei dem anderen Indolteil drei weitere Substituenten vorhanden sind. Außerdem wurden die typischen Signale für ein Mehraningerüst (H₂-3, H₂-5, H-14, H-15, H-21, 20-CH₂CH₃) beobachtet (Tab. 5), so daß ein Mehranin als Substruktur vorliegt. Das Alkaloid 10 wurde durch Vergleich mit publizierten Daten [27, 30] als

Das Alkaloid **10** wurde durch Vergleich mit publizierten Daten [27, 30] als Pedunculin (Conopholin) identifiziert. Es wurde 1995 in Blättern von *Ervatamia peduncularis* [30] und von *Tabernaemontana divaricata* (unter dem Namen Conopholin) [27] gefunden.

Methylenbismehranin (11)

Das Alkaloid **11** wurde als Hauptkompenente mit Cyclohexan/Aceton/ Diethylamin 8:2:0.6 isoliert (Schema 3) [R_f 0.66 (System 1, S. 78), [α]_D²⁸-5.9° (MeOH, c 0.50)].

Im Vergleich zu Mehranin (1) zeigen die IR- und UV-Spektren von 11 ähnliche Absorptionen, was auf ein Dihydroindol hinweist. Die hochaufgelöste Molekülmasse 632.4080 liefert die Summenformel $C_{41}H_{52}N_4O_2$. Im EI-Massenspektrum von 11 sind Fragmentionen (m/z 309, 166, 138) zu beobachten, die auch für das Mehranin (1) typisch sind (Abb. 10). Darüber hinaus treten auch Ionen bei m/z 323 [309+CH₂] und 170 [156+CH₂] auf, die auf eine zusätzliche Methylengruppe hinweisen. Das deutet darauf hin, daß Verbindung 11 aus zwei durch eine CH₂-Brücke verknüpfte Mehranin-Moleküle besteht.



Abb. 10. Massenspektrometrische Fragmentierung von Methylenbismehranin

Die vorgeschlagene Struktur wurde durch die NMR-spektroskopischen Daten gestützt. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren sind im aliphatischen Bereich abgesehen von einer zusätzlichen Methylengruppe (δ_H 3.79, δ_C 41.1) völlig identisch mit denen von Mehranin. Im aromatischen Bereich vom ¹H-NMR-Spektrum findet man anstelle von vier Protonensignalen wie bei Mehranin nur drei Signale, die ein ABX-System bilden. Ihre Integrale zeigen, daß jedes Signal außer der zusätzlichen CH₂-Gruppe doppelt so vielen Protonen wie beim Mehranin entspricht, so daß die Struktur von **11** symmetrisch sein muß. Das deutet darauf hin, daß die zusätzliche CH₂-Gruppe zwischen C-10, C-10' oder C-11, C-11' steht.

Der endgültige Strukturbeweis erfolgte durch HSQC- und HMBC-Spektren. Die HMBC-Korrelationen von CH₂ (3.79 ppm) mit CH-9 (bzw. CH-9') (122.1 ppm), C-10 (bzw. C-10') (131.1 ppm) und CH-11 (bzw. CH-11') (127.7 ppm) beweisen die 10, 10'-Verknüpfung durch die CH₂-Brücke (Abb. 11). Die

relative Konfiguration von **11** wurde analog zu 3-Oxomehranin (Abb. 6) durch ein NOESY-Experiment ermittelt. Die Analyse der Spektren ergab NOE's zwischen H-3 β /H-5 β , H-5 β /H-6 β , H-6 β /H-2 und H-2/H-16 β , die somit auf einer Seite des Moleküles stehen. Die NOE's zwischen H-3 α /H-21, H-21/H-9, H-21/H₃-18, H-21/H₂-19, H-17 α /H₃-18 und H-5 α /H-6 α beweisen, daß sich diese Protonen auf der anderen Seite des Moleküles befinden. Die Konfiguration des Epoxidrings wurde durch NOE's zwischen H-15/H₃-18 und H-15/H₂-19 ermittelt.

Damit wurde die Strukturaufklärung des neuen Bisindolalkaloids **11**, das wir als Methylenbismehranin bezeichnen, abgeschlossen.



Abb. 11. HMBC-Spektrum von Methylenbismehranin (**11**) (CDCl₃)

Tabernaebovin (12)

Elution mit *n*-Hexan/Aceton/Diethylamin 6:4:0.5 ergab die Hauptverbindung **12**, die nach der Umkristallisation aus Aceton als weiße Nadeln erhalten wurde (Schema 3) [R_f 0.58 (System 1, S. 78), [α]_D²⁴133.0° (CHCl₃, c 1.00), Schmp. 163-165 °C].

Die UV- und IR-Spektren von **12** zeigen ähnliche Absorptionen wie bei **11**. Die hochaufgelöste Molekülmasse 618.3930 liefert die Summenformel $C_{40}H_{50}N_4O_2$, was zwei Molekülen Mehranin entspricht.

Das komplizierte ¹H-NMR-Spektrum enthält typische Signale des Mehraningerüstes (H₂-3, H₂-5, H-14, H-15, 20-C₂H₅ und NCH₃), die doppelt vorkommen, was ebenso wie die doppelte Anzahl von 40 Signalen im ¹³C-NMR-Spektrum für eine unsymmetrische Verknüpfung von zwei Mehranin-Molekülen spricht (Tab. 5, 6). Im aromatischen Bereich findet man nur fünf Protonensignale. Vier davon können durch ihre Kopplungskonstante einem Indolteil zugeordnet werden (7.09 ppm, *td*, 7.6/1.2 Hz; 6.90 ppm, *d*, 6.7 Hz; 6.54 ppm, *td*, 7.3/0.7 Hz und 6.27 ppm, *d*, 7.9 Hz).

Eine Mehranin-Substruktur (C-2' bis C-21') wurde durch die gefundenen Korrelationen im ¹H-¹H-COSY-, HSQC- und HMBC-Spektrum ermittelt, wobei die Verknüpfung mit der zweiten Molekülhälfte an C-2' festgestellt wurde. In dem zweiten Teil erscheint das Signal von H-12 (bei 6.24 ppm) sehr breit und die H-9-, H-11- und H-21-Signale fehlen. H-11 und H-21 konnten jedoch im HSQC-Spektrum erkannt werden. Für H-9 wurden die Kopplungen mit anderen Protonen und C-Atomen im ¹H-¹H-COSY- sowie im HMBC-Spektrum nicht gefunden.

Das Problem kann aber mit Hilfe der Strukturzuordnung von 11 gelöst werden. Vergleich der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der zweiten Molekülhälfte mit denen von 11 ergibt, daß die Verschiebungen fast identisch sind, so daß ebenfalls eine Mehranin-Substruktur (C-2 bis C-21) mit Substitution an C-10 vorliegt (Tab. 5, 6). Die Verknüpfung beider Teile zwischen C-10 und C-2' wurde durch die Korrelation zwischen H-16' und C-10 im HMBC-Spektrum bestätigt (Abb. 12). Substruktur wurde Die Stereochemie von jeder analog wie bei Methylenbismehranin (11) durch das NOESY-Experiment analysiert [52]. Außerdem wird die Konfiguration an C-2' durch biogenetische Analogie gleich wie bei (-)-Mehranin vermutet.

Die Verbindung **12** wurde Tabernaebovin genannt. Sie wurde zum ersten Mal isoliert und strukturell aufgeklärt.



Abb. 12. HMBC-Spektrum von Tabernaebovin (12) (CDCl₃)

H	10	11	12	13	14
2	3.44 (<i>d</i> , 5.2)	3.37 (<i>d</i> , 5.2)	3.34 (br. <i>d</i> , 5.2)	3.34 (<i>dd</i> , 10.7/5.2)	3.34 (<i>dd</i> , 10.7/5.2)
3	2.38 (<i>d</i> , 13.1)	α: 2.34 (<i>d</i> , 12.6)	α: 2.30	α: 2.36 (<i>d</i> , 12.8)	α: 2.35 (<i>d</i> , 12.8)
	3.58 (<i>d</i> , 11.9)	β: 3.56 (<i>dd</i> , 12.9/1.6)	β: 3.53 (br. <i>d</i> , 12.8)	β: 3.54 (<i>dd</i> , 11.9/1.0)	β: 3.55 (<i>d</i> , 13.1)
5	2.21; 3.20	α: 2.18	α: 2.07	α: 2.22	α: 2.22
		β: 3.18 (<i>td</i> , 6.6/2.2)	β: 3.15 (<i>t</i> , 7.6)	β: 3.19 (<i>td</i> , 7.9/2.4)	β: 3.20 (<i>td</i> , 7.9/1.5)
6	1.65; 2.36	α: 1.62; β: 2.29	α: 1.50; β: 2.23	α: 1.62; β: 2.27	α: 1.62; β: 2.28
9	6.97 (<i>d</i> , 1.1)	6.86 (s)		6.86 (<i>d</i> , 1.2)	6.84 (s)
11	7.02 (<i>dd</i> , 7.6/1.4)	6.84 (<i>dd</i> , 8.5/1.6)	6.93 (br. [*])	6.81 (<i>dd</i> , 7.6/1.4)	6.77 (<i>d</i> , 7.9)
12	6.44 (<i>d</i> , 7.9)	6.30 (<i>d</i> , 8.2)	6.24 (br. <i>d</i> , 7.0)	6.24 (<i>d</i> , 7.6)	6.23 (<i>d</i> , 7.6)
14	3.34 (<i>d</i> , 3.7)	3.33	3.30	3.30 (<i>d</i> , 3.7)	3.31 (<i>d</i> , 3.4)
15	2.95 (<i>d</i> , 3.7)	2.94 (<i>d</i> , 3.8)	2.88 (br. s)	2.84 (<i>d</i> , 4.0)	2.85 (<i>d</i> , 4.0)
16	1.30; 1.80	α: 1.11; β: 1.74	α: 1.10; β: 1.74	1.07; 1.72	1.08; 1.73
17	1.50	α: 1.42	α: 1.37	α: 1.34 (<i>dt</i> , 14.0/4.0)	α: 1.36 (<i>d</i> , 15.6)
	1.80	β: 1.78	β: 1.76	β: 1.76	β: 1.78 (<i>dd</i> , 14.0/2.0)
18	0.79 (<i>t</i> , 7.4)	0.76 (<i>t</i> , 7.4)	0.68 (<i>t</i> , 7.4)	0.53 (<i>t</i> , 7.5)	0.55 (<i>t</i> , 7.3)
19	1.00 (q, 7.4)	1.22	1.11	1.03	1.06
21	2.30(s)	2.24 (s)	2.05 (br. s^*)	2.21	2.20
N(1)Me	2.81 (s)	2.72 (s)	2.70 (s)	2.70 (s)	2.70 (s)
-CH ₂ -		3.79 (s)			
3'	4.52 (s)		α: 2.27 (<i>d</i> , 12.8)	3.74	3.91 (<i>t</i> , 9.0)
			β: 3.49 (<i>dd</i> , 13.0/1.5)		

Tabelle 5. ¹H-NMR-Daten von dimeren Alkaloide **10-14** (500 MHz, δ (ppm), J (Hz), CHCl₃)

*: nur zu erkennen im GHSQC-Spektrum

Tab. 5. (Fortsetzung)

	10	11	12	13	14
5'	2.60		α: 2.07	4.02 (td, 9.2/2.4)	
	2.90		β: 2.78 (<i>td</i> , 8.5/3.4)		
6'	1.55		α: 1.50	3.24 (<i>dd</i> , 14.6/7.9)	3.27 (<i>dd</i> , 15.0/8.6)
	2.02 (td, 11.3/6.4)		β: 1.59	3.45 (<i>dd</i> , 14.3/10.7)	3.50 (<i>t</i> , 10.4)
9'	5.66 (s)		6.90 (<i>d</i> , 6.7)	7.54 (<i>dd</i> , 5.5/2.4)	7.54 (<i>dd</i> , 6.6/2.1)
10'			6.54 (<i>td</i> , 7.3/0.7)	7.06	7.05
11'			7.09 (td, 7.6/1.2)	7.06	7.05
12'			6.27 (<i>d</i> , 7.9)	7.06	7.05
14'	3.42 (<i>d</i> , 3.7)		3.30		
15'	3.27 (<i>d</i> , 3.7)		2.98 (<i>d</i> , 3.9)	2.91 (<i>d</i> , 14.0)	2.98 (<i>d</i> , 13.7)
				3.74	3.62 (<i>d</i> , 13.4)
16'			1.83	4.48 (<i>dd</i> , 12.8/2.9)	4.48 (<i>d</i> , 11.9)
			2.83 (<i>dd</i> , 13.4/3.7)		
17'	2.56 (<i>d</i> , 15.3)		α: 1.43	α: 2.58	α: 2.60 (<i>d</i> , 15.0)
	2.73 (<i>d</i> , 15.3)		β: 2.08	β: 1.84	β: 1.87
				(<i>ddd</i> , 11.9/6.9/3.2)	(<i>ddd</i> , 12.8/4.7/2.4)
18'	0.75 (<i>t</i> , 7.4)		0.68 (<i>t</i> , 7.4)	1.66 (<i>dd</i> , 6.7/1.5)	1.65 (<i>d</i> , 5.8)
19'	1.00(q, 7.4)		1.07	5.34 (q, 6.7)	5.40 (<i>q</i> , 6.4)
21'	2.75 (s)		2.04 (s)	2.71 (<i>d</i> , 3.4)	3.47
22'					3.71 (<i>d</i> , 3.4)
N(1')-H	8.75 (s)			7.44 (s)	7.43 (s)
N(1')-Me			2.46 (s)		
N(4')-Me				2.59 (s)	2.57 (s)
10'-OH	5.22 (s)				
11'-OMe	3.85 (s)				
12'-OMe	3.88 (s)				
COO <u>Me</u>	3.79 (s)			2.45 (s)	2.39(s)
С	10	11	12	13	14
--------------------	--------------	--------------	--------------	-------------	--------------
C	72.5	72 /	72.2	72.2	72.2
2 3	73.3 53.0	73.4 53.2	73.3 53.1	53.1	73.2 53.1
5	53.0	53.2	53.6	53.6	53.6
5	41 1	40.9	41 1	40.6	40.6
7	51.4	51.3	51.2	51.3	51.3
8	136.8	137.0	136.4	137.2^{*}	137.3^{*}
9	123.0	122.1	120.7	121.1	121.2
10	122.5	131.2	132.2	134.8	134.8
11	128.2	127.7	126.9	126.8	126.9
12	106.0	106.5	105.9	106.4	106.4
13	149.9	148.4	148.8	149.1	149.2
14	52.9	53.0	53.1	53.1	53.1
15	57.3	57.4	57.6	57.7	57.6
16	19.9	19.8	20.1	20.0	20.0
17	23.9	23.9	24.3	24.5	24.3
18	7.5	7.6	7.5	7.2	7.3
19	28.1	27.8	27.9	27.8	27.8
20	34.7	34.6	34.5	34.6	34.6
21	67.4	67.2	66.7	66.3	66.5
N(1)-Me	31.6	31.8	31.5	31.7	31.7
-CH ₂ -		41.1			
2'	165.4		74.8	137.8	137.4*
3'	58.5		52.2	52.4	59.9
5'	47.8		53.6	59.7	51.9
6'	42.5		36.2	19.3	17.1
7'	54.6		56.8	110.4	110.4
8'	133.8		135.1	129.8	130.0
9'	103.9		123.0	117.5	117.6
10'	143.7		115.6	121.6	121.8
11'	138.6		128.1	118.8	118.9
12'	136.9		102.7	109.7	109.8
13'	128.5		152.4	136.0	136.2

Tabelle 6. ¹³C-NMR-Daten von dimeren Alkaloide **10-14** (75 MHz, δ (ppm), CHCl₃)

	10	11	12	13	14
14' 15' 16' 17' 18' 19' 20' 21' 22' N(1')-Me COO <u>Me'</u> <u>C</u> OOMe' 11'-OMe 12'-OMe	54.4 56.6 90.7 23.5 7.4 26.8 36.8 61.7 50.9 168.9 61.0 60.8		53.1 60.2 26.0 28.4 8.1 32.9 32.8 72.8 29.0	171.8 52.4 44.7 39.1 12.2 118.6 137.4 [*] 47.0 42.4 49.9	174.2 52.1 44.5 39.0 12.1 119.9 136.2 35.8 70.5 42.0 50.2

Tab. 6. (Fortsetzung)

*: Zuordnung austauschbar

Tabernaemontabovin (13)

Elution mit CHCl₃/MeOH 9:1 ergab eine Fraktion, die noch mal durch präp. DC mit Cyclohexan/Aceton/Diethylamin 8:2:0.6 gereinigt wurde, um das Alkaloid **13** zu isolieren (Schema 3) [R_f 0.49 (System 1, S. 78), $[\alpha]_D^{24.9}$ -74.2° (MeOH, c 0.50)].



Verbindung **13** zeigt IR-Absorptionen bei 3460 (NH), 2798 (NCH₃) und 1715 cm⁻¹ (Estercarbonyl) sowie UV-Absorptionmaxima bei 265 und 208 nm. Das EI-Massenspektrum enthält ein Molekülion bei m/z 646 ($C_{41}H_{50}N_4O_3$) und intensive Peaks bei m/z 181 (**q**) und 122 [**q**-COOMe] (Abb. 13). Außerdem zeigen die Fragmente bei m/z 309 und 335 eine Spaltung der Verbindung **13** in zwei monomere Alkaloidbruchstücke an, wobei das Fragment bei m/z 309 dem Mehranin-Teil (A) zuzuordnen ist.

Weiterhin ist der Mehranin-Teil aufgrund der gleichen NMR-spektroskopischen Verschiebungen identisch mit C-2 bis C-21 von **11** bzw. von **12** (Tab. 5, 6). Im ¹H-NMR-Spektrum erkennt man für den zweiten Teil ein NH-Signal bei 7.44 ppm, ein olefinisches Quartett bei 5.34 ppm (6.7 Hz), das mit dem Methylsignal bei 1.66 ppm koppelt (Ethyliden-Rest), zwei Protonenmultipletts bei 4.48 und 4.02 ppm sowie zwei zu tiefem Feld verschobene Methylsinguletts bei 2.45 und 2.59 ppm. Das ¹³C-NMR-Spektrum liefert neben den 20 zum ersten Teil zugeordneten Signalen noch 21 weitere Signale, davon sind 10 olefinische C-Atome und ein Carbonyl-C-Atom (171.8 ppm).

Die Interpretation der ¹H-¹H-COSY-Messung ergab für das zweite Monomer die wichtigen Kopplungen zwischen H-19'/ H₃-18', H₃-18'/H-15' β , H-16'/ H₂-17', H-5'/H₂-6', H-3'/H₂-17', H-3'/H-15' α , H-5'/H-21'. Die weitere Strukturaufklärung erfolgte durch die HMBC-Messung. Die Analyse des Spektrums liefert Korrelationen von C-14' mit H-21' und H-5', was darauf hindeutet, daß die Methylestergruppe an C-21' sitzt sowie die Korrelationen von H-21' mit C-20' und C-19', welche die Ethylidengruppe an C-20' lokalisieren. Die Stellung der *N*-Methylgruppe zwischen C-3' und C-5' ergibt sich aus Kopplungen dieser beiden C-Atome mit den Protonen der *N*-Methylgruppe. Außerdem wurde die 10,16'-Verknüpfung durch Kopplungen zwischen H-9/C-16' und H-11/C-16' ermittelt (Abb. 14).

Die Bestimmung der Stereochemie von 13 erfolgte durch Interpretation des NOESY-Spektrums mit Hilfe des Dreiding Modells [53]. Der NOE zwischen H_3 -18'/H-15' β (ca. 3.5 Å) beweist die E-Konfiguration der Doppelbindung vom Ethylidenteil. Weiterhin zeigen NOE's zwischen H-15'\u00b3/H-21' (ca. 3.7 \u00d3) die 1,3-cis-quasi-diaxiale Anordnung dieser Protonen, so daß die Methylestergruppe äquatorial orientiert ist, NOE's zwischen H-3'/H-6'a (ca. 0.9 Å) die cis-quasi-diaxiale Konfiguration dieser Protonen. Außerdem zeigt die Kopplungskonstante von 2.4-3.4 Hz zwischen H-21'(quasi-axial) und H-5', daß H-5' äquatorial orientiert ist. Ebenso läßt sich für H-16' aus der Kopplungskonstanten von 12.8 Hz die axiale Orientierung ableiten. Die diskutierten spektroskopischen Befunden führen zur Struktur 13 für das neue Alkaloid, das von uns als Tabernaemontabovin bezeichnet wird.



Abb. 13. Massenspektrometrische Fragmentierung von Tabernaemontabovin (13)



Abb. 14. Korrelationen im zweiten Teil von Tabernaemontabovin (**13**), die in den COSY- (rote Pfeile) und HMBC-Spektren (grüne Pfeile) beobachtet wurden

Tabernaemontavin (14)

Das Alkaloid **14** wurde ebenfalls aus dem Essigester-/*n*-Butanol-Extrakt, wie in Schema 3 angegeben, isoliert [R_f 0.40 (System 1, S. 78), [α]_D^{24.7}-56.8° (MeOH, c 0.50)]. Auch hier handelt es sich, wie nachstehend bewiesen, um ein neues Bisindolalkaloid, für das wir den Namen Tabernaemontavin vorschlagen.



14

Die hochaufgelöste Molekülmasse von **14** (676.4075) liefert die Summenformel $C_{42}H_{52}N_4O_4$. Das EI-Massenspektrum zeigt Fragmente vom Typ **q** (m/z 211) und (**q**-COOMe) (m/z 152) (Abb. 13). Die im Vergleich zu Verbindung **13** auftretende Massenverschiebung von 30 Masseneinheiten (CH₂O) bei Ion **q** sowie das Auftreten eines Ions vom Typ (**q**-CH₂OH) bei m/z 180 zeigen eine zusätzliche CH₂OH-Gruppe am Piperidinring des Alkaloidteils B an.

Im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum kann man analog wie bei **13** C-2 bis C-21 des ersten Molekülteils zuordnen. Außerdem sind beim zweiten Teil die Signale für Indolring, Ethyliden-, Methylester- und *N*-Methylgruppen vorhanden. Der Unterschied zwischen **14** und **13** liegt in einer zusätzlichen Methylengruppe ($\delta_{\rm H}$ 3.71, $\delta_{\rm C}$ 70.5), ihre Verschiebung weist auf einen benachbarten Sauerstoff hin. Die Struktur von **14** wurde analog wie bei **13** durch COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren aufgeklärt (Abb. 15), wobei die neue CH₂-OH-Gruppe an C-5' verknüpft wurde. Die 10,16'-Verknüpfung wurde durch Korrelationen zwischen C-16'/H-9 und C-16'/H-11 im HMBC-Experiment ermittelt. Weiterhin zeigen NOE's zwischen H₃-18'/H-21' und H-15' α /H-19' die Z-Stereochemie des Ethylidenteils, NOE's zwischen H-6' β /H-22' eine quasi-cis-diaxiale Anordnung der 22'- und 6'-Methylengruppen, so daß die obige dargestellte Konfiguration an C-3' gestützt wird. Die Stereochemie an C-16' wurde durch fast identische Verschiebungen und H,H-Kopplungskonstanten von C-16', C-17', H-16', H-17' α und H-17' β als identisch mit **13** ermittelt, was auch durch die ähnlichen CD-Spektren von **14** und **13** (Tab. 7) bestätigt wurde. Außerdem zeigt der NOE-Effekt zwischen CO₂Me-14' und H-2, daß die CO₂Me-Gruppe in der Nähe des aromatischen Ringsystems des anderen Molekülteils steht, wodurch man die Abschirmung der Methylestergruppe (2.39 ppm) erklären kann.



Abb. 15. Korrelationen im zweiten Teil von Tabernaemontavin (**14**), die in den COSY- (rote Pfeile) und HMBC-Spektren (grüne Pfeile) beobachtet wurden

Alkaloide	CD							
13	$\Delta \epsilon_{303}$ -16.1	$\Delta \epsilon_{296}$ +27.8	$\Delta \epsilon_{288}$ +15.6	$\Delta \varepsilon_{275}$ -28.9	$\Delta \epsilon_{261} + 17.8$	$\Delta \varepsilon_{239}$ -36.7	$\Delta \epsilon_{224}$ +39.8	
14	Δε ₃₀₄ -5.5	$\Delta \epsilon_{296}$ +10.6	$\Delta \epsilon_{289} + 6.8$	Δε ₂₇₅ -7.4	$\Delta \epsilon_{260}$ +14.6	$\Delta \epsilon_{239} - 6.6$	$\Delta \epsilon_{225}$ +10.4	

Tabelle 7. CD-Spektren der dimeren Alkaloide 13 und 14 (MeOH)

2.1.4 Zur Biosynthese der neuen Alkaloiden 2 und 3 sowie 11 und 12

Die neuen monomeren Alkaloide 3-Oxomehranin (2) und 14α , 15 β -Dihydroxy-N-methylaspidospermidin (3) sowie die zwei neuen dimeren Substanzen Methylenbismehranin (11) und Tabernaebovin (12)gehören zum Aspidosperma-Typ, dessen Biosynthese aus Tryptamin (Tryptophan) und Secologanin (Iridoidmonoterpen) erfolgt [14c]. Wir vermuten, daß 14,15-Dehydro-*N*-methylaspidospermidin, Quebrachamin das aus durch die Cyclisierung der C7-C21-Bindung aufgebaut wird, Vorstufe zur Biosynthese der neuen monomeren Alkaloide 2 und 3 (Abb. 16) sein könnte. Hierzu notwendige Biosyntheseschritte sind Hydroxylierung, Epoxydierung sowie Oxidation.

Die Biosynthese der dimeren Indolalkaloide wurde wegen ihrer komplizierten Struktur bisher nicht viel untersucht. Man konnte aber durch biomimetische Synthese einige dimere Alkaloide aus zwei monomeren Alkaloiden erhalten. Ein Beispiel ist die erfolgreiche biomimetische Synthese des Antitumor-Alkaloids Vinblastin durch Kopplung von Catharanthin-N-oxid und Vindolin [54]. Analog vermuten wir, daß die dimeren Indolalkaloide **11** und **12** aus zwei Molekülen (-)-Mehranin entstehen. Bei **11** erfolgt zuerst eine C-Methylierung an C-10 des Mehranins und nachfolgend eine Hydroxylierung dieser Methylgruppe. Wasserabspaltung von dieser Hydroxygruppe und einem an C-10 verknüpften Wasserstoff eines zweiten Moleküls führt zu dem dimeren Alkaloid **11**. Bei Verbindung **12** könnte zuerst eine Phenoloxydation an C-10 und dann eine Verknüpfung zwischen C-10 der Phenolradikale und C-2' eines zweiten Moleküls stattfinden (Abb. 16).

Eine experimentelle Bestätigung dieser Hypothese wie auch die der Biosynthesen der komplizierten dimeren Alkaloide 13 und 14 muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.



Abb. 16. Möglicher Biosyntheseweg der neuen Alkaloide 2, 3, 11 und 12

2.2 Untersuchungen der Inhaltstoffe von *Fissistigma bracteolatum* Chatterjee (Annonaceae)

2.2.1 Chemische Merkmale der Familie Annonaceae und der Gattung *Fissistigma*

Die Familie Annonaceae mit etwa 2000 Arten in annähernd 120 Gattungen ist verbreitet in tropischen und subtropischen Ländern. Viele Arten von dieser Familie haben eßbare Früchte und werden als Heilpflanze verwendet [55]. Phytochemisch sind die Alkaloide der Benzylisochinolin-Reihe in erste Linie das chemisches Merkmale der Familie, obwohl sie in einzelnen Arten nicht gefunden wurden. Charakteristisch ist das Lanostantriterpen Polycarpol, das ebenso wie die Acetogenine nur in dieser Familie vorkommt [56, 57]. Weiterhin dürften das Amyloid, die Reservezellulose des Annonaceenendosperms, Flavonoide sowie etherische Öle ebenfalls familientypisch sein [57].

Fissistigma ist eine große Gattung mit ca. 70 Arten [55]. In Südostasien werden viele Arten von dieser Gattung gegen Bauchschmerzen, Fieber und zur Behandlung von Knochenbrüchen verwendet [16b]. Phytochemisch wurde diese Gattung nicht viel untersucht. Seit 1969 bis jetzt sind nur 22 Publikationen über die Arten *Fissistigma* erschienen. Davon wurden zwei Arten *F. glaucescens* und *F. oldhamii* intensiv in China und Taiwan erforscht [58, 59]. Man hat verschiedene Alkaloidtyps in der Gattung gefunden, wobei die Aporphin-Protoberberin- und Phenanthren-Alkaloide oft vorkommen [60, 61]. Außerdem sind Flavonoide auch vorhanden [62, 63].

2.2.2 Beschreibung der Pflanzen, ihre bisherige Untersuchung und volksmedizinische Anwendung

F. bracteolatum (Abb. 17) ist eine behaarte Kletterpflanze, die in Wäldern Vietnams und anderen südostasiatischen Ländern wächst. Die braunen, ovalen und auf der Rückseite behaarten Blätter sind etwa 25 cm lang und enthalten 32 zu einem Gitter verbundene Blattäderchen-Paare [64].

Phytochemische Untersuchungen an dieser Pflanze liegen noch nicht vor.

In China wurde die Pflanze zur Blutstillung von Wunden oder Behandlung von Knochenbrüchen verwendet. In Vietnam wurde sie mit anderen Zutaten gegen Blutvergiftung benutzt und sie ist gut für den Blutkreislauf [13].



a. Schematische Darstellung von Blatt, Blüten und Samen



b. Photografische Darstellung der Blätter

Abb. 17. Fissistigma bracteolatum Chatt. (Annonaceae)

2.2.3 Eigene Untersuchung über Fissistigma bracteolatum

2.2.3.1 Trennung und Isolierung der Verbindungen

Blätter und Stengel von *F. bracteolatum* wurden mit 95 % igem Methanol extrahiert. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt und die zurückbleibende wäßrige Lösung wurde nacheinander mit *n*-Hexan, Essigester und *n*-Butanol extrahiert. Das Rückstand von *n*-Hexan-, Essigester- und *n*-Butanol-Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel-Alufolien [a] voruntersucht. Die Spektren der *n*-Hexan- und Essigester-Extrakte zeigten interessante Flecken, so daß die beide Extrakte weiter an Kieselgel säulenchromatographiert wurden. Die Feintrennung wird im Schema 4 gezeigt.

2.2.3.2 Einfache Chalcone

2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcon (15)

Verbindung **15** wurde aus Fraktion 10 umkristallisiert (Schema 4). Die Hauptkomponente des *n*-Hexan-Extrakts besitzt den R_{f} -Wert von 0.28 (System 2, S. 78) und zeigt keine optische Aktivität.

Das UV-Spektrum von **15** weist Absorptionsmaxima bei 365 und 254 nm auf, die typisch für ein Chalcongerüst sind [65]. Im EI-Massenspektrum erscheinen neben dem Molpeak bei m/z 314 zwei Fragmente bei m/z 77 und 105 (Benzoylkation), die durch α -Spaltung an der Ketogruppe entstehen und auf einen unsubstituierten Ring A hinweisen [66a]. Weiterhin zeigen die Fragmente bei m/z 237 und 283 ([M-OCH₃]⁺) drei Methoxygruppen und eine Hydroxyfunktion am Ring B (Abb. 18).



Abb. 18. Massenspektrometrische Fragmentierung von 2-Hydroxy-3,4,6trimethoxychalcon (**15**)



Schema 4. Feintrennung der Verbindungen aus den n-Hexan- und Essigester-Extrakte

Im ¹H-NMR-Spektrum findet man Signale für fünf aromatische Protonen bei 8.03 ppm (2H) und 7.45 ppm (3H), die auf den Ring A entfallen. Die Signale von H- α (δ 7.99) und H- β (δ 8.23) koppeln miteinander mit einer für trans-ständige olefinische Protonen charakteristischen Kopplungskonstanten von 15.9 Hz. Außerdem erkennt man noch zwei Singuletts bei 6.62 und 6.08 ppm sowie drei Methoxysignale bei 3.87, 3.89 und 3.92 ppm, die zum Ring B gehören. Das ¹³C-NMR-Spektrum stützt das Vorliegen eines Chalconderivats mit Signalen bei 191.9 ppm (C=O), 122.5 ppm (C- α), 135.8 ppm (C- β) und drei Methoxygruppen bei 55.8, 55.9 und 61.2 ppm [67] (Tab. 8). Die chemische Verschiebung der OMe-Gruppe bei 61.2 ppm weist darauf hin, daß diese OMe-Gruppe von zwei Sauerstoff-Substituenten flankiert wird [68].

Beim Vergleichen der spektroskopischen Daten von **15** mit publizierten Werten für 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcon erwiesen sich die beiden Verbindungen als identisch. Sie wurde zum ersten Male in der Rinde von *Uvaria dependens* gefunden [69]. 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcon gehört zu den sogenannten *"Retro*-Chalconen" [70a], bei denen die Biosynthese der beiden aromatischen Ring umgekehrt zur *normalen* Flavonoid-Biosynthese erfolgt [71, 72]. Dadurch ergibt sich ein ungewöhnliches Oxygenierungsmuster.

2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcen (16)

Verbindung **16** wurde aus dem EtOAc-Extrakt isoliert. Rechromatographie an Kieselgel mit *n*-Hexan/Aceton 8:2, dann an RP8 mit Acetonitril/H₂O 6:4 als Laufmittel liefert Verbindung **16**, deren Struktur, wie nachstehend bewiesen, als 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcen aufgeklärt wurde (Schema 4). Verbindung **16** zeigt einen R_{f} -Wert von 0.48 (System 2, S. 78) und besitzt keine optische Aktivität.

Die hochaufgelöste Molmasse bei m/z 300.1380 liefert die Summenformel $C_{18}H_{20}O_4$. Im EI-Massenspektrum erkennt man durch das Fragment bei m/z 91 im ¹H-NMR-Spektrum Benzylteil, der wieder einen auch durch charakteristische Signale bestätigt wurde (bei 7.15-7.26 ppm, 5H). Außerdem erscheinen im olefinischen Bereich noch zwei Signale bei 6.25 ppm (1H) und 6.71 ppm (2H) sowie ein OH-Signal bei 7.94 ppm, dessen Verschiebung keine Wasserstoffbrücken-Bindung zeigt. Im aliphatischen Bereich findet man drei Methoxysignale bei 3.70, 3.79 und 3.84 ppm und ein CH₂-Signal bei 3.51 ppm. Das ¹³C-NMR-Spektrum liefert die Signale für 18 C-Atome, 14 davon olefinisch, aber keine Ketogruppe. Die gefundenen Daten weisen darauf hin, daß bei 16 eine CH₂-Gruppe anstelle der Ketogruppe an C- β ' steht. Diese Vermutung wurde durch HMBC-Korrelationen (Abb. 19) zwischen den CH₂-Protonen (3.51 ppm) und C-1' (142.3 ppm) sowie C-2'/C-6' (129.3 ppm) im Ring A gestützt. Außerdem korrelieren diese CH₂-Protonen mit den Signalen bei 131.1 und 122.7 ppm, wobei das Signal bei 122.7 ppm wegen seiner Kopplung mit dem H-5-Proton bei 6.25 ppm im Ring B an C-β zugeordnet wurde, so daß das Signal bei 131.1 ppm dem C-α entspricht. Im Ring B beweist die Kopplung zwischen dem OH-Proton und C-1 die Stellung der OH-Gruppe an C-2 und die Kopplung zwischen H- β und dem Signal bei 155.2 ppm dessen Zuordnung zu C-6, das wegen seiner Korrelation zu 3.79 ppm die Methoxygruppe trägt. Das Signal bei 131.3 ppm korreliert mit dem OH-Proton und wurde deswegen zu C-3 zugeordnet. Das Proton bei 6.25 ppm, das mit allen C-Atomen im Ring B außer C-2 stark koppelt, muß an C-5 angeordnet sein, so daß das verbleibende Signal bei 152.4 ppm sowie die Methoxygruppe bei 3.84 ppm zu C-4 gehören. Im NOESY-Spektrum zeigt H-5 Korrelationen zu den beiden OMe-Signalen bei 3.84 ppm (4-OMe) und 3.79 ppm (6-OMe). Die Unterscheidung der dicht benachbarten Signalen von C- α (δ 131.1) und C-3 (δ 131.3) konnte anhand des APT-Spektrums getroffen werden, aus dem hervorging, daß das Signal bei 131.1 ppm zu einem CH-Signal, das bei 131.3 ppm zu einem quartären C-Atom gehört. Das Signal bei 7.15 ppm (bzw. 126.6) entspricht C-4'. Die vier Protonensignale von H-2'/H-6' und H-3'/H-5' sind stark überlagert; wegen der HMBC-Korrelation von H₂- β ' zum ¹³C-Signal bei 129.3 ppm kann dieses jedoch C-2'/C-6' zugeordnet werden, das Signal bei 129.1 ppm gehört daher zu C-3'/C-5'.

Damit wurde die Strukturermittlung von **16** abgeschlossen, wobei es sich um ein neues Chalcen aus der *Retro*-Gruppe handelt.





Abb. 19. HMBC-Spektrum von 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcen (16) (Aceton- d_6)

Position	15 ^a			16 ^b		17 ^b		
	H, J (Hz)	С	H, J (Hz)	С	H, J (Hz)	С		
1		105.2		107.4		100 5		
1		105.2		107.4		109.5		
2		150.6		149.8		149.5		
3		129.7		131.3		131.6		
4		154.0		152.4		152.2		
5	6.08(s)	88.2	6.25 (<i>s</i>)	89.5	6.25(s)	89.6		
6		156.9		155.2		154.9		
β	8.23 (<i>d</i> , 15.9)	135.8	6.71 (<i>m</i>)	122.7	2.96 (<i>m</i>)	19.4		
α	7.99 (<i>d</i> , 15.9)	122.5	6.71 (<i>m</i>)	131.1	3.14 (<i>m</i>)	39.1		
β'		191.9	3.51 (<i>m</i>)	41.7		200.7		
1'		139.1		142.3		137.9		
2'/6'	8.03 (<i>m</i>)	128.5	7.26 (<i>m</i>)	129.3	8.04 (<i>d</i> , 7.4)	128.9		
3'/5'	7.45 (<i>m</i>)	128.4	7.26 (<i>m</i>)	129.1	7.51 (<i>t</i> , 7.4)	129.4		
4'	7.45 (<i>m</i>)	132.1	7.15 (<i>m</i>)	126.6	7.61 (<i>tt</i> , 7.4/1.3)	133.6		
2-OH	6.62 (s)		7.94 (s)		7.85 (s)			
3-OCH ₃	3.87(s)	61.2	3.70(s)	60.9	3.72(s)	60.9		
$4-OCH_3$	3.92(s)	55.8	3.84(s)	56.1	3.85(s)	56.2		
6-OCH ₃	3.89(s)	55.9	3.79(s)	56.1	3.78(s)	56.1		

Tabelle 8. ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten der Chalcone **15-17** (300/75 MHz, δ (ppm), ^a CDCl₃, ^b (CD₃)₂CO)

2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxydihydrochalcon (17)

Verbindung **17** wurde an RP8 mit MeOH/ H_2O 8:2 als Laufmittel chromatographisch gereinigt (Schema 4). Sie besitzt einen R_f -Wert von 0.35 (System 2, S. 78) und keine optische Aktivität.

Die hochaufgelöste Molekülmasse 316.1306 liefert die Summenformel $C_{18}H_{20}O_5$. Im Massenspektrum findet man zwei Fragmente bei m/z 77 und 105, die typisch für einen unsubstituierten Ring A sind (Abb. 20). Außerdem zeigen die Fragmente bei m/z 197 und 184 einen Ring B mit drei Methoxygruppen und einer Hydroxyfunktion an.

Im Vergleich zu **15** können im ¹H-NMR-Spektrum von **17** fünf aromatische Protonensignale bei 7.51-8.04 ppm, die ein AA'BB'C-System bilden, zum Ring A sowie ein Singulett bei 6.25 ppm und drei Methoxysignale bei 3.72, 3.78 und 3.85 ppm zum Ring B zugeordnet werden. Der Unterschied zwischen beiden Verbindungen liegt im Propanteil. Bei **17** sind die Protonensignale für H- α und H- β im tiefen Feld nicht vorhanden. Dagegen befinden sich im aliphatischen Bereich zwei Methylensignale bei 3.14 und 2.96 ppm, die miteinander koppeln und gut zu H₂- α und H₂- β im Dihydrochalcongerüst passen [73]. Übereinstimmend damit zeigt das ¹³C-NMR-Spektrum ein Ketosignal bei 200.7 ppm, zwölf zu Ring A und B gehörende aromatische Signale und fünf aliphatische Signale (Tab. 8). Die zwei CH₂-Signale bei 39.1 und 19.4 ppm können den α - und β -C-Atomen im Dihydrochalcon zugeordnet werden [72].

Die Struktur von **17** wurde durch 2D-NMR-Messungen bestätigt. Im HMBC-Spektrum findet man die Korrelationen zwischen H₂- α /C=O, H₂- α /C- β und H₂- α /C-1, sowie zwischen H₂- β /C=O, H₂- β /C- α , H₂- β /C-1, H₂- β /C-2 und H₂- β /C-6, was die Propan-1-on-Substruktur zeigt. Im Ring B sind HMBC-Korrelationen zwischen dem 2-OH-Proton und C-1, C-2 und C-3 sowie zwischen dem 5-H-Proton und allen C-Atomen im Ring außer C-2 vorhanden. Weiterhin korrelieren im NOESY-Spektrum die Signale für die H₂- α und H₂- β mit dem Signal bei 8.04 ppm (2 H), das so zu den Protonen 2' und 6' im Ring A zugeordnet werden kann, so daß das Signal bei 7.51 ppm (2 H) den Protonen H-3' und H-5' entspricht. Das Signal bei 7.61 ppm wurde wegen seinem NOE-Effekt zu den Protonen H-3' bzw. H-5' zum Proton H-4' zugeordnet. Diese Befunde führen zur Konstitution von **17**, wobei es sich um das neue 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxydihydrochalcon handelt, das wie **15** und **16** zur *Retro*-Gruppe gehört.

2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxydihydrochalcon (18)

Der Essigester-Extrakt wurde an Kieselgel chromatographiert. Elution mit n-Hexan/Aceton 8:2 ergibt die Fraktion 5, die weiter an RP8-Säulen mit

Acetonnitril/ H_2O 7:3 als Laufmittel getrennt wurde, um die reine Verbindung **18** zu gewinnen (Schema 4).

Nach der Umkristallisation aus Aceton bildet **18** nadelförmige Kristalle vom Schmp. 101-103 °C. Die Verbindung zeigt einem R_f -Wert von 0.38 (System 2, S. 78) und besitzt keine optische Aktivität. Die hochaufgelöste Molekülemasse 316.1313 liefert die Summenformel $C_{18}H_{20}O_5$.



	$[\mathbf{M}]^+$	a	b	c	d
17 $R_1 = OH, R_2 = OMe, R_3 = R_4 = H$	316	105	77	197	184*
18 $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = OMe$	316	211	184 [#]	91	77

 $(\mathbf{d}+\mathbf{H})^{+}, (\mathbf{b}+\mathbf{H})^{+}$

Abb. 20. Massenspektrometrische Fragmentierung von der Dihydrochalcone 17 und 18

Im ¹H-NMR erkennt man fünf aromatische Protonensignale, die charakteristisch für einen unsubstituierten Ring sind, drei Methoxysignale bei 3.68, 3.95 und 3.96 ppm sowie ein Singulett bei 6.29 ppm für den fünffachsubstituierten Ring. Zwei Methylentripletts bei 3.33 und 2.96 ppm mit einer gemeinsamen Kopplungskonstanten von 7.4 Hz können analog wie bei **17** den α - und β -Protonen zugeordnet werden. Außerdem zeigt die Verschiebung der OH-Gruppe bei 13.69 ppm eine Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen dieser OH-Gruppe und der benachbarten Ketogruppe [74], so daß die OH-Gruppe an C-2' von Ring A steht und somit Ring B der unsubstituierte Ring ist. Diese Vermutung wurde durch Fragmente bei m/z 211 und 184 (Ring A mit drei Methoxygruppen und einer Hydroxyfunktion) und bei m/z 91 und 77 (unsubstituierter Ring B) im Massenspektrum (Abb. 20) sowie durch die HMBC-Korrelation von H₂- β mit C-2/C-6 gestützt. Die Positionen der drei Methoxygruppen im Ring A wurden durch NOE-Differenz-Experimente bestimmt (Abb. 21). Bei selektiver Anregung von OCH₃ bei 3.68 ppm nahm die

Intensität des OH-Signals bei 13.69 ppm zu. Das bedeutet, daß die OCH₃-Gruppe der OH-Gruppe benachbart und demzufolge an C-3' gebunden ist. Die Anregung des Signals bei 6.29 ppm ergab einen NOE-Effekt zu den beiden OCH₃-Signalen bei 3.96 und 3.95 ppm, so daß dieses Proton zwischen diesen beiden Methoxygruppen steht. Dies ist nur möglich, wenn sich das Proton in Position 5' und die beiden Methoxygruppen in Position 4' und 6' befinden. Damit ist das Substitutionsmuster von Ring A ermittelt. Die Zuordnung der ¹H- und ¹³C-Signale im Ring B sowie im Propan-1-on-Teil (Tab. 9) erfolgte einerseits durch Vergleichen mit publizierten Daten [75], andererseits mit Hilfe der HSQC- und HMBC-Spektren.

Verbindung **18** mit der Struktur 2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxydihydrochalcon ist bisher noch nicht bekannt, obwohl viele ähnliche Struktur schon gefunden wurden. Das Substitutionsmuster ist umgekehrt zu dem von **15**, **16** und **17**, und zeigt deshalb ein normales Dihydrochalcon an.

<u>2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy-β'-methoxychalcan (19)</u>

Verbindung **19** wurde aus dem *n*-Hexan-Extrakt mit *n*-Hexan/EtOAc 8:2 chromatographiert und danach durch präparative Dünschichtchromatographie gereinigt (Schema 4). Die ölige Verbindung **19** mit dem R_{f} -Wert von 0.46 (System 2, S. 78) hat einen Drehwert von -2.1° (MeOH, c 0.38).

Das UV-Spektrum zeigt zwei Maxima bei 277 und 223 nm. Die hochaufgelöste Molekülmasse 332.1639 liefert die Summenformel $C_{19}H_{24}O_{5}$. Im Massenspektrum findet man analog zu 18 ein Fragment für den unsubstituierten Ring B bei m/z 91, wobei das Fragment **a** um 16 Masseneinheiten verschoben ist (m/z 227). Aus dem Fragment bei m/z 300 ([M-MeOH]⁺) und dem daraus gebildeten Ion bei m/z 196 ([M-MeOH-C₈H₈]⁺] kann man einen Methoxysubstituenten an C- β ' vermuten (Abb. 23). Im Vergleich zu **18** sind die NMR-spektroskopischen Daten sehr ähnlich; zusätzlich gibt es ein CH₃-Signal $(\delta_{\rm H} 3.31, \delta_{\rm C} 57.2)$, dessen Verschiebungen die Anwesenheit einer Methoxygruppe zeigt, und ein CH-Multiplett ($\delta_{\rm H}$ 4.79, $\delta_{\rm C}$ 78.5). Außerdem fehlt im ¹³C-NMR ein Signal für eine Ketogruppe, so daß C- β ' vermutlich eine Methoxysubstitution aufweist.

Die Struktur von **19** wurde weiterhin durch 2D-NMR-Spektren bewiesen. Die Konstitutionen der Ringe A und B wurden durch die Korrelationen in den HSQC-, HMBC- (Abb. 23) und NOESY-Experimenten als identisch mit denen von **18** ermittelt. Die OCH₃-Verknüpfung an C- β ' wurde durch Korrelationen zwischen β '-OC<u>H</u>₃ (3.31 ppm)/C- β ' (78.5 ppm), H- β ' (4.79 ppm)/C-1' (107.5 ppm), H- β '/C-2' (151.2 ppm) und H- β '/C-6' (154.6 ppm) bestimmt.

Damit wurde die neue Struktur von **19** als 2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy- β '-methoxychalcan aufgeklärt.



Abb. 21. NOE-Differenz von 2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxydihydrochalcon (18) (Aceton-d₆)



Abb. 22. HMBC-Spektrum von 2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy-β'methoxychalcan (**19**) (Aceton-d₆)

2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy-β'-ethoxychalcan (20)

Weitere Elution mit *n*-Hexan/EtOAc 8:2 ergibt Verbindung **20**, die nachher durch präp. Dünnsichtchromatographie gereinigt wurde (Schema 4). Verbindung 20 besitzt einen R_f von 0.45 (System 2, S. 78) und einen Drehwert von -1.6° (MeOH, c 1.00).



	$[\mathbf{M}]^+$	$[M-ROH]^+$	$[\mathbf{M}-\mathbf{ROH}-\mathbf{C}_{8}\mathbf{H}_{8}]^{+}$	a	c
19 R= Me	332	300	196	227	91
20 R= Et	346	300	196	241	91

Abb. 23. Massenspektrometrische Fragmentierung der Chalcane 19 und 20

Verbindung **20** zeigt ein ähnliches UV-Spektrum wie **19** mit zwei Maxima bei 276 und 222 nm, was auf einen gleichen Strukturtyp hinweist. Ebenfalls erkennt man im EI-Massenspektrum Fragmente, die typisch für ein Chalcangerüst mit unsubstituiertem Ring B sind. Das den Ring A enthaltende Fragment **a** ist im Vergleich zu **19** um 14 Masseneinheiten verschoben (m/z 241). Da das Ion vom Typ [M-ROH-C₈H₈]⁺ bei m/z 196 keine Verschiebung zeigt (Abb. 23), kann man auf eine Ethylgruppe am C- β ' schließen.

Im ¹³C-NMR-Spektrum sind die Signale für Ring A und B sowie H₂- α und H₂- β sehr ähnlich mit denen von **19**. Lediglich für β ' wird eine merkliche Abweichung ($\Delta\delta_C \beta'$ = -1.6) gefunden, was eine Substitution dieses C-Atoms beweist. Im ¹H-NMR-Spektrum findet man statt des Signals der OMe-Gruppe an β ' (Verbindung **19**) ein Methyltriplett bei 1.19 ppm und ein Methylenmultiplett bei 3.49 ppm mit einer gemeinsamen Kopplungskonstante von 7.0 Hz. Daraus ergibt sich als Substituent an C- β ' eine Ethoxygruppe.

Damit wurde die neue Verbindung **20** als 2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy- β '- ethoxychalcan aufgeklärt.

Position	18		19		20	
	H, J (Hz)	С	H, J (Hz)	С	H, J (Hz)	С
1 2/6	7.28 (<i>m</i>)	142.7 129.3 [*]	7.20 (<i>d</i> , 7.8)	142.9 129.2	7.20 (<i>d</i> , 7.8)	142.9 129.2
3/5	7.28(m)	129.2	(<i>dd</i> , 7.8/7.2)	129.1	(<i>dd</i> , 7.8/7.2)	129.1
а В	2.96	31.3	(t, 7.2) 2.77 (m)	32.7	(t, 7.2) 2.79 (m)	32.6
α	(<i>t</i> , 7.4) 3.33	46.7	2.62 (m) 2.18 (m)	37.4	2.63 (<i>m</i>) 2.15 (<i>m</i>)	37.6
β'	(<i>t</i> , 7.4)	206.1	2.00 (m) 4.79 (dd 8 3/5 4)	78.5	2.02 (m) 4.88 (dd 85/49)	76.9
1' 2' 3' 4'		106.6 159.6 131.6 159.9	(uu, 0.5/5.7)	107.5 151.2 132.2 153.9	(uu, 0.5/4.7)	108.1 151.4 132.4 153.9
5' 6' β'-OCH ₃	6.29 (<i>s</i>)	88.3 159.9	6.24 (s) 3.31 (s)	89.7 154.6 57.2	6.23 (<i>s</i>)	89.6 154.2
β '-O <u>CH</u> ₂ CH ₃ β '-OCH ₂ <u>CH</u> ₃					3.49 (<i>m</i>) 1.19 (<i>t</i> , 7.0)	65.6 15.4
2'-OH 3'-OCH ₃ 4'-OCH ₃ 6'-OCH ₃	13.69 (s) 3.68 (s) 3.95 (s) 3.96 (s)	60.3 56.4 56.4	8.29 (s) 3.69 (s) 3.83 (s) 3.75 (s)	60.6 56.2 56.2	8.52 (s) 3.69 (s) 3.82 (s) 3.74 (s)	$60.5 \\ 56.3^* \\ 56.2^*$

Tabelle 9. ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten von Verbindungen **18-20** (300/75 MHz, δ (ppm), (CD₃)₂CO)

*: Zuordnung austauschbar

2.2.3.3 Flavene

5,7,8-Trimethoxyflav-3-en (21)

Verbindung **21** wurde aus dem *n*-Hexan-Extrakt isoliert (Schema 4). Die Substanz mit dem R_f -Wert von 0.54 (System 2, S. 78) besitzt keine optische Aktivität.

Das Massenspektrum zeigt einen Molekülion (Basispeak) bei m/z 298 sowie Fragmente bei m/z 297 (Flavyliumion) und 221, was auf eine Flavenstruktur mit drei Methoxysubstituenten im Ring A hinweisen kann [66b] (Abb. 24).



Abb. 24. Massenspektrometrische Fragmentierung von 5,7,8-Trimethoxyflav-3-en (**21**)

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt Signale für einen unsubstituierten Ring B (bei 7.30-7.46 ppm, 5H), ein Singulett bei 6.24 ppm und drei Methoxygruppen bei 3.53 ppm (3H) und 3.79 ppm (6H). Außerdem findet man noch drei Signale bei 5.74 (*dd*, 9.9/3.8 Hz), 5.85 (*dd*, 3.8/1.4 Hz) und 6.78 ppm (*dd*, 9.9/1.6 Hz), die ein AMX-System bilden. Im ¹³C-NMR-Spektrum können die 14 olefinischen

und 4 aliphatischen Signale eindeutig zugeordnet werden. Das Signal bei 76.9 ppm, das einer CH-Gruppe entspricht, stimmt gut mit dem C-2-Atom im Flavan-System überein [76], so daß die Doppelbindung an C-3 vorliegt.

Bei Vergleichen der NMR-Daten von **21** mit publizierten Daten für 5,7,8-Trimethoxyflav-3-en [69] erwiesen sich die beiden Verbindungen als identisch. Verbindung **21** wurde bisher lediglich in der Rinde von *Uvaria dependens* gefunden.

2.2.3.4 Sesquiterpen-verknüpfte Flavene

In *F. bracteolatum* wurde weiterhin von uns ein neuartiger Verbindungstyp gefunden. Dazu gehören vier neue Flavene, die mit einem Sesquiterpen verknüpft sind, und die bisher aus der Natur noch nicht bekannt waren. Bisher sind nur aus *Lindera umbellata* (Lauraceae) einige Flavonoide bekannt, die mit einem Monoterpen über Ring A verknüpft sind [77, 78]. Die neuen Verbindungen aus unserer Pflanze zeigen Verknüpfung zwischen dem Sesquiterpenteil und C-4 von Ring C des Flavonoids. Nach ihrem Vorkommen möchten wir diese neuen Naturstoffe als Fissistigmatin A-D bezeichnen.

Die vier Verbindungen zeigen im UV-Licht eine starke Fluoreszenz, was auf ein konjugierte System hinweist. Es ist auffällig, daß alle Verbindungen identische EI-Massenspektren mit dem Basis-Peak bei m/z 297 aufweisen, der einem Flavylium-Fragment entspricht, das auch durch die typischen Signale in den NMR-Spektren bestätigt wird. Jedoch ergeben die ESI-Massenspektren unterschiedliche Molmassen, die aus den unterschiedlichen Sesquiterpenteilen resultieren.

Fissistigmatin A (22)

Wiederholte Flash-Chromatographie des *n*-Hexan-Extrakts an Kieselgel und RP8 ergibt Verbindung **22**, die mit CH₃OH/H₂O 9:1 eluiert wurde (Schema 4) [R_f 0.35 (System 2, S. 78), $[\alpha]_D^{28.0}$ -108° (MeOH, c 1.00), Schmp. 80-82 °C (Cyclohexan/Aceton)].

Das UV-Spektrum zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 272 und 228 nm, was auf ein aromatisches System hinweist. Das positive ESI-Massenspektrum liefert die $[M+Na]^+$ - und $[M+H]^+$ -Ionen bei m/z 541 und 519, woraus ein Molekulargewicht von 518 folgt. Die hochaufgelöste Molmasse ergibt für den $[M+Na]^+$ -Peak bei m/z 541 die Summenformel C₃₃H₄₂NaO₅. Im EI-Spektrum findet man keinen Molpeak. Der Peak höchster Masse, der gleichzeitig Basispeak ist, erscheint bei m/z 297.1123 (C₁₈H₁₇O₄), was einem stark konjugierten Flavylium-Ion entspricht [66b]. Die Massendifferenz von 221 (518-297) entspricht einer Sesquiterpenyleinheit (C₁₅H₂₅O), was durch Analyse der NMR-Spektren bestätigt wird. Das ¹H-NMR-Spektrum ist ziemlich kompliziert. Man erkennt sofort nur einen Benzylteil (7.36-7.78 ppm, 5H), drei Methoxygruppen (3.88 ppm, 6H) und 3.82 ppm, 3H) und drei Methylgruppen (1.76, 1.14 und 1.02 ppm). Das ¹³C-NMR-Spektrum liefert die Signale für 33 C-Atome, wobei 16 olefinisch sind. Die Verschiebung eines aromatischen CH-Atomes bei 93.3 ppm in Zusammenhang mit einem Methoxysignal bei 61.2 ppm ist charakteristisch für ein Flavonoid mit drei OMe-Substituenten an C-5, C-7 und C-8 des Ringes A [79]. Die Struktur des Flavonteils wurde durch Korrelationen zwischen H-3/H-4, H-2'/6'/H-3'/5' und H-3'/5'/H-4' im COSY-Spektrum sowie zwischen H-6/C-5, H-6/C-7, H-6/C-8, H-6/C-10, H-3/C-1', H-3/C-2, H-4/C-3, H-4/C-9, H-4/C-2 und H-4/C-5 im HMBC-Spektrum ermittelt, wobei das Substitutionsmuster im durch die NOE-Differenz-Messung gestützt Ring Α wird. Die Strukturaufklärung des Sesquiterpenteils erfolgt ebenfalls durch 2D-NMR-Interpretationen. Durch das H¹-H¹-COSY-Spektrum wurden die Spin-Systeme H-1''/H₂-2''/H₂-3'' und H-5''/H₂-6''/H-7''/H₂-8''/H₂-9'' beobachtet. Außerdem findet man im HMBC-Spektrum die wichtigen Korrelationen zwischen H₃-15"/C-3" und H₃-15"/C-5", zwischen H₂-12"/C-7" und H₂-12"/C-13", zwischen H₃-13"/C-7", H₃-13"/C-11" und H₃-13"/C-12", zwischen H₃-14"/C-1", H₃-14"/C-5", H₃-14"/C-9" und H₃-14"/C-10", aus denen im Zusammenhang mit den gefundenen Daten vom COSY-Spektrum die Konstitution des Sesquiterpenteils ermittelt wurde. vollständige Die Verknüpfung zwischen beiden Teilen an C-4 und C-1" wurde durch HMBC-Korrelationen zwischen H-4/C-1", H-4/C-2" und H-4/C-10" bestimmt

(Abb. 25).

Die Stereochemie an C-1'', C-4'', C-5'', C-7'' und C-10'' wurde durch NOESY-Messungen aufgeklärt. Me-14'' zeigt starke NOE-Korrelation mit H-2'' β , H-9'' β und H₃-15'' sowie mittlere mit H-6'' β und H-8'' β , die Methylgruppen 14'' und 15'' müssen daher axial-ständig auf einer Seite des Moleküls sein. Das NOESY-Korrelations-Signal zwischen H-5'' und H-7'' weist auf die 1,3-cis-diaxiale Orientierung dieser Protonen auf anderer Seite des Moleküls hin. Daraus folgt sowohl die trans-Verknüpfung der beiden Ringe als auch eine β -Orientierung des 1-Methyl-ethyliden-Substituenten an C-7''. Ein NOE-Kreuzpeak zwischen H-5'' α und der sich teilweise überlagernden Signalgruppe H-1''/H-2'' β (ax.)/H-8'' α (ep.) kann dann nur H-1'' α (ax.)/H-5'' α (ax.) zugeordnet werden. Der Flaven-Substituent befindet sich also in der äquatorialen 4 β -Position wegen der starken NOE's zwischen H-3/Me-14'', H-4/H-1'' α und H-4/H-9'' β (Abb. 26). Aus diesen spektroskopischen Befunden folgt die Struktur **22**, wobei die absolute Konfiguration noch offen blieb.

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der p-Brombenzoylester von 22 hergestellt und von dieser Verbindung eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Sie lieferte die Absolutkonfiguration einschließlich der R-Konfiguration an C-4. Die Sesquiterpen-Substruktur bildet mit der Flaven-Substruktur einen Winkel von ca. 90° (Abb. 27).

Damit wurde die Strukturaufklärung dieser als Fissistigmatin A bezeichneten Verbindung 22 abgeschlossen.







Abb. 25. HMBC-Spektrum von Fissistigmatin A (22) (Aceton-d₆)



Abb. 26. NOESY-Spektrum von Fissistigmatin A (22) (Aceton-d₆, x: Verunreinigung)



Abb. 27. Röntgenstrukturanalyse des p-Brombenzoyl-Derivats von Fissistigmatin A (**22**)

Fissistigmatin B (23)

Weitere Elution mit CH₃OH/H₂O 9:1 des *n*-Hexan-Extrakts an PR8 liefert Verbindung **23**, deren Strukturermittlung wie nachstehend beschrieben erfolgte (Schema 4) [R_f 0.32 (System 2, S. 78), $[\alpha]_D^{26.3}$ 8.1° (MeOH, c 0.76)].

Die EI- und ESI-Massenspektren von 23 sind identisch mit denen von 22. Das positive ESI-Spektrum zeigt den [M+Na]-Peak bei m/z 541, von dem analog wie bei 22 die Summenformel $C_{33}H_{42}O_5$ abgeleitet wurde.

Durch H-H-COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren wurde Identität der Konstitutionen von 22 und 23 bestätigt. Die relativen Konfigurationen an C-1", C-4", C-5", C-7" und C-10" sind identisch mit 22, was durch die gefundenen Korrelationen in NOESY- und NOE-Differenz-Spektren ermittelt werden konnte. Die NMR-Spektren der beiden Verbindungen 22 und 23 sind sehr ähnlich. Im ¹H-NMR-Spektrum ist nur das H-3-Signal zu tiefem Feld bei 6.05 ppm und das H-4-Signal zu hohem Feld bei 3.77 ppm verschoben. Abweichungen der ¹³C-chemischen Verschiebungen von ≥ 1 ppm treten lediglich für C-2, C-3, C-4, C-1", C-2", C-9" und C-14" auf, was auf eine Änderung der Konfiguration an C-4 hinweist. Damit im Einklang steht die größere Kopplungkonstante ³J _{H-4/H-1}, für 23 (5.4 Hz) im Vergleich zu 22 (1.2 Hz), da nur ein Diederwinkel H-4/C-4/C-1"/H-1" 150° beträgt. Der Diederwinkel H-4/C-4/C-1''/C-2'' liegt dagegen nur bei etwa 90°, was erklärt, weshalb für 23 im Gegensatz zu 22 keine HMBC-Korrelation zwischen H-4 und C-2" gefunden wird. Die Tieffeldverschiebung des C-3-Signals für 23 gegenüber 22 ($\Delta\delta$ 4.8) läßt sich damit erklären, daß es bei 22 durch die enge räumliche Nachbarschaft von Me-14" und H-3 zu einer dem γ-gauche-Effekt analogen Hochfeldverschiebung des C-3-Signals kommt. Bei 23 besteht keine Nachbarschaft H-3/Me-14''; enge es tritt daher für 23 keine C-3-Hochfeldverschiebung auf. Auch die NOE-Korrelationen zwischen den beiden Moleküteilen, die für 23 gefunden wurden, stehen in Übereinstimmung mit einer S-Konfiguration an C-4: Es tritt ein starker NOE zwischen H-3 und H-9" β einerseits und H-4 und Me-14" andererseits auf (Abb. 28), während im Falle der C-4-(R)-konfigurierten Verbindung 22 ein starker NOE für H-3/ Me-14" und H-4/H-9" β gefunden wurde. Da 23 auch ein spiegelbildliches CD-Spektrum im Vergleich zu 22 aufweist (Abb. 29), ist C-4 im Fall von 23 S-konfiguriert.

Damit wurde die Struktur von Verbindung 23 als 4S-Diastereomer von 22 ermittelt. Sie wurde als Fissistigmatin B bezeichnet.

Fissistigmatin C (24)

Wiederholte Chromatographie des Rückstandes von dem *n*-Hexan-Extrakt an Kieselgel und dann an RP8 ergibt bei Elution mit CH₃OH/H₂O 8.5:1.5 die

Verbindung **24**, die anschließend aus *n*-Hexan/Aceton umkristallisiert wurde (Schema 4) [R_f 0.34 (System 2, S. 78), [α]_D^{22.7}-162.2° (MeOH, c 0.05), Schmp. 75-77 °C (*n*-Hexan/Aceton)].

Durch das ESI-Spektrum ($[M+Na]^+$ bei m/z 523) und Interpretation des ¹³C-NMR-Spektrums erhält man ein Molekulargewicht von 500 sowie die Summenformel $C_{33}H_{40}O_4$. Das EI-Massenspektrum von **24** mit dem Basispeak bei m/z 297 ist identisch mit dem von 22, was auf einen identisch Flaventeil hinweist. Die massenspektroskopischen Befunde wurden weiter durch die ähnlichen NMR-Daten vom Flaventeil im Vergleich zu 22 gestützt. Im ¹H-NMR-Spektrum erkennt man für den Sesquiterpenteil noch die Anwesenheit 7"-(1-Methyl)-Ethylidensowie einer 14"-Methylgruppe. einer Die Methylgruppe an C-15" ist nicht vorhanden. Dagegen werden zwei zusätzliche olefinischen Singuletts bei 4.64 und 4.43 ppm beobachtet. Im Zusammenhang mit dem um 18 Einheiten geringeren Molgewicht als bei 22 können wir vermuten, daß in 24 ein H₂O-Einheit fehlt, so daß statt der OH- und Methylgruppen an C-4" eine Doppelbindung zwischen C-4" und C-15" vorliegt. Im Einklang damit zeigt das ¹³C-NMR-Spektrum 2 olefinische C-Atome mehr als bei 22 und kein Signal bei ca. 70 ppm. Durch H-H-COSY-, HSQC- und besonders durch das HMBC-Spektrum mit Korrelationen von H₂-15" (4.64 und 4.43 ppm) mit C-3" (37.3 ppm), C-4" (151.4 ppm) und C-5" (51.7 ppm) (Abb. 30) wurde diese Struktur bestätigt.

Die relative Konfiguration wurde analog wie bei **22** durch NOESY-Messungen untersucht. Hier findet man wieder NOE's zwischen H-1''/H-5'' und H-5''/H-7'', die die 1,3-cis-diaxiale Anordnung dieser Protonen zeigen. Me-14'' korreliert mit H-2'' β , H-9'' β und H₂-15'', so daß sie axial auf der anderen Seite des Moleküles steht. Wie für **22** wird auch für **24** eine kleine Kopplungskonstante ³J_{H-4/H-1''} (1.3Hz), eine ¹³C chemische Verschiebung für C-3 von ca. 102 ppm und ein starkes HMBC-Signal H-4/C-2'' gefunden. In Analogie zu **22** ist C-4 daher R-konfiguriert. Diese Annahme wird weiter durch die ähnlichen CD-Spektren von **22** und **24** (Tab. 10) und die gleichen NOE-Korrelationen zwischen dem Sesquiterpen- und dem Flaven-Teil (starke NOE's H-3/Me-14'', H-4/H-9'' β) für **22** und **24** gestützt.

Damit wurde die Strukturaufklärung von **24** abgeschlossen. Sie wurde als Fissistigmatin C bezeichnet.

Verbindung	CD							
22	$\Delta \epsilon_{204}$ -4.28	$\Delta \epsilon_{227}$ +5.96	$\Delta \epsilon_{240}$ +2.48	$\Delta \epsilon_{269}$ -7.01				
23	$\Delta \varepsilon_{202}$ +2.02	$\Delta \varepsilon_{227}$ -5.97	$\Delta \epsilon_{243}$ -1.99	$\Delta \varepsilon_{273} 3.22$				
24	$\Delta \epsilon_{202}$ -18.99	$\Delta \epsilon_{228}$ +6.83	$\Delta \epsilon_{242} + 2.32$	$\Delta \varepsilon_{269}$ -8.86				
25	$\Delta \epsilon_{207}$ -0.07	$\Delta \epsilon_{226} + 3.70$	$\Delta \epsilon_{244}$ -2.98	$\Delta \epsilon_{262} - 3.72$				

Tabelle 10. CD-Spektren der Fissistigmatin A-D (22-25) (MeOH)



Abb. 28. NOESY-Spektrum von Fissistigmatin B (23) (Aceton-d₆)



Abb. 29. CD-Spektren der Fissistigmatin A und B (22, 23) (MeOH)



Abb. 30. HMBC-Spektrum von Fissistigmatin C (24) (Aceton-d₆)

Fissistigmatin D (25)

Verbindung **25** wurde durch Chromatographie des Essigester-Extrakts an RP8 mit Acetonitril/H₂O 6:4 isoliert (Schema 4) [R_f 0.29 (System 2, S. 78), $[\alpha]_D^{23.3}$ -72.5° (MeOH, c 1.00)]. Die Massenfeinbestimmung des [M+Na]⁺-Ions bei m/z 541 im ESI-Spektrum von **25** lieferte die Summenformel C₃₃H₄₂NaO₅. Das EI-Spektrum sowie die NMR-Daten zeigen die gleiche Struktur des Flaventeils wie bei den anderen Substanzen in dieser Serie. Die beiden Dubletts bei 5.99 (H-3) und 3.69 (H-4) ppm mit gemeinsamer Kopplungskonstanten von 6.8 Hz weisen durch die Ähnlichkeit mit den obigen Daten auf die Verknüpfung mit dem Sesquiterpenteil an C-4 hin. Im ¹H-NMR-Spektrum findet man für den Sesquiterpenteil vier quartäre Methylgruppen bei 0.86, 1.00, 1.16 und 1.20 ppm. Außer den sieben zur Flaven-Substruktur gehörenden aromatischen Protonen sind keine olefinische Signale vorhanden. Dementsprechend zeigt das ¹³C-NMR-Spektrum 18 Flaven-C-Atomen und 15 aliphatische Signale für das Sesquiterpen. Das quartäre Signal bei 74.4 ppm weist analog wie bei **22** auf einen benachbarten Sauerstoff-Substituenten hin.

Die Struktur von **25** folgt insbesondere aus 2D-NMR-Experimenten. Im ¹H-¹H-COSY-Spektrum erkennt man 2 Spin-Systeme mit H₂-10''/H₂-9''/H-8''/H-1''/H-2'' sowie H₂-6''/H₂-5''/H-4''. Der COSY-Kreuzpeak zwischen H-8'' und H-1'' zeigt die Verknüpfung der beiden Ringe an diesen Positionen. Um die Struktur weiter ermitteln zu können, wurde das HMBC-Spektrum (Abb. 31) verwendet. Wichtige gefundene Korrelationen bestehen zwischen H₃-13'' und C-2''/C-4''/C-3''/C-14'', H₃-14'' und C-2''/C-4''/C-3''/C-13'', H₃-15 und C-8''/C-6''/C-7'' sowie H₃-12'' und C-4/C-10''/C-11''/C-1''. Die HMBC-Korrelation zwischen H-4 und C-10''/C-11''/C-12'' sowie H-1'' und C-4 bestätigen die Verknüpfung der beiden Molekülteile an C-4 und C-11''.

Die Ermittlung der Stereochemie erfolgt durch das NOESY-Spektrum. Die NOE's zwischen H₃-12''/H-2'', H-2''/H-4''/H₃-14'', H-8''/H₃-12'' zeigen ihre Anordnung auf einer Seite des Moleküls und die NOE's von H-1'' mit H₃-13'' und H₃-15'', deren Orientierung auf der anderen Seite des Moleküls. Die gefundene Struktur des Sesquiterpenteils entspricht dem Globulol, dessen ¹³C-Daten [80] im 7-gliedrigen Ring gut mit denen von **25** übereinstimmen, wodurch die oben ermittelte Stereochemie für den Sesquiterpenteil bestätigt wird. Die Konfiguration an C-4 wurde einerseits durch NOE's von H-1'' mit H-3 und H-4, von H₃-13'' mit H-2'/6' und H-3 sowie von H-4 mit H-10'' α , andererseits durch ähnliche CD-Daten wie von **22** und **24** (Tab. 10) als S bestimmt (**25** (Abb. 32) gehört bezüglich C-4 zur gleichen stereochemischen Reihe wie **22** und **24**, wegen des Methylsubstituenten an C-11'' ändert sich bei **25** jedoch formal die Bezeichnung der Konfiguration an C-4).

Damit wurde die Strukturaufklärung von **25** abgeschlossen. Sie wurde als Fissistigmatin D bezeichnet.



Abb. 31. HMBC-Spektrum von Fissistigmatin D (25) (Aceton-d₆)


Abb. 32. Darstellung des 3D-Modells von Fissistigmatin D (**25**) (zwei unterschiedliche Perspekiven, bei der unteren Darstellung sind der besseren Übersichtlichkeit halber die Protonen nicht mitgezeichnet)

	22		23		24		25	
		Н	С	Н	С	Н	С	Н
2 3 4 5 6 7 8 9 10 1' 2'/6' 3'/5' 4' 5-OMe 7-OMe	$150.3 \\ 101.9 \\ 30.1^* \\ 152.9^a \\ 93.3 \\ 152.8^a \\ 132.1 \\ 148.1 \\ 108.9 \\ 135.3 \\ 125.2 \\ 129.3 \\ 129.1 \\ 56.0 \\ 56.6 \\ 100000000000000000000000000000000000$	5.68 (<i>d</i> , 6.0) 4.09 (<i>dd</i> , 6.0/1.2)) 6.49 (<i>s</i>) 7.78 (<i>d</i> , 7.4) 7.42 (<i>t</i> , 7.4) 7.36 (<i>t</i> , 7.4) 3.88 (<i>s</i>) 3.88 (<i>s</i>)	149.1 106.7 32.2 153.6 92.8 152.8 132.7 148.2 108.6 135.4 125.2 129.3 129.0 55.8 56.6	6.05 (<i>d</i> , 6.4) 3.77 (<i>dd</i> , 6.4/ 5.4) 6.49 (<i>s</i>) 7.81 (<i>d</i> , 7.5) 7.43 (<i>t</i> , 7.5) 7.35 (<i>t</i> , 7.5) 3.86 (<i>s</i>) 3.89 (<i>s</i>)	150.4 101.7 30.5* 152.8 ^a 93.4 152.9 ^a 132.2 148.2 108.7 135.2 125.2 129.3 129.2 56.1 56.6	5.68 (<i>d</i> , 6.1) 4.16 (<i>dd</i> , 6.1/1.3) 6.51 (<i>s</i>) 7.76 (<i>d</i> , 7.4) 7.43 (<i>t</i> , 7.4) 7.35 (<i>t</i> , 7.4) 3.90 (<i>s</i>) 3.88 (<i>s</i>)	151.9 103.9 39.2 153.6 93.0 152.6 132.7 149.5 107.9 135.0 125.3 129.2 129.1 55.7 56.7	5.99 (<i>d</i> , 6.8) 3.69 (<i>d</i> , 6.8) 6.52 (<i>s</i>) 7.83 (<i>d</i> , 7.4) 7.44 (<i>t</i> , 7.4) 7.34 (<i>t</i> , 7.4) 3.84 (<i>s</i>) 3.89 (<i>s</i>)
8-OMe	61.2	3.82 (s)	61.3	3.82 (s)	61.2	3.82 (s)	61.3	3.82 (s)

Tabelle 11. ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten der Fissistigmatin A-D (22-25) (500/125 MHz, δ (ppm), J (Hz), (CD₃)₂CO)

Tab. 11. (Fortsetzung)

		22		23		24		25
1"	57.5	1.44	58.8	1.59	57.1	1.68	45.8	1.45
2''	22.4	α: 1.36; β: 1.56	25.2	α: 1.13; β: 1.46	25.8	α: 1.47; β: 1.64	31.4	0.59
3''	44.1	α:1.28; β: 1.66	44.8	α: 1.37; β: 1.66	37.3	α: 1.90; β: 2.24	20.4	
4''	71.3		71.2		151.4 ^a		27.2	0.58
5''	56.9	1.31	57.2	1.27	51.7	1.86 (br. <i>d</i> , 11.5)	21.0	α: 1.81; β: 1.10
6''	26.4	α: 2.01; β: 1.26	26.8	α: 1.96; β: 1.20	30.1*	α: 1.52; β: 1.49	45.6	α: 1.53; β: 1.73
7''	47.0	1.94	46.8	1.86	46.3	2.02	74.4	
8''	27.9	α: 1.67; β: 1.51	28.1	α: 1.53; β: 1.39	27.8	α: 1.71; β: 1.49	59.7	2.02
9''	42.6	α: 1.43; β: 2.22	43.6	α: 1.20; β: 1.94	39.4	α: 1.61; β: 2.29	25.6	α: 1.62; β: 1.78
10"	39.2		39.8		40.5		37.9	α: 0.97; β: 1.79
11"	151.6		151.6		151.5 ^a		53.6	
12"	108.6	Z: 4.75 (s)	108.4	Z: 4.69 (s)	108.8	Z: 4.77 (s)	17.6	0.86 (<i>s</i>)
		E: 4.69 (<i>s</i>)		E: 4.65 (<i>s</i>)		E: 4.71 (<i>s</i>)		
13"	21.2	1.76 (<i>dd</i> , 1.3/0.7)	21.1	1.72 (<i>t</i> , 1.1)	21.1	1.78 (s)	17.3	1.16 (<i>s</i>)
14''	17.7	1.14 (<i>s</i>)	16.0	1.08 (s)	15.0	0.94 (s)	29.3^{*}	1.00 (s)
15"	22.9	1.02 (s)	23.1	1.02 (s)	105.7	Z: 4.43 (s)	20.7	1.20 (s)
						E: 4.64(<i>s</i>)		

^a: Zuordnung austauschbar; ^{*}: erkennen im HSQC-Spektrum

2.2.4 Zur Biosynthese der neuen Chalcone und Sesquiterpenverknüpften Flavene

In *F. bracteolatum* sind Chalcone eine verbreitete Stoffklasse. Bei der Biosynthese der sogenannten "*normalen*" Chalcone wird Ring A aus Malonyl-CoA und Ring B aus Cinnamoyl-CoA mit Hilfe der Chalcon-Synthase (CHS) gebildet. Es ist bewiesen, daß die Chalcon-Synthase der Schlüssel zur Biosynthese des Flavonoidgerüsts ist. Sie katalysiert die Kopf-Schwanz-Kondensation der 3 Acetat-Einheiten aus Malonyl-CoA mit 4-Coumaroyl-CoA, um 2',4',6',4-Tetrahydroxychalcon aufzubauen, das die Vorstufe zur Biosynthese der verschiedenen Flavontypen bildet [70b] (Abb. 33).



Abb. 33. Biosynthese des Chalcongerüsts

Weitere Biosyntheseschritte, die zu den einzelnen Chalconen (**18-20**, S. 47) führen und jeweils von spezifischen Enzymen gesteuert werden, sind Hydroxylierung und O-Methylierung am Phenolring, Hydrierung der α,β -Doppelbindung, Reduktion der Ketogruppe zur Hydroxygruppe und deren Methylierung bzw. Ethylierung. Die Chalcone **18-20** haben keine OH-Gruppe im Ring B, was man dadurch erklären kann, daß die Biosynthese (nach Abb. 33) direkt vom Cinnamat ausgeht.

Bei den "*Retro*"-Chalconen (**15-17**, S. 47) wird Ring A aus Cinnamoyl-CoA und Ring B aus 3 Acetat-Einheiten aufgebaut [72]. Man hat vermutet, daß ein Keto-Enol-Gleichgewicht vorliegt, wobei ein Austausch der 1,3-Position zwischen Keto- und Hydroxygruppe über eine Zwischenstufe stattfindet (Abb. 34).



Abb. 34. Umlagerung von normalen Chalconen zu Retro-Chalconen

In unserem Pflanzen besitzen alle isolierten Chalconoide entweder im Ring A oder im Ring B das gleiche Substitutionsmuster. Sie könnten deswegen aus gleichem Ausgangsmaterial, aber mit zwei verschiedenen Enzymsystemen für *"normale"* und *"Retro"-*Chalcone aufgebaut werden.

Für die Biosynthese der Sesquiterpen-verknüpften Flavene vermuten wir, daß jede Substruktur nach dem üblichen Biosyntheseweg aufgebaut wird und daß anschließend die Verknüpfung stattfindet.

Das Sesquiterpen wird aus 3 Isopren-Einheiten in Form von aktiviertem Isopentenyl-Diphosphat gebildet, die zuerst zum Farnesyldiphosphat kondensieren [81]. Weitere Cyclisierung sowie Isomerisierung führt zu den verschiedenen Sesquiterpentypen.

Die Biosynthese des Flavonoids wurde voranstehend diskutiert.

Bei der Biosynthese des Anthocyanins hat man vermutet, daß bei cis-Konfiguration der Doppelbindung die Cyclisierung der Ketogruppe mit der 2-OH-Gruppe eines "*normalen*" Chalcons bzw. der Ketogruppe mit der 2'-OH-Gruppe eines "*Retro*"-Chalcons zu einem Hemiacetal führt. Dieses könnte sich pH-abhängig zum Flavylium-Kation oder Chinonmethid-Kation umlagern. Bei trans-Konfiguration der Doppelbindung muß vorher eine Isomerisierung stattfinden [70c] (Abb. 35).



Abb. 35. Biosynthese des Anthocyanins

Es wurde beobachtet, daß bei Temperaturen um 20°C mit 0.1M HCl (+)-Mollisacacidin mit Phloroglucinol zum 3,4-*trans*-Produkt kondensiert [82] (Abb. 36).



Abb. 36. Kondensation zwischen (+)-Mollisacacidin und Phloroglucinol

Unter diesen Reaktionsbedingungen findet auch die Kondensation zwischen (+)-Mollisacacidin und (+)-Catechin statt, was eine Möglichkeit für die Biosynthese des Proanthocyanidins in vielen Pflanzen zeigen könnte [82].

Bei Biosynthese der neuen Sesquiterpen-verknüpften Flavene vermuten wir, daß nach der Isomerisation der α , β -Doppelbindung von Verbindung **15** zur cis-Konfiguration und über den oben beschriebenen Weg zum Flavylium-Kation cyclisieren könnte. Mit einem Sesquiterpenmolekül als Reaktionspartner sollte ähnlich der Reaktion von (+)-Mollisacacidin mit Phloroglucinol (Abb. 36) die Bildung der Sesquiterpen-verknüpften Flavene stattfinden (Abb. 37).



Abb. 37. Möglicher Biosyntheseweg der neuen Sesquiterpen-verknüpften Flavene

3 Experimenteller Teil

3.1 Allgemeine Untersuchungsverfahren

Chromatographie *Dünnschichtchromatographie

Sorbentien: [a] DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm (Merck)
[b] Glasplatten, Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 1.0 mm präp. DC (Merck)
Detektion: UV-Licht (254 nm und 365 nm)
Sprühreagenzien:
Vanillin/ Schwefelsäure (1g Vanillin in 100 ml 98 % iger Schwefelsäure), nach Besprühen Wärmebehandlung.
Dragendorff-Reagenz [83]
*Säulenchromatographie

Sorbentien: [c] Kieselgel 60, Korngröße 0.063-0.2 mm (Merck)

[d] Kieselgel 60, Korngröße 0.04-0.063 mm (Merck)

[e] Lichroprep RP-8, Korngröße 0.04-0.065 µm (Merck)

Schmelzpunkte

Gerät: ZEISS-Mikroskop-Heiztisch nach Boetius, Werte nicht korrigiert.

Drehwerte Gerät: JASCO DIP 1000 Polarimeter, 100 mm Zellenlänge

Spektroskopische Methoden *IR-Spektren Gerät: BRUKER IFS 28 *UV-Spektren Gerät: KONTRON UVIKON 940 *CD-Spektren Gerät: JASCO J 710 *EI-MS/HR-EIMS Gerät: AMD 402 (EI 70 eV), HR-EIMS: Auflösung ca. 5000 *ESI-MS Gerät: FINNIGAN MAT TSQ 7000, ESI-Spannung 4.5 kV, N₂ als Spülgas, Einspritzung: Havard Apparatus Syringe Pump, Bedingungen: Flußrate $3 \mu l / min.$ *HR-ESIMS Gerät: FINNIGAN MAT 95 XL, Auflösung ca. 8000 *NMR-Spektren Gerät: VARIAN UNITY 500 bei 499.85 (¹H) und 125.7 MHz (¹³C)

VARIAN GEMINI 300 bei 300.24 (¹H) und 75.5 MHz (¹³C) Die chemischen Verschiebungen sind bezogen auf TMS (δ = 0 ppm).

Röntgenstrukturanalyse

Gerät: IPDS, Kristallsystem: orthorhombisch, Raumgruppe: P2₁2₁2₁.

System	Laufmittel	Verhältnis
1	Cyclohexan/Chloroform/Diethylamin	6:3:1
2	<i>n</i> -Hexan/Aceton	7:3

Tabelle 12 Verwendete Laufmittels für die DC

3.2 Untersuchung der Inhaltsstoffe von *T. bovina*

3.2.1 Pflanzenmaterial und Isolierung des Rohalkaloids

Blätter und Stengel von T. bovina wurden im März 1996 in der Provinz Hoabinh, Vietnam gesammelt, getrocknet und anschließend gemahlen. 3 kg trockenes Pulver wurde mit 95 % igem Methanol (61) je dreimal über Nacht bei Raumtemperatur extrahiert. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt und die zurückbleibende wäßrige Lösung nacheinander mit insgesamt 31 n-Hexan, 41 Essigester und 3 1 n-Butanol je dreimal ausgeschüttelt. Es wurden 30 g, 32 g, bzw. 64 g Rückstand aus den entsprechenden Lösungsmitteln erhalten. Diese Rückstände wurden zur Abtrennung der Rohalkaloide nach einem standardisierten Extraktionsschema (Schema 1) aufgearbeitet. Jeder Rückstand wurde jeweils in 300 ml 0.2M Salzsäure gelöst und diese wäßrige Phase dreimal mit dem gleichen Volumen Toluol/ Ether (2:1) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Kaliumhydrogencarbonat auf pH 8-9 gebracht, dann dreimal mit ca. 300 ml Wasser ausgeschüttelt und anschließend zur Trockne eingeengt. Die wäßrige Phase II wurde verworfen. Der Rückstand der organischen Phase enthielt nach DC-Untersuchungen keine Alkaloide und andere interessante Verbindungen und wurde daher nicht weiter bearbeitet.

Die wäßrige Phase I wurde mit Kaliumhydrogencarbonat bis pH 8-9 alkalisiert und dreimal mit 300 ml Chloroform/ Ethanol (2:1) ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase III wurde verworfen. Die das Rohalkaloid enthaltende organische Phase wurde bis zur Trockne eingeengt. Die Ausbeuten an Rückstand der *n*-Hexan-, Essigester- bzw. *n*-Butanol-Extraktion betrugen 1.5 g, 12.3 g, bzw. 7.8 g.

3.2.2 Isolierung und physikalische Daten der Indolalkaloide

Das verbleibende Rohalkaloidgemisch der *n*-Hexan-, Essigester-, und *n*-Butanol-Extrakte wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel-Alufolien [a] auf Alkaloide untersucht. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Cyclohexan/Chloroform/Diethylamin (6:3:1) verwendet. Das Detektieren der Substanzen erfolgte mit Dragendorff-Reagenz.

Die Alkaloidspektren der Essigester- und *n*-Butanol-Extrakte zeigten weitgehende Übereinstimmung, daher wurden beide Rückstände vereinigt (insgesamt 20 g).

<u>*n*-Hexan-Extrakt</u>:

1.5 g Rohalkaloid des *n*-Hexan-Extrakts wurde auf einer Säule mit 150 g Kieselgel [c] aufgetrennt (Fraktionen zu je 50 ml). Als Laufmittel diente dabei ein CHCl₃/EtOAc-Gradient (9.5:0.5 \rightarrow 6.0:4.0). Der gesamte Verlauf der Trennung wurde dünnschichtchromatographisch mit Dragendorff-Reagenz als Detektionsmittel verfolgt.

Die Isolierung der Substanzen 1, 2 und 4 zeigt Schema 2.

Essigester- /*n*-Butanol-Extrakt:

Der vereinigte Rohalkaloid-Rückständ des Essigester-/*n*-Butanol-Extrakts (20 g) wurde säulenchromatographisch an 200 g Kieselgel [c] aufgetrennt (Fraktionen zu je 200 ml). Als mobile Phase diente dabei ein *n*-Hexan/EtOAc-Gradient (2:8 \rightarrow 0:10) sowie im Anschluß ein EtOAc/MeOH-Gradient (10:0 \rightarrow 7:3). Der gesamte Trennverlauf wurde mit DC verfolgt. Dragendorff-Sprühreagenz diente zum Nachweis der Alkaloide.

Die ausführliche Isolierung der Substanzen 3, 5, 6-14 wird in Schema 3 gezeigt. Die Substanz 1 aus dem n-Hexan-Extrakt wurde durch DC-Vergleich nachgewiesen, jedoch nicht isoliert.

Außerdem es gab noch 2 Verbindungen, die sich bei der Auftrennung als instabil erwiesen, und ein aus zwei Verbindungen bestehendes Gemisch. Die verwendeten üblichen Isolierungs- und Trennmethoden (präparative DC, SC, HPLC) brachten keinen ausreichenden Trennerfolgt, so daß diese drei Substanzen nicht weiter untersucht wurden.

(-)-Mehranin (1)

Ausbeute: 0.0066 %

Farblose Nadeln, Schmp. 102-104 °C (Aceton)

 $[\alpha]_{D}^{24}$: -48.4° (CHCl₃, c 1.02)

 $R_f = 0.72$ (System 1, S. 78)

 $\underline{IR} \nu_{max}^{\text{CHCl}_3} \text{cm}^{-1}: 2967, 2865, 2797 \text{ (NCH}_3\text{)}, 1605, 1482, 1377, 1250, 1022, 893, 850$

<u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 306 (3.23), 256 (3.56), 210 (3.89)

CD: siehe Tabelle 3, S. 17

<u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 310 $[M]^+$ (100), 199 (25) $[C_{13}H_{15}N_2]^+$, 170 (14) $[C_{12}H_{12}N]^+$, 166 (29) $[C_{10}H_{16}NO]^+$, 158 (55), 144 (64) $[C_{10}H_{10}N]^+$, 138 (35), 123 (18), 108 (23)

¹<u>H-NMR</u> und ¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 1 und 2, S. 14, 15

Monohydrobromid von 1:

15 mg **1** in 3 ml abs. Methanol wurde mit 10 mg Hydrobromid (48 %) bei Raumtemp. 3 Stunde gerührt. Das Gemisch wurde im Vakuum bis zur Trockne eingeengt und dann mit abs. Methanol/Aceton umkristalisiert.

Röntgenkristallstrukturanalyse von (-)-Mehranin-monohydrobromid

C₂₀H₂₇BrN₂O, [M] = 391.36, T = 293(2) K, $\lambda = 0.71073$ Å, orthorhombisch, P2₁2₁2₁, a = 7.7021(12), b = 8.354(2), c = 32.135(6) Å, α = β = γ = 90°, Z = 4, V = 2067.8(7) Å³, D_c = 1.260 g/cm³, μ(Mo_{Kα}) = 2.003 mm⁻¹, 2θ_{max} = 52.06, gemessene Reflexe = 13297, unabhängige Reflexe = 3822 [R(int) = 0.0991], **1**-HBr kristallisiert mit einem Methanol- und ½ H₂O-Molekülen pro Formeleinheit.

3-Oxomehranin (2)

Ausbeute: 0.0005 % Öl $[\alpha]_D^{26}$: -19.1° (CHCl₃, c 0. 40) $R_f= 0.49$ (System 1, S. 78) <u>IR</u> $v_{max}^{CHCl_3}$ cm⁻¹: 2946, 2871, 2801 (NCH₃), 1654 (C=O), 1606, 1485, 1234, 883 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 307(3.55), 256 (3.96), 218 (4.03) <u>CD</u>: siehe Tabelle 3, S. 17 <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 324 [M]⁺ (56), 158 (24), 157 (100) [C₁₁H₁₁N]⁺, 144 (57) [C₁₀H₁₀N]⁺, 91 (14) <u>Hochaufgelöstes MS</u>: Gefunden Berechnet Summenformel

Gefunden	Berechnet	Summenformel
324.1812	324.1838	$C_{20}H_{24}N_2O_2$
157.0892	157.0891	$C_{11}H_{11}N$
158.0945	158.0969	$C_{11}H_{12}N$
144.0826	144.0813	$C_{10}H_{10}N$

¹<u>H-NMR</u> und ¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 1 und 2, S. 14, 15

14 α , 15 β -Dihydroxy-*N*-methylaspidospermidin (3)

Ausbeute: 0.0005 % Farblose Nadeln, Schmp. 200-203 °C (Aceton) $[\alpha]_{D}^{30}$ +15.3° (MeOH, c 0.06) $R_{f} = 0.09$ (System 1, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3355 (br., OH), 2932, 2809 (NCH₃), 1646, 1457, 1239, 1135, 1070, 765 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 309 (3.55), 257 (3.99), 210 (4.38) CD: siehe Tabelle 3, S. 17 EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 328 $[M]^+$ (49), 300 (10), 184 (8), 156 (100) $[C_8H_{14}NO_2]^+$, 144 (12) $[C_{10}H_{10}N]^+$ Hochaufgelöstes MS: Summenformel Gefunden Berechnet 328.2119 328.2150 $C_{20}H_{28}N_2O_2$ 156.1024 156.0991 $C_8H_{14}NO_2$ ¹H-NMR und ¹³C-NMR: siehe Tabelle 1 und 2, S. 14, 15 Röntgenkristallstrukturanalyse von Verbindung 3: $C_{28}H_{28}N_2O_2$, [M] = 328.44, T = 293(2) K, $\lambda = 0.71073$ Å, orthorhombisch, $P2_{1}2_{1}2_{1}$, a = 8.448(2), b = 14.162(3), c = 14.372(3) Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$, Z = 4, V = 1719.6 (6) Å³, D_c = 1.269 g/cm³, $\mu(Mo_{K\alpha}) = 0.082 \text{ mm}^{-1}$, $2\theta_{max} = 52.12$, gemessene Reflexe = 12986, unabhängige Reflexe = 3360 [R(int) = 0.0638]

Hecubin (4)

Ausbeute: 0.0007 % Farblose Nadeln, Schmp. 158-160 °C (Aceton) $[\alpha]_D^{2^5}$: 27.0° (CHCl₃, c 0.50) R_f = 0.80 (System 1, S. 78) <u>IR</u> $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm⁻¹: 2966, 2928, 2879, 2857, 1662, 1606, 1471, 1371, 1014 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 293 (3.69), 286 (3.71), 229 (4.42) <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 310 [M]⁺ (100), 226 (30), 184 (27), 170 (90) [C₁₂H₁₂N]⁺, 166 (12), 158 (85) [C₁₁H₁₂N]⁺, 144 (33) [C₁₀H₁₀N]⁺, 140 (87) [C₈H₁₄NO]⁺, 138 (10), 122 (13), 108 (25) <u>H-NMR</u> und ¹³C-NMR: siehe Tabelle 1 und 2, S. 14, 15

(-)-Ibogain (5) Ausbeute: 0.0017 % Farbloses Öl $[\alpha]_D^{26}$: -35° (CHCl₃, c 2.00) R_f= 0.60 (System 1, S. 78) $\frac{\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_{3}\text{cm}^{-1}: 3467 \text{ (NH), } 2959, 2933, 2874, 1483, 1279, 1032, 824 \\ \underline{\text{UV}} \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} \text{nm } (\log \epsilon): 288 (3.97), 225 (4.31) \\ \underline{\text{EIMS}} (70 \text{ eV}) \text{ m/z (rel. Int.): } 310 [\text{M}]^{+} (100), 295 (15), 281 (7), 225 (50), 202 (27), 186 (18), 176 (21), 149 (29), 136 (62), 122 (38) \\ ^{1}\underline{\text{H-NMR}} (300 \text{ MHz, CDCl}_{3}): \\ \delta 7.73 (1\text{H}, s, \text{NH}), 7.13 (1\text{H}, d, 8.8 \text{ Hz, H-12}), 6.91 (1\text{H}, d, 2.2 \text{ Hz, H-9}), 6.77 \\ (1\text{H}, dd, 8.5/2.5 \text{ Hz, H-11}), 3.85 (3\text{H}, s, 10\text{-OCH}_{3}), 0.90 (3\text{H}, t, 7.1 \text{ Hz, H}_{3}\text{-18}), \\ ^{13}\text{C-NMR: siehe Tabelle 4, S. 25}$

Ibogalin (6)

Ausbeute: 0.0010 % Farblose Kristalle, Schmp. 138-140 °C (Aceton/Methanol) $[\alpha]_D^{28}$: -40.9° (MeOH, c 0.255) $R_f= 0.51$ (System 1, S. 78) <u>IR</u> $v_{max}^{CHCl_3}cm^{-1}$: 3467 (NH), 2959, 2933, 2873, 1614, 1484, 1308, 864, 835 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 300 (3.87), 228 (3.99) <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 340 [M]⁺ (90), 325 (11), 255 (45), 216 (10), 170 (20), 149 (43), 136 (100), 135 (50), 122 (34) ¹<u>H-NMR</u> (300 MHz, CDCl_3): δ 7.59 (1H, *s*, NH), 6.91^a (1H, *s*, H-9), 6.78^a (1H, *s*, H-12), 3.92^b (3H, *s*, 10-OCH₃), 3.87^b (3H, *s*, 11-OCH₃), 0.88 (3H, *t*, 7.0 Hz, H₃-18) ^{a, b} Zuordnung austauschbar ¹³C-NMR: siehe Tabelle 4, S. 25

19R-epi-Voacristin (7)

Ausbeute: 0.0003 % Öl $[\alpha]_D^{26}$: -42.0° (CHCl₃, c. 0.50) $R_f = 0.43$ (System 1, S. 78) <u>IR</u> $v_{max}^{CHCl_3}$ cm⁻¹: 3450 (NH), 3400 (br. OH), 2966, 1712 (CO₂CH₃), 1486, 1026, 895 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 276 (3.95), 210 (4.44) <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 384 [M]⁺ (100), 369 (37), 366 (90) [M-H₂O]⁺, 339 (17), 307 (10) [M-H₂O-CO₂CH₃]⁺, 283 (14), 244 (36), 224 (18), 184 (25), 165 (12), 152 (40), 138 (17), 122 (23) <u>¹H-NMR</u> (300 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (1H, *s*, NH), 7.16 (1H, *d*, 8.8 Hz, H-12), 6.92 (1H, *d*, 2.5 Hz, H-9), 6.83 (1H, *dd*, 8.5/2.5 Hz, H-11), 4.12 (1H, *s*, H-21), 3.93 (1H, *qd*, 6.3/2.8 Hz, H-19), 3.85 (3H, *s*, 10-OCH₃), 3.73 (3H, *s*, CO₂CH₃), 1.28 (3H, *d*, 6.3 Hz, H₃-18)

¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 4, S. 25

19-epi-Isovoacristin (8)

Ausbeute: 0.0017 % Öl $[\alpha]_D^{26.4}$: -18.9° (CHCl₃, c 0.37) $R_f= 0.44$ (System 1, S. 78) $IR v_{max}^{CHCl_3}cm^{-1}$: 3448 (NH), 3300 (br. OH), 2930, 2856, 1717 (CO₂CH₃), 1628, 1457, 1161, 1079 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ε): 297 (3.47), 226 (4.09) <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 384 [M]⁺ (65), 366 (100) [M-H₂O]⁺, 339 (12), 307 (12) [M-H₂O-COOCH₃]⁺, 283 (10), 244 (36), 224 (18), 206 (22), 184 (21), 160 (36), 165 (12), 152 (36), 149 (67), 138 (16), 122 (28) ¹<u>H-NMR</u> (300 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (1H, *s*, NH), 7.33 (1H, *d*, 8.8 Hz, H-9), 6.77 (2H, *m*, H-10, H-12), 4.14 (1H, *s*, H-21), 3.93 (1H, *qd*, 6.4/2.5 Hz, H-19), 3.83 (3H, *s*, 11-OCH₃), 3.74 (3H, *s*, CO₂CH₃), 1.28 (3H, *d*, 6.3 Hz, H₃-18) ¹³C-NMR: siehe Tabelle 4, S. 25

19-Hydroxyconopharyngin (9)

Ausbeute: 0.0007 % Ö1 $[\alpha]_{D}^{23.8}$: -35.0° (CHCl₃, c 1.00) $R_f = 0.37$ (System 1, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 3450 (NH), 3400 (OH), 2938, 2867, 1719 (COOCH₃), 1485, 1323, 1160, 1127, 1079, 846, 837 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 305 (3.97), 233 (4.10) <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 414 $[M]^+$ (60), 396 (100) $[M-H_2O]^+$, 369 (7), 353 (19), 337 (11) [M-H₂O-CO₂CH₃]⁺, 313 (7), 274 (21), 205 (18), 190 (27), 165 (6), 152 (13), 138 (7), 134 (11) ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.71 (1H, s, NH), 6.89^a (1H, s, H-9), 6.79^a (1H, s, H-12), 4.06 (1H, s, H-21), 3.92^b (3H, s, 10-OCH₃), 3.89^b (3H, s, 11-OCH₃), 3.73 (3H, s, CO₂CH₃), 1.28 (3H, *d*, 6.6 Hz, H₃-18) ^{a, b} Zuordnung austauschbar ¹³C-NMR: siehe Tabelle 4, S. 25

Pedunculin (Conopholin) (10)

Ausbeute: 0.0600 % Farblose Nadeln, Schmp. 195-198 °C (Aceton) $[\alpha]_D^{23.8}$: -119.7° (CHCl₃, c 0.50) R_f = 0.37 (System 1, S. 78) $\underline{IR} \ v_{max}^{\text{CHCl}_3} \text{cm}^{-1} : 3535 \text{ (NH)}, 3392 \text{ (OH)}, 2945, 2807 \text{ (NCH}_3), 1670 \text{ (konju.} \\ \text{CO}_2\text{CH}_3), 1609, 1491, 1467, 1438, 1263, 1084, 1059, 850 \\ \underline{UV} \ \lambda_{max}^{\text{MeOH}} \text{nm} \text{ (log } \epsilon) : 338 \text{ (4.08)}, 307 \text{ (4.14)}, 265 \text{ (4.12)}, 238 \text{ (sch.)}, 215 \\ \text{(4.31)} \\ \underline{\text{EIMS}} \text{ (70 eV) m/z (rel. Int.)} : 736[\text{M}]^+ \text{ (100)}, 678 \text{ (49)}, 446 \text{ (31)}, 415 \text{ (82)}, 350 \\ \text{(64)}, 323 \text{ (36)}, 290 \text{ (20)}, 263 \text{ (29)}, 249 \text{ (32)}, 204 \text{ (15)}, 108 \text{ (18)} \\ \\ \underline{^{1}\text{H-NMR}} \text{ und } {^{13}\text{C-NMR}} : \text{siehe Tabelle 5 und 6, S. 32, 34}$

Methylenbismehranin (11)

Ausbeute: 0.0053 % Ö1 $[\alpha]_{D}^{28}$ -5.9° (MeOH, c 0.50) $R_f = 0.66$ (System 1, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 2944, 2873, 2800 (NCH₃), 2739, 1611, 1489, 1449, 1374, 1250, 1010, 897, 851, 827, 807 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 312 (3.67), 268 (4.12), 216 (4.25) <u>CD</u>^{MeOH}: ϵ_{314} -0.66, ϵ_{274} +8.00, ϵ_{249} -1.86, ϵ_{231} +0.62 EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 632[M]⁺ (100), 534 (29), 323 (8), 309 (3), 224 (13), 204 (16), 170 (12), 166 (10), 158 (12), 144 (5), 138 (8), 91 (16), 83 (25) Hochaufgelöstes MS: Gefunden Berechnet Summenformel 632.4089 632.4080 $C_{41}H_{52}N_4O_2$ ¹H-NMR und ¹³C-NMR: siehe Tabelle 5 und 6, S. 32, 34

Tabernaebovin (12)

204.1385

135.1047

Ausbeute: 0.0012 % Weißes Nadeln, Schmp. 163-165 °C (Aceton) $[\alpha]_{D}^{24}$ +133.0° (CHCl₃, c 1.00) R_f= 0.58 (System 1, S. 78) <u>IR</u> $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm⁻¹: 3003, 2964, 2937, 2863, 2796 (NCH₃), 2740, 1603, 1491, 1449, 1380, 895, 850, 815 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 320 (3.92), 267 (4.41), 217 (4.52) <u>CD</u>^{MeOH}: ε_{329} +8.3, ε_{276} +42.3, ε_{253} -17.2 EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 618[M]⁺ (100), 512 (12), 452 (35), 309 (8), 204 (6), 135(10)Hochaufgelöstes MS: Gefunden Berechnet Summenformel 618.3930 618.3932 $C_{40}H_{50}N_4O_2$ 452.2760 452.2701 $C_{30}H_{34}N_{3}O$

 $C_{13}H_{18}NO$ $C_9H_{13}N$

204.1381

135.1046

¹<u>H-NMR</u> und ¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 5 und 6, S. 32, 34

Tabernaemontabovin (13)

Ausbeute: 0.0017 % Öl $[\alpha]_{D}^{24.9}$ -74.2° (MeOH, c 0.50) $R_f = 0.49$ (System 1, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 3460 (NH), 2946, 2873, 2798 (NCH₃), 1715 (CO₂CH₃), 1612, 1487, 1462, 1238, 1011, 898, 851, 831, 810 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 291 (Sch.), 265 (4.49), 208 (4.91) CD: siehe Tabelle 7, S. 39 <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 646 $[M]^+$ (43), 630 (7), 587 (5) $[M-CO_2CH_3]^+$, 452 (16), 335 (23), 309 (10), 181 (100), 122 (97) Hochaufgelöstes MS: Gefunden Berechnet Summenformel 646.3882 646.3882 $C_{41}H_{50}N_4O_3$ 335.2142 335.2123 $C_{22}H_{27}N_2O$ 181.1090 181.1103 $C_{10}H_{15}NO_2$ 122.0971 122.0970 $C_8H_{12}N$

¹<u>H-NMR</u> und ¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 5 und 6, S. 32, 34

Tabernaemontavin (14)

Ausbeute: 0.0008 % Ö1 $[\alpha]_{D}^{24.7}$ -56.8° (MeOH, c 0.50) $R_f = 0.40$ (System 1, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 3460 (NH), 2967, 2874, 2796 (NCH₃), 1707 (CO₂CH₃), 1612, 1487, 1462, 1328, 1287, 1130, 897, 850, 814 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 292 (Sch.), 266 (4.23), 208 (4.67) CD: siehe Tabelle 7, S. 39 EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 676 $[M]^+$ (45), 646 (18) $[M-CH_2O]^+$, 466 (12), 309 (15), 211 (67), 180 (100), 152 (15), 59 (22) Hochaufgelöstes MS: Gefunden Berechnet Summenformel 676.3987 676.4075 $C_{42}H_{52}N_4O_4$ 646.3549 646.3518 $C_{40}H_{46}N_4O_4$ 211.1195 211.1208 $C_{11}H_{17}NO_3$ 180.1024 180.1013 $C_{10}H_{14}NO_{2}$ ¹H-NMR und ¹³C-NMR: siehe Tabelle 5 und 6, S. 32, 34

3.3 Untersuchung der Inhaltsstoffe von *Fissistigma bracteolatum*

3.3.1 Pflanzenmaterial

Blätter und Stengel von *F. bracteolatum* wurden im August 1997 in der Provinz Hoabinh, Vietnam gesammelt, getrocknet und anschließend gemahlen. 850 g trockenes Pulver wurde mit 95 % igem Methanol (4 l) je dreimal über Nacht bei Raumtemperatur extrahiert. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt und die zurückbleibende wäßrige Lösung wurde nacheinander mit insgesamt 2 l n-Hexan, 3 l Essigester und 3 l n-Butanol je dreimal ausgeschüttelt. Es wurden 11 g, 16 g, bzw. 20 g Rückstand aus den entsprechenden Lösungsmitteln erhalten. Nur der n-Hexan- und Essigester-Extrakt wurden in dieser Arbeit untersucht.

3.3.2 Isolierung und physikalische Daten der Inhaltsstoffe von *Fissistigma bracteolatum*

<u>*n*-Hexan-Extrakt</u>:

11 g *n*-Hexan-Extrakt wurde auf einer Säule mit 200 g Kieselgel [c] aufgetrennt (Fraktionen zu je 100 ml). Als Laufmittel diente dabei ein *n*-Hexan/EtOAc-Gradient ($8.0:2.0 \rightarrow 6.0:4.0$). Der gesamte Verlauf der Trennung wurde dünnschichtchromatographisch mit Vanilin/H₂SO₄ als Detektionsmittel verfolgt. Es wurde 10 Hauptfraktionen gesammelt.

Die ausführliche Isolierung der Substanzen 15, 17, 19-24 wird in Schema 4 gezeigt.

Essigester-Extrakt:

Der Essigester-Extrakt (16 g) wurde säulenchromatographisch an 250 g Kieselgel [c] aufgetrennt (Fraktionen zu je 200 ml). Als mobile Phase diente dabei ein *n*-Hexan/Aceton-Gradient (7:3 \rightarrow 0:10). Der gesamte Trennverlauf wurde durch DC mit Vanilin/H₂SO₄ als Sprühreagenz verfolgt.

Die Isolierung der Substanzen 16, 18, 25 wird in Schema 4 gezeigt. Außerdem es gab noch 2 Verbindungen, die sich bei der Auftrennung als instabil erwiesen. Die verwendeten üblichen Isolierungs- und Trennmethoden (präp. DC, SC, HPLC) brachten keinen ausreichenden Trennerfolgt, so daß diese zwei Substanzen nicht weiter untersucht wurden.

2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcon (15)

```
Ausbeute: 0.0024 %
Öl
```

$$\begin{split} & R_{f} = 0.28 \text{ (System 2, S. 78)} \\ & \underline{IR} \ \nu_{max}^{\text{CHCl}_{3}} \text{cm}^{-1} \text{: } 3495 \text{ (OH), } 3009, 2941, 2844, 1653 \text{ (konju. C=O), } 1584, 1505, \\ & 1356, 1113, 1047, 1019, 911, 865, 832 \\ & \underline{UV} \ \lambda_{max}^{\text{MeOH}} \text{nm} \text{ (log ϵ): } 365 \text{ (} 4.39\text{), } 254 \text{ (} 4.15\text{), } 203 \text{ (Sch.)} \\ & \underline{\text{EIMS}} \text{ (70 eV) m/z (rel. Int.): } 314 \text{ [M]}^{+} \text{ (} 42\text{), } 297 \text{ (12), } 283 \text{ (100), } 237 \text{ (4), } 105 \\ & (21), 77 \text{ (6)} \\ \\ ^{1}\text{H-NMR und} ^{13}\text{C-NMR: siehe Tabelle 8, S. 49} \end{split}$$

2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcen (16)

Ausbeute: 0.0011 % Öl $R_f = 0.48$ (System 2, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 3513 (OH), 2938, 2841, 1724, 1613, 1506, 1465, 1425, 1347, 1267, 1114, 978 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 267 (3.91), 203 (4.54) <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 300 [M]⁺ (100), 285 (11), 196 (30), 181 (20), 153 (21), 105 (19), 91 (70) Hochaufgelöstes MS: Gefunden Berechnet Summenformel 300.1380 300.1361 $C_{18}H_{20}O_4$ 285.1126 285.1146 $C_{17}H_{17}O_4$ 196.0735 196.0730 $C_{10}H_{12}O_4$

¹<u>H-NMR</u> und ¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 8, S. 49

2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxydihydrochalcon (17)

Ausbeute: 0.0096 % Ö1 $R_f = 0.35$ (System 2, S. 78) IR v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 3521 (OH), 2938, 2841, 1676 (konju. C=O), 1618, 1598, 1511, 1465, 1427, 1349, 1241, 1181, 1159, 1112, 1039, 972, 872, 847 UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 236 (4.16), 205 (4.67) EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 316 [M]⁺ (100), 197 (66), 184 (40), 153 (14), 105 (26), 77(18)Hochaufgelöstes MS: Gefunden Berechnet Summenformel 316.1306 316.1311 $C_{18}H_{20}O_5$ 197.0819 197.0814 $C_{10}H_{13}O_4$ 184.0743 184.0736 $C_9H_{12}O_4$ 153.0572 153.0551 $C_8H_9O_3$ ¹H-NMR und ¹³C-NMR: siehe Tabelle 8, S. 49

2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxydihydrochalcon (18)

Ausbeute: 0.0018 % Farblose Nadeln, Schmp. 101-103 °C (Aceton) $R_f = 0.38$ (System 2, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 3532 (br., OH), 2935, 2851, 1619 (konju. C=O), 1598, 1497, 1439, 1416, 1358, 1287, 1149, 1126, 999, 977, 819 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 288 (4.17), 235 (Sch.), 203 (Sch.) EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 316 [M]⁺ (57), 211 (100), 197 (11), 184 (24), 169 (11), 91(30)Hochaufgelöstes MS: Gefunden Berechnet Summenformel 316.1313 316. 1311 $C_{18}H_{20}O_5$ 211.0603 211.0606 $C_{10}H_{11}O_5$ 197.0821 197.0814 $C_{10}H_{13}O_4$ 184.0747 184.0736 $C_9H_{12}O_4$

 1 <u>H-NMR</u> und 13 <u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 9, S. 56

2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy-β'-methoxychalcan (19)

Ausbeute: 0.0012 % Ö1 $[\alpha]_{D}^{22.3}$ -2.1° (MeOH, c 0.38) $R_f = 0.46$ (System 2, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 3254 (OH), 2936, 2843, 1621, 1599, 1518, 1342, 1245, 1199, 1112, 1074, 864 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 277 (3.45), 223 (4.26) EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 332 [M]⁺ (11), 300 (100), 285 (34), 227 (22), 196 (47), 91 (56), 77 (15) Hochaufgelöstes MS: Gefunden Berechnet Summenformel 332.1639 332.1624 $C_{19}H_{24}O_5$ 285.1138 285.1127 $C_{17}H_{17}O_4$ 227.0950 227.0920 $C_{11}H_{15}O_5$ 196.0752 196.0736 $C_{10}H_{12}O_4$

¹<u>H-NMR</u> und ¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 9, S. 56

2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy- β '-ethoxychalcan (20)

Ausbeute: 0.0024 % Öl $[\alpha]_D^{22.6}$ -1.6° (MeOH, c 1.00) R_f = 0.45 (System 2, S. 78) <u>IR</u> $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm⁻¹: 3254 (OH), 2937, 2842, 1622, 1599, 1519, 1399, 1341, 1245, 1199, 1112, 1074, 864, 820 $\underbrace{UV \lambda_{max}}^{MeOH} nm (log \epsilon): 276 (3.20), 222 (3.99) \\ \underline{EIMS} (70 \text{ eV}) m/z (rel. Int.): 346[M]^+ (7), 300 (100), 285 (15), 241 (8), 196 (22), 181 (12), 91 (31) \\ \underline{Hochaufgelöstes MS}: \\ \underline{Gefunden} \qquad \underline{Berechnet} \qquad \underline{Summenformel} \\ \underline{Ot (1701)} \qquad \underline{Ot (1701)} \\ \underline{Ot (1701)} \qquad \underline{Ot (1701)} \\ \underline{Ot (1701)} \qquad \underline{Ot (1701)} \\ \underline{$

346.1791	346.1780	$C_{20}H_{26}O_5$
300.1375	300.1362	$C_{18}H_{20}O_4$
285.1127	285.1127	$C_{17}H_{17}O_4$
196.0744	196.0736	$C_{10}H_{12}O_4$
¹ U NMD und ¹³ C N	MD, sicho Taballo 0 S 56	

¹<u>H-NMR</u> und ¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 9, S. 56

5,7,8-Trimethoxyflav-3-en (21)

Ausbeute: 0.0210 % Öl $R_f= 0.54$ (System 2, S. 78) <u>IR</u> $v_{max}^{CHCl_3}cm^{-1}$: 2939, 2842, 1733, 1608, 1504, 1426, 1346, 1239, 979, 844 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ε): 284 (3.91), 211 (4.46) <u>EIMS</u> (70 eV) m/z (rel. Int.): 298 [M]⁺ (100), 297 (23), 283 (25), 267 (10), 221 (16), 115 (8), 91 (7) <u>H-NMR</u> (125 MHz, (CD₃)₂CO): δ 7.46 (2H, *m*, H-2'/H-6'), 7.30 (3H, *m*, H-3'/H-5', H-4'), 6.78 (1H, *dd*, 9.9/1.6

Hz, H-4), 6.24 (1H, *s*, H-6), 5.85 (1H, *dd*, 3.8/1.4 Hz, H-2), 5.74 (1H, *dd*, 9.9/3.8 Hz, H-3), 3.79 (6H, *s*, 5-OMe, 7-OMe), 3.53 (3H, 8-OMe) 13 <u>C-NMR</u> (75 MHz, (CD₃)₂CO):

δ 155.1 (C-7), 152.2 (C-5), 147.8 (C-9), 141.8 (C-1'), 132.6 (C-8), 129.3 (C-3'/C-5'), 128.9 (C-4'), 127.7 (C-2'/C-6'), 121.4 (C-3), 119.5 (C-4), 105.9 (C-10), 90.6 (C-6), 76.9 (C-2), 60.8 (8-OMe), 56.3 (7-OMe), 56.2 (5-OMe)

Fissistigmatin A (22)

Ausbeute: 0.0080 % Weißes Nadeln, Schmp. 80-82 °C (Cyclohexan/Aceton) $[\alpha]_{D}^{28.0}$ -108° (MeOH, c 1.00) R_f= 0.35 (System 2, S. 78) <u>IR</u> $v_{max}^{CHCl_3}$ cm⁻¹: 3593, 2934, 2855, 1669, 1641, 1611, 1589, 1502, 1425, 1345, 1282, 1135, 1115, 1048, 983, 953 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 272 (3.73), 228 (4.25) CD: siehe Tabelle 10, S. 65 ESIMS m/z (rel. Int): 541 $[M+Na]^+$ (38), 519 $[M+H]^+$ (32), 299 (100), 267 (18) EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 297 (100), 282 (3), 267 (12), 253 (2) Hochaufgelöstes ESIMS: Gefunden Berechnet Summenformel 541.2922 541.2936 $C_{33}H_{42}NaO_5$

Hochaufgelöstes EIMS:

GefundenBerechnetSummenformel297.1123297.1127 $C_{18}H_{17}O_4$ $^{1}H-NMR$ und $^{13}C-NMR$: siehe Tabelle 11, S. 71Veresterung von 22 mit p-Brombenzovlchlorid:

20 mg der Verbindung 22 in 0.5 ml Pyridin wurde mit 50 mg p-Brombenzoylchlorid unter Eiskühlung versetzt. Man hat ein paar Kristalle von Steglich-Reagenz (N,N-Dimethyl-4-aminopyridin) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemp. 6 Tage gerührt, dann im Vakuum bis zur Trockne eingeengt und anschließend an Säulen chromatographiert. Als Laufmitteln diente n-Hexan/Essigester 7:3. Der gebildete Ester wurde in Aceton/Methanol umkristallisiert.

Röntgenkristallstrukturanalyse von 22-p-Brombenzoyl:

 $C_{40}H_{45}BrO_6$, [M] = 701.75, T = 220(2) K, $\lambda = 0.71073$ Å, orthorhombisch, $P2_12_12_1$, a = 7.1978(12), b = 22.457(4), c = 24.243(5) Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$, Z = 4, V = 3918.6(12) Å³, D_c = 1.227 g/cm³, $\mu(Mo_{K\alpha}) = 1.094 \text{ mm}^{-1}$, $2\theta_{max} = 51.6$, gemessene Reflexe = 28203, unabhängige Reflexe = 7428 [R(int) = 0.1021]], **22**-p-Brombenzoyl kristallisiert mit einem fehlgeordneten MeOH-Molekül.

Fissistigmatin B (23)

Ausbeute: 0.0012 % Ö1 $[\alpha]_{D}^{26.3}8.1^{\circ}$ (MeOH, c 0.76) R_f= 0.32 (System 2, S. 78) <u>IR</u> $v_{max}^{CHCl_3}$ cm⁻¹: 3593, 3511, 2933, 2855, 1737, 1641, 1610, 1504, 1465, 1425, 1342, 1237, 1136, 1114, 908, 891 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 268 (3.67), 210 (4.26) CD: siehe Tabelle 10, S. 65 ESIMS m/z (rel. Int): 519 $[M+H]^+$ (16), 297 (100), 267 (32) EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 297 (100), 282 (2), 267 (11), 253 (2) Hochaufgelöstes EIMS: Gefunden Summenformel Berechnet 297.1123 297.1127 $C_{18}H_{17}O_4$ ¹H-NMR und ¹³C-NMR: siehe Tabelle 11, S. 71

Fissistigmatin C (24)

Ausbeute: 0.0011 % Weißes Nadeln, Schmp. 75-77 °C (*n*-Hexan/Aceton) $[\alpha]_D^{22.7}$ -162.2° (MeOH, c 0.05) R_f = 0.34 (System 2, S. 78) <u>IR</u> $v_{max}^{CHCl_3}$ cm⁻¹: 3631, 3451, 2938, 2839, 1669, 1644, 1611, 1503, 1465, 1437, 1237, 1135, 1115, 1016, 890 UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε): 273 (4.03), 219 (4.69), 206 (4.75)CD: siehe Tabelle 10, S. 65ESIMS m/z (rel. Int): 523 [M+Na]⁺ (28), 501 [M+H]⁺ (10), 299 (100)EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 297 (100), 282 (3), 267 (11), 253 (2)Hochaufgelöstes EIMS:GefundenBerechnet297.1123SummenformelCommon Component of the tabelle 11, S. 71

Fissistigmatin D (25)

Ausbeute: 0.0012 % Amorph $[\alpha]_{D}^{23.3}$ -72.5° (MeOH, c 1.00) R_f= 0.29 (System 2, S. 78) <u>IR</u> v_{max}^{CHCl₃}cm⁻¹: 3594, 2929, 2857, 1723, 1661, 1609, 1588, 1503, 1464, 1437, 1424, 1378, 1342, 1236, 1135, 1110, 1042, 982 <u>UV</u> λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 269 (3.95), 241 (4.26) CD: siehe Tabelle 10, S. 65 ESIMS m/z (rel. Int): 541 $[M+Na]^+$ (49), 519 $[M+H]^+$ (9), 297 (100), 267 (60) EIMS (70 eV) m/z (rel. Int.): 297 (100), 282 (3), 267 (11), 253 (3) Hochaufgelöstes ESIMS: Gefunden Berechnet Summenformel 541.2926 541.2933 $C_{33}H_{42}NaO_5$ Hochaufgelöstes EIMS: Gefunden Berechnet Summenformel 297.1127 297.1123 $C_{18}H_{17}O_4$

¹<u>H-NMR</u> und ¹³<u>C-NMR</u>: siehe Tabelle 11, S. 71

4 Zusammenfassung

In der vorliegende Arbeit wird über phytochemischen Untersuchungen der beiden vietnamesischen Heilpflanzen *Tabernaemontana bovina* Lour (Apocynaceae) und *Fissistigma bracteolatum* Chatterjee (Annonaceae) berichtet.

Die Trennung bzw. Reinigung der Inhaltsstoffe aus den beiden Pflanzen erfolgte durch mehrfache präparative Dünnschicht- und Säulenchromatographie an Kieselgel oder RP8 mit verschiedene Laufmitteln.

Die bekannten Verbindungen wurden durch Vergleich der MS- und NMR-Spektren mit Literaturdaten identifiziert. Die Konstitution und relative Konfiguration der neuen Substanzen wurden durch kombinierte Anwendung von IR, UV, MS und besondere 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie ermittelt. Die absolute Konfiguration erfolgte durch Röntgenstrukturanalyse sowie Circular Dichroismus.

* *Tabernaemontana bovina* Lour

Aus den Blättern und Stengeln von *Tabernaemontana bovina* wurden 14 Indolalkaloide isoliert. Sie gehören zu den Ibogain- und Plumeran-Typ, die oft in *Tabernaemontana*-Gattung vorkommen.

Davon sind folgende acht Alkaloide bekannt: (-)-Mehranin (1), Hecubin (4), (-)-Ibogain (5), Ibogalin (6), 19-epi-Voacristin (7), 19-epi-Isovoacristin (8), 19-Hydroxyconopharyngin (9) und Pedunculin (10).

Die folgenden sechs neuen Alkaloide wurden strukturell aufgeklärt:

- . 3-Oxomehranin (2)
- 14α , 15β -Dihydroxy-*N*-methylaspidospermidin (**3**)
- . Methylenbismehranin (11)
- . Tabernaebovin (12)
- . Tabernaemontabovin (13)
- . Tabernaemontavin (14)

Es ist auffällig, daß sich alle sechs neuen Verbindungen vom (-)-Mehranin (1), einem pentacyclischen Aspidospermindin mit einer Epoxygruppe an C-14 und C-15 des Piperidinrings, ableiten oder eine Mehranin-Struktureinheit enthalten. Die Verbindungen 2 und 3 unterscheiden sich durch verschiedene Substitution im Piperidinring. Bei den Bisindolen neuartigen Strukturtyps sind entweder zwei Mehranin-Moleküle miteinander verknüpft (11 und 12), oder ein Mehranin ist mit einem umgelagerten Molekülteil mit 8 oder 9-gliedrigem Heterocyclus (13 und 14) verbunden. Die Auswertung der Kernresonanz-Spektren, die stark überlappende Protonensignale zeigten, gelang durch umfangreiche Anwendung der 2D-NMR-Methoden (¹H-¹H-COSY-, HSQC-, HMBC- und NOESY-Spektren). Dadurch konnten auch die komplizierten Strukturen der Bisindolalkaloide 11, 12, 13 und 14 ermittelt werden. Die Konstitution sowie die relative Konfiguration des monomeren Alkaloids 3 wurde weiterhin durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt.

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von (-)-Mehranin wurde eine Röntgenstrukturanalyse des Monohydrobromids durchgeführt. Der Vergleich der CD-Spektren der neuen Alkaloide 2 und 3 mit dem CD-Spektrum von (-)-Mehranin (1) ergab identische absolute Konfigurationen für alle drei Verbindungen. Aus biologischen Erwägungen wird auch bei den dimeren Alkaloide die gleiche Absolutkonfiguration des Mehranin-Teils angenommen.



* *Fissistigma bracteolatum* Chatterjee

Untersuchungen über Inhaltsstoffe aus den volkmedizinisch verwendeten Blättern und Stengeln von *Fissistigma bracteolatum* führten zur Isolierung der zwei bekannten Verbindungen 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcon (**15**) und 5,7,8-Trimethoxyflav-3-en (**21**) sowie von fünf neuen Chalconoiden und vier neuen Flavenen, die mit einem Sesquiterpen verbunden sind.

Die neuen Chalconoide sind:

. 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxychalcen (16)

- . 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxydihydrochalcon (17)
- . 2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxydihydrochalcon (18)
- · 2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy- β '-methoxychalcan (19)
- . 2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxy- β '-ethoxychalcan (20)

Die Verbindungen 18-20 besitzen das gleiche Substitutionsmuster (2'-OH, 3',4',6'-OMe) in Ring A, während dieses Substitutionsmuster bei Verbindungen 16 und 17 in Ring B erscheint. Diese gehören deshalb zu den "*Retro*"-Chalconoiden, welche im Pflanzenreich selten vorkommen.

Die neuen mit einem Sesquiterpen verbundenen Flavene sind:

- . Fissistigmatin A (22)
- Fissistigmatin B (23)
- . Fissistigmatin C (24)
- . Fissistigmatin D (25)

Aus den spektroskopischen Daten wurde ermittelt, daß alle 4 Verbindungen als Flaven-Baustein das 5,7,8-Trimethoxyflav-2-en enthalten. Die Sesquiterpenteile von 22-24 gehören zum Eudesman-Typ, während Verbindung 25 ein Aromadendran-Sesquiterpen enthält. Alle Sesquiterpene sind an C-4 des Flavens gebunden. Die relative Konfiguration aller Verbindungen konnte durch NOESY-Spektren ermittelt werden. Zur Bestimmung absoluten der Konfiguration wurde die Verbindung 22 mit p-Brombenzoylchlorid verestert und von diesem Ester eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Als Ergebnis ergibt sich die R-Konfiguration an C-4, wobei die Sesquiterpen-Substruktur mit der Flaven-Subtruktur einen Winkel von ca. 90° bildet. Durch Vergleich der NMR- und CD-Spektren der übrigen Verbindungen erhält man für 24 die gleiche Konfiguration an C-4 (R) wie bei 22, für 23 und 25 jedoch die umgekehrte 4S-Konfiguration (25 gehört bezüglich C-4 zur gleichen stereochemischen Reihe wie 22 und 24, aufgrund des Methylsubstituenten an C-11'' ändert sich bei **25** jedoch formal die Bezeichnung der Konfiguration an C-4).

Naturstoffe mit der Verknüpfung zwischen einem Flavon und einem Sesquiterpen sind bis jetzt noch nicht bekannt, so daß mit den vier gefundenen Verbindungen eine neue Naturstoffklasse entdeckt wurde. Ein möglicher Biosyntheseweg für diesen neuen Strukturtyp wurde vorgeschlagen.



5 Literaturverzeichnis

- K. Hostettman und P. J. Lea (eds.), Biologically active natural products, Clarendon Press, Oxford, **11** (1987)
- 2 J. B. Harborne und F. A. Tomas-Barberan (eds.), Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids, Clarendon Press, Oxford, **16** (1991)
- 3 G. Adam, Pharmazie, **29**, 737 (1974)
- 4 G. Adam, Spektrum, **14**, 24 (1983)
- 5 J. Bielenberg, Pharmazie in unserer Zeit, 6, 272 (1998)
- 6 G. A. Cordell, Phytochem., 40, 1585-1612 (1995)
- 7 M. Hamburger, et al., Phytochem., **30**, 3864-3874 (1991)
- 8 K. Hostettmann, et al., Planta medica, **63**, 2-10 (1997)
- 9 G. Adam, Abstrakt in "Deutsch-Vietnamesisches Symposium über Naturstoffchemie " in Hanoi, 15-24.4.98
- 10 P. H. Abelson, Science, 247, 513 (1990)
- 11 T. A. Van Beek, et al., J. Ethnopharm., 10 (1984)
 - a. S. 113
 - b. S. 35
 - c. S. 135
- 12 T. D. Ly, 1900 Used Plant Species in Vietnam, The Gioi Press, Hanoi, 29 (1993)
- 13 V. V. Chi, Tu Dien Cay Thuoc Vietnam (A Dictionary of Vietnamese Medicinal Plant), Y Hoc Printing, Ho Chi Minh, 713 (1997)
- 14 T. A. van Beek, et al., (S. William Pelletier, ed.), Alkaloids: Chemical and biological perspectives, JohnWiley & Sons Press, New York, 6 (1988)a. S. 78
 - b. S. 76

c. S. 87-90

- 15 T. D. Ly, Feddes Repertorium aus dem Bereich Botanik und Arboretum des Museums f
 ür Naturkunde der Humboldt-Univesit
 ät zu Berlin, 97, 451 (1986)
- 16 M. Perry, Medicinal Plants of East and Southeast Asia, the MIT Press, Cambridge (1980)

a. S. 24-25

b. S. 19

- 17 M. Lounasmaa, et al., (G. A. Cordell, ed.), The Alkaloids, Academic Press, San Diego, 52, 104-195 (1999)
- 18 I. W. Southon, et al., Dictionary of Alkaloids, Chapman and Hall, London (1989)
- 19 R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhäuser Verlag, Basel, 3,124-163 (1964)
- 20 M. V. Kisakürek, et al., (S. William Pelletier, ed.), Alkaloids: Chemical and biological perspectives, John Wiley & Sons Press, New York, **1**, 262 (1983)
- 21 Xiao Zhang Feng, et al., Planta medica, 44, 212-214 (1982)
- 22 Xiao Zhang Feng, et al., J. Nat. Prod., 44, 670-675 (1981)
- 23 P. H. Ho, Cay co Vietnam (An Illustrated Flora of Vietnam), Mekong Press, Santa Ana, **2**, 882 (1993)
- 24 A. J. M. Leeuwenberg, A Revision of Tabernaemontana, Royal Botanic Gardens Press, Kennt, 125 (1991)
- 25 J. Mokry´, et al., Colletion Czechchoslov. Chem. Commun., **32**, 2523-2531 (1967)
- 26 Atta-ur-Rahman, et al., Z. Naturforsch., 38b, 1700-1701 (1983)
- 27 Toh-Seok Kam, et al., Phytochem., 40, 313-316 (1995)
- 28 K. Merzweiler, T. P. Lien, T. V. Sung, H. Ripperger, G. Adam, J. Prakt. Chem., 69-71 (1999)

- 29 T. P. Lien, H. Ripperger, A. Porzel, K. Merzweiler, T. V. Sung, G. Adam, Phytochem., **49**, 1457-1461 (1998)
- 30 Monique Ze`chec-Hanrot, et al., Phytochem., 40, 587-591 (1995)
- 31 Kanwal Raj, et al., Phytochem., **13**, 1621-1622 (1974)
- 32 M. Hesse, Indolalkaloide, Verlag Chemie, Weinheim, **1** (1974)
 - a. S. 15-19
 - b. S. 217
- 33 Liu Gui, et al., Planta medica, 519-521 (1988)
- 34 Atta-ur-Rahman, et al., Z. Naturforsch., **38b**, 117-119 (1983)
- 35 J. E. Saxton, (G. A. Cordell, ed.), The Alkalois; Chemistry and Biology, Academic Press, San Diego, **51**, 22 (1998)
- 36 K. Bla'ha, et al., Tetrahedron Lett., **27**, 2763-2766 (1972)
- 37 Hans Achenbach, et al., Z. Naturforsch. 35b, 219-225 (1980)
- 38 Mohamed Damak, et al., Tetrahedron Lett., **39**, 3531-3534 (1976)
- 39 K. Bla'ha, et al., Collection Czechoslov. Chem. Commun., **39**, 2258-2266 (1974)
- 40 G. A. Cordell, Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach, John Wiley & Sons Press, New York, 761 (1981)
- 41 T. V. Beek, et al., Phytochem., 23, 1771-1778 (1984)
- 42 Norbert Neuss, J. Org. Chem., 24, 2047-2048 (1959)
- 43 T. R. Govindachari, et al., Tetrahedron Lett., 43, 3873-3878 (1965)
- 44 S. P. Gunasekera et al., Phytochem., **19**, 1213-1218 (1980)
- 45 Atta-ur-Rahman, Planta medica, **51**, 57-59 (1987)
- 46 Premila Perera, et al., Planta medica, 47, 148-150 (1983)
- 47 F. Ladhar, et al., J. Nat. Prod., 44, 459-465 (1981)
- 48 H. Takayama, et al., Chem. Pharm. Bull., 42, 280-284 (1994)
- 49 T. A. van Beek, et al., J. Nat. Prod., 48, 400-423 (1985)

- 50 T. S. Kam, et al., Tetrahedron Lett., **33**, 969 (1992)
- 51 T. S. Kam, et al., J. Nat. Prod., 56, 1865 (1993)
- 52 T. P. Lien, C. Kamperdick, T. V. Sung, G. Adam, H. Ripperger, Phytochem.,49, 1797-1799 (1998)
- 53 H. Ripperger, T. P. Lien, C. Kamperdick, T. V. Sung, G. Adam, Two further bisindole Alkaloids from *T. bovina*, im Druck (J. Prakt. Chem).
- 54 H. Takayama, et al. (G. A. Cordell, ed.), The Alkaloids; Chemistry and Biology, Academic Press, San Diego, **55**, 444-447 (1998)
- 55 M. Leboeuf et al., Phytochem., **21**, 2783-2813 (1982)
- 56 A. Cave, et al., Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Springer Verlag, Wien, 70, 82 (1997)
- 57 R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhäuser Verlag, Basel, 8, 42-48 (1989)
- 58 G. J. Chang, et al., Br. J. Pharmacol., **118**, 1571-1583 (1996)
- 59 W. J. Bin, et al., Chem. Pharm. Bull., **42**, 2202-2204 (1994)
- 60 S. T. Lu, et al., Phytochem., **24**, 1829-1834 (1985)
- 61 Y. C. Chia, et al., Phytochem., 48, 367-369 (1998)
- 62 Y. Alias, et al., J. Nat. Prod., 58, 1160-1166 (1995)
- 63 L. Shang, et al., Yunnan Zhiwu Yanjiu, **16**, 191-195 (1994)
- 64 P. H. Ho, Cay co Vietnam (An Illutstrated Flora of Vietnam), Mekong Press, Santa Ana, **2**, 329 (1993)
- 65 L. Jurd, (T. A. Geissman, ed.), The Chemistry of Flavonoids Compounds, Pergamon Press, Oxford, 141-147 (1962)
- 66 S. E. Drewes, (H. Budzikiewicz, ed.), Progress in Mass Spectrometry, **2**: Chroman and Related Compounds, Verlag Chemie, Weinheim (1979)
 - a. S. 61-63
 - b. S. 54-55

- 67 P. K. Agrawal, et al., (P. K. Agrawal ed.), Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Press, Amsterdam, 365-427 (1989)
- 68 A. Makriyannis, et al., Tetrahedron Lett., **30**, 2753-2756 (1979)
- 69 M. H. H. Nkunya, et al., Phytochem., **34**, 853-856 (1993)
- 70 J. B. Harborne (ed.), The Flavonoids, advances in research since 1986Chapman & Hall Press, London (1993)
 - a. Bruce A. Bohn, S. 398
 - b. Werner Heller et al., S. 502
 - c. R. Bruoillard, et al., S. 566-568
- 71 Shin-ichi Ayabe, et al., Phytochem., **19**, 2179-2183 (1980)
- 72 D. Meksuriyen et al., J. Natur. Prod., **51**, 1129-1135 (1988)
- 73 H. Achenbach, et al., Phytochem., 27, 1835-1841 (1988)
- 74 A. Sinz, et al., Phytochem., 50, 1069-1072 (1999)
- 75 K. Ichino, et al., J. Nat. Prod., **51**, 915-917 (1988)
- 76 S. Morimoto, et al., Chem. Pharm. Bull., **36**, 39-47 (1988)
- 77 Kazuhiko Ichino, et al., Chem. Pharm. Bull., 35, 920-923 (1987)
- 78 H. Shimomura, Phytochem., 27, 3937-3939 (1988)
- 79 M. Iinuma, et al., Chem. Pharm. Bull., 28, 708-716 (1980)
- 80 Wolf-Rainer Abraham, et al., Phytochem., **31**, 3749-3755 (1992)
- 81 Martin Luckner, Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 182-204 (1990)
- 82 E. Haslam, (J. B. Harborne und T. J. Mabry, ed.), The Flavonoids, advances in research, Chapman & Hall Press, London, 442-443 (1982)
- 83 E.Stahl, Dünnschichtchromatographie, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin (1967)

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1996 bis Juni 1999 im Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Naturstoffchemie, durchgeführt.

Danksagungen

Meinem Betreuer, Herrn Professor Dr. G. Adam möchte ich tiefen Dank aussprechen für die Überlassung des interessanten Themas, die wertvollen Hinweise und Diskussionen sowie für die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. habil. H. Ripperger danke ich herzlich für die Anleitung, die Auswertung zahlreicher NMR-Spektren sowie für wertvolle Hinweise und Diskussionen.

Frau Dr. A. Porzel und Frau Dr. C. Kamperdick bin ich für viele vertiefende NMR-Messungen, ihre Auswertung sowie die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes sehr verbunden. Herrn Dr. J. Schmidt danke ich für die Aufnahme der Massenspektren sowie zahlreiche Hinweise.

Herrn Prof. Dr. Merzweiler und Herrn Dr. Ch. Wagner danke ich für die Röntgenstrukturanalyse

Mein Dank gilt Herrn Dr. habil. D. Gross und Herrn Dr. habil. H. W. Liebisch für die freundliche Hilfe, Frau M. Süße für NMR-, IR- und CD-Messungen, Frau I. Horn für die Messung von Massenspektren.

Für technische Hilfe bei den Zeichenarbeit danke ich Frau C. Kaufmann und Frau A. Kohlberg.

Allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenbiochemie, die durch freundliche Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, möchte ich ebenfalls herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Tran Van Sung, Institut für Chemie, N. Z. N. F. T des Vietnams, möchte ich meinen aufrichtigen Dank sagen für wertvolle Unterstützung.

Der DAAD-Stiftung danke ich herzlich für die Finanzierung eines Forschungsaufenthaltes im Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/S.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Halle/Saale, den 4. 6. 1999

Trinh Phuong Lien

Lebenslauf

Name	: Trinh Phuong Lien		
geboren	: 11. 05. 1971 in Hanoi/Vietnam		
Staatsangehörigkeit	: vietnamesisch		
Familienstand	: ledig		
Schulbildung/Studium			
Sept. 1977-Juni 1988	: Grundschule, Mittelschule, Sekundärschule/ Abitur		
Okt. 1988-März 1993	: Studium an Universität Hanoi/Diplom		
Apr. 1993-Apr. 1996	: Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Naturstoffchemie des Institutes für Chemie, N. Z. N. F. T des Vietnams		
Apr. 1996-Sept. 1996	: Sprachkurs der deutschen Sprache in Göttingen		
Sept. 1996-Juli 1999	: Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Naturstoffchemie des Institutes für Pflanzenbiochemie im Rahmen eines DAAD- Austauschsprogramms zur Untersuchung der vietnamesischen Heilpflanzen		

Halle, den 4. 6. 1999

Trinh Phuong Lien