

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

---

**Isolierung, Identifizierung und Partialsynthese  
von Pflanzeninhaltsstoffen aus  
*Croton flavens* L.**

---

von

Wolfram Johannes Eisenreich

aus

München

2002

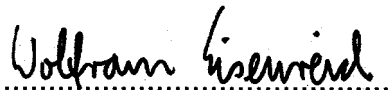
## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. F. Bracher betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 08.03.2002

A handwritten signature in black ink, reading "Wolfram Eisenreich", written over a horizontal dotted line.

(Wolfram Eisenreich)

Dissertation eingereicht am	08.03.2002
1. Gutachter	Prof. Dr. F. Bracher
2. Gutachter	Prof. Dr. E. Reimann
Mündliche Prüfung am	11.04.2002

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 1999 bis April 2002 am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Bracher. Für seine großzügige Förderung und Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. E. Reimann danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Einen großen Dank möchte ich an die Hanns-Seidel-Stiftung richten, die mich seit dem 1. Juli 2000 aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) mit einem Begabtenstipendium fördert.

Für die Mithilfe bei der Isolierung der Pflanzeninhaltsstoffe möchte ich mich bei Herrn O. Lenk und ganz besonders bei Frau E. Armbrust bedanken. Herrn Dr. G. Höfner möchte ich für die Durchführung der GABA-Rezeptorbindungsstudien und Herrn M. Strobl für die Mithilfe bei den Untersuchungen zur Spurenanalytik bei verschiedenen *Croton*-Pflanzen danken. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. J. Krauß und Herrn J. Müller für viele Tipps, Anregungen und fachliche Gespräche.

Herrn Prof. Bringmann und seinen Mitarbeitern möchte ich für die Aufklärung der Konfiguration der Morphinandienon-Dimere sehr herzlich danken.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, besonders Herrn I. Rais, Frau C. Berns und der „Spätaufsteher-Frühstücksrunde“, möchte ich für das gute Arbeitsklima und den freundschaftlichen Umgang danken.

Danken möchte ich Herrn Dr. H. Lerche und seinem Team für die Anfertigung der NMR- und Massenspektren sowie für seine Mithilfe bei der Strukturaufklärung.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden Herrn J. Leikert und Herrn C. Müller, mit denen ich seit dem ersten Tag des Pharmaziestudiums trotz mancher Versuchung immer auf dem Pfad der Wissenschaft geblieben bin.

Ich möchte nicht vergessen, die Mitglieder der Pharma-Fußballmannschaft zu erwähnen. Mit ihnen verbinden mich viele schöne Erlebnisse und Titelgewinne, die mich immer wieder für den Laboralltag motiviert haben.

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

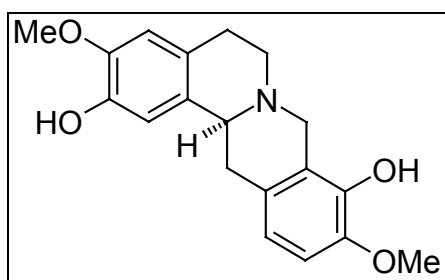
<b>A. Formelübersicht</b> .....	<b>1</b>
<b>B. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>C. Allgemeiner Teil</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Allgemeine Übersicht</b> .....	<b>6</b>
1.1 Systematik und Verbreitung.....	6
1.2 Botanische Beschreibung .....	6
1.3 Bisher bekannte Inhaltsstoffe von <i>Croton flavens</i> L.....	7
1.4 Volksmedizinische Anwendung .....	8
<b>2 Phytochemische Untersuchung von <i>Croton flavens</i> L.</b> .....	<b>9</b>
2.1 Aufgabenstellung .....	9
2.2 Extraktgewinnung und Isolierung der Verbindungen .....	9
2.2.1 Vorbereitung .....	9
2.2.2 Strauch A.....	10
2.2.3 Strauch B und C .....	12
2.2.4 Strauch D.....	13
2.2.5 Strauch E.....	13
2.3 Strukturaufklärung der Tetrahydroprotoberberine.....	15
2.3.1 Allgemeines über Protoberberine .....	15
2.3.2 Scoulerin.....	16
2.3.3 Coreximin .....	19
2.4 Strukturaufklärung der Morphinandienone.....	25
2.4.1 Allgemeines über Morphinandienone .....	25
2.4.2 Salutarin .....	26
2.4.3 Salutaridin.....	31
2.4.4 O-Methylflavinantin .....	32
2.4.5 Norsinoacutin.....	38
2.4.6 Flavinantin .....	40
2.5 Strukturaufklärung der Morphinandienon-Dimere.....	45
2.5.1 Saludimerin A .....	45
2.5.2 Saludimerin B .....	50
2.5.3 Aufklärung der absoluten Konfiguration von Saludimerin A und B.....	57
2.5.4 Salsinodimerin .....	63
2.6 Strukturaufklärung von Salutarin-N-oxid .....	67

2.6.1	Allgemeines über Alkaloid- <i>N</i> -oxide .....	67
2.6.2	Salutarin- <i>N</i> -oxid .....	67
2.7	Strukturaufklärung des Phenanthrens Crotoflavol .....	69
<b>3</b>	<b>Spurenanalytik bei weiteren <i>Croton</i>-Pflanzen .....</b>	<b>74</b>
<b>4</b>	<b>Partialsynthesen .....</b>	<b>78</b>
4.1	Norsalutarin .....	78
4.2	Sinoacutin .....	79
4.3	<i>O</i> -Methylsalutarin.....	80
4.4	Salutarin- <i>N</i> -oxid .....	80
4.5	Salutaridinol (I) und 7- <i>epi</i> -Salutaridinol (II) .....	81
4.6	Saludimerin A .....	81
4.7	Saludimerin B und Salsinodimerin .....	81
<b>5</b>	<b>Stereochemie und Biosynthese der Alkaloide .....</b>	<b>83</b>
5.1	Allgemeines und Aufgabenstellung.....	83
5.2	Biosynthese der Benzylisochinolin-Alkaloide .....	84
5.2.1	Biosynthese von ( <i>S</i> )-Retikulin.....	84
5.2.2	Biosynthese der Tetrahydroprotoberberine .....	86
5.2.3	Biosynthese der Morphinandienone .....	86
5.2.4	Biosynthese von Thebain, Codein und Morphin .....	89
5.2.5	Synthese von Salutaridinol .....	90
5.3	Aufklärung der Stereochemie von Salutarin und Salutaridin .....	91
5.4	Analytische Trennung der Enantiomere.....	92
5.5	Enantiomerentrennung über Kristallisation diastereomerer Salze .....	94
<b>6</b>	<b>Pharmakologische Untersuchungen.....</b>	<b>95</b>
6.1	Externe Untersuchungen .....	95
6.2	GABA-Rezeptor Bindungsstudien.....	95
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>D.</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>102</b>
<b>1</b>	<b>Herkunft des Drogenmaterials.....</b>	<b>102</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeine Angaben.....</b>	<b>102</b>
<b>3</b>	<b>Isolierung der Inhaltsstoffe .....</b>	<b>107</b>
3.1	Phytochemische Untersuchungen des <i>Croton</i> -Strauches A .....	107
3.2	Inhaltsstoff-Screening der <i>Croton</i> -Sträucher B - D .....	108
3.3	Phytochemische Untersuchungen des <i>Croton</i> -Strauches E .....	109
<b>4</b>	<b>Spurenanalytik bei weiteren <i>Croton</i>-Pflanzen .....</b>	<b>112</b>

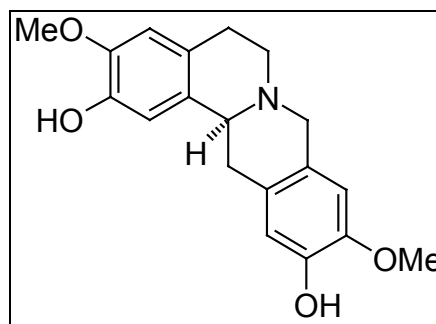
<b>5</b>	<b>Physikalische Daten der isolierten Verbindungen</b> .....	<b>113</b>
5.1	Protoberberine .....	113
5.1.1	Scoulerin.....	113
5.1.2	Coreximin .....	114
5.2	Morphinandienone .....	115
5.2.1	Salutarin .....	115
5.2.2	Salutaridin.....	116
5.2.3	O-Methylflavinantin .....	117
5.2.4	Norsinoacutin.....	118
5.2.5	Flavinantin .....	119
5.3	Dimere der Morphinandienone .....	120
5.3.1	Saludimerin A .....	120
5.3.2	Saludimerin B .....	121
5.3.3	Salsinodimerin .....	122
5.4	Salutarin-N-oxid .....	124
5.5	Crotoflavol.....	125
<b>6</b>	<b>Partialsynthesen</b> .....	<b>126</b>
6.1	Norsalutarin .....	126
6.2	Sinoacutin .....	127
6.3	O-Methylsalutarin.....	128
6.4	Salutarin-N-oxid .....	130
6.5	Salutaridinol (I) und 7-epi-Salutaridinol (II) .....	131
6.6	Saludimerin A .....	133
6.7	Saludimerin B und Salsinodimerin.....	134
<b>7</b>	<b>Bindung an GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren</b> .....	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>Enantiomerentrennung über Kristallisation diastereomerer Salze</b> .....	<b>136</b>
<b>E.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>137</b>
<b>1</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b> .....	<b>137</b>
<b>2</b>	<b>Spektrenanhang</b> .....	<b>139</b>
2.1	NMR-Spektren .....	139
2.2	CD-Spektren .....	143
<b>3</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>147</b>

## A. Formelübersicht

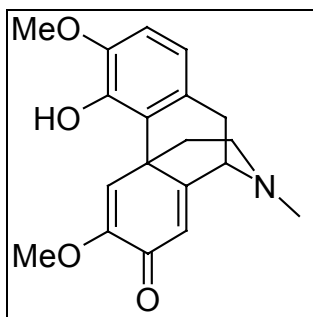
Sind Substanzen mit römischen Ziffern (I) beschriftet, wurden sie nicht im Rahmen dieser Arbeit aus *Croton flavens* L. isoliert. Folgende Strukturen, die mit arabischen Ziffern (1) nummeriert wurden, sind dagegen in den untersuchten Pflanzen gefunden worden. Die mit \* gekennzeichneten Substanzen sind neue Naturstoffe.



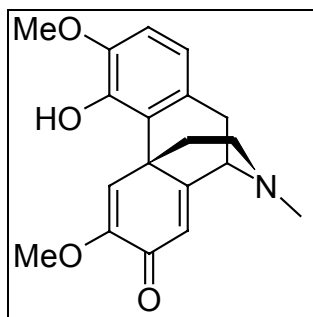
Scoulerin (1)



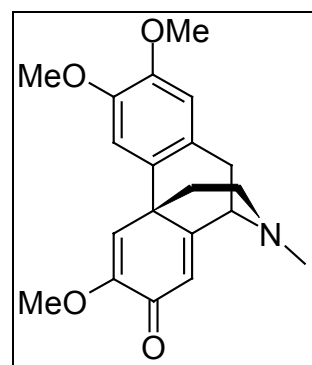
Coreximim (2)



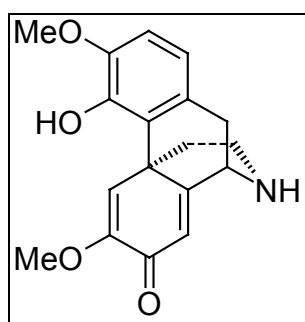
Salutarin (3)



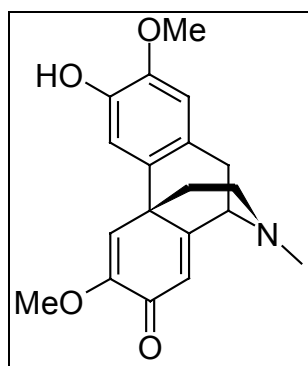
Salutaridin (3a)



O-Methylflavinantin (4)

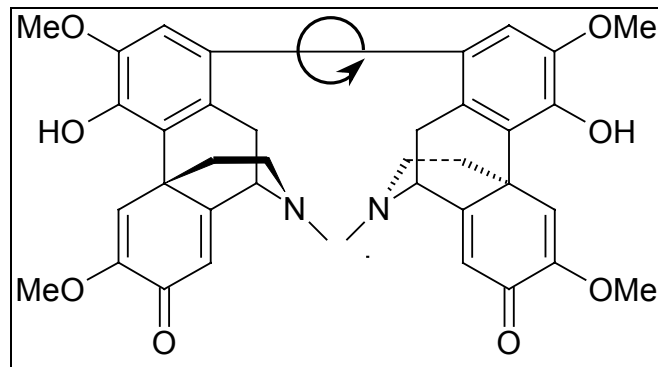


Norsinoacutin (5)

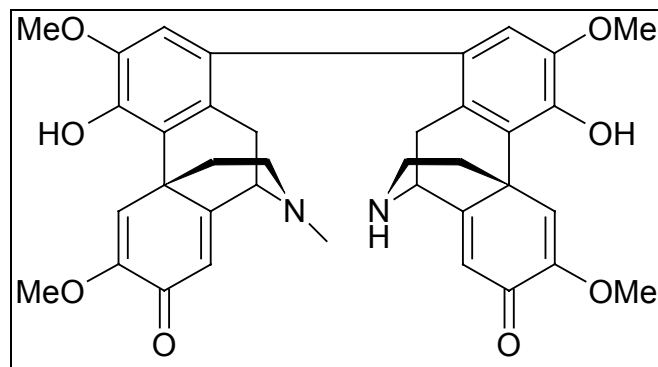


Flavinantin (6)

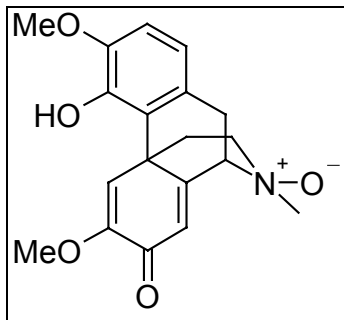




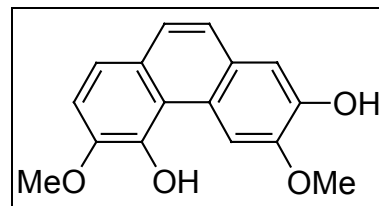
Saludimerin A (7\*) und Saludimerin B (8\*)



Salsinodimerin (9\*)

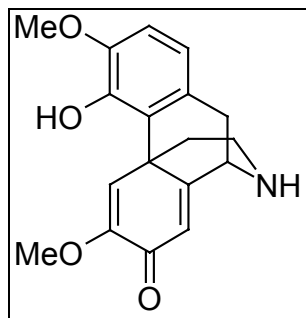


Salutarin-N-oxid (10)

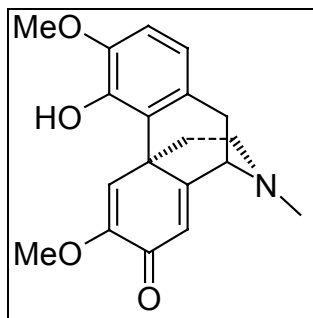


Crotoflavol (11\*)

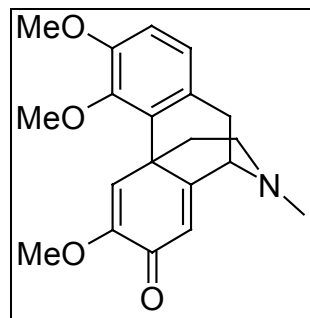
Folgende Verbindungen wurden außerdem partialsynthetisch hergestellt:



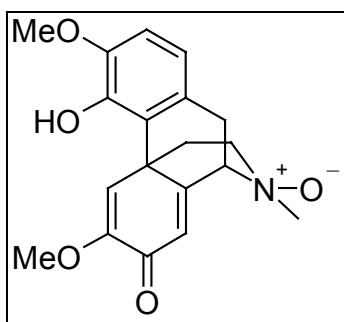
Norsalutarin



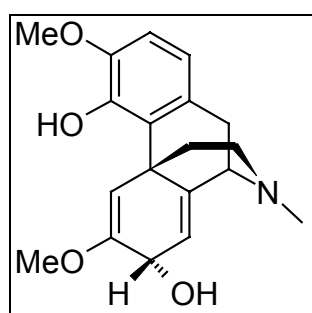
Sinoacutin (**3b**)



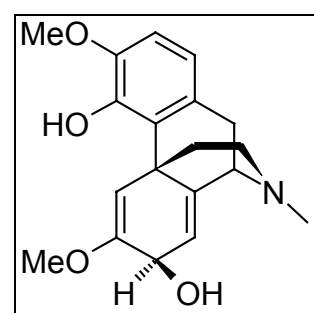
O-Methylsalutarin



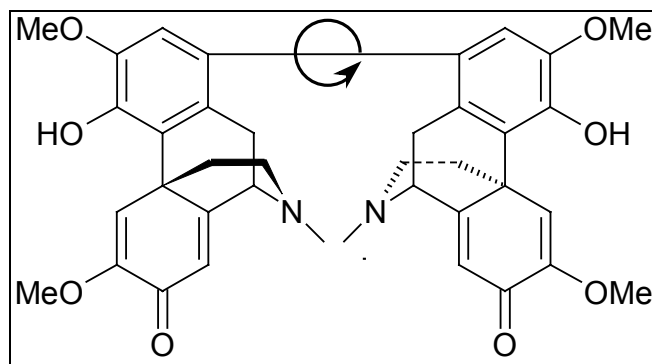
Salutarin-N-oxid (**10**)



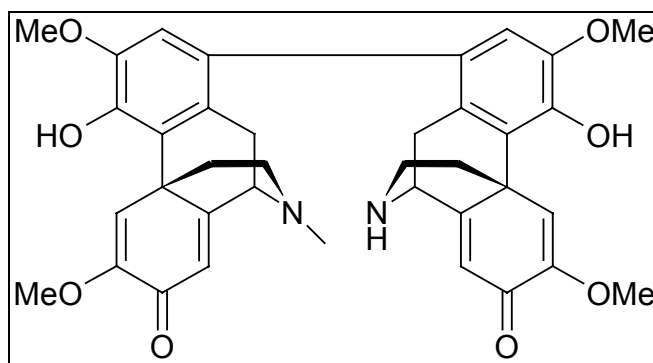
Salutaridinol I



7-epi-Salutaridinol



Saludimerin A (**7\***) und Saludimerin B (**8\***)



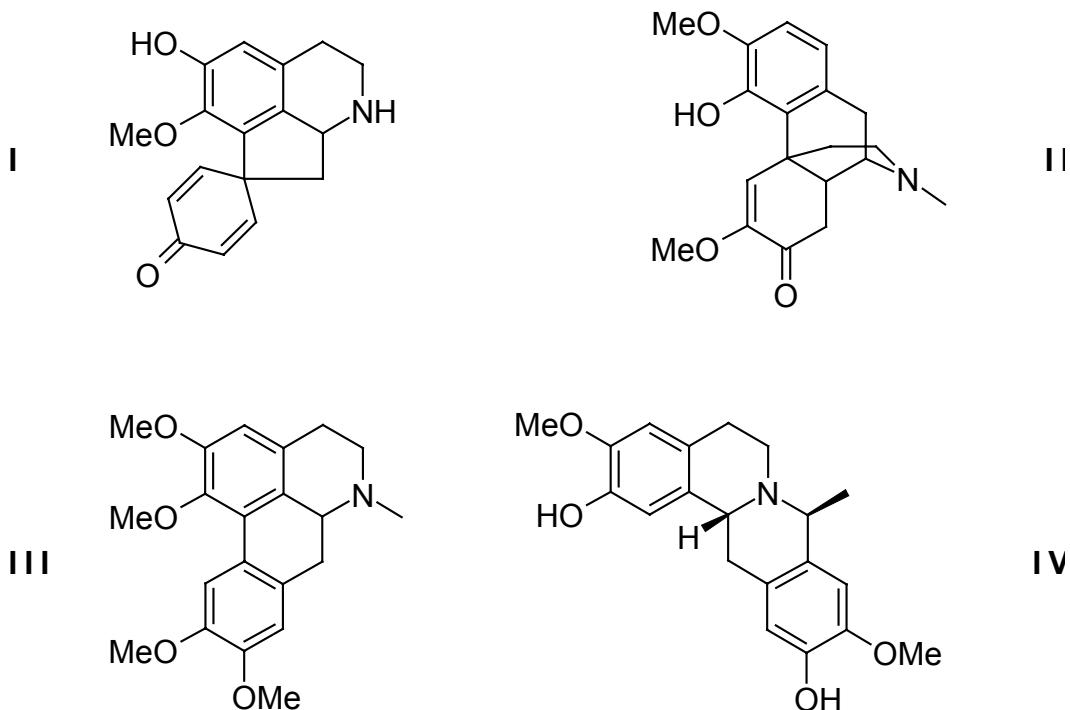
Salsinodimerin (**9\***)

## B. Einleitung

Die Familie der Euphorbiaceae umfasst ca. 283 Gattungen, deren größte Vertreter *Euphorbia*, *Croton*, *Phyllanthus* und *Acalypha* sind. Die Gattung *Croton* umfasst ca. 700 Arten, die weit verbreitet in verschiedenen Regionen der Tropen gedeihen. Mehr als zwei Drittel aller Arten wachsen in Amerika. Es treten aber auch zahlreiche Vertreter in Afrika und Madagaskar auf.

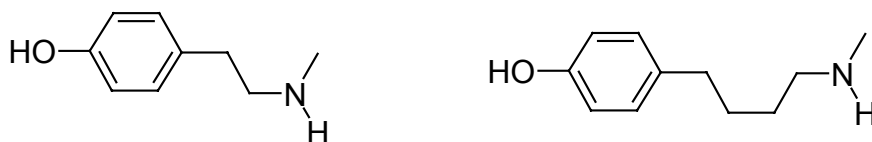
Da eine durchgreifende Revision der Gattung aussteht, fehlt ein aktuelles Konzept zur intragenerischen Gliederung. Die Nomenklatur ist uneinheitlich und oft werden Synonyme für die gleiche Art verwendet.<sup>1</sup>

Nur wenige Arten sind bis jetzt phytochemisch untersucht worden. Besonderes Interesse wecken die häufig vorkommenden Alkaloide des Benzyltetrahydroisochinolin-Typs.<sup>2</sup> So wurden z. B. Proaporphine (I) und Morphinane (II) in *Croton linearis* und *Croton plumieri* gefunden.<sup>3</sup> Alkaloide des Aporphin-Typs (III) kommen z. B. in *Croton draconoides*<sup>4</sup> und *Croton celtidifolius*<sup>5</sup> vor. 1998 wurde erstmalig ein Tetrahydroprotoberberin (Hemiargyrin IV) aus einer *Croton*-Spezies isoliert.<sup>6</sup>



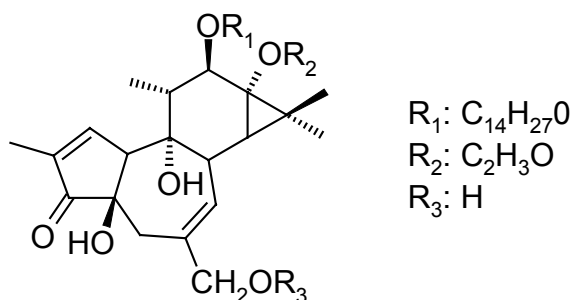
I: Crotonosin, II: 8,14-Dihydrosalutaridin, III: Glaucin, IV: Hemiargyrin

Neben den Benzylisochinolin-Alkaloiden konnten aus *Croton humilis* N-Methyltyramin-Derivate und Homologe isoliert werden.<sup>7</sup>



**Abb. 1:** N-Methyltyramin mit homologem Derivat

Daneben kommen in einigen Arten Diterpene vor. Die sogenannten Phorbolster des Tigliantyps (**V**) aus *Croton tiglium* sind dabei von besonderer Bedeutung. Zum einen zeigen sie tumorpromovierende Eigenschaften.<sup>8</sup> Es wurde aber auch gezeigt, dass einige dieser Substanzen Anti-HIV Wirkung besitzen.<sup>9</sup> Weitere Inhaltsstoffe sind ätherische Öle, fette Öle und Gerbstoffe.



**V:** 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)

In der Volksmedizin haben viele *Croton*-Arten ihre Verwendung gefunden. So wird *Croton campestris* bei sekundärer Syphilis, Lymphatitis, Fieber und Flechten verwendet. Aus dem Latex von *Croton draconoides* wird Mexikanisches Drachenblut gewonnen und zur Wundheilung genutzt. In Mittelamerika wurden die getrockneten Blätter von *Croton linearis* bei Koliken verschrieben. Laut DAB 6 wird durch kalte Pressung der reifen, schwach gerösteten Samen von *Croton tiglium* Crotonöl gewonnen. Dieses ist ein Bestandteil in den Baunscheidtölen, die als unspezifisches Hautreizmittel zur Behandlung von rheumatischen Beschwerden verwendet werden.<sup>10</sup> Angesichts der enthaltenen tumorpromovierenden Diterpenester ist von der längerfristigen Applikation dieser Öle abzuraten.

## C. Allgemeiner Teil

### 1 Allgemeine Übersicht

#### 1.1 Systematik und Verbreitung

Die untersuchten Pflanzen lassen sich systematisch ins Pflanzenreich wie folgt einordnen:<sup>11</sup>

Abteilung:	Spermatophyta
Unterabteilung:	Magnoliophytina
Klasse:	Rosopsida
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Euphorbiales
Familie:	Euphorbiaceae
Unterfamilie:	Crotonoideae
Gattung:	<i>Croton</i>
Art:	- <i>flavens</i> L. - <i>balsamifera</i> Jacq. - <i>flavens</i> L. var. <i>balsamifera</i> (Jacq.) Muell. Arg.

Es werden drei Synonyme verwendet, die für ein und dieselbe Art stehen sollen. Bei näherer Betrachtung unterscheiden sich die Pflanzen jedoch stark von einander.

#### 1.2 Botanische Beschreibung

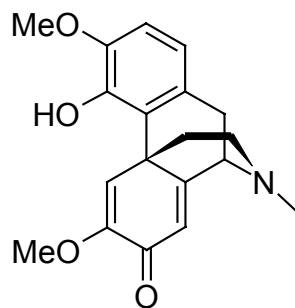
*Croton flavens* L. ist ein wohlriechender Strauch, der eine Höhe von ca. ein bis drei Metern erreicht. Die Blätter sind oval, vier bis dreizehn Zentimeter lang und ca. 4 Zentimeter breit. Die Blütentrauben sind 5 bis 10 Zentimeter lang und haben weibliche und männliche Kelche. Die Kapseln erreichen eine Größe von 5 Millimeter und die Samen sind dunkelgrau.



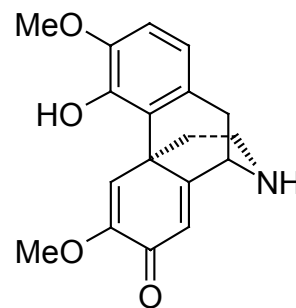
**Abb. 2:** Blätter und Blüten von *Croton flavens* L. [Foto Krauß, 1999]

### 1.3 Bisher bekannte Inhaltsstoffe von *Croton flavens* L.

Hier zeigt sich am deutlichsten, dass die Art nicht als homogen zu betrachten ist. Aus *Croton balsamifera* Jacq. von Barbados wurden die Morphinandienone Salutaridin (**3a**) und Norsinoacutin (**5**) isoliert.<sup>12</sup>

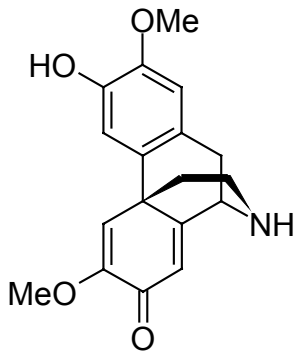


**3a**

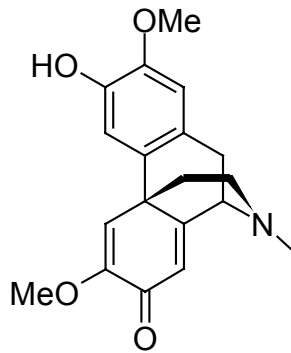


**5**

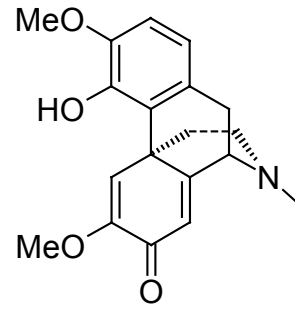
Bei *Croton flavens* L. von Jamaika wird noch weiter unterschieden zwischen Pflanzen mit ganzrandigen und gezackten Blättern. Bei der Art mit gezackten Blättern wurden die Morphinandienone Flavinin (**VI**) und Norsinoacutin (**5**) gefunden.<sup>13</sup> Aus der Art mit den ganzrandigen Blättern wurden Flavinantin (**6**), Sinoacutin (**3b**) und Norsinoacutin (**5**), aber kein Flavinin (**VI**) isoliert.<sup>14</sup>



**VI**

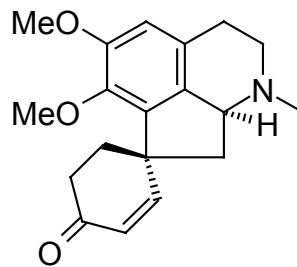


**6**



**3b**

Neueste Untersuchungen von *Croton flavens* L. aus Kolumbien ergaben, dass auch das Proaporphin (-)-Amuronin (**VII**) in der Pflanze vorkommt.<sup>15</sup>



**VII: (-)-Amuronin**

Neben Alkaloiden konnten aus den Wurzeln von *Croton flavens* L. aus Curaçao Hydroxyphorbolster des Tiglian-Typs, die sogenannten Crotonfaktoren, isoliert werden.<sup>16</sup>

Die Berichte über die unterschiedliche Zusammensetzung der Inhaltsstoffe führen alleine schon zu Verwirrungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden noch weitere Rätsel über die Homogenität dieser Art aufwerfen.

#### 1.4 Volksmedizinische Anwendung

Aus den Blättern von *Croton flavens* L. wird auf Curaçao der „Welensali-Tee“ zubereitet. In der Volksmedizin wird dieser für die Behandlung von Bauchschmerzen und Erkältungen verwendet. Auffällig ist, dass die Bevölkerung durch eine extrem hohe Inzidenzrate von Speiseröhrenkrebs belastet ist. Auslöser dafür könnten die Phorbolster des Tiglian-Typs sein.<sup>17</sup> Die Blätter werden außerdem innerlich bei Entzündungen im Mundbereich, Prostatabeschwerden und Nasenbluten sowie äußerlich bei schmerzenden Beinen verwendet.<sup>10</sup>

## 2 Phytochemische Untersuchung von *Croton flavens* L.

### 2.1 Aufgabenstellung

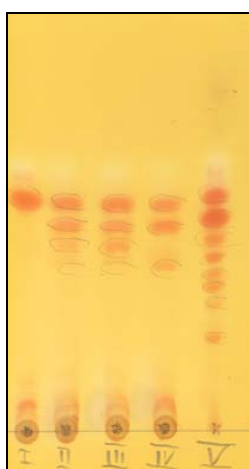
Im Gewächshaus des Departments für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München werden insgesamt fünf Sträucher der Art *Croton flavens* L. kultiviert. Diese wurden von Prof. Dr. J. Grau, Botanischer Garten München, und Prof. Dr. M. H. Zenk, Biozentrum – Pharmazie Universität Halle, auf Barbados in der Karibik gesammelt und identifiziert. Es wurden von verschiedenen Standorten auf der Insel Pflanzen bzw. Proben mitgebracht. Voruntersuchungen von Prof. Dr. M. H. Zenk haben gezeigt, dass die verschiedenen Pflanzen bzw. Proben unterschiedlichste Alkaloidgehalte besitzen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, Inhaltsstoffe aus diesen Pflanzen zu isolieren und zu identifizieren. Besonderes Augenmerk sollte auf der Untersuchung der Stereochemie der Alkaloide liegen.

### 2.2 Extraktgewinnung und Isolierung der Verbindungen

#### 2.2.1 Vorbereitung

Von den fünf Sträuchern wurden wenige Blätter gesammelt, mit Methanol versetzt, zerkleinert und einen Tag extrahiert. Der Extrakt wurde filtriert und dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass in Strauch A nach Anfärben mit Dragendorffs Reagenz nur ein Alkaloid erkennbar ist. Aus Strauch B und C sollten dagegen mindestens vier Substanzen isolierbar sein. In Strauch D scheinen drei Inhaltsstoffe und in Strauch E sieben bis acht Alkaloide vorzuliegen.

A B C D E



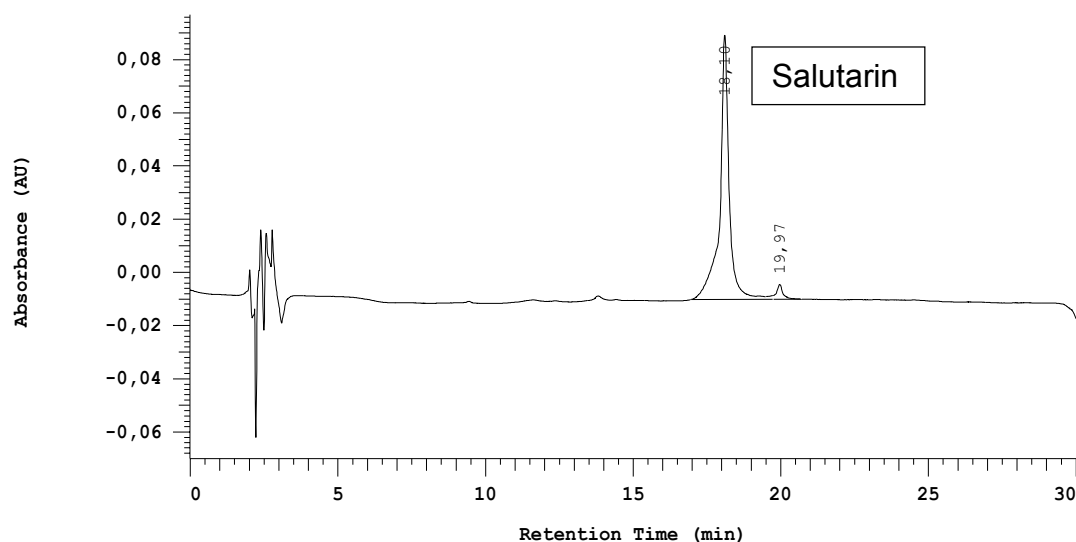
**Abb. 3:** DC-Untersuchung der fünf Sträucher A - E von *Croton flavens* L.



### 2.2.2 Strauch A

Strauch A ist ca. drei Meter hoch und deutlich größer als die anderen vier Pflanzen. Von den kleineren Sträuchern können nur sehr wenige Blätter gesammelt werden, um das Überleben nicht zu gefährden. Da also viel mehr Pflanzenmaterial von Strauch A zur Verfügung stand, wurde dieser zuerst phytochemisch untersucht. Es wurden mehrere Ansätze gemacht, die nach zwei verschiedenen Methoden bearbeitet wurden. Die Extraktion erfolgte aber immer nach dem gleichen Schema. Die Blätter (ca. 500 g) wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und zerkleinert. Die Bruchstücke wurden mit Methanol versetzt und mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Pflanzenmaterial wurde in einer Soxhlett-Apparatur zwei Tage lang mit Methanol erschöpfend extrahiert. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer eingedunstet. Der so erhaltene Trockenextrakt wurde auf zwei verschiedenen Wegen weiter verarbeitet:

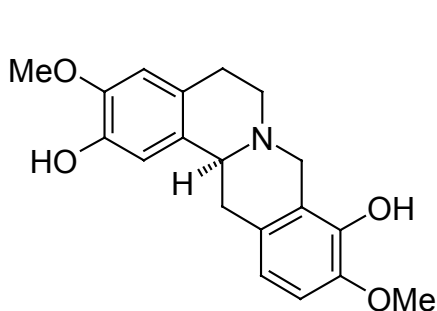
**Methode 1:** Durch einen modifizierten Stas-Otto-Gang wurden die Alkaloide von den restlichen Pflanzeninhaltsstoffen abgetrennt. Der Trockenextrakt wurde mit 5%iger Essigsäure angesäuert und mit Petrolether ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde verworfen. Die Wasserphase wurde mit Natriumcarbonat auf pH 8 - 9 gebracht und mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft (4.86 g). Der Rückstand wurde mit dem HPLC-System zur Alkaloidanalytik (siehe Kapitel D.2 und Lit.<sup>18</sup>) untersucht:



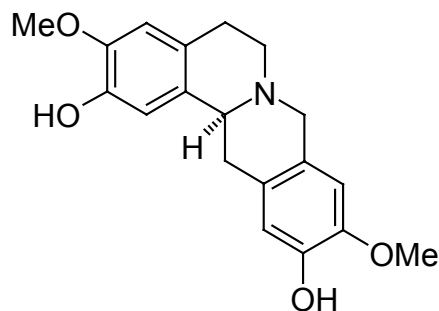
**Abb. 4:** HPLC-Fingerprintanalyse der Inhaltsstoffe des Strauches A

Analytische HPLC, Merck Lachrom, **System 1** zur Alkaloidanalytik: Säule: LiChroCART 250-4 RP-18, Gradientensystem.

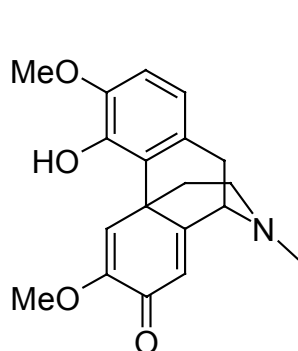
Obwohl hier nur ein oder zwei Inhaltsstoffe erkennbar waren, wurden mittels Flashchromatographie in der Reihenfolge ihrer Elution die Tetrahydroprotoberberine Scoulerin (**1**) und Coreximim (**2**) sowie die Morphinandienone Salutarin (**3**) und O-Methylflavinantin (**4**) isoliert. Salutarin ist ein Gemisch der beiden Enantiomere Salutaridin (**3a**) und Sinoacutin (**3b**). Zusätzlich wurde ein Phenanthren gefunden, das bisher noch nicht als Naturstoff beschrieben worden war. Die Substanz wurde Crotoflavol (**11**) benannt.



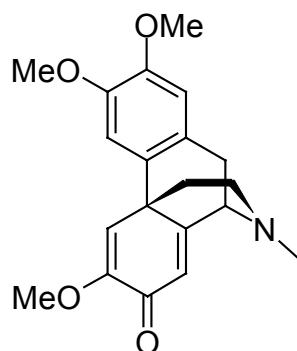
**1**



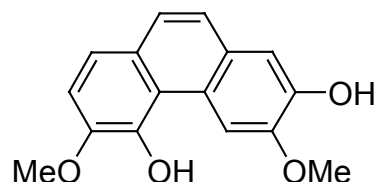
**2**



**3**



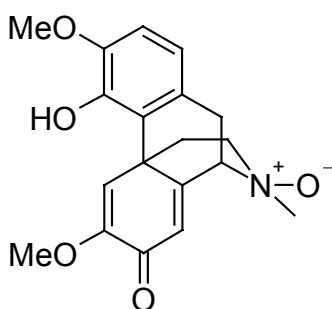
**4**



**11**

**Methode 2:** Mittels Flashsäulenchromatographie sollten die Alkaloide von den restlichen Pflanzeninhaltsstoffen abgetrennt werden. Zudem sollte dadurch das Phenanthren Crotoflavol (**11**) in größeren Mengen erhalten werden. Die Überlegung war, dass die basischen Alkaloide an den sauren Silanolgruppen des Kieselgels stark zurückgehalten und beim Spülen mit Ethylacetat nicht eluiert werden. Erst bei Zugabe einer basischen Komponente wie Ethyldimethylamin sollten die erwünschten Verbindungen eluiert werden. Der Rohextrakt (20 g) wurde daher in Ethylacetat aufgenommen und mittels einer Flashsäulenchromatographie mit Gradientensystem (Ethylacetat / Ethyldimethylamin / Methanol) aufgetrennt. In den Fraktionen, die man durch Spülen mit Ethylacetat erhielt, konnte nicht wie erwartet das Phenanthren Crotoflavol (**11**) gefunden werden. Die Fraktionen, die mit den Fließmittelgemischen

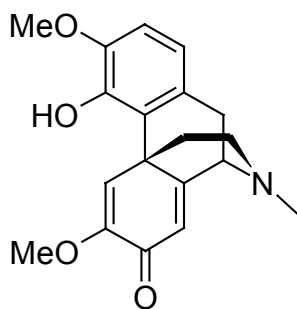
aus Ethylacetat / Ethyldimethylamin / Methanol erhalten wurden, beinhalteten die Alkaloide Scoulerin (**1**), Coreximin (**2**), Salutarin (**3**) und O-Methylflavinantin (**4**). Die letzten Fraktionen, die durch Elution mit Methanol / Ethyldimethylamin erhalten wurden, enthielten die Verbindung Salutarin-N-oxid (**10**), die wie Salutarin (**3**) als Enantiomeregemisch vorliegt.



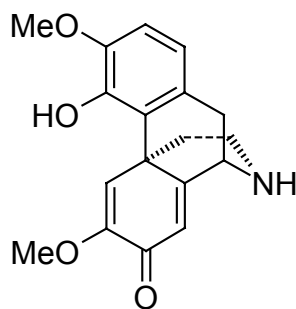
**10**

### 2.2.3 Strauch B und C

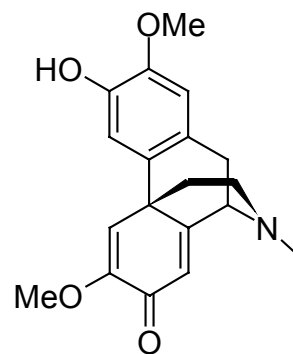
Von diesen Sträuchern stand nur sehr wenig Pflanzenmaterial zur Untersuchung zur Verfügung, da beide sehr klein sind. Ca. 22 g frische Blätter wurden mit Methanol versetzt und mit einem Ultra-Turrax zerkleinert. Die Ansätze wurden einen Tag bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Nach dem Eindampfen standen ca. 2 g Rohextrakt zur Verfügung. Die Alkaloide (ca. 130 mg) wurden nach dem im Kapitel C.2.2.2 beschriebenen modifizierten Ausschüttelgang abgetrennt. Mittels Flashsäulenchromatographie (Dichlormethan / Methanol 95:5) wurden die einzelnen Verbindungen voneinander getrennt. Es wurden keine Tetrahydroprotoberberine isoliert, was wahrscheinlich auf die geringe Menge an Pflanzenextrakt zurückzuführen ist. Dagegen konnten enantiomerenreines Salutaridin (**3a**), O-Methylflavinantin (**4**), Norsinoacutin (**5**) und Flavinantin (**6**) gefunden werden.



**3a**



**5**



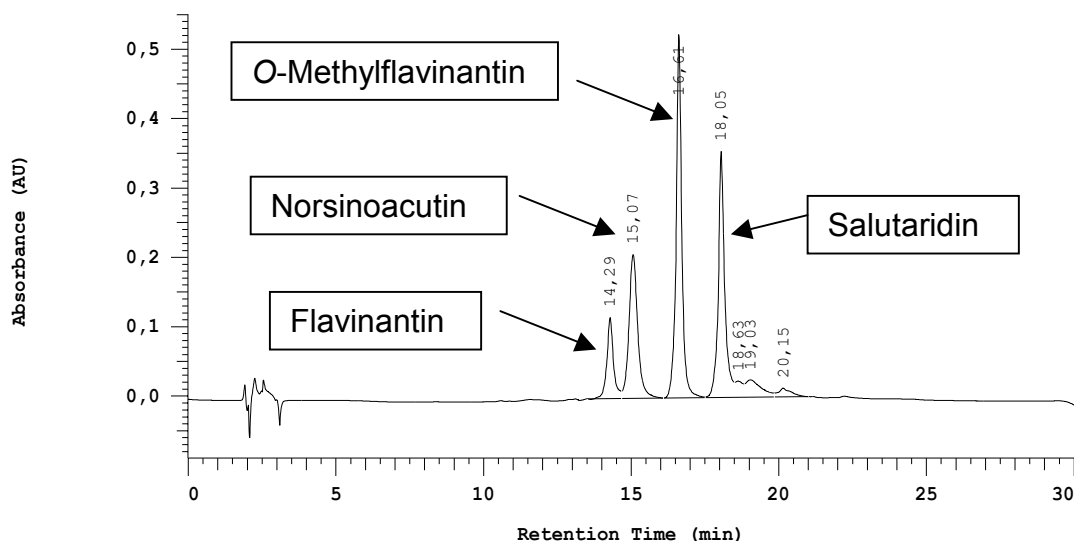
**6**

#### 2.2.4 Strauch D

Auch hier waren die verfügbaren Mengen an Pflanzenmaterial (24 g frische Blätter) sehr gering. Diese wurden wie oben zerkleinert und extrahiert. Der Rohextrakt (1 g) wurde ebenfalls dem modifizierten Stas-Otto-Gang unterzogen und es wurden 197 mg Alkaloidgemisch erhalten. Mittels Flashsäulenchromatographie konnten die Morphinandienone Salutarin (**3**), O-Methylflavinantin (**4**) und Flavinantin (**6**) isoliert werden. Nicht gefunden wurde das Alkaloid Norsinoacutin, welches das *N*-Norderivat des linksdrehenden Enantiomers Sinoacutin ist. Es zeigt sich also, dass in den Sträuchern, in denen das Enantiomergemisch Salutarin vorliegt, das Enzym für die *N*-Demethylierung offensichtlich fehlen muss. Ist dagegen Norsinoacutin in der Pflanze vorhanden, wird Sinoacutin selektiv und quantitativ *N*-demethyliert.

#### 2.2.5 Strauch E

Einer der Sträucher war im Begriff abzusterben. Daher wurden alle Blätter (885 g) gesammelt und wie bei Strauch A zerkleinert und extrahiert. Der Rohextrakt wurde nach Methode 1 bearbeitet. 3.3 g Alkaloidgemisch wurden erhalten und mittels analytischer HPLC untersucht.

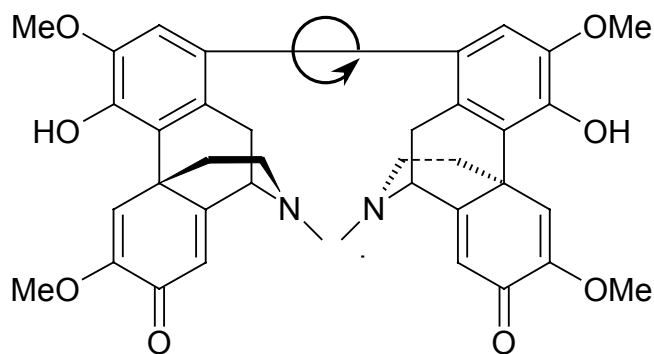


**Abb. 5:** HPLC-Fingerprintanalyse der Inhaltsstoffe von Strauch E

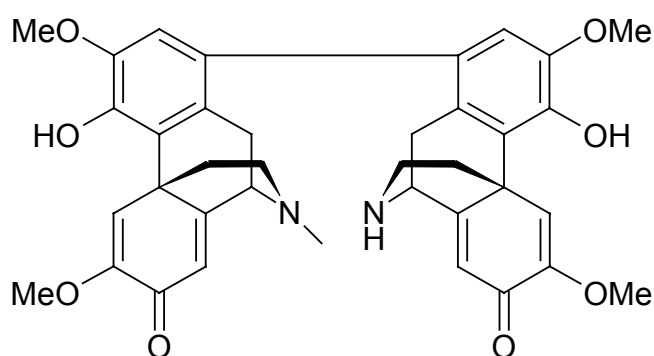
Analytische HPLC, Merck Lachrom, **System 1** zur Alkaloidanalytik: Säule: LiChroCART 250-4 RP-18, Gradientensystem.

Obwohl nur vier Inhaltsstoffe deutlich zu erkennen sind, wurden neun Alkaloide mittels Flashsäulenchromatographie isoliert. Dies sind in der Reihenfolge der Elution die schon bekannten Tetrahydroprotoberberine Scoulerin (**1**) und Coreximin (**2**), sowie die Morphinandienone Salutaridin (**3a**), O-Methylflavinantin (**4**), Norsinoacutin

(5) und Flavinantin (6). Außerdem konnten drei Morphinandienon-Dimere, die wie das oben beschriebene Phenanthren neue Naturstoffe darstellen, isoliert und die Struktur aufgeklärt werden. Die ersten beiden Substanzen sind Rotamere und sind jeweils aus zwei Molekülen Salutaridin aufgebaut. Die Dimere wurden Saludimerin A (7) und Saludimerin B (8) benannt. Dem letzten Alkaloid, das aus einem Molekül Salutaridin und einem Molekül Norsinoacutin zusammengesetzt ist, wurde der Name Salsinodimerin (9) gegeben.



7 und 8

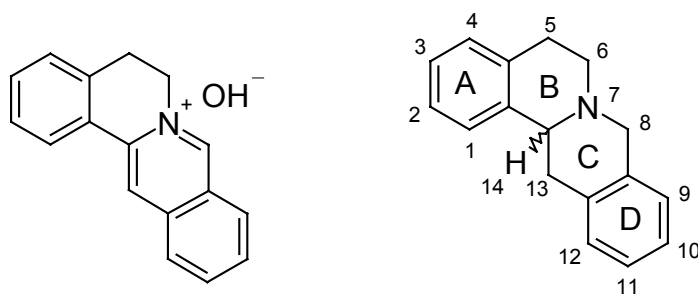


9

## 2.3 Strukturaufklärung der Tetrahydroprotoberberine

### 2.3.1 Allgemeines über Protoberberine

Die vor allem in den Pflanzenfamilien Annonaceae, Berberidaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rutaceae und Papaveraceae vorkommenden Protoberberin-Alkaloide enthalten ein Dibenzo[a,g]chinolizin-Gerüst. Dieses kann in den Positionen 2, 3, 9, 10 oder 2, 3, 10, 11 und in seltenen Fällen auch in Position 1 durch sauerstoffhaltige Funktionen substituiert sein. Darüber hinaus können zusätzlich die C-Atome 8 und 13 eine Methylgruppe tragen. Diese Alkaloide können als gelb bis rot gefärbte quartäre Protoberberine oder als farblose tertiär-basische Tetrahydroprotoberberine auftreten.<sup>19</sup> Bisher wurden über 70 Vertreter dieser Stoffklasse isoliert und identifiziert.



**Abb. 6:** Grundstruktur der Berberine und Nummerierung der Tetrahydroprotoberberine

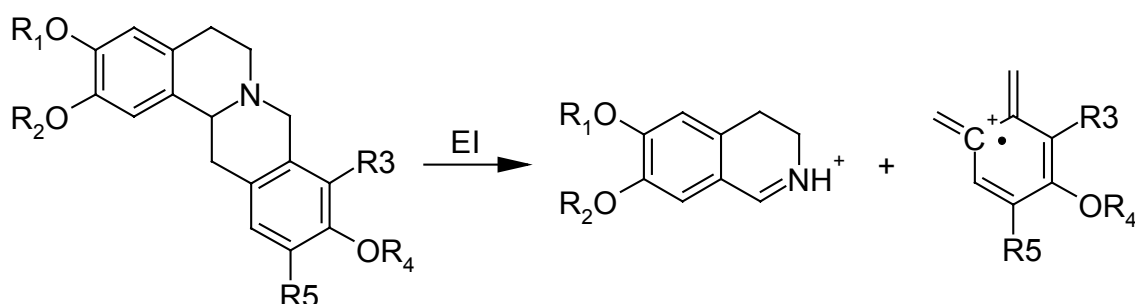
Protoberberine sind für ihre spasmolytische, cholekinetische, bakterizide und antimykotische Aktivität bekannt. So werden zum Beispiel Pflanzenextrakte und Tinkturen aus Schöllkraut bei Galle- und Leberleiden und Dysmenorrhoe angewendet. Die Wirkung beruht unter anderem auf einer Hemmung der Acetylcholinesterase, die sich erregend auf die glatte Muskulatur bzw. auf die Gallenwege auswirkt. Das z. B. im Sauerdorn vorkommende Berberin besitzt darüber hinaus eine antiarrhythmische sowie inotrope Herzwirksamkeit und wurde früher als Antipyretikum, Adstringens und Desinfektionsmittel verwendet. Berberinsulfat wurde in Augentropfen gegen Bindehautentzündung eingesetzt.

Aber auch andere Protoberberine sind wegen ihres breiten Wirkungsspektrums von großem pharmakologischen Interesse. So hemmt das in der Lerchenspornwurzel vorkommende Tetrahydropalmatin die Atmungskette in Rinderherzzellen.<sup>20</sup>

Die absolute Stereochemie der Tetrahydroprotoberberinalkaloide kann mit Hilfe des Drehwinkels sowie des IR-Spektrums bestimmt werden. Die Substanzen haben in der Regel nur ein Stereozentrum am C-14. Es wurde festgestellt, dass linksdrehende

Alkaloide der (*S*)-Serie angehören und alle rechtsdrehenden Enantiomere (*R*)-Konfiguration besitzen.<sup>21</sup> Ob die Ringe cis- oder trans-verknüpft sind, kann man anhand der Bohlmann-Banden im IR-Spektrum erkennen. Bei Basen, die sich vom Chinolizidin ableiten, treten im Bereich von 2700 bis 2800  $\text{cm}^{-1}$  nur dann Absorptionsbanden auf, wenn bei den Ringen eine trans-Verknüpfung vorliegt.<sup>22</sup>

Aufgrund ihrer charakteristischen Massenspektren können Tetrahydroprotoberberine identifiziert werden und man kann Rückschlüsse auf das Substitutionsmuster ziehen. Der Ring C wird durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion gespalten und man erhält zwei typische Ionen.<sup>23</sup>

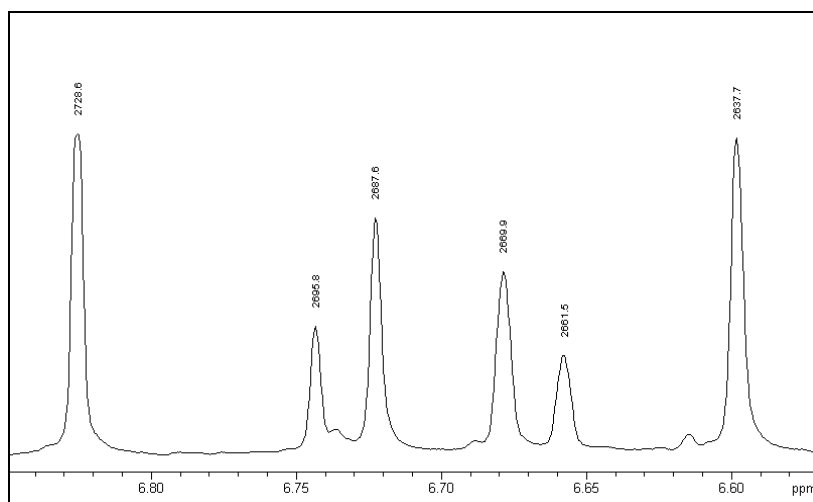


**Abb. 7:** Fragmentierungsmuster der Tetrahydroprotoberberine

### 2.3.2 Scoulerin

Die Substanz **1** gibt bei DC-Überprüfung einen einzigen Fleck, der sich mit Dragendorffs Reagenz orange anfärben lässt. Das UV-Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 284 nm. Der Schmelzpunkt liegt im Bereich von 198 - 200 °C.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt Signale für zwei Methoxygruppen bei  $\delta_{\text{H}} = 3.87$  und  $3.88$  ppm, zwei Singulett für aromatische Protonen bei  $\delta_{\text{H}} = 6.60$  und  $6.83$  ppm und zwei Dubletts bei  $\delta_{\text{H}} = 6.67$  und  $6.73$  ppm mit einer Kopplungskonstante von je  $J = 8.3$  Hz. Auch der Dacheffekt weist darauf hin, dass diese beiden Wasserstoffatome miteinander koppeln. Dies deutet ein 2,3- und 9,10-Substitutionsmuster an. Darüber hinaus lassen sich 9 aliphatische Protonen im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 2.61$  bis  $4.23$  ppm erkennen. Die Signale sind teilweise überlagert bzw. wegen Signalaufspaltungen höherer Ordnung nicht exakt zuzuordnen.



**Abb. 8:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **1**

Erst durch das HMQC-Spektrum lässt sich erkennen, dass in dem Molekül vier Methylengruppen ( $\delta_{\text{C}} = 29.2, 36.3, 51.5$  und  $53.5$  ppm), zwei Methylgruppen ( $\delta_{\text{C}} = 55.9$  und  $56.1$  ppm) und eine Methin-Gruppe ( $\delta = 59.2$  ppm) vorhanden sind. Zudem lassen sich vier aromatische Kohlenstoffatome, die mit je einem Wasserstoffatom verknüpft sind, erkennen bei  $\delta_{\text{C}} = 108.9, 110.6, 111.3$  und  $119.3$  ppm.

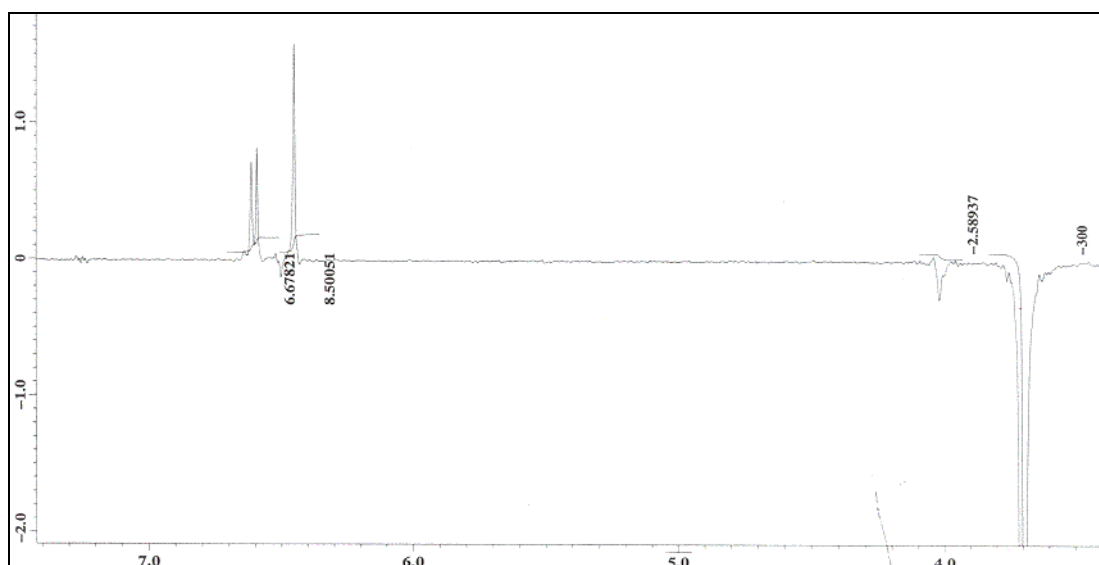
Diese Erkenntnisse werden durch das DEPT-Spektrum bestätigt. Man sieht vier sekundäre sowie sieben primäre und tertiäre Kohlenstoffatome. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum kann man zusätzlich noch acht Signale quartärer aromatischer Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 121.2, 126.1, 128.1, 130.6, 141.4$ , zweimal  $143.9$  und  $145.0$  ppm erkennen.

Durch das HH-COSY-Spektrum wird deutlich, dass die Protonen einer Methylengruppe nur geminale Kopplung aufweisen. Die Protonen einer Methin- und einer Methylengruppe müssen aufgrund dieses Experimentes benachbart sein und die vier Protonen zweier Methylengruppen zeigen ebenfalls Kopplungen miteinander. Diese Erkenntnisse deuten auf die Tetrahydroprotoberberin-Grundstruktur hin.

Das Massenspektrum ist ein weiterer Beleg für diese Annahme. Man kann einen Molekülpeak bei  $m/z = 327$  [ $\text{M}^+$ ] erkennen, der charakteristisch ist für Benzyltetrahydroisochinolin-Alkaloide. Darüber hinaus lassen sich typische Fragmente bei  $m/z = 178$  und  $150$  erkennen. Damit kann man Rückschlüsse auf das Substitutionsmuster der Aromaten ziehen. In jedem Teilfragment muss eine Methoxygruppe und eine Hydroxygruppe vorhanden sein. Die Hochauflösung lässt auf die Summenformel von  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$  schließen.

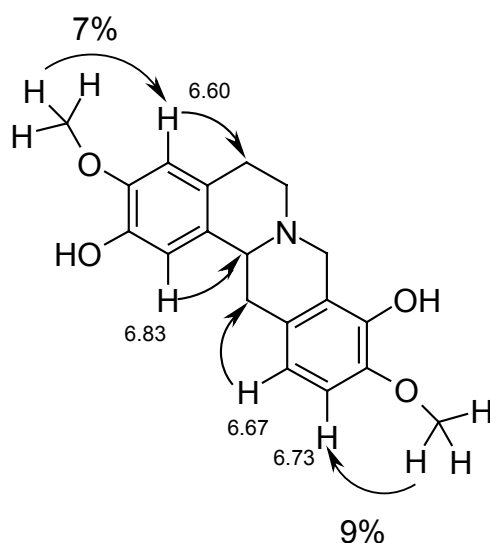


Das Substitutionsmuster an den beiden Aromaten ist damit aber noch nicht geklärt. Aufschluss darüber können NOE-Experimente geben. Bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz der beiden Methoxygruppen bei  $\delta = 3.87$  und  $3.88$  ppm steigt die relative Intensität der Signale des Singulett bei  $\delta = 6.60$  ppm und eines der beiden Dubletts bei  $\delta = 6.73$  ppm.



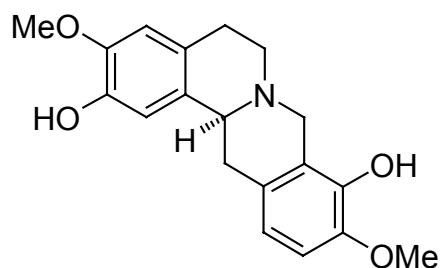
**Abb. 9:** NOE-Spektrum von **1**

Die genaue Position der Substituenten kann man nun durch HMBC-Experimente herausfinden. Das Singulett bei  $\delta = 6.83$  ppm zeigt eine Fernkopplung über drei Bindungen mit dem Kohlenstoffatom der Methingruppe. Das Singulett bei  $\delta = 6.60$  ppm koppelt mit dem Kohlenstoffatom einer der beiden Methylengruppen, die aufgrund des HH-COSY-Spektrums benachbart sind. Eines der beiden Dubletts ( $\delta = 6.67$  ppm) zeigt eine Verknüpfung mit der Methylengruppe, die neben der Methingruppe liegen muss. Das zweite Dublett zeigt keine Kopplungen mit Kohlenstoffatomen im aliphatischen Bereich und die isolierte Methylengruppe liegt nicht im Bereich einer Fernkopplung mit einem aromatischen Proton. Damit kann man folgende Struktur formulieren:



**Abb. 10:** Fernkopplungen und NOE-Effekte mit Prozentangabe von **1**

Das IR-Spektrum zeigt die charakteristischen Bohlmann-Banden im Bereich von 2700 - 2800  $\text{cm}^{-1}$ . Damit sind die Ringe C und D trans verknüpft. Der Drehwinkel beträgt  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -346^\circ$  ( $c = 0.1$ , Methanol; Lit.<sup>24</sup>:  $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -355^\circ$ ,  $c = 0.2$ , Methanol). Damit wurde die Struktur von **1** als (-)-Scoulerin bewiesen.



**1**

Dieses Alkaloid wurde erstmals 1936 aus *Corydalis scouleri* (Papaveraceae) isoliert und von Manske identifiziert.<sup>25</sup> Es konnte schon aus vielen weiteren Pflanzenfamilien isoliert werden, aber noch nie aus einer *Croton*-Art. Scoulerin ist eine wichtige Zwischenstufe bei der Biosynthese von Berberin.<sup>26</sup> Ferner wurde für diese Substanz eine antiemetische und antitussive Wirkung beschrieben.<sup>27</sup>

### 2.3.3 Coreximin

Die Strukturaufklärung von **2** verlief ähnlich wie bei Scoulerin. Die isolierte Substanz zeigt auf der DC-Platte einen einzigen Fleck, der sich mit Dragendorffs Reagenz orange anfärben lässt. Nach dem Trocknen erhält man ein weißes Pulver, das in

Chloroform und Methanol schwer löslich ist. Das Schmelzintervall liegt bei 248 - 250 °C und das UV-Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 288 nm.

Die NMR-Spektren wurden in DMSO aufgenommen, weil sich die Substanz nur schlecht in deuteriertem Chloroform löst. Die Daten können daher nur bedingt mit Literaturwerten verglichen werden. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind vier Signale von aromatischen Protonen zu finden, doch diesmal erscheinen nur Singulets bei  $\delta = 6.55, 6.61, 6.63$  und  $6.69$  ppm. Auf Grund dieser Daten kann man vermuten, dass der Ring D nicht in der 9- und 10-Position substituiert ist, sondern am C-10 und C-11. Darüber hinaus zeigt das Spektrum zwei breite Signale bei  $\delta = 8.66$  und  $8.69$  ppm, die von Hydroxygruppen stammen könnten. Zwei Methoxygruppen sind bei  $\delta = 3.72$  und  $3.74$  ppm zu finden. Weitere Signale von neun aliphatischen Protonen liegen im Bereich von  $\delta = 2.41$  bis  $3.81$  ppm.

Das Massenspektrum zeigt Charakteristika der Tetrahydroprotoberberine ( $m/z = 327$  [ $\text{M}^+$ ], 178, 150). Die Summenformel von  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$  wird durch die hochauflösende Masse bestätigt. Aufgrund der Massenfragmente  $m/z = 178$  und  $150$  müssen auch hier wieder jeweils am Ring A und D eine Hydroxy- und eine Methoxygruppe vorliegen (vgl. Abb. 7).

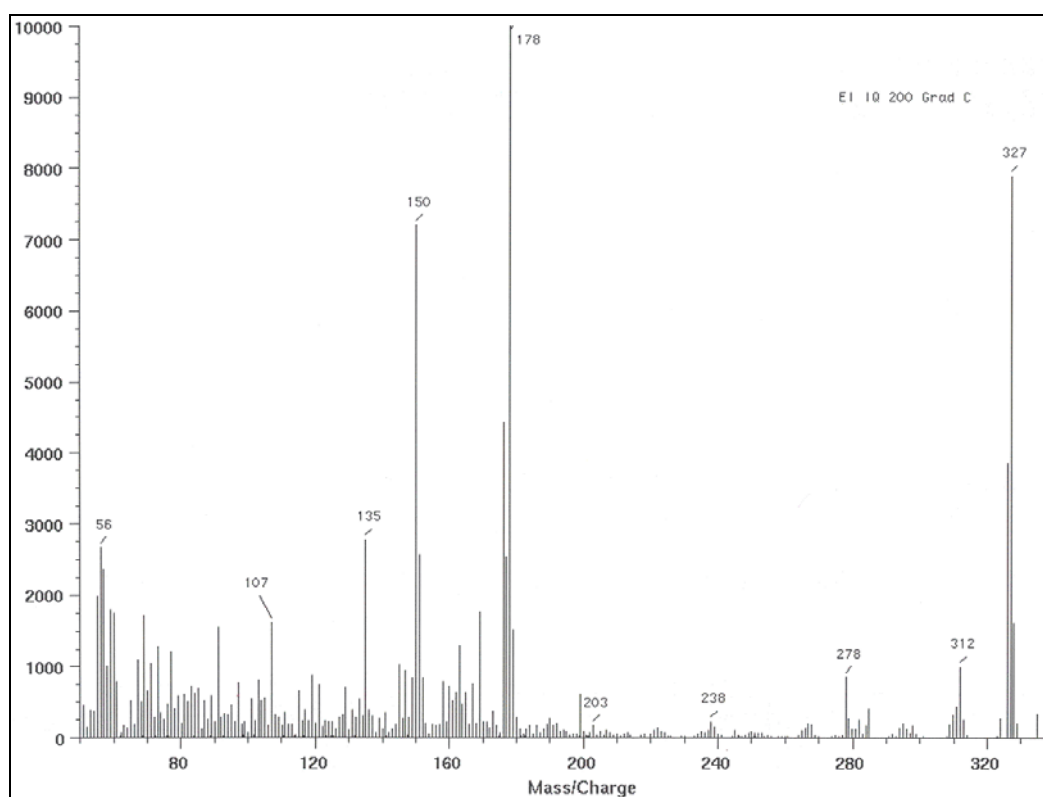


Abb. 11: Massenspektrum von 2

Durch das HMQC-Spektrum kann man die aliphatischen Protonen vier sekundären Kohlenstoffatomen ( $\delta_C = 28.4, 35.6, 51.0, 57.6$  ppm) und einem tertiären Kohlenstoffatom ( $\delta_C = 59.0$ ) zuordnen. Die beiden Methoxygruppen können ebenfalls erkannt werden ( $\delta_C = 55.4$  und  $55.6$  ppm).

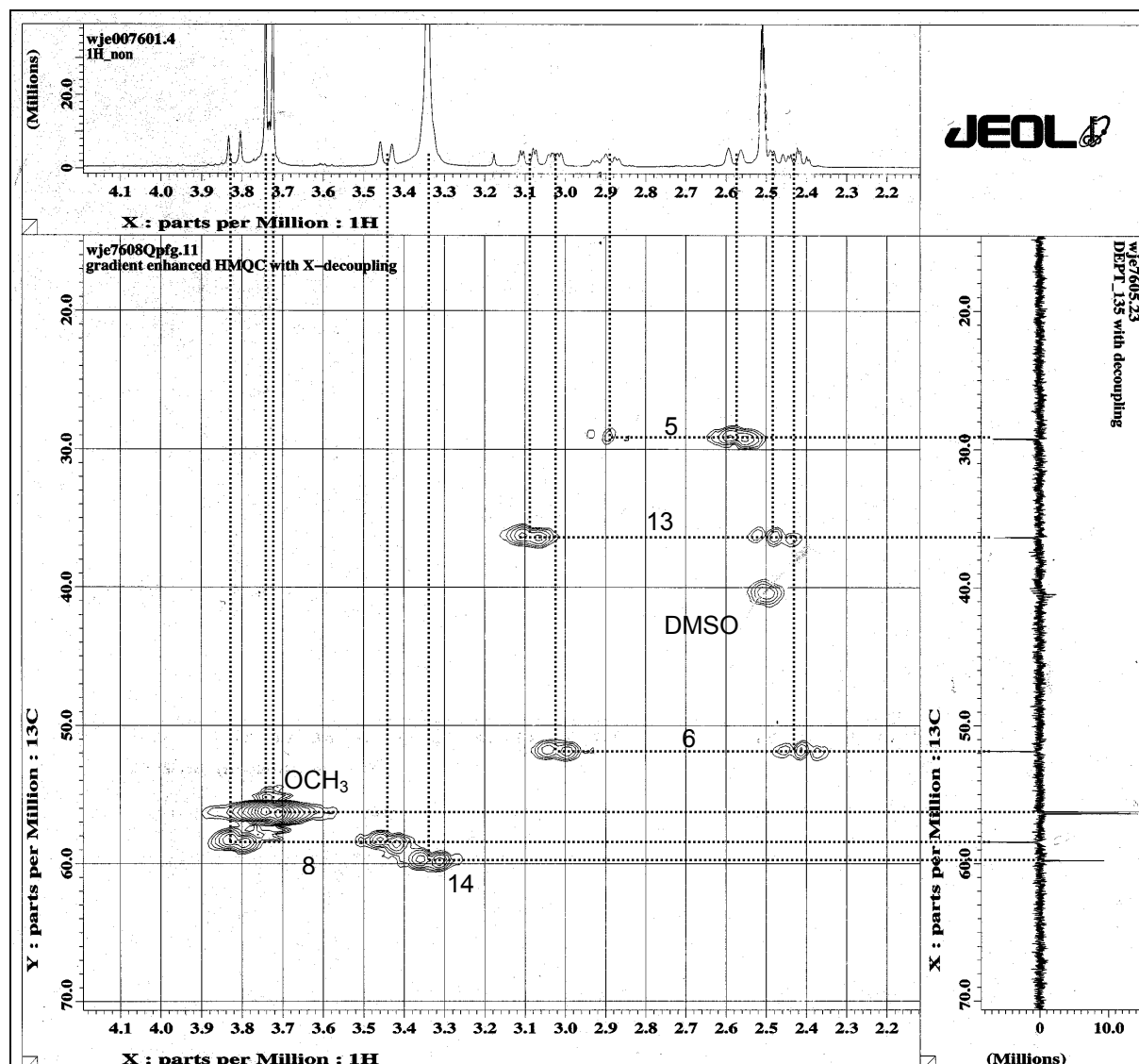
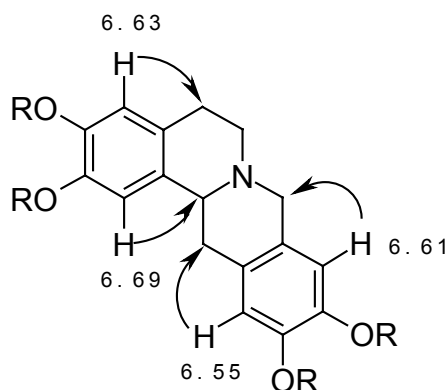


Abb. 12: HMQC-Spektrum von 2

Die vier aromatischen Protonen zeigen Kopplungen mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 109.6, 111.7, 112.3$  und  $115.1$  ppm. Das HH-COSY-Experiment zeigt, dass wieder eine Methylengruppe isoliert vorliegen muss, die Protonen zweier weiterer Methylengruppen miteinander koppeln und eine Methingruppe in der Nachbarschaft einer weiteren Methylengruppe liegt. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt die restlichen

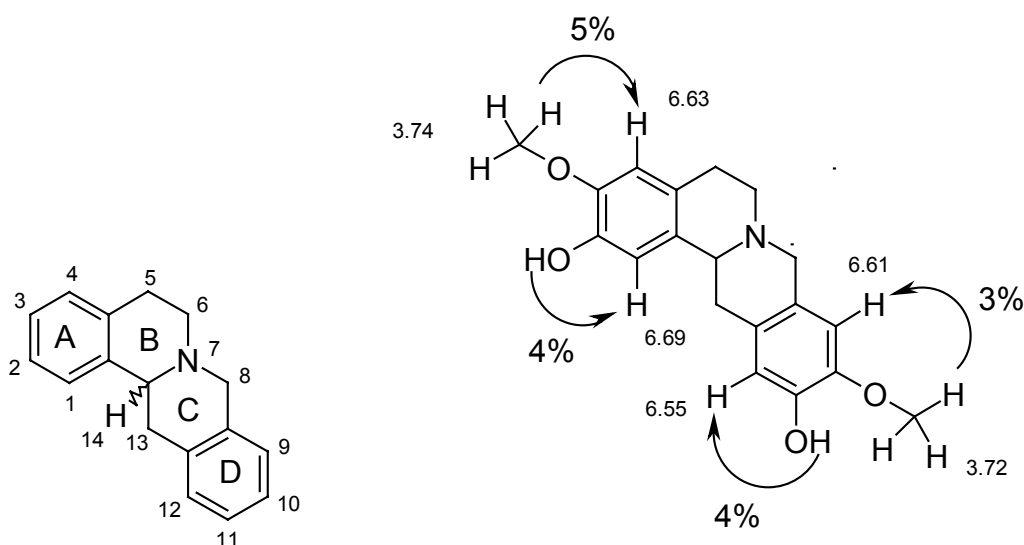
quartären Kohlenstoffatome an ( $\delta_C = 124.6, 124.8, 126.3, 130.0, 144.5, 144.6$  und zweimal  $145.8$  ppm).

Jedes der vier aromatischen Protonen zeigt im HMBC-Spektrum eine Fernkopplung mit je einem aliphatischen Kohlenstoffatom. Das Singulett bei  $\delta = 6.69$  ppm ist verknüpft mit dem tertiären Kohlenstoffatom. Das Proton bei  $\delta = 6.63$  ppm koppelt mit der Methylengruppe, die benachbart zu einer zweiten Methylengruppe liegt. Das Singulett bei  $\delta = 6.61$  ppm zeigt eine Fernkopplung über drei Bindungen mit dem isolierten sekundären Kohlenstoffatom und das Signal bei  $\delta = 6.55$  ppm koppelt mit der Methylengruppe, die benachbart zur Methingruppe liegt. Damit lässt sich folgende Struktur postulieren, wobei R ein Proton oder eine Methylgruppe sein kann:



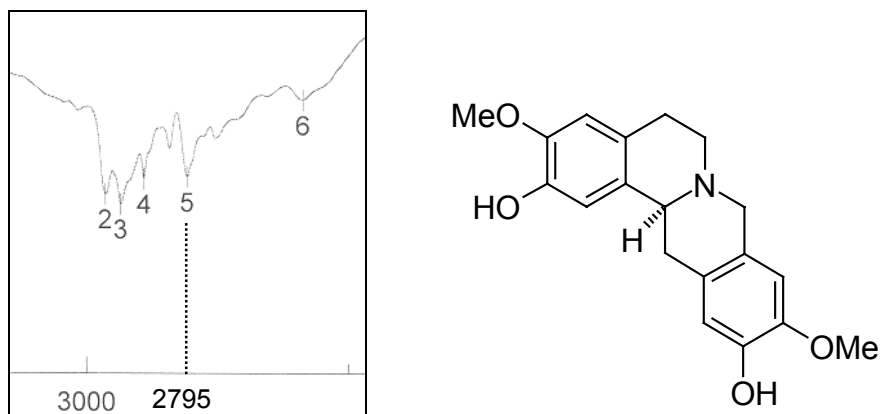
**Abb. 13:** Ausgewählte Fernkopplungen von **2**

Die genaue Anordnung der Substituenten am Aromaten wird durch Aufnahme von NOE-Spektren bestimmt. Durch Einstrahlung in den Frequenzbereich der Protonen der Methoxygruppe bei  $\delta = 3.74$  ppm vergrößert sich das Signal des H-4 bei  $\delta = 6.63$  ppm. Damit trägt das C-3 Kohlenstoffatom eine der Methoxygruppen. Wird bei der Resonanzfrequenz der Methoxygruppe bei  $\delta = 3.72$  ppm eingestrahlt, zeigt sich ein Effekt bei dem Signal bei  $\delta = 6.61$  ppm. Das Kohlenstoffatom C-9 ist daher mit einer Methoxygruppe substituiert. Wird mit der gemeinsamen Resonanzfrequenz der Protonen der Hydroxygruppen eingestrahlt, vergrößern sich die Signale bei  $\delta = 6.55$  und  $6.69$  ppm, was damit die Hydroxy-Substitution in der 2- und 11-Position beweist.



**Abb. 14:** Nummerierung des Grundgerüsts und NOE-Effekte von **2** mit Prozentangabe

Die Stereochemie dieses Alkaloids kann durch das IR-Spektrum und die optische Drehung aufgeklärt werden. Die für eine *trans*-Verknüpfung der Ringe C und D charakteristischen Bohlmann-Banden sind bei  $2795\text{ cm}^{-1}$  zu finden und der Drehwinkel  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  beträgt  $-123^\circ$  ( $c = 0.6$ , Methanol; Lit.<sup>28</sup>:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -128^\circ$ ,  $c = 0.25$ , Methanol). Damit wurde die Struktur von (-)-Coreximim vollständig aufgeklärt.



**Abb. 15:** IR-Spektrum mit Bohlmann-Bande (Peak 5) von **2**

Coreximim wurde erstmals 1938 aus *Dicentra eximia* (Papaveraceae) von Manske isoliert.<sup>29</sup> Dieses Alkaloid kommt in vielen verschiedenen Pflanzenfamilien vor, wurde jedoch noch nicht aus der Gattung *Croton* isoliert. Über eine pharmakologische Aktivität ist noch nichts beschrieben.

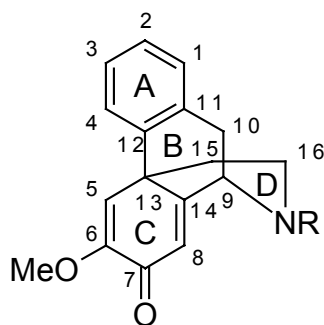
**Tab. 1:** NMR- Daten von Scoulerin in CDCl<sub>3</sub> und von Coreximmin in d<sub>6</sub>-DMSO

Position der C- bzw. H-Atome	<sup>1</sup> H-NMR-Daten [ppm]		<sup>13</sup> C-NMR-Daten [ppm]	
	Scoulerin	Coreximmin	Scoulerin	Coreximmin
1	6.83	6.69	111.3	112.3
2	-	-	143.9	144.6
3	-	-	145.0	145.8
4	6.60	6.63	110.6	111.7
4a	-	-	126.1	124.6
5	ca. 2.6 ca. 3.2	2.72 2.89	29.2	28.4
6	ca. 2.7 ca. 3.2	2.41 3.02	51.5	51.0
8	ca. 3.5 4.23	3.44 3.81	53.5	57.6
8a	-	-	121.2	124.8
9	-	6.61	141.4	109.6
10	-	-	143.9	145.8
11	6.73	-	108.9	144.5
12	6.67	6.55	119.3	115.1
12a	-	-	128.1	126.3
13	2.81 ca. 3.2	2.47 3.09	36.3	35.6
14	ca. 3.5	3.34	59.2	59.0
14a	-	-	130.6	130.0
3/10-OCH <sub>3</sub>	3.87	3.72	55.9	55.4
3/10-OCH <sub>3</sub>	3.88	3.74	56.1	55.6

## 2.4 Strukturaufklärung der Morphinandienone

### 2.4.1 Allgemeines über Morphinandienone

Der Begriff Morphinandienon-Alkaloide wurde erstmals 1965 von Kühn und Pfeifer eingeführt, um die Morphinan-7-on Struktur zu beschreiben.<sup>30</sup>



**Abb. 16:** Grundstruktur und Nummerierung

Vertreter dieser Stoffklasse wurden bisher aus den Pflanzenfamilien der Papaveraceae, Menispermaceae und Euphorbiaceae isoliert. Bisher wurden an die 30 verschiedene Substanzen identifiziert. Sie spielen zum Teil eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Thebain, Codein und Morphin. Gemäß ihrer absoluten Konfiguration am C-9 werden die Morphinandienone der (*R*)- bzw. (*S*)-Gruppe zugeordnet.<sup>31</sup>

Morphinandienone besitzen bestimmte charakteristische Eigenschaften, die sie von der Mehrzahl anderer Morphinane abheben:

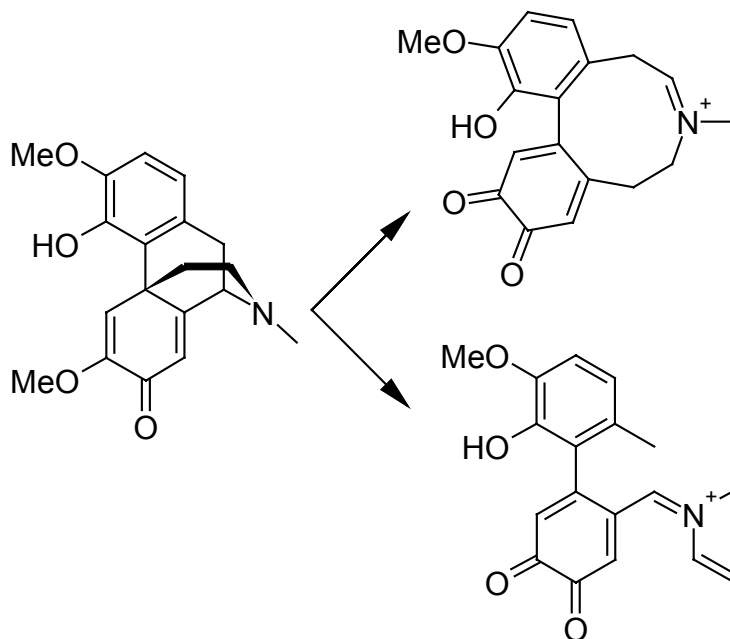
Morphinandienone sind entweder in der 2,3- oder 3,4-Position mit sauerstoffhaltigen Funktionen substituiert. Zusätzlich tragen sie in der Regel eine Methoxygruppe am C-6.

Das UV-Spektrum weist zwei charakteristische Absorptionsmaxima im Bereich von 235 - 240 nm und 275 - 290 nm auf. Die molaren Extinktionskoeffizienten haben ein Verhältnis von ca. 2:1. Morphinandienone, die am C-2 und C-3 substituiert sind, haben in der Regel die höhere Absorptionsbande näher an 290 nm als an C-3 und C-4 substituierte Vertreter dieser Gruppe.

Die IR-Spektren der Morphinandienone zeigen drei Banden, die charakteristisch sind für ein kreuzkonjugiertes Cyclohexadienon-System, das in  $\alpha$ -Position mit einer Methoxygruppe substituiert ist. Ein typischer Vertreter absorbiert bei den Wellenzahlen 1665, 1635 und 1615  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>32</sup>



Das Massenspektrum weist neben einem intensiven Molekülpeak  $[M^+]$  drei charakteristische Fragmentierungen auf. Dies sind der Verlust der C-6 Methoxygruppe  $[M^+ -15]$ , von Kohlenmonoxid  $[M^+ -28]$  oder die simultane Abspaltung von beiden Gruppen  $[M^+ -43]$ . Für Salutaridin wurden zwei Strukturen vorgeschlagen, wie sich das Molekül beim Verlust der Methylgruppe stabilisieren kann.<sup>33</sup>



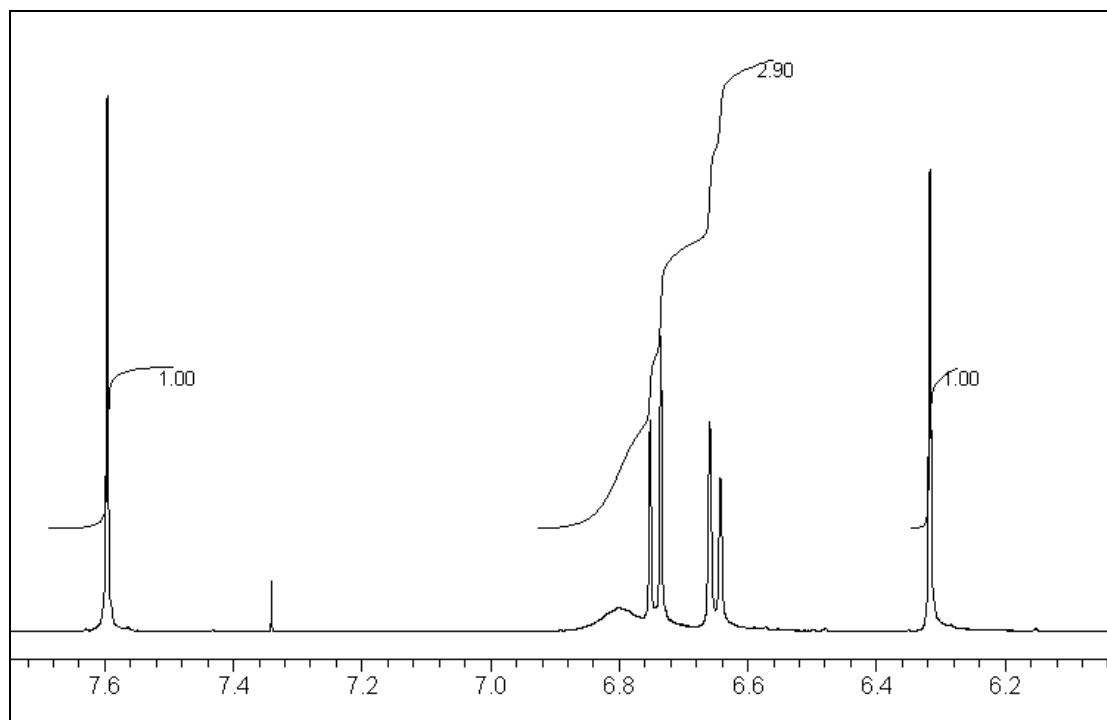
**Abb. 17:** Massenfragmente  $[M^+ -15]$  von Salutaridin

#### 2.4.2 Salutarin

Die aus Strauch A in großer Menge isolierte Substanz **3** zeigt auf der DC im Laufmittel 2 einen einzigen Fleck, der sich mit Dragendorffs Reagenz orange anfärben lässt. Der Schmelzpunkt beträgt 206 - 208 °C und das UV-Spektrum zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 241 und 280 nm. Das IR-Spektrum besitzt die für Morphinandienone typischen Banden bei 1673, 1643 und 1614  $\text{cm}^{-1}$ . Im Massenspektrum erkennt man einen starken Molekülpeak bei  $m/z = 327$  und das charakteristische Zerfallsmuster mit  $m/z = 312$ , 299 und 284. Die hochauflösende Masse lässt auf eine Summenformel von  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$  schließen.

Die Aufklärung der Struktur gelingt durch die NMR-Spektroskopie. Man sieht im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zwei Singulets bei  $\delta_{\text{H}} = 6.32$  und 7.60 ppm und zwei Dubletts bei  $\delta_{\text{H}} = 6.65$  und 6.74 ppm mit einer Kopplungskonstante von je  $J = 8.3$  Hz. Diese beiden Signale zeigen einen Dacheffekt. Die starke Entschirmung des Protons bei  $\delta_{\text{H}} = 7.60$  ppm kommt durch die Dienonstruktur zustande und lässt sich damit als H-5

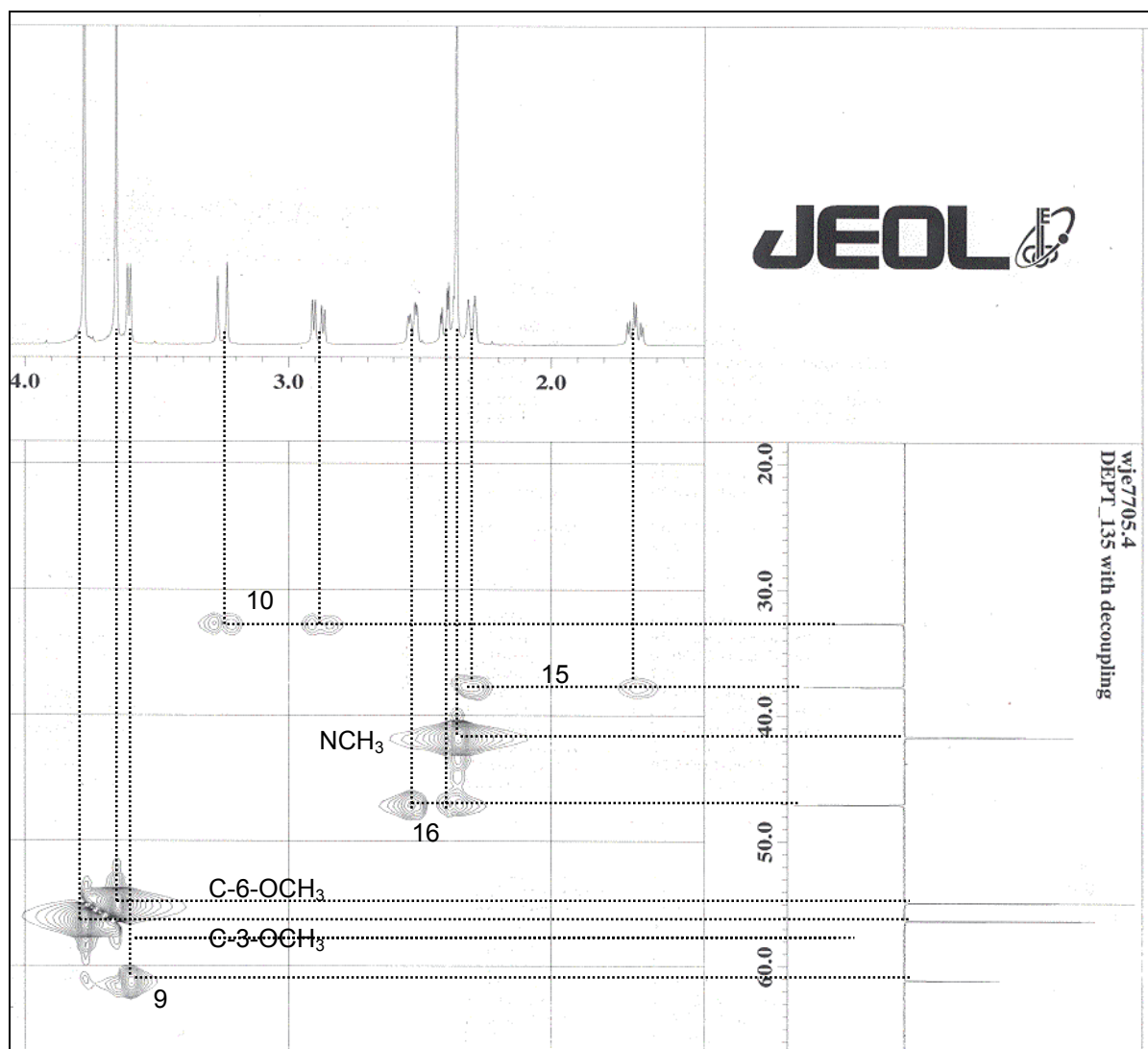
identifizieren. Die Existenz der Dubletts lässt darauf schließen, dass der Ring A am C-3 und C-4 substituiert ist und die Kohlenstoffatome C-1 und C-2 die Protonen tragen.



**Abb. 18:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **3**

Darüber hinaus erkennt man drei Singulets von jeweils drei Protonen bei  $\delta_{\text{H}} = 2.44$ ,  $3.74$  und  $3.86$  ppm. Die letzten beiden Signale lassen sich aufgrund der chemischen Verschiebung als Methoxygruppen identifizieren und das Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 2.44$  ppm kann eine *N*-Methylgruppe sein. Man kann darüber hinaus noch sieben Signale im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 1.77$  bis  $3.69$  ppm mit zum Teil Aufspaltungen höherer Ordnung erkennen.

Im HMQC-Spektrum lassen sich die aliphatischen Protonen drei sekundären Kohlenstoffatomen ( $\delta_{\text{C}} = 32.6$ ,  $37.7$  und  $47.0$  ppm) und dem tertiären C-9 ( $\delta_{\text{C}} = 61.1$  ppm) zuordnen. Die Protonen der drei Singulets tragen die Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 41.6$  ( $\text{NCH}_3$ ),  $54.8$  ( $\text{OCH}_3$ ) und  $56.3$  ( $\text{OCH}_3$ ) ppm. Die Dubletts im tiefen Feld koppeln mit den Signalen bei  $\delta_{\text{C}} = 109.6$  und  $118.7$  ppm (C-1 und C-2). Das Proton bei  $\delta_{\text{H}} = 7.60$  ppm wird vom Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}} = 120.7$  ppm (C-5) getragen und das verbleibende Proton H-8 koppelt mit dem Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 122.1$  ppm (C-8).

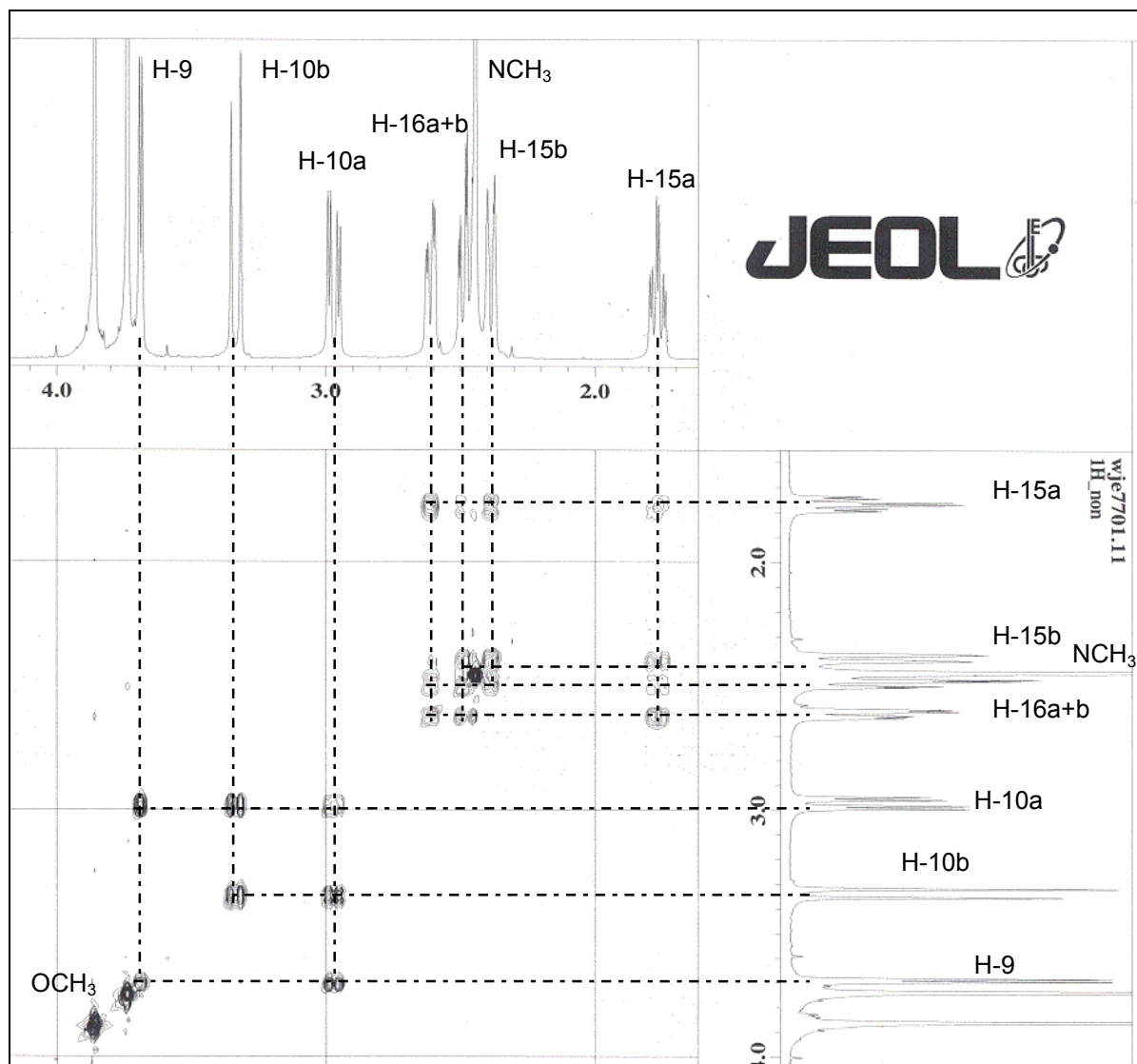


**Abb. 19:** HMQC-Spektrum von **3**

Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum kann man zusätzlich die Signale der quartären Kohlenstoffatome bei  $\delta_C = 43.7, 124.0, 129.6, 143.5, 145.5, 150.9, 161.8$  und  $181.4$  ppm erkennen. Das Signal bei  $\delta_C = 43.7$  ppm stammt vom C-13 und das Signal bei  $\delta_C = 181.4$  ppm ist der Carbonylgruppe (C-7) zuzuordnen.

Im HH-COSY-Spektrum kann man die Kopplungen der beiden aromatischen Protonen erkennen, die aber aufgrund der Aufspaltung zu Dubletts schon eindeutig identifiziert wurden. Darüber hinaus lassen sich noch zwei Kopplungspartner erkennen. Das Wasserstoffatom am C-9 zeigt vicinale Kopplungen mit einem der beiden Protonen am C-10 ( $J = 5.3$  Hz). Man kann bei den beiden geminalen Protonen am C-10 eine Aufspaltung mit einer Kopplungskonstante von je  $J = 17.6$  Hz beobachten. Die vier Wasserstoffatome am C-15 und C-16 zeigen vicinale und

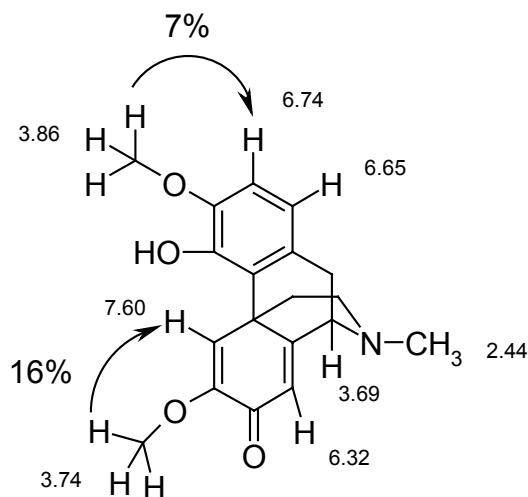
geminale Kopplungen miteinander und man sieht daher Aufspaltungsmuster höherer Ordnung, die zum Teil nicht auswertbar sind.



**Abb. 20:** HH-COSY-Spektrum von **3**

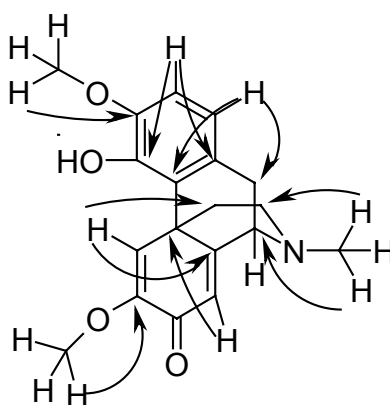
Weitere Aufschlüsse über die Struktur kann man durch NOE-Experimente erhalten. Bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz der Methoxygruppe bei  $\delta_H = 3.74$  ppm vergrößert sich das Signal bei  $\delta_H = 7.60$  ppm (H-5). Damit muss diese Methoxygruppe am C-6 gebunden sein. Bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz der zweiten Methoxygruppe bei  $\delta_H = 3.86$  ppm vergrößert sich das Dublett bei  $\delta_H = 6.74$  ppm. Dieses Signal muss von dem Proton an C-2 ( $\delta_C = 109.6$  ppm) stammen. Damit ist das H-1 ( $\delta_H = 6.65$  ppm) und C-1 ( $\delta_C = 118.7$  ppm) ebenfalls aufgeklärt. Die

Substituenten am Ring A sind somit eine Methoxygruppe am C-3 und eine Hydroxygruppe am C-4.



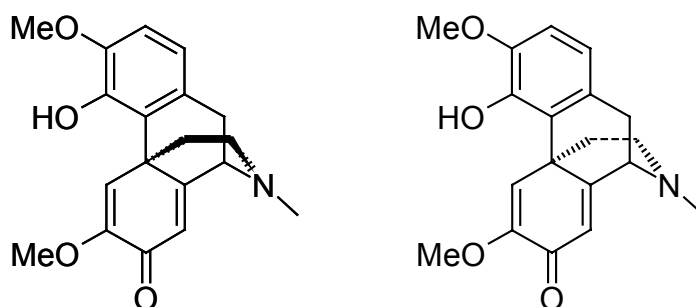
**Abb. 21:** Ausgewählte chemische Verschiebungen und NOE-Effekte von **3**

Die vollständige Aufklärung der Struktur gelingt durch die Auswertung des HMBC-Spektrums. Die Protonen der Methoxygruppen koppeln über drei Bindungen mit den Kohlenstoffatomen C-3 ( $\delta_C = 145.5$  ppm) und C-6 ( $\delta_C = 150.9$  ppm). Die Protonen der *N*-Methylgruppe zeigen Verknüpfungen mit dem C-9 ( $\delta_C = 61.1$  ppm) und C-16 ( $\delta_C = 47.0$  ppm). Man sieht Kopplungen des Protonensignals bei  $\delta_H = 7.60$  ppm mit der Methylengruppe C-15 ( $\delta_C = 37.7$  ppm) und mit den Kohlenstoffatomen C-12 ( $\delta_C = 124.0$  ppm), C-6 ( $\delta_C = 150.9$  ppm), C-14 ( $\delta_C = 161.8$  ppm) und C-7 ( $\delta_C = 181.4$  ppm). Das Wasserstoffatom bei  $\delta_H = 6.74$  ppm koppelt mit keinem aliphatischen Kohlenstoffatom, sondern nur mit C-1 ( $\delta_C = 118.7$  ppm), C-11 ( $\delta_C = 129.6$  ppm), C-4 ( $\delta_C = 143.5$  ppm) und C-3 ( $\delta_C = 145.5$  ppm). Das Dublett bei  $\delta_H = 6.65$  ppm zeigt eine Verknüpfung mit C-10 ( $\delta_C = 32.6$  ppm) sowie mit den aromatischen Kohlenstoffatomen C-12, C-4 und C-3. Das Protonensignal  $\delta_H = 6.32$  ppm koppelt mit dem quartären Kohlenstoffatom C-13 ( $\delta_C = 43.7$  ppm), sowie mit C-9 und C-6.



**Abb. 22:** Ausgewählte HMBC-Kopplungen von Salutarin

Salutarin wurde erstmals 1959 isoliert.<sup>34</sup> Erst später stellte man fest, dass Salutarin das Gemisch der beiden Enantiomere Salutaridin (**3a**) und Sinoacutin (**3b**) ist.



**Abb. 23:** Salutaridin (**3a**) und Sinoacutin (**3b**) = Salutarin (**3**)

Die Stereochemie dieses Alkaloidgemisches wird in Kapitel C.5 und die Pharmakologie in Kapitel C.6 näher beleuchtet.

#### 2.4.3 Salutaridin

Eine aus dem Strauch E isolierte Substanz hat den gleichen  $R_f$ -Wert, das gleiche Massenspektrum und die gleichen UV-, IR- und NMR-Daten wie Salutarin (**3**). Trotzdem unterscheiden sich diese Alkaloide im Schmelzpunkt (195 - 197 °C zu 206 - 208 °C) voneinander.

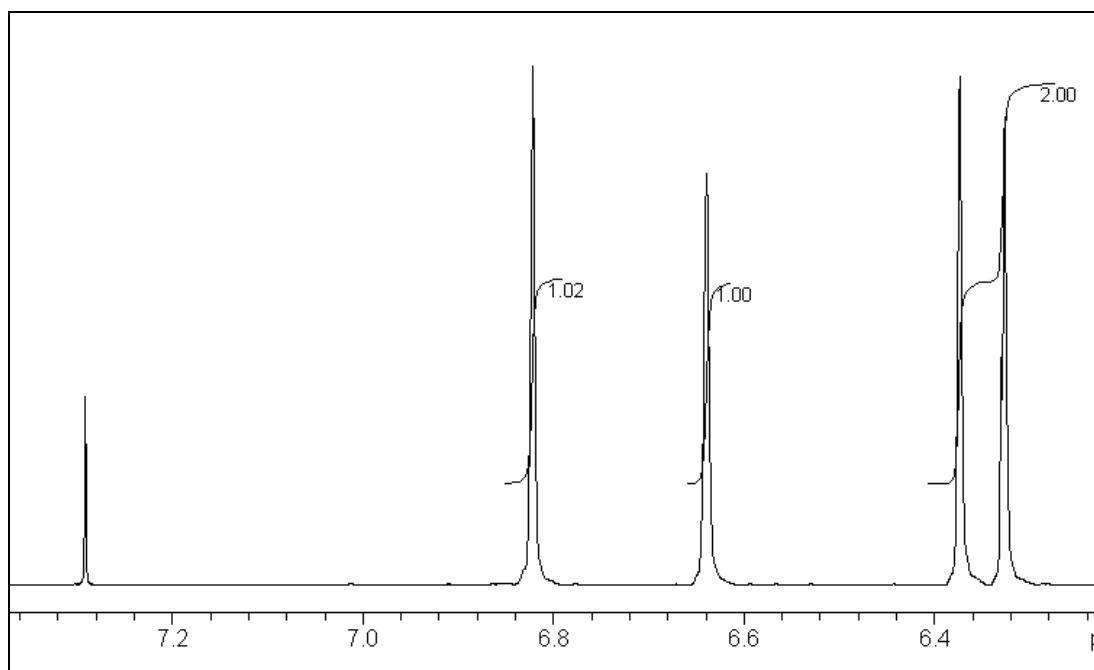
Durch die in Kapitel C.5.3 beschriebenen Untersuchungen des Drehwinkels bzw. HPLC-Versuche mit einer chiralen Säule konnte festgestellt werden, dass in diesem Strauch nicht das Enantiomergemisch Salutarin (**3**), sondern das (*R*)-konfigurierte Salutaridin (**3a**) vorkommt.

#### 2.4.4 O-Methylflavinantin

Die Substanz **4** konnte aus allen fünf Sträuchern isoliert werden. Die Abtrennung von Salutarin bzw. Salutaridin gestaltete sich als sehr schwierig und daher wurden dünnschichtchromatographische Untersuchungen mit verschiedenen Laufmitteln und Detektionsmitteln unternommen. Dabei stellte sich heraus, dass der Fleck auf der DC sich mit Dragendorffs Reagenz orange anfärben lässt, im Gegensatz zu Salutarin (**3**) mit Eisenchlorid Reagenz aber keine Reaktion zeigt. Es wurde daher angenommen, dass dieses Alkaloid keine phenolische Hydroxygruppe besitzt. Dies konnte durch die Aufnahme eines Massenspektrums bestätigt werden. Es zeigt sich ein intensiver Molekülpeak bei  $m/z = 341$  sowie das typische Zerfallsmuster der Morphinandienone  $m/z = 326 [M^+ -15]$ ,  $313 [M^+ -28]$ ,  $298 [M^+ -43]$ . Im Gegensatz zu Salutaridin ist die Verbindung **4** um 14 Masseneinheiten schwerer, was auf eine weitere Methoxygruppe schließen lässt.

Mit den geringen isolierten Mengen (4 mg) aus dem Strauch A wurden nur unsaubere  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erhalten, die zur Strukturaufklärung nicht ausreichten. Diese gelang daher erst, als aus dem Strauch E größere Substanzmengen isoliert werden konnten. Der Schmelzpunkt von **4** liegt bei 109 - 111 °C, das UV-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 238 und 283 nm und im IR-Spektrum kann man die für Morphinandienone typischen Banden bei 1664, 1635 und  $1615\text{ cm}^{-1}$  sehen. Die vorgeschlagene Summenformel von  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_4$  wird durch die Hochauflösung des Massenspektrums bestätigt.

Der größte Unterschied zum  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Salutarin ist, dass im tiefen Feld ausschließlich Singulets bei  $\delta_{\text{H}} = 6.32, 6.37, 6.63$  und  $6.82$  ppm zu sehen sind. Der Ring A kann daher nicht in 3- und 4-Position sondern nur in 2- und 3-Position substituiert sein.

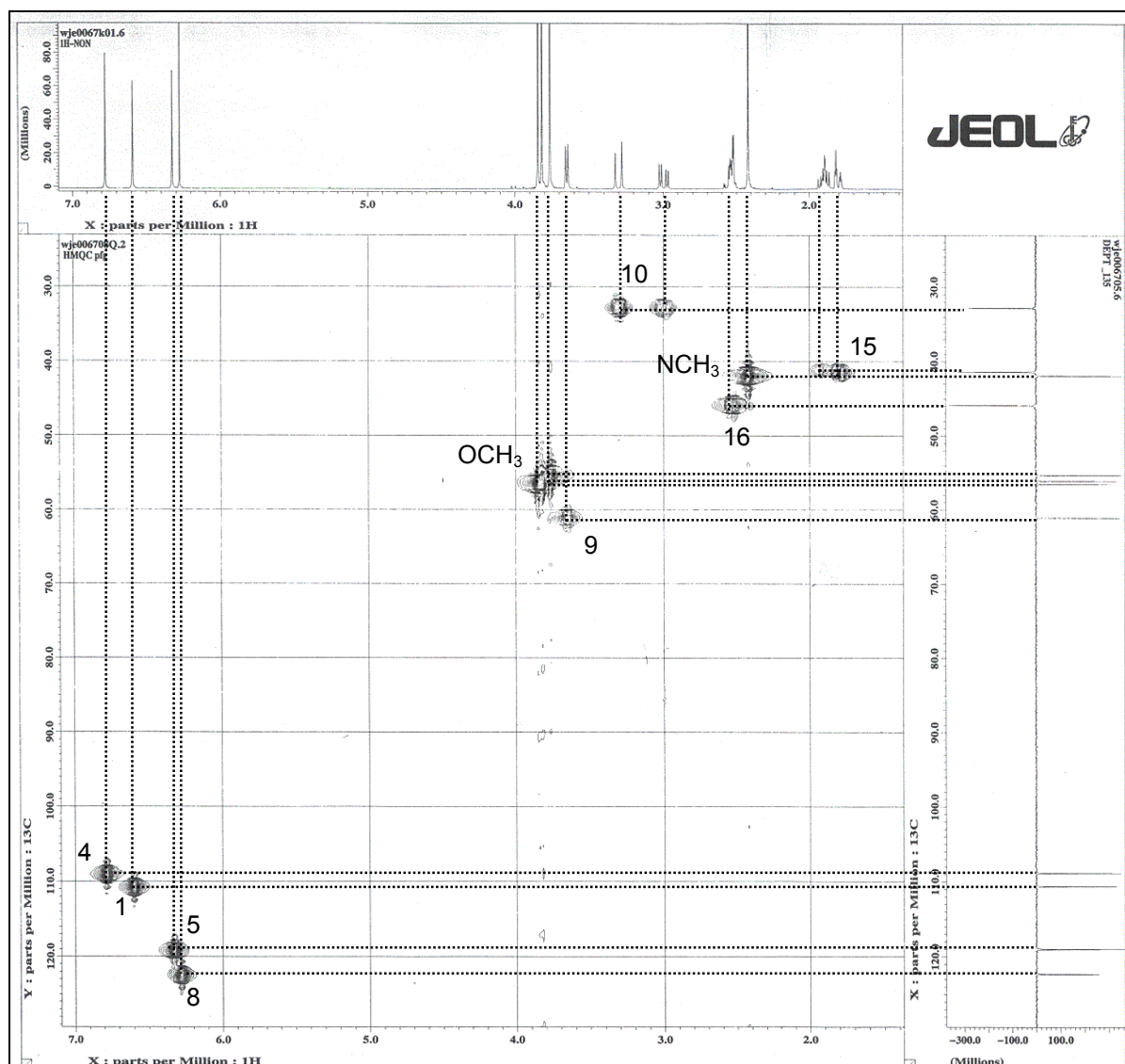


**Abb. 24:** Ausschnitt aus dem im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **4**

Die drei Methoxygruppen zeigen Signale bei  $\delta_{\text{H}} = 3.81, 3.86$  und  $3.89$  ppm. Bei  $\delta_{\text{H}} = 2.47$  ppm liegt das Singulett einer *N*-Methylgruppe. Im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 1.85 - 3.69$  ppm liegen die Signale von sieben weiteren aliphatischen Wasserstoffatomen. Das Aufspaltungsmuster von vier Protonen lässt sich nicht weiter analysieren. Dagegen erkennt man ein Dublett bei  $\delta_{\text{H}} = 3.69$  ppm mit einer Kopplungskonstante von  $J = 6.1$  Hz. Ein weiteres Dublett lässt sich bei  $\delta_{\text{H}} = 3.35$  ppm mit einer großen geminalen Kopplungskonstante von  $J = 17.8$  Hz erkennen. Ein Doppeldublett mit den Kopplungskonstanten von  $J = 17.8$  Hz und  $J = 6.1$  Hz sieht man bei  $\delta_{\text{H}} = 3.04$  ppm. Der Dacheffekt deutet auf gegenseitige Kopplungen zwischen diesen drei Protonen hin. Diese Daten stimmen mit den publizierten Werten für *O*-Methylflavinantin überein.<sup>35</sup>

Durch das HMQC-Experiment lassen sich die Signale der aliphatischen Protonen drei sekundären Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 32.7, 41.3$  und  $45.8$  ppm und einem tertiären Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}} = 60.9$  ppm zuordnen. Mit dem Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 41.8$  ppm koppeln die Protonen der *N*-Methylgruppe und die drei Methoxygruppen koppeln mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 55.2, 56.0$  und  $56.4$  ppm. Die vier Wasserstoffatome im tiefen Feld zeigen eine Verknüpfung mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 108.8, 110.5, 118.9$  und  $122.2$  ppm. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sieht man außerdem die Signale der quartären Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 42.3, 128.9, 130.1, 148.1, 148.4, 151.5, 161.8$  und  $181.0$  ppm.



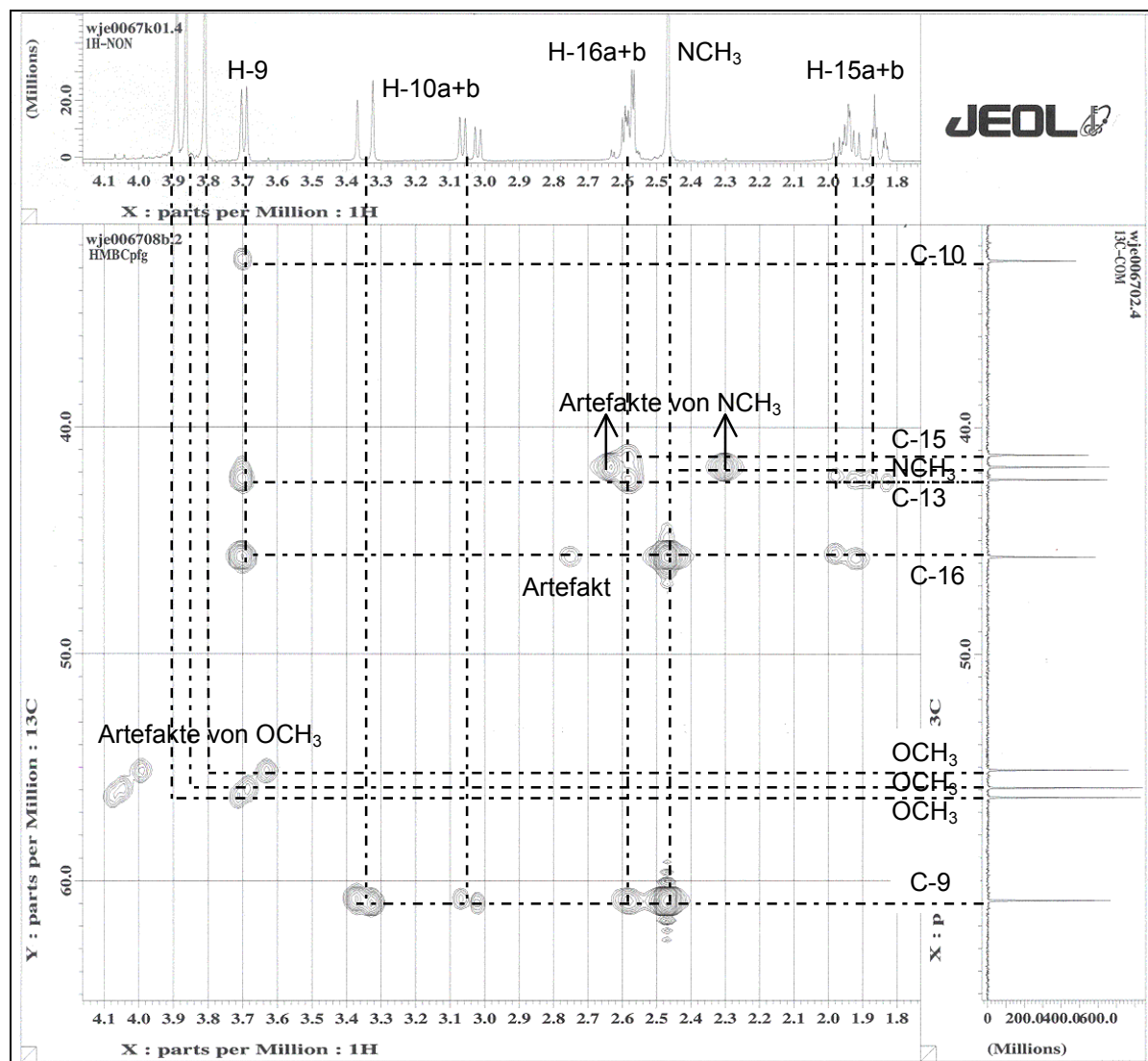


**Abb. 25:** HMQC-Spektrum von **4**

Im HH-COSY-Spektrum kann man die Kopplungen der aliphatischen Protonen aufklären. Die Protonen einer Methylengruppe zeigen geminale Kopplungen und eines der beiden Protonen zeigt zusätzlich Fernkopplungen mit dem Wasserstoffatom der Methingruppe. Die vier Protonen der beiden anderen Methylengruppen zeigen sowohl geminale wie auch vicinale Kopplungen untereinander.

Im HMBC-Spektrum kann man erkennen, dass die Methoxygruppe bei  $\delta_H = 3.81$  ppm mit dem Kohlenstoffatom bei  $\delta_C = 151.5$  ppm koppelt. Die Protonen der Methoxygruppen bei  $\delta_H = 3.86$  und  $3.89$  ppm zeigen Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 148.1$  und  $148.4$ . Das Signal der Wasserstoffatome der *N*-Methylgruppe bei  $\delta_H = 2.47$  ppm zeigt eine Verknüpfung mit dem Signal der

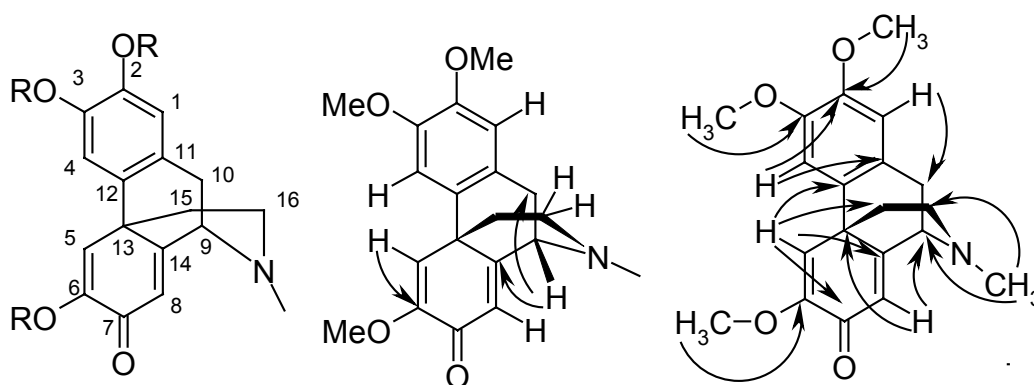
Methingruppe bei  $\delta_C = 60.9$  ppm (C-9) und einer Methylengruppe bei  $\delta_C = 45.8$  ppm (C-16). Das Dublett des Protons der Methingruppe bei  $\delta_H = 3.69$  ppm zeigt Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 32.7$  (C-10), 41.8 (NCH<sub>3</sub>), 42.3 (C-13), 45.8 (C-16), 122.2 (C-8), 128.9 (C-11) und 161.8 (C-14) ppm.



**Abb. 26:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **4**

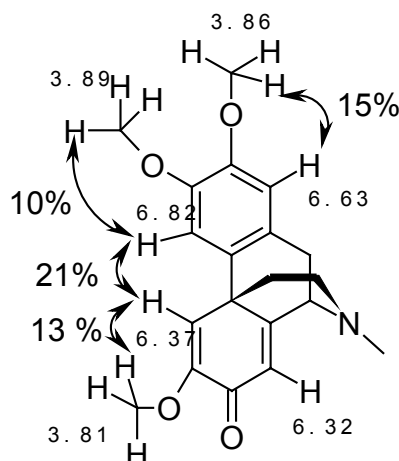
Das Proton bei  $\delta_H = 6.82$  ppm koppelt mit aromatischen Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 128.9$  und  $148.4$  ppm und zusätzlich mit dem quartären Kohlenstoffatom bei  $\delta_C = 42.3$  ppm. Bei diesem Proton muss es sich daher um das H-4 handeln. Das Wasserstoffatom bei  $\delta_H = 6.63$  zeigt Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 130.1$  und  $148.1$  ppm und auch zu der Methylengruppe bei  $\delta_C = 32.7$  ppm. Da diese Protonen eine HH-Verknüpfung mit den Protonen der Methingruppe zeigen, muss dies das C-10 sein und das Wasserstoffatom bei  $\delta_H = 6.63$  ppm das H-1. Man sieht

Kopplungen des Protons bei  $\delta_H = 6.37$  ppm zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 181.0$  (C-7), 161.8 (C-14), 151.5 (C-6), 130.1 (C-12) und 41.3 (C-15) ppm. Daher handelt es sich bei diesem Wasserstoffatom um das H-5. Das Proton bei  $\delta_H = 6.32$  ppm zeigt Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 151.5$  (C-6), 60.9 (C-9) und 42.3 (C-13) ppm und ist daher das H-8.



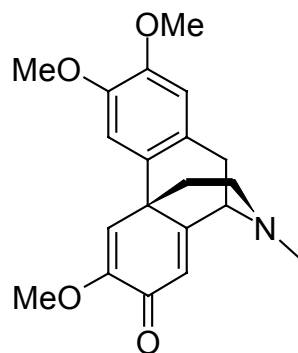
**Abb. 27:** Ausgewählte Fernkopplungen von **4** über zwei und drei Bindungen

Um die genaue Position der Substituenten festzulegen, wurden NOE-Experimente durchgeführt. Bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz der ersten Methoxygruppe bei  $\delta_H = 3.81$  ppm vergrößert sich das Singulett bei  $\delta_H = 6.37$  ppm. Bei Einstrahlung auf das Signal der zweiten Methoxygruppe bei  $\delta_H = 3.86$  ppm vergrößert sich das Singulett bei  $\delta_H = 6.63$  ppm. Darüber hinaus lässt sich ein NOE-Effekt zwischen den Protonen der dritten Methoxygruppe bei  $\delta_H = 3.89$  ppm und dem Signal bei  $\delta_H = 6.82$  ppm feststellen. Bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenzen der oben angeregten Protonen zeigen sich in umgekehrter Weise NOE-Effekte mit den drei Methoxygruppen. Darüber hinaus vergrößert sich das Signal bei  $\delta_H = 6.37$  ppm bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz von  $\delta_H = 6.82$  ppm und umgekehrt. Damit wurde gezeigt, dass dies die Wasserstoffatome in 4- und 5-Position sein müssen. Das Signal des Protons in der 8-Position bei  $\delta_H = 6.32$  ppm zeigt keine nennenswerten NOE-Effekte.



**Abb. 28:** NOE-Effekte von **4** mit Prozentangaben

Damit wurde die Struktur von **4** lückenlos aufgeklärt. Dieses Alkaloid wurde erstmals 1969 von Kametami et al. aus Flavinantin (**6**) synthetisiert.<sup>36</sup> Erst 1972 wurde natürliches *O*-Methylflavinantin aus *Nemuaron vieillardii* (Monimiaceae)<sup>37</sup> und später aus *Rhigiocarya racemifera* (Menispermaceae)<sup>38</sup> isoliert. Später wurde dieses Alkaloid aus *Litsea sebifera* (Lauraceae) isoliert und mit dem neuen Namen Sebiferin versehen.<sup>39</sup> Die absolute Konfiguration von *O*-Methylflavinantin wurde von Bhakuni aufgeklärt. Es konnte nachgewiesen werden, dass das (*R*)-Enantiomer aus (-)-Retikulin biosynthetisiert wird.<sup>40</sup> Die spezifische Drehung von **4** ( $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ ,  $c = 0.2$ , Chloroform) stimmt mit den publizierten Literaturwerten von (*R*)-*O*-Methylflavinantin überein ( $[\alpha]_D^{24} = -13^\circ$ , Chloroform).<sup>41</sup> Dieses Alkaloid zeigt analgetische und narkotische Wirkung.<sup>42</sup> Darüber hinaus zeigt *O*-Methylflavinantin synergistische Effekte mit zwei Pregnanglykosiden bei der Blutgerinnung.<sup>43</sup>



**4**

#### 2.4.5 Norsinoacutin

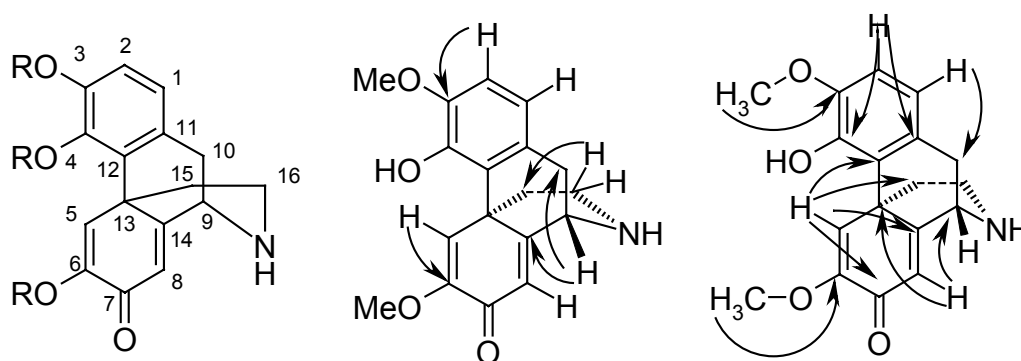
Die isolierte Substanz zeigt bei dünnschichtchromatographischer Auftrennung einen einzelnen Fleck, der sich mit Dragendorffs Reagenz orange anfärben lässt. Der Schmelzpunkt liegt bei 119 - 120 °C und das UV-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 241 und 279 nm. Im IR-Spektrum kann man die für Morphinandienone typischen Banden bei 1666, 1638 und 1614 erkennen. Im Massenspektrum sieht man einen starken Molekülpeak bei  $m/z = 314$  und das typische Zerfallsmuster für Morphinandienone ( $m/z = 298 [M^+ -15]$ ,  $285 [M^+ -28]$  und  $270 [M^+ -43]$ ). Durch die Hochauflösung erhält man eine Summenformel von  $C_{18}H_{19}NO_4$ , was für ein Norderivat der Morphinandienone spricht.

Die Signale im  $^1H$ -NMR-Spektrum deuten auf eine 3,4-Disubstitution des Ringes A hin. Man kann im tiefen Feld zwei Dubletts bei  $\delta_H = 6.65$  und  $6.75$  ppm mit einer Kopplungskonstante von je  $J = 8.4$  Hz erkennen. Darüber hinaus sieht man zwei Singulets bei  $\delta_H = 6.27$  und  $7.60$  ppm. Zwei Singulets für jeweils drei Protonen bei  $\delta_H = 3.73$  und  $3.86$  ppm stammen von Methoxygruppen. Man kann bei dieser Verbindung kein Signal für eine *N*-Methylgruppe finden, was daher für ein *N*-Norderivat spricht. Im Bereich von  $\delta_H = 1.57$  bis  $3.91$  ppm finden sich die Signale von sieben weiteren aliphatischen Protonen.

Im HH-COSY-Spektrum zeigt sich die vicinale Kopplung der Protonen einer Methylengruppe mit einer Methingruppe sowie die geminalen und vicinalen Kopplungen der vier Wasserstoffatome zweier Methylengruppen.

Im APT-Spektrum sieht man sieben primäre bzw. tertiäre Kohlenstoffatome und elf sekundäre bzw. quartäre Kohlenstoffatome. Eine genaue Zuordnung gelingt mit dem HMQC-Experiment. Die vier aromatischen Protonen zeigen Kopplungen mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 109.6$ ,  $118.8$ ,  $120.5$  und  $121.1$  ppm. Die drei Wasserstoffatome bei  $\delta_H = 3.73$  ppm sind verknüpft mit dem Signal bei  $\delta_C = 54.8$  ppm und die drei Protonen bei  $\delta_H = 3.86$  ppm mit dem Kohlenstoffatom bei  $\delta_C = 56.3$  ppm. Diese Signale sind daher Methoxygruppen zuzuordnen. Darüber hinaus lassen sich eine Methingruppe bei  $\delta_C = 54.4$  ppm und drei Methylengruppen bei  $\delta_C = 39.0$ ,  $39.6$  und  $43.0$  ppm erkennen. Demnach stammen die restlichen acht Signale von quartären Kohlenstoffatomen ( $\delta_C = 44.3$ ,  $123.8$ ,  $129.9$ ,  $143.5$ ,  $145.5$ ,  $150.9$ ,  $164.1$  und  $181.6$  ppm).

Die genaue Position der einzelnen Atome der Verbindung wurde durch das HMBC-Spektrum aufgeklärt:



**Abb. 29:** Ausgewählte Kopplungen von **5** über zwei und drei Bindungen

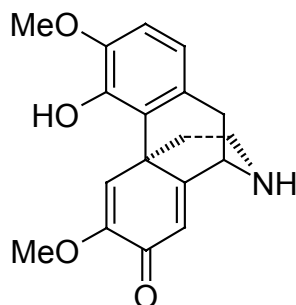
Die Protonen der Methylengruppe bei  $\delta_C = 39.6$  ppm zeigen keine Kopplungen zu einem aromatischen Kohlenstoffatom und müssen daher am C-16 positioniert sein. Man sieht aber eine Verknüpfung zu der Methylengruppe C-15 bei  $\delta_C = 43.0$  ppm.

In dem Molekül ist nur eine Methingruppe bei  $\delta_C = 54.4$  ppm vorhanden und muss daher an der 9-Position liegen. Das Proton zeigt  $^2J$ -Kopplungen zum C-10 bei  $\delta_C = 39.0$  ppm und zum quartären Kohlenstoffatom C-14 bei  $\delta_C = 164.1$  ppm.

Die Protonen im tiefen Feld zeigen in diesem Experiment kaum  $^2J$ -Kopplungen, was an einem ungünstigen Winkel im aromatischen System für die Ausbildung dieser Kopplungen liegt. Man sieht nur Kopplungen der Protonen bei  $\delta_H = 6.27$  und  $7.60$  ppm zu den Kohlenstoffatomen C-3 ( $\delta_C = 145.5$  ppm) und C-6 ( $\delta_C = 150.9$  ppm), die mit einer Methoxygruppe substituiert sind. Diese kann man sehr gut zuordnen, da die Protonen der Methoxygruppen deutliche Kopplungen über drei Bindungen zum jeweiligen aromatischen Kohlenstoffatom zeigen.

Die Protonen im tiefen Feld sind zur Ausbildung von  $^3J$ -Kopplungen besonders befähigt. Das am stärksten ins Tieffeld verschobene Proton am C-5 bei  $\delta_H = 7.60$  ppm zeigt Kopplungen zum C-7 ( $\delta_C = 181.6$  ppm), C-12 ( $\delta_C = 123.8$  ppm), C-14 ( $\delta_C = 164.1$  ppm) und C-15 ( $\delta_C = 43.01$  ppm). Das Singulett bei  $\delta_H = 6.27$  ppm koppelt mit den Kohlenstoffatomen C-9 bei  $\delta_C = 54.4$  ppm und C-13 bei  $\delta_C = 44.3$  ppm. Durch die beiden Dubletts im aromatischen Bereich kann man die Position der Kohlenstoffatome im Ring A aufklären. Das Signal bei  $\delta_H = 6.75$  zeigt Kopplungen mit dem C-4 ( $\delta_C = 143.5$  ppm) und dem C-11 ( $\delta_C = 129.9$  ppm). Das Proton am C-1 bei  $\delta_H = 6.65$  ppm zeigt unter anderem eine Kopplung zum C-10 bei  $\delta_C = 39.0$  ppm, womit die Verknüpfung aller Wasserstoff- und Kohlenstoffatome aufgeklärt ist.

Die Konfiguration von **5** wurde mit Hilfe der optischen Drehung bestimmt. Der Drehwinkel  $[\alpha]_D^{20}$  beträgt  $-91^\circ$  ( $c = 6.7$ , Methanol; Literatur<sup>13</sup>:  $[\alpha]_D^{16} = -107^\circ$ , Ethanol). Damit ist die isolierte Substanz **5** Norsinoacutin:



**5**

Norsinoacutin wurde erstmals aus *Croton balsamifera* isoliert.<sup>12</sup>

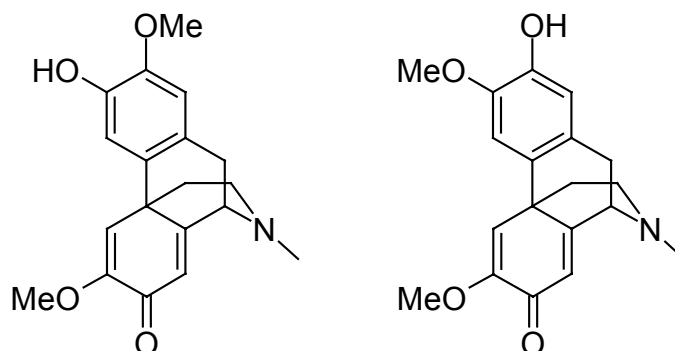
#### 2.4.6 Flavinantin

Die isolierte Substanz **6** zeigt auf der DC einen einzigen Fleck, der sich mit Dragendorffs Reagenz orange anfärben lässt. Der Schmelzpunkt liegt in einem Bereich von  $128 - 130^\circ\text{C}$ . Das UV-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei  $239$  und  $286$  nm. Das IR-Spektrum zeigt die für Morphinandienone typischen Banden bei  $1664$ ,  $1634$  und  $1622$   $\text{cm}^{-1}$ . Das Massenspektrum enthält einen starken Molekülpeak bei  $m/z = 327$  und das typische Zerfallsmuster mit  $[M^+ - 15]$ ,  $[M^+ - 28]$  und  $[M^+ - 43]$ . Die hochaufgelöste Masse bestätigt eine Summenformel von  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ .

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt vier Singulets bei  $\delta_{\text{H}} = 6.32$ ,  $6.35$ ,  $6.61$  und  $6.92$  ppm. Drei weitere Singulets für jeweils drei Protonen sieht man bei  $\delta_{\text{H}} = 2.46$ ,  $3.79$  und  $3.86$  ppm. Daraus kann man schließen, dass es sich bei **6** wieder um ein Morphinandienon handelt, das in 2- und 3-Position substituiert ist und zwei Methoxygruppen sowie eine *N*-Methylgruppe trägt. Sieben weitere aliphatische Protonen liegen im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 1.83 - 3.69$  ppm.

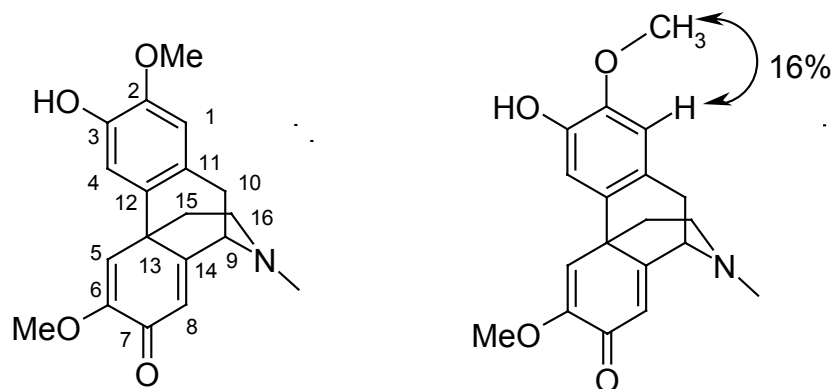
Das DEPT-Spektrum und das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigen in Verbindung mit dem HMQC-Spektrum drei Methylengruppen bei  $\delta_{\text{C}} = 32.8$ ,  $41.3$  und  $45.8$  ppm, eine *N*-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 41.8$  ppm, zwei Methoxygruppen bei  $\delta_{\text{C}} = 55.1$  und  $56.0$  ppm, eine Methingruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 61.0$  ppm, vier mit jeweils einem Proton substituierte Kohlenstoffatome im tiefen Feld bei  $\delta_{\text{C}} = 109.8$ ,  $111.4$ ,  $119.2$  und  $122.3$  ppm und acht quartäre Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 42.3$ ,  $127.7$ ,  $130.8$ ,  $144.7$ ,  $145.9$ ,  $151.4$ ,

161.7 und 181.1 ppm. Die Daten ähneln denen von *O*-Methylflavinantin, was den Schluss nahelegt, dass das Alkaloid **6** eine der beiden folgenden Strukturen hat:



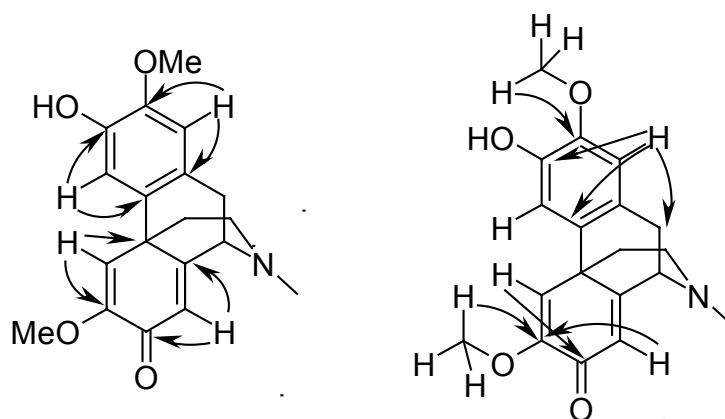
**Abb. 30:** Die Isomere Flavinantin bzw. Isosalutaridin

Diese Frage wurde mit Hilfe des HMBC-Spektrums und eines NOE-Experiments aufgeklärt. Die Protonen der Methoxygruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.79$  ppm zeigen  $^3J$ -Fernkopplungen zu dem Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}} = 151.4$  ppm und die Protonen der zweiten Methoxygruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.86$  ppm zeigen  $^3J$ -Fernkopplungen zu dem Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}} = 145.9$  ppm. Die beiden Singulets bei  $\delta_{\text{H}} = 6.32$  und  $6.35$  ppm koppeln mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 151.4$ ,  $161.7$  und  $181.1$  ppm, was in Analogie zu den anderen isolierten Verbindungen die Atome C-6, C-14 und C-7 sein müssen. Damit stammt das Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 3.86$  ppm von den Wasserstoffatomen der Methoxygruppe am Aromaten. Strahlt man nun auf die Resonanzfrequenz ein zeigt sich ein NOE-Effekt mit dem Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 6.61$  ppm. Dieses Signal wiederum zeigt im HMBC-Spektrum Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 32.8$  (C-10),  $130.8$  (C-12),  $144.7$  (C-3) und  $145.9$  (C-2) ppm. Nur das Proton in der 1-Position kann mit der Methylengruppe des C-10  $^3J$ -Fernkopplungen eingehen.



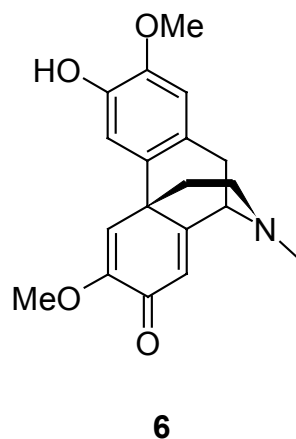
**Abb. 31:** Nummerierung und NOE-Effekte bei **6**





**Abb. 32:** Ausgewählte Fernkopplungen über zwei und drei Bindungen von **6**

Um die absolute Konfiguration aufzuklären, wurde der Drehwinkel gemessen. Die Verbindung **6** hat eine spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = -20.6^\circ$  ( $c = 6.7$ , Methanol; Lit.<sup>75</sup>:  $[\alpha] = -14.5^\circ$ ,  $c = 1.1$ , Ethanol). Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>44</sup> Damit wurde die Struktur des Alkaloids **6** aufgeklärt als 3-Hydroxy-2,6-dimethoxymorphinandienon (= Flavinantin):



Tab. 2:  $^1\text{H-NMR}$ -Daten [ppm] der Morphinandienone in  $\text{CDCl}_3$ 

Position der H-Atome	Salutarin	Salutarin-N-Oxid	Norsino-acutin	O-Methyl-flavinantin	Flavinantin
1	6.65	6.64	6.65	6.63	6.61
2	6.74	6.80	6.75	-	-
4	-	-	-	6.82	6.92
5	7.60	7.50	7.60	6.37	6.35
8	6.32	6.46	6.27	6.32	6.32
9	3.69	4.25	3.91	3.69	3.69
10	2.97	3.25-	3.14	3.04	3.04
	3.34	3.48	3.34	3.35	3.34
15	1.77	2.35	1.57	1.85	1.83
	2.39	2.64	2.52	1.95	1.92
16	2.49	3.16-	2.71-	2.49-	2.53-
	2.61	3.37	2.87	2.63	2.63
NCH <sub>3</sub>	2.44	3.33	-	2.47	2.46
2-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	3.86	3.86
3-OCH <sub>3</sub>	3.86	3.89	3.86	3.89	-
6-OCH <sub>3</sub>	3.74	3.76	3.91	3.81	3.79

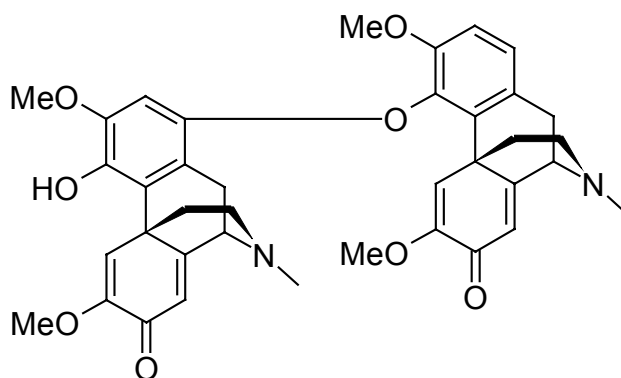
Tab. 3:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten [ppm] der Morphinandienone in  $\text{CDCl}_3$

Position der C-Atome	Salutarin	Salutarin-N-Oxid	Norsinoacutin	O-Methylflavinantin	Flavinantin
1	118.7	118.9	118.8	110.5	111.4
2	109.6	110.7	109.6	148.1	145.9
3	145.5	147.0	145.5	148.4	144.7
4	143.5	144.3	143.5	108.8	109.8
5	120.7	119.1	121.1	118.9	119.2
6	150.9	151.6	150.9	151.5	151.4
7	181.4	180.4	181.6	181.0	181.1
8	122.1	127.0	120.5	122.2	122.3
9	61.1	77.0	54.4	60.9	61.0
10	32.6	36.4	39.0	32.7	32.8
11	129.6	125.0	129.9	128.9	127.7
12	124.0	124.5	123.8	130.1	130.8
13	43.7	42.3	44.3	42.3	42.3
14	161.8	155.5	164.1	161.8	161.7
15	37.7	33.5	43.0	41.3	41.3
16	47.0	61.8	39.6	45.8	45.8
NCH <sub>3</sub>	41.6	58.4	-	41.8	41.8
2-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	56.0	56.0
3-OCH <sub>3</sub>	56.3	56.6	56.3	56.4	-
6-OCH <sub>3</sub>	54.8	55.3	54.8	55.2	55.1

## 2.5 Strukturaufklärung der Morphinandienon-Dimere

Aus dem Strauch E wurden drei weitere Substanzen isoliert, die sich auf der DC orange anfärben lassen. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Alkaloiden konnten keine EI- bzw. CI-Massenspektren aufgenommen werden. Mittels HPLC-MS gelang es jedoch, die Molekülmassen zu bestimmen. Das Molekulargewicht ist für die ersten beiden Substanzen jeweils 652 und für die dritte Substanz 638. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich um dimere Alkaloide handelt.

Vereinzelt wurden schon interessante Alkaloid-Dimere isoliert.<sup>45</sup> In der Regel sind diese über eine oder mehrere Etherbrücken verbunden. Sariyar et al. isolierten 1990 aus zwei *Papaver*-Arten (+)-Salutadimerin (**VIII**), das durch oxidative Kupplung aus zwei Molekülen Salutaridin entstanden sein soll.<sup>46</sup> Dies ist das bisher einzige isolierte dimere Morphinandienon-Alkaloid.



**VIII**

Salutadimerin hat ebenfalls das Molekulargewicht von  $m/z = 652$ , zeigt aber andere spektroskopische Eigenschaften als die aus *Croton flavens* L. isolierten Substanzen.

### 2.5.1 Salutimerin A

Die Substanz **7** zersetzt sich ab 220 °C. Das UV-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 241 und 283 nm. Das IR-Spektrum zeigt die für Morphinandienone typischen Banden bei 1670, 1642 und 1618  $\text{cm}^{-1}$ . Die hochauflösende Masse ergab ein Molekulargewicht von 652.2759, was für die Summenformel  $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8$  spricht. Die spezifische Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  beträgt  $-219^\circ$  ( $c = 1.7$  mg, Methanol).

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt (siehe Anhang E.2.1) im Gegensatz zu den bisher isolierten Substanzen nur drei Singulets im tiefen Feld bei  $\delta_{\text{H}} = 6.30$ , 6.59 und 7.56 ppm. Man sieht darüber hinaus zwei Singulets von Methoxygruppen bei  $\delta_{\text{H}} = 3.78$  und 3.91 ppm und das Singulett einer *N*-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.29$  ppm. Ferner

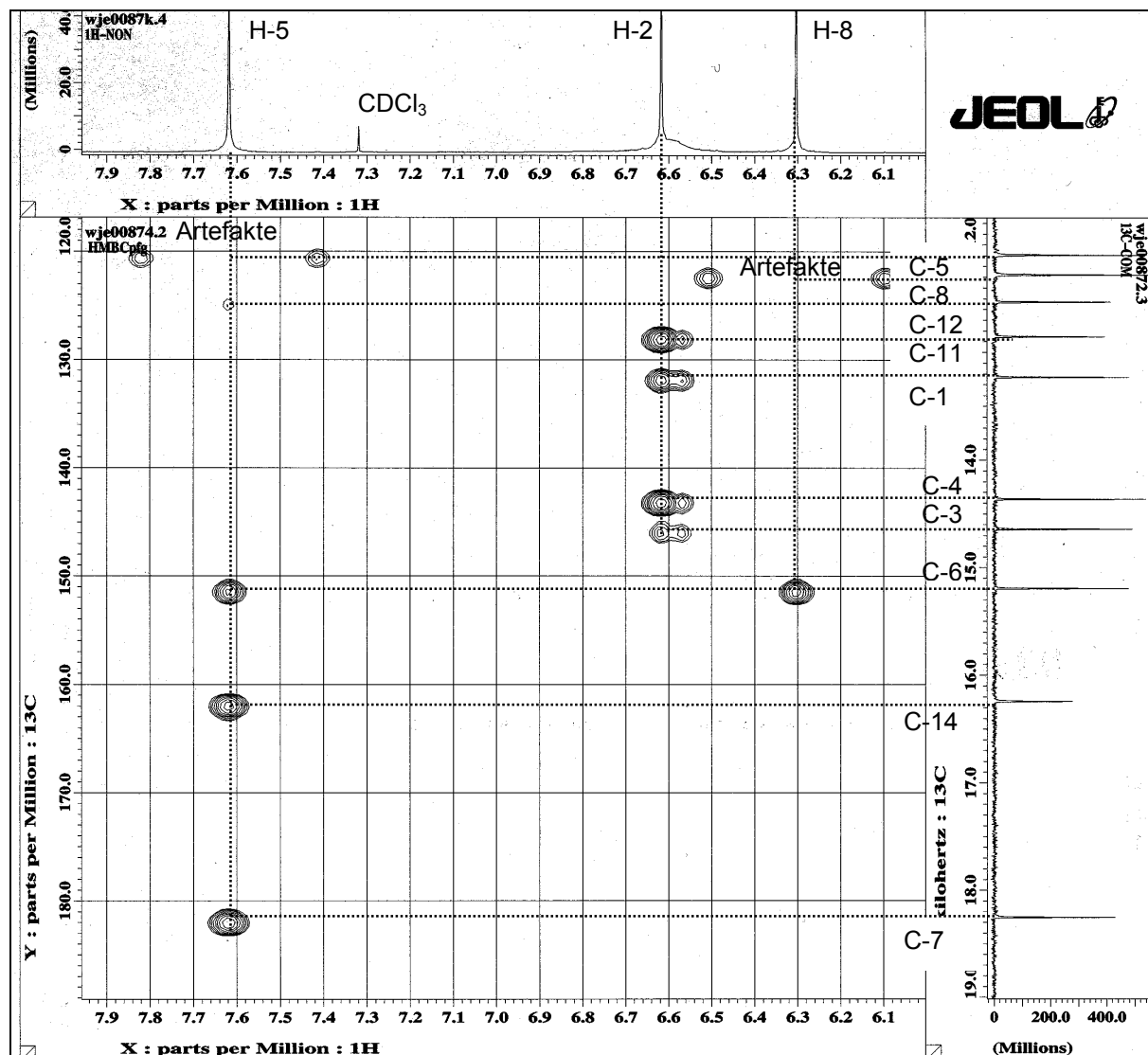
kann man die Signale von sieben aliphatischen Protonen im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 1.78 - 3.57$  ppm erkennen. Man sieht Multipletts für jeweils ein Wasserstoffatom bei  $\delta_{\text{H}} = 1.78$  und  $2.26$  ppm. Im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 2.41 - 2.51$  kann man ein Multiplett von zwei sich überlagernden Protonen erkennen. Bei  $\delta_{\text{H}} = 2.62$  ppm sieht man ein Doppeldublett mit den Kopplungskonstanten von  $J = 12.1$  Hz und  $J = 4.0$  Hz. Ferner kann man ein Dublett mit der Kopplungskonstante  $J = 18.3$  Hz bei  $\delta_{\text{H}} = 2.84$  ppm erkennen. Die Methingruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.57$  ppm zeigt vicinale Kopplungen mit der Kopplungskonstante von  $J = 5.1$  Hz. Man sieht also im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur einen Satz von Signalen, was für das Vorliegen eines symmetrischen Dimers spricht.

Aus dem DEPT-Spektrum,  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum und dem HMQC-Spektrum kann man entnehmen, dass in dem Molekül drei Methylengruppen bei  $\delta_{\text{C}} = 31.1, 37.6$  und  $47.3$  ppm, eine *N*-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 41.7$  ppm, zwei Methoxygruppen bei  $\delta_{\text{C}} = 54.9$  und  $56.4$  ppm, eine Methingruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 60.6$  ppm, drei tertiäre Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 110.1, 120.3$  und  $122.1$  ppm sowie neun quartäre Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 43.9, 124.6, 127.8, 131.6, 142.8, 145.6, 151.1, 161.5$  und  $181.5$  ppm vorliegen.

Im HH-COSY-Spektrum kann man erkennen, dass das Wasserstoffatom der Methingruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.57$  ppm (H-9) mit einem Proton einer Methylengruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.26$  ppm (H-10a) koppelt. Die beiden Wasserstoffatome dieser Methylengruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 31.1$  ppm (C-10) zeigen geminale Kopplungen miteinander. Die Protonen der beiden anderen Methylengruppen am C-15 und C-16 koppeln miteinander und zeigen dadurch Signalaufspaltungen höherer Ordnung.

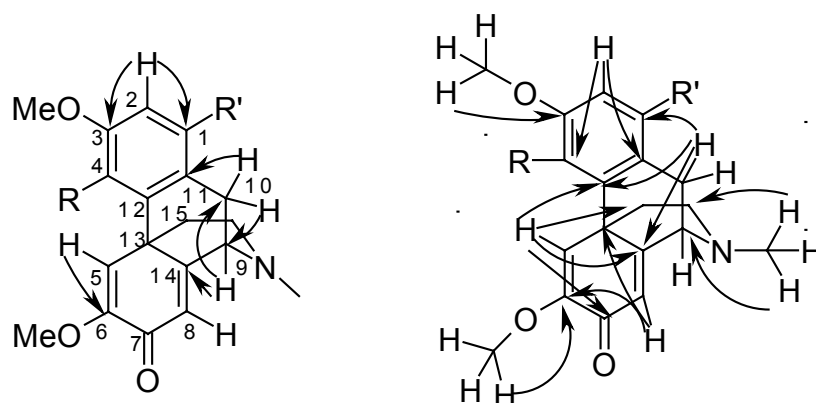
Alle Daten deuten darauf hin, dass ein Morphinandienon-Dimer vorliegt, das entweder am Ring A oder C eine C-C-Verknüpfung eingegangen ist. Aufklärung darüber ergibt sich aus dem HMBC-Spektrum. Die Protonen der beiden Methoxygruppen zeigen  $^3J$ -Kopplungen zu den jeweiligen Ringkohlenstoffatomen:  $\delta_{\text{H}} = 3.78$  zu  $\delta_{\text{C}} = 151.1$  (C-6) ppm und  $\delta_{\text{H}} = 3.91$  zu  $\delta_{\text{C}} = 145.6$  (C-3) ppm. Die Wasserstoffatome der *N*-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.29$  ppm koppeln mit der Methingruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 60.6$  ppm (C-9) und der Methylengruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 47.3$  ppm (C-16). Das Proton  $\delta_{\text{H}} = 7.56$  ppm zeigt Kopplungen zu dem am stärksten ins tiefe Feld verschobenen Kohlenstoffatom C-7 bei  $\delta_{\text{C}} = 181.5$  ppm sowie zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 161.5$  (C-14),  $151.1$  (C-6),  $124.6$  (C-12) und  $37.6$  (C-15) ppm. Das Wasserstoffatom bei  $\delta_{\text{H}} = 6.30$  ppm koppelt ebenfalls mit dem Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}} = 151.1$  ppm (C-6) sowie mit dem C-13 ( $\delta_{\text{C}} = 43.9$  ppm). Damit kann das verbleibende aromatische Proton bei  $\delta_{\text{H}} = 6.59$  ppm nur am Ring A liegen. Das Wasserstoffatom zeigt keinerlei Fernkopplungen zu aliphatischen Kohlenstoffatomen und kann daher nur mit dem C-2 verknüpft sein. Man sieht

dagegen vier Kopplungen über zwei und drei Bindungen zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 127.8$  (C-11), 131.6 (C-1), 142.8 (C-4) und 145.6 (C-3) ppm.



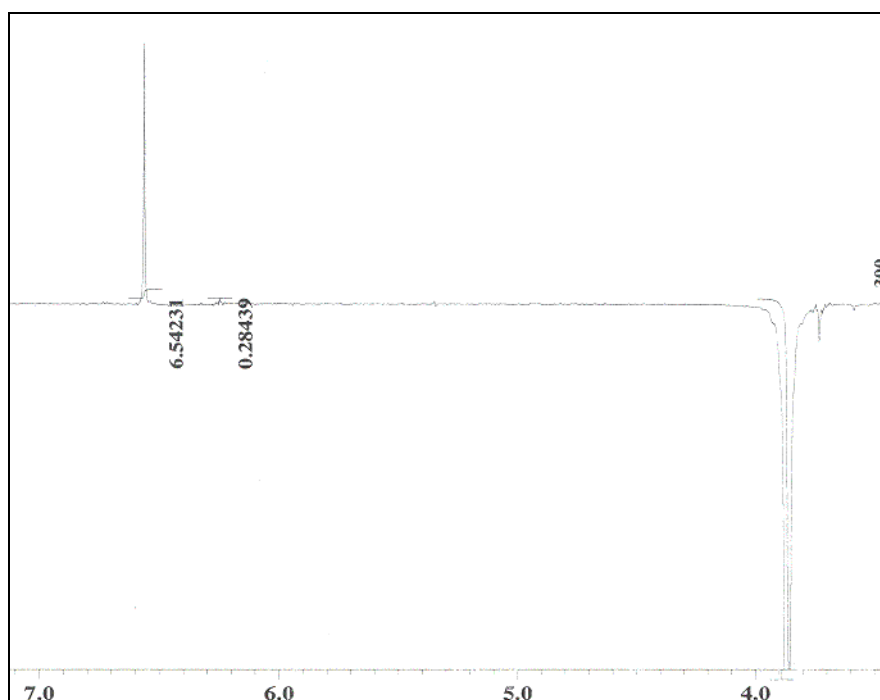
**Abb. 33:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von 7

Das Proton der Methingruppe bei  $\delta_H = 3.57$  ppm zeigt unter anderem Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 31.1$  (C-10) und 161.5 (C-14) ppm. Man sieht Fernkopplungen der Protonen der Methylengruppe des C-10 mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C = 60.6$  (C-9), 124.6 (C-12), 127.8 (C-11), 131.6 (C-1) und 161.5 (C-14) ppm.



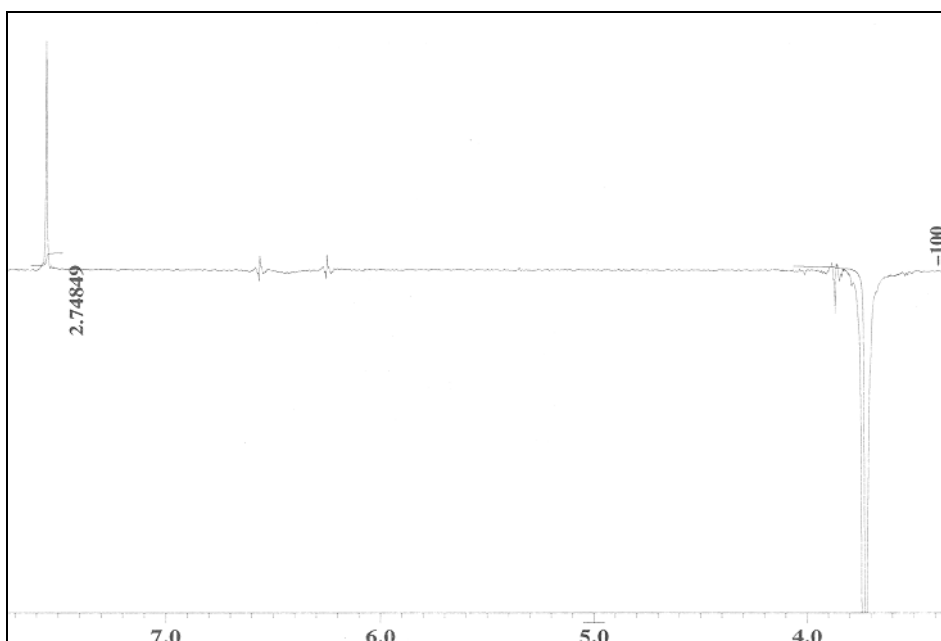
**Abb. 34:** Ausgewählte  $^2J$ - und  $^3J$ -Kopplungen von **7**

Die genaue Position der Methoxygruppe kann durch NOE-Experimente herausgefunden werden. Bei Einstrahlung auf die Protonen der Methoxygruppe bei  $\delta_H = 3.91$  ppm vergrößert sich das Signal bei  $\delta_H = 6.59$  ppm (H-2).



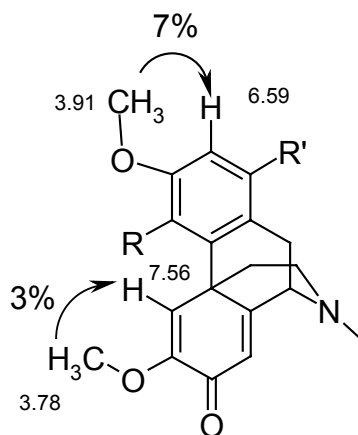
**Abb. 35:** NOE-Spektrum von **7**

Das am stärksten in das tiefe Feld verschobene Signal bei  $\delta_H = 7.56$  ppm (H-5) vergrößert sich bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz der 6-Methoxygruppe bei  $\delta_H = 3.78$  ppm.



**Abb. 36:** NOE-Spektrum von **7**

Damit enthält die Substanz **7** folgendes Strukturelement, wobei noch nicht klar ist, wie der Ring A in 1- bzw. 4-Position substituiert ist:

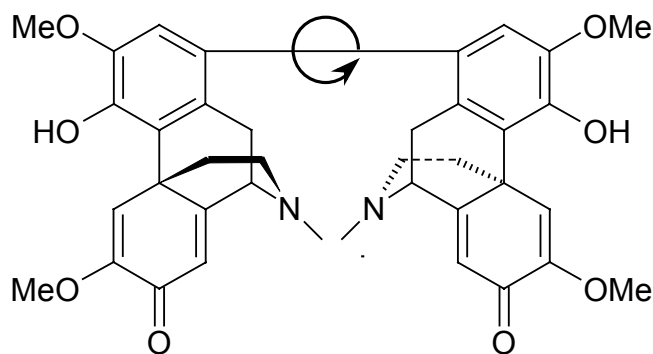


**Abb. 37:** NOE-Effekte von **7** mit Prozentangabe

Das Kohlenstoffatom in 1-Position ist nicht mit einer Sauerstofffunktion substituiert, da die chemische Verschiebung mit  $\delta_C = 131.6$  ppm dafür zu niedrig ist. Darüber hinaus sind solche Substitutionsmuster bisher nicht bekannt. Viel logischer erscheint es, wenn das Kohlenstoffatom in 4-Position die Hydroxygruppe trägt und damit die Grundstruktur von Salutaridin (**3a**) vorliegt, das aus der selben Pflanze isoliert werden konnte. Das Molekulargewicht von **7** ist  $m/z = 652$ , was der Hinweis auf das Vorliegen eines Dimers ist. Da man im NMR-Spektrum lediglich einen Signalsatz



sieht, kann das nur bedeuten, dass zwei Moleküle Salutaridin durch eine oxidative 1, 1'-Verknüpfung ein Dimer bilden. Dies erscheint auch deshalb wahrscheinlich, weil die Kupplung in para-Position zur Hydroxygruppe stattfinden würde, die eine solche Reaktion besonders begünstigt. Folgende Struktur wird daher aufgrund der spektroskopischen Erkenntnisse vorgeschlagen:



7

Nachdem dies als Strukturbeweis nicht befriedigend ist, wurde versucht, dieses Molekül partialsynthetisch herzustellen (siehe Kapitel C.4.6). Dies gelang durch Umsetzung von Salutaridin mit Silbernitrat. Die daraus resultierende Substanz stimmt in allen chemisch-physikalischen Eigenschaften mit **7** überein. Die Konstitution von **7** wurde dadurch bewiesen, dass bei der Partialsynthese enantiomerenreines Salutaridin eingesetzt wurde und die CD-Spektren vom Produkt und von **7** übereinstimmen (siehe Kapitel E.2.2). Die Aufklärung der absoluten Konfiguration wird in Kapitel C.2.5.3 behandelt.

### 2.5.2 Saludimerin B

Das Alkaloid **8** lässt sich nur schwer von **7** trennen und zeigt ähnliche chemisch-physikalische Eigenschaften. Die Substanz zersetzt sich ab 225 °C. Das UV-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 244 und 283 nm. Man sieht im IR-Spektrum die typischen Banden bei 1668, 1638 und 1611  $\text{cm}^{-1}$ . Durch Hochauflösung ergibt sich ein Molekulargewicht von  $m/z = 652.2781$ , was für eine Summenformel von  $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8$  spricht. Die spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$  beträgt  $-154^\circ$ .

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt ähnlich wie **7** drei Singulets im tiefen Feld, zwei Methoxygruppen bei  $\delta_{\text{H}} = 3.77$  und  $3.70$  ppm, eine *N*-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.33$  ppm und die Signale für sieben aliphatische Protonen in einem Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 1.74$  bis  $3.51$  ppm.

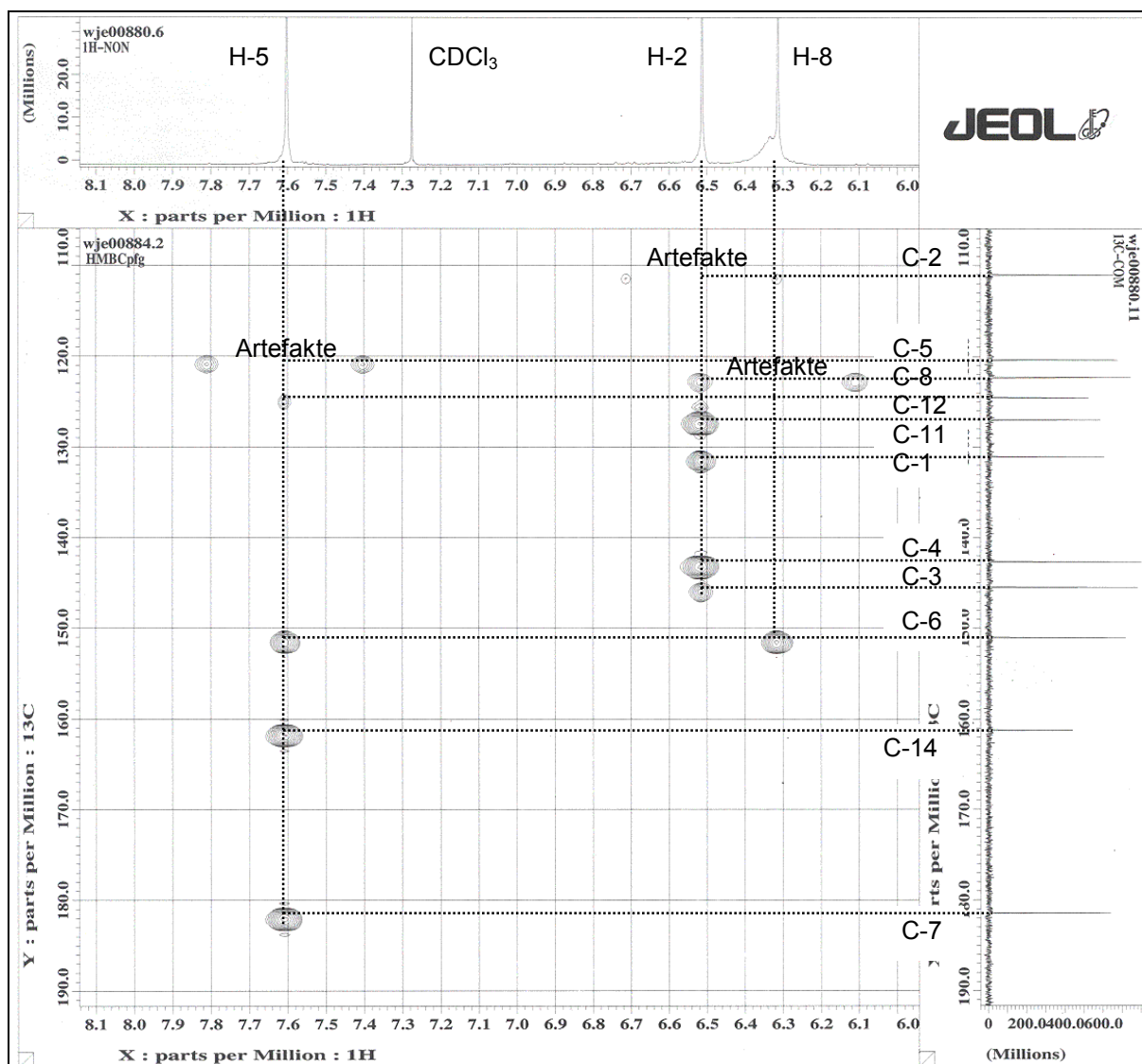
Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum kann man 19 Kohlenstoffatome erkennen. Durch das DEPT-Spektrum und das HMQC-Spektrum lässt sich das weiter aufschlüsseln in neun quartäre Kohlenstoffatome ( $\delta_{\text{C}} = 44.0, 124.7, 127.1, 131.1, 142.8, 145.6, 151.1, 161.3$  und  $181.5$  ppm), vier Methingruppen ( $\delta_{\text{C}} = 61.0, 111.1, 120.5$  und  $122.4$  ppm), drei Methylengruppen ( $\delta_{\text{C}} = 33.0, 37.5$  und  $47.1$  ppm) und drei Methylgruppen ( $\delta_{\text{C}} = 42.0, 55.0$  und  $56.4$  ppm).

Im HH-COSY-Spektrum kann man erkennen, dass erneut die Protonen einer Methylengruppe mit dem Proton einer Methingruppe und die Wasserstoffatome zweier Methylengruppen untereinander koppeln.

Daraus kann man schließen, dass **8** ein Morphinandienon-Dimer ist, das ebenfalls aus zwei gleichen Monomereinheiten aufgebaut ist und sich aufgrund des Substitutionsmusters oder der Stereochemie von **7** unterscheiden muss.

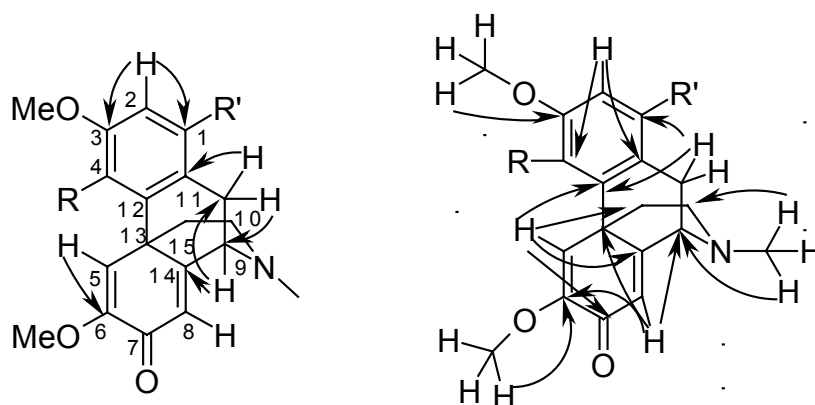
Das HMBC-Spektrum zeigt  $^3\text{J}$ -Kopplungen zwischen den Protonen der Methoxygruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.70$  ppm und dem Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}} = 151.1$  ppm (C-6). Die zweite Methoxygruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.77$  ppm koppelt mit dem Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}} = 145.6$  ppm (C-3). Die Wasserstoffatome der *N*-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.33$  ppm zeigen Kopplungen zu der Methingruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 61.0$  ppm (C-9) und der Methylengruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 47.1$  ppm (C-16).

Wie man in Abb. 38 erkennen kann zeigt das Wasserstoffatom bei  $\delta_{\text{H}} = 7.53$  ppm Fernkopplungen zu den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 124.7$  (C-12),  $151.1$  (C-6),  $161.3$  (C-14) und  $181.5$  (C-7) ppm. Zu diesen Kopplungen ist nur das H-5 befähigt. Das Proton bei  $\delta_{\text{H}} = 6.44$  ppm koppelt mit keinem aliphatischen Kohlenstoffatom, sondern nur mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 127.1$  (C-11),  $131.1$  (C-1),  $142.8$  (C-4) und  $145.6$  (C-3) ppm. Damit muss dieses Wasserstoffatom in 2-Position liegen. Das Wasserstoffatom bei  $\delta_{\text{H}} = 6.24$  ppm zeigt Kopplungen zu dem Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}} = 151.1$  (C-6) ppm.



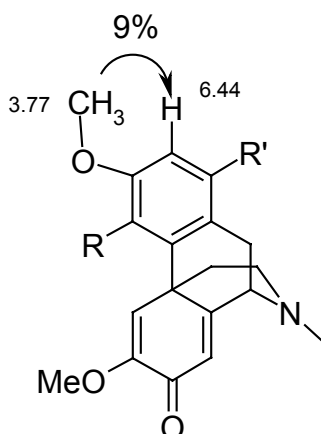
**Abb. 38:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **8**

Das Proton der Methingruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.51$  ppm koppelt unter anderem mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} = 33.0$  (C-10) und  $161.3$  (C-14) ppm. Die Wasserstoffatome des C-10 bei  $\delta_{\text{H}} = 2.66$  ppm zeigen Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen  $\delta_{\text{C}} = 124.7$  (C-12),  $127.1$  (C-11) und  $131.1$  (C-1) ppm. Damit ist bewiesen, dass der Ring A erneut in 1-, 3- und 4-Position kein Wasserstoffatom trägt und das restliche Molekül wie **7** aufgebaut sein muss.



**Abb. 39:** Ausgewählte Fernkopplungen von **8**

Ein NOE-Experiment bestätigt, dass die Methoxygruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.77$  ppm benachbart zum H-2 bei  $\delta_{\text{H}} = 6.44$  ppm liegt.

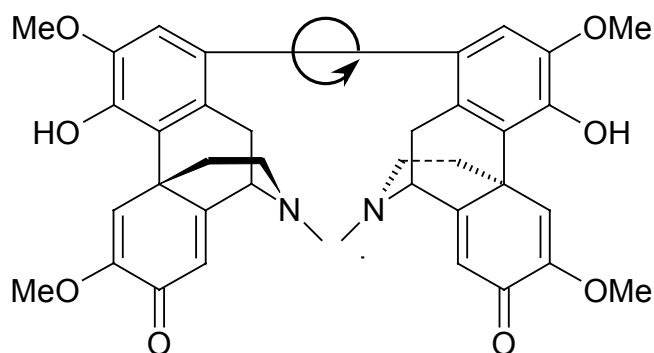


**Abb. 40:** NOE-Effekt bei Saludimerin B mit Prozentangabe

Alle Daten (siehe auch Tab. 4 und Tab. 5) deuten darauf hin, dass auch dieses Dimer aus zwei Molekülen Salutaridin (**3a**) zusammengesetzt ist. Die chemische Verschiebung des C-1-Atoms lässt auf eine 1,1'-Verknüpfung schließen. Die beiden Substanzen unterscheiden sich aber dennoch in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften. Es war daher anzunehmen, dass es sich bei den isolierten Verbindungen ähnlich wie bei Disinomenin, dem Oxidationsprodukt aus dem Alkaloid Sinomenin, um Rotamere handelt.<sup>47</sup> Entlang der 1,1'-Biarylachse liegt eine eingeschränkte Rotation vor, was zu zwei Stereoisomeren führt, wenn die Rotationsbarriere  $> 105$  kJ/mol beträgt.<sup>48</sup> Ein Beweis für diese Annahme ist, dass sich Saludimerin A zum Teil in Saludimerin B und Saludimerin B sich teilweise zu

Saludimerin A umwandelt, wenn die Substanzen geschmolzen bzw. in Methanol bei Raumtemperatur stehen gelassen werden.

Die Aufklärung der Konstitution gelang durch die Partialsynthese aus Salutaridin (**3a**) durch Umsetzung mit Kaliumhexacyanoferrat (siehe Kapitel C.4.7). Die CD-Spektren der isolierten Substanz und des partialsynthetisch hergestellten Produktes sind identisch (siehe Kapitel E.2.2). Die Aufklärung der absoluten Konfiguration von Saludimerin B wird im nächsten Kapitel abgehandelt. Das Alkaloid **8** ist daher ein Dimer des Salutaridins und ein Rotamer von Saludimerin A.



**8**

**Tab. 4:**  $^1\text{H-NMR}$ -Daten [ppm] von Salutaridin und Saludimerin A und B in  $\text{CDCl}_3$

Position der H-Atome	Salutaridin	Saludimerin A	Saludimerin B
1	6.65	-	-
2	6.74	6.59	6.44
5	7.60	7.56	7.53
8	6.32	6.30	6.24
9	3.69	3.57	3.51
10	2.97 3.34	2.26 2.84	2.65-2.67
15	1.77 2.39	1.78 2.41-2.51	1.74-1.81 2.37
16	2.49 2.61	2.41-2.51 2.62	2.52-2.61
$\text{NCH}_3$	2.44	2.29	2.33
3- $\text{OCH}_3$	3.86	3.91	3.77
6- $\text{OCH}_3$	3.74	3.78	3.70

**Tab. 5:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten [ppm] von Salutaridin und Saludimerin A und B  $\text{CDCl}_3$

Position der C-Atome	Salutaridin	Saludimerin A	Saludimerin B
1	118.7	131.6	131.1
2	109.6	110.1	111.1
3	145.5	145.6	145.6
4	143.5	142.8	142.8
5	120.7	120.3	120.5
6	150.9	151.1	151.6
7	181.4	181.5	181.5
8	122.1	122.1	122.4
9	61.1	60.6	61.0
10	32.6	31.1	33.0
11	129.6	127.8	127.1
12	124.0	124.6	124.7
13	43.7	43.9	44.0
14	161.8	161.5	161.3
15	37.7	37.6	37.5
16	47.0	47.3	47.1
NCH <sub>3</sub>	41.6	41.7	42.0
3-OCH <sub>3</sub>	56.3	56.4	56.4
6-OCH <sub>3</sub>	54.8	54.9	55.0

2.5.3 Aufklärung der absoluten Konfiguration von Saludimerin A und B

Die beiden Rotamere Saludimerin A und B besitzen die gleiche Konstitution, aber nicht die gleiche absolute Konfiguration, da durch eine eingeschränkte Rotation entlang der Biarylachse ein neues chirales Element entsteht. In diesem Fall von axialer Chiralität spricht man von Atropisomerie.<sup>49</sup> Da das monomere Salutaridin (**3a**) weitere Chiralitätszentren besitzt, liegen bei den isolierten Verbindungen Atropdiastereomere vor, die unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften besitzen. Es war nun die Frage zu klären, wie die Ringsysteme der beiden Monomere zueinander stehen. Biaryl-derivate können Konformationen entgegengesetzter Helicität einnehmen. Die konformative Chiralität wird durch den Diederwinkel zwischen den Ebenen, die die beiden Aromaten aufspannen, bestimmt.

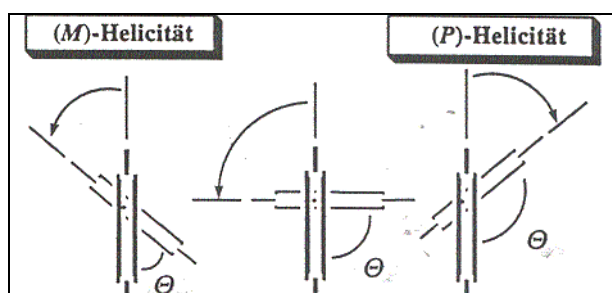


Abb. 41: (M)- und (P)-Helicität

Betrachtet man einen Aromaten "von der Seite" und liegt der zweite Aromat mit seinem höchsten Substituenten auf der linken Seite, so spricht man von der (M)-Helicität. Liegt er auf der rechten Seite, so spricht man von der (P)-Helicität.<sup>50</sup>

Im Arbeitskreis von Prof. Bringmann, Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg, wurden aufwändige CD-Untersuchungen und CD-Berechnungen durchgeführt, um die absolute Konfiguration von Saludimerin A und B aufzuklären. Äußerst ungewöhnlich an diesen beiden Rotameren ist, dass die CD-Spektren der beiden Verbindungen fast identisch sind. Dies bedeutet, dass der zentrochirale Anteil des Monomers Salutaridin (**3a**) einen wesentlich stärkeren Einfluss auf das CD-Spektrum des Rotamers hat als der axiale Anteil. Daher kann man die beiden CD-Spektren zunächst nicht hinreichend interpretieren und auch keine Aussage über die absolute Konfiguration treffen.

In das CD-Spektrum der Dimere geht zweimal der zentrochirale Anteil (Z) und einmal der axiale Anteil (A und B) ein. Um nun die zentrochiralen Anteile zu eliminieren bzw. den axialen Anteil herauszufiltern, wurde ein Rechenexperiment durchgeführt, wie es in ähnlicher Form bei der Bestimmung der Axial-Chiralität von dimeren Naphthylisochinolin-Alkaloiden verwendet wurde.<sup>51</sup> Man subtrahiert vom CD-



Spektrum des Saludimerins A das CD-Spektrum von Saludimerin B:  $Z/A/Z - Z/B/Z$ . Die beiden zentrochiralen Anteile von Saludimerin A und die beiden von Saludimerin B heben sich auf, da beide Rotamere aus zwei identischen Salutaridin-Einheiten zusammengesetzt sind, die somit identische CD-Anteile zum CD-Spektrum beisteuern. Daher werden nur noch die beiden – zueinander spiegelbildlichen – axialen Anteile voneinander abgezogen:  $A - B$ . Damit sieht man als Ergebnis das verdoppelte CD-Spektrum des axialen Anteils ( $A - B = A - (-A) = 2A \rightarrow$  Achse von A). Die Verdoppelung bewirkt im Spektrum nur eine Streckung in Richtung der Y-Achse, hat aber keinen Einfluss auf die relative Lage der Maxima und Minima. Analog wird der Achsenanteil von B ermittelt ( $Z/B/Z - Z/A/Z = B - A = B - (-B) = 2B \rightarrow$  Achse von B). Die beiden so erhaltenen CD-Spektren sind nun wie Bild und Spiegelbild (siehe Abb. 42). Sie weisen den für Biaryle typischen Verlauf auf und zeigen ein sogenanntes Biaryl-Couplet. Eine Auswertung nach der Exciton Chirality Methode ist nun möglich:<sup>52</sup> Wenn von höheren Wellenlängen kommend zuerst ein Maximum und dann ein Minimum im CD-Spektrum erscheint, dann liegt das (*P*)-Atropdiastereomer (= Saludimerin A) vor. Kann man die umgekehrte Reihenfolge erkennen, spricht man vom (*M*)-Atropdiastereomer (= Saludimerin B).

Dieses Ergebnis wurde dadurch bestätigt, dass die axialen Anteile des (*M*)-Atropdiastereomers und des (*P*)-Atropdiastereomers unter Verwendung der CNDO/S-Methode<sup>53</sup> errechnet und analog zu den experimentellen Spektren voneinander subtrahiert wurden. Beim Vergleich dieser "Achsenkomponenten"-Spektren mit den "Achsenkomponenten"-Spektren von Saludimerin A und B war zu erkennen (Abb. 42, Mitte), dass die Spektren von Saludimerin A und dem (*P*)-Atropdiastereomer, sowie von Saludimerin B und dem (*M*)-Atropdiastereomer eine gute Übereinstimmung zeigen. Nur das zusätzliche Minimum bei 235 nm im berechneten CD-Spektrum des (*M*)-Atropdiastereomers bzw. das zusätzliche Maximum bei 235 nm im berechneten CD-Spektrum des (*P*)-Atropdiastereomers passten nicht ganz ins Bild. Eine genauere Berechnung unter erhöhter Berücksichtigung der Flexibilität der Verbindungen an der Achse<sup>54</sup> ist noch in Arbeit.

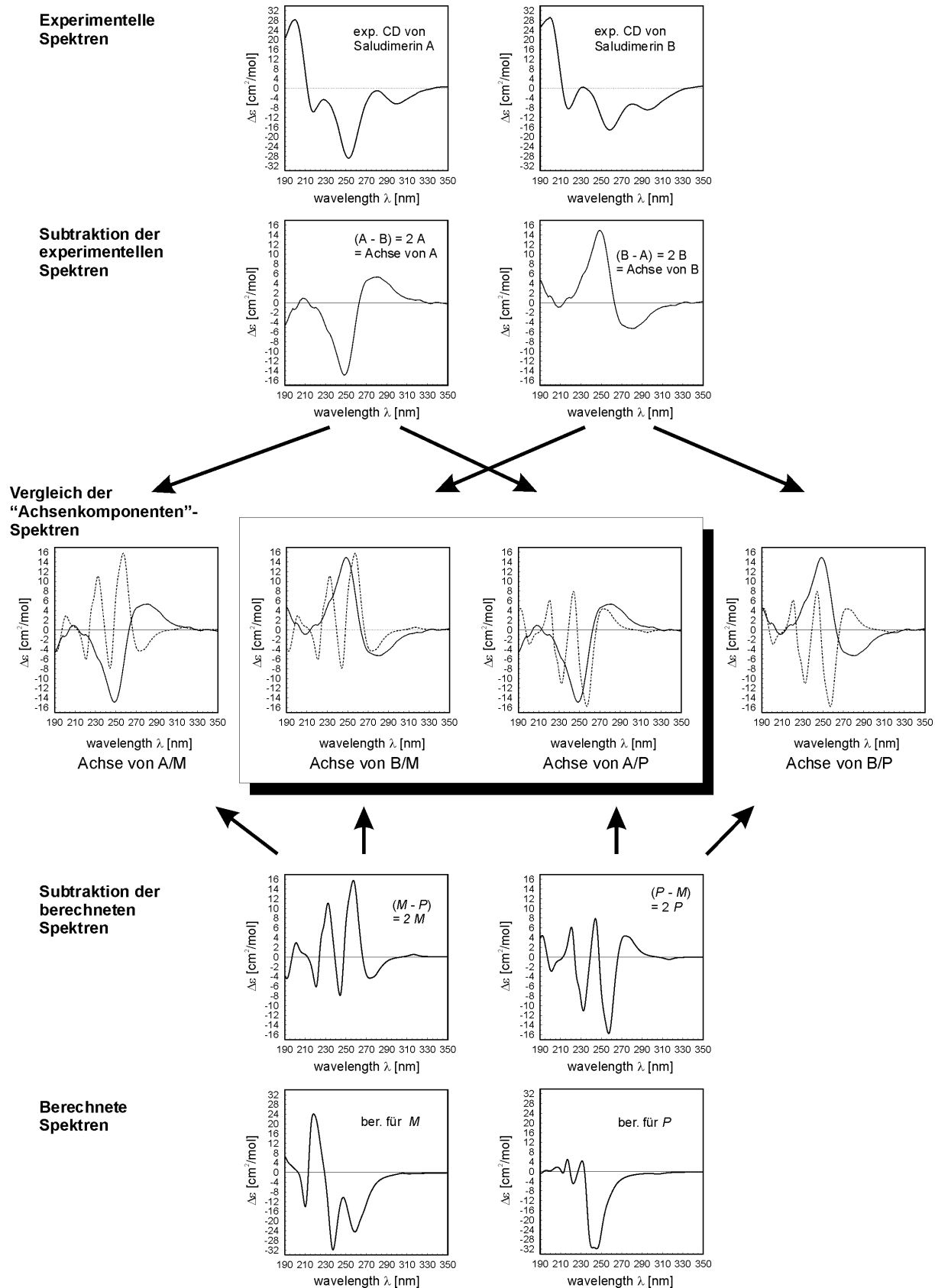
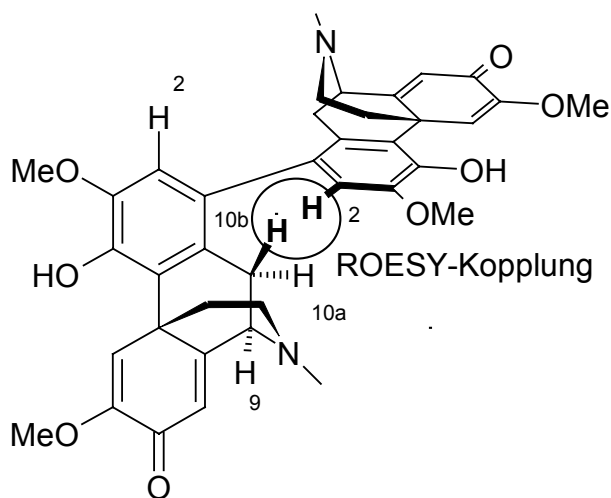
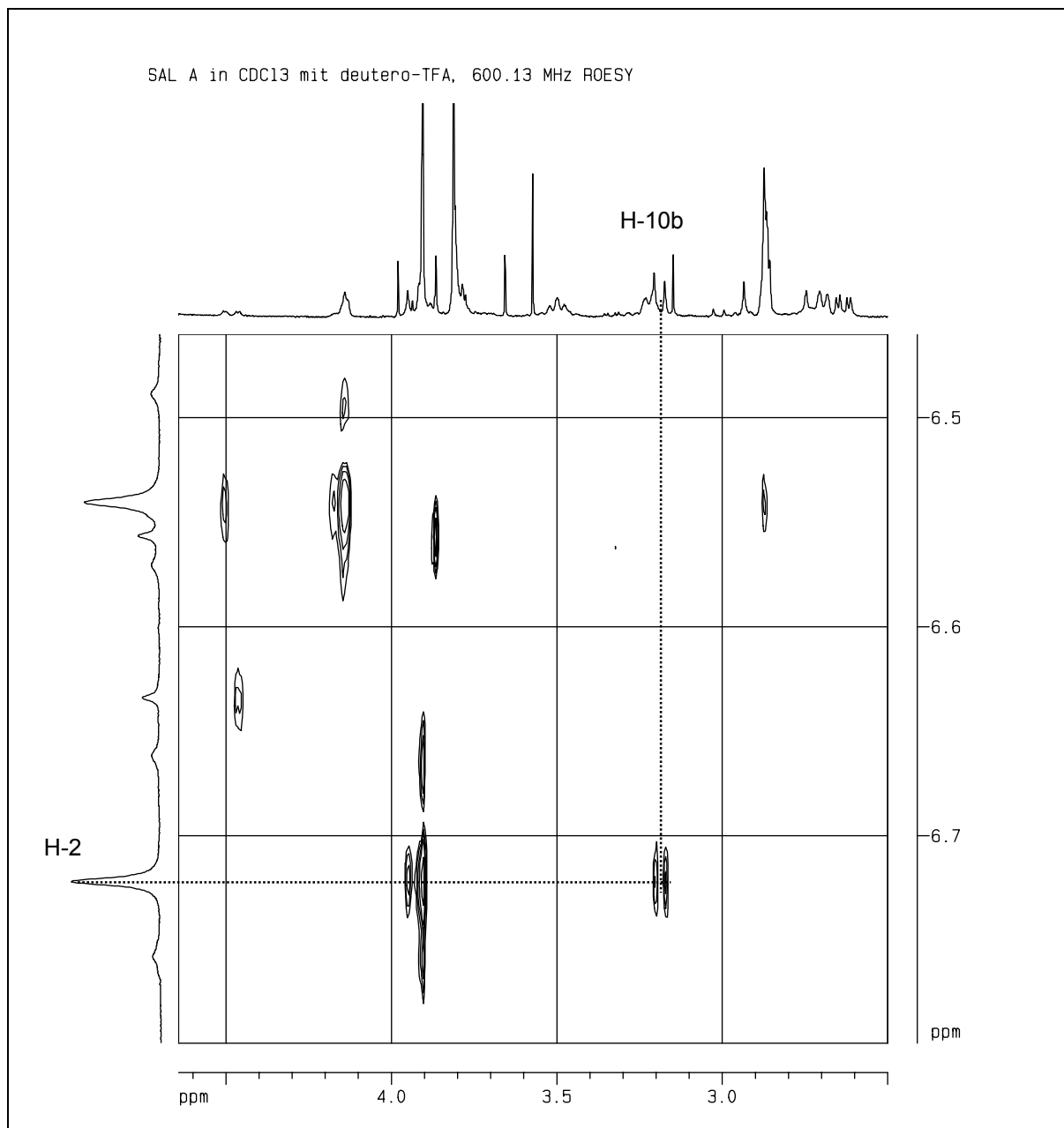


Abb. 42: CD-Untersuchungen und Berechnungen von Saludimerin A und B

Die endgültige Aufklärung der absoluten Konfiguration von **7** und **8** gelang daher erst durch die Aufnahme von ROESY-Spektren. Durch die Zugabe von Deuterotrifluoressigsäure zur  $\text{CDCl}_3$ -Lösung wurden die Signale der beiden Wasserstoffatome H-10a und H-10b von Saludimerin A und B sauber aufgelöst. Damit konnte man sie aufgrund ihrer Kopplungskonstanten mit dem Methinproton H-9 eindeutig zuordnen. Der Diederwinkel zwischen H-9 und H-10a beträgt etwa  $36^\circ$  was eine geminale Kopplung mit  $J = 5.3 \text{ Hz}$  bewirkt. Zwischen H-10b und H-9 kommt keine Kopplung zustande, da der Diederwinkel ca.  $80^\circ$  beträgt.

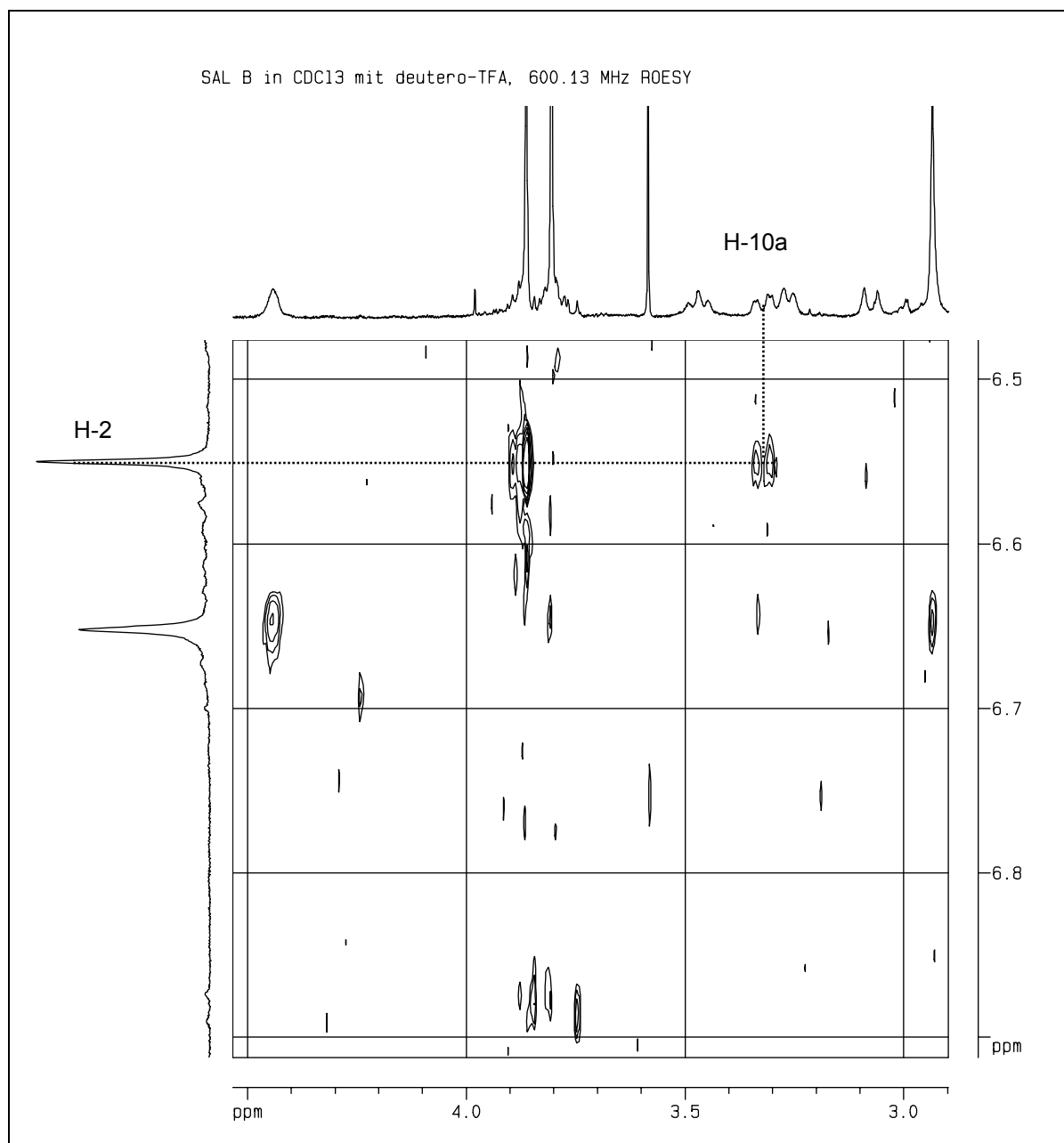


**Abb. 43:** Aufklärung der absoluten Konfiguration von Saludimerin A als das (*P*)-Atropdiastereomer durch ein ROESY-Experiment



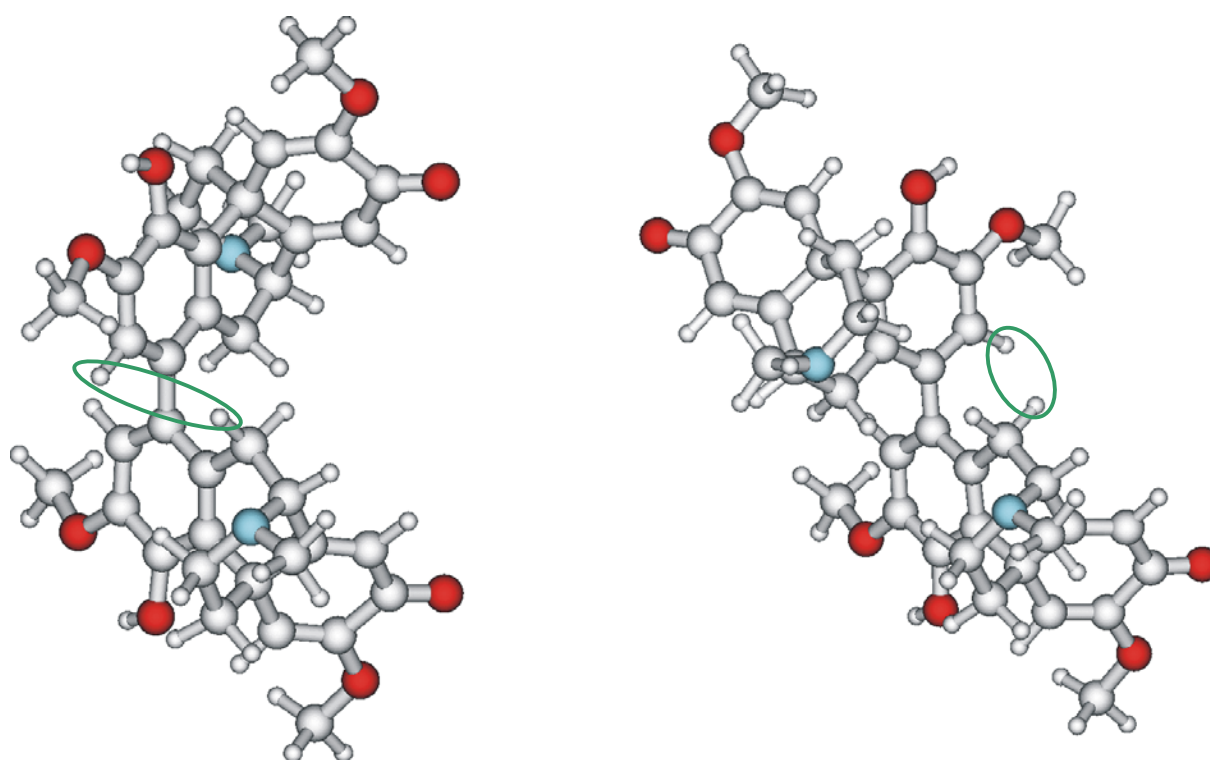
**Abb. 44:** ROESY-Spektrum von Saludimerin A

Im ROESY-Spektrum, das Kopplungen zwischen räumlich benachbarten Wasserstoffatomen aufzeigt, kann man nun erkennen, dass bei Saludimerin A das H-2 des einen Ringsystems mit dem H-10b des anderen Ringsystems koppelt.



**Abb. 45:** ROESY-Spektrum von Saludimerin B

Bei Saludimerin B zeigt das H-2 im ROESY-Spektrum eine Verknüpfung mit H-10a. Damit war definitiv bewiesen, dass Saludimerin A (**7**) das (*P*)-Atropdiastereomer und Saludimerin B (**8**) das (*M*)-Atropdiastereomer ist.



*P*-Saludimerin A  
 $\gamma = 92.959^\circ$

*M*-Saludimerin B  
 $\gamma = -97.636^\circ$

**Abb. 46:** Absolute Konfiguration von Saludimerin A (7) und B (8)

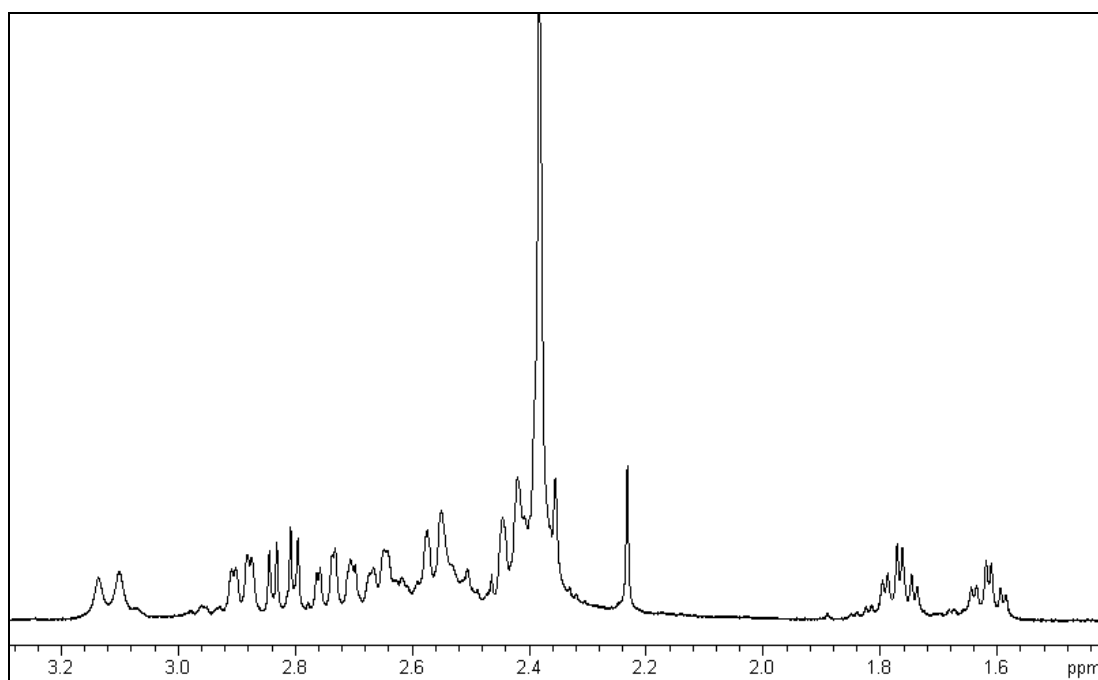
Wasserstoffatome, die ROESY-Kopplungen zeigen, sind durch Ellipsen hervorgehoben

#### 2.5.4 Salsinodimerin

Aus dem Strauch E wurde noch ein weiteres Alkaloid isoliert (32 mg). Ein Schmelzpunkt konnte nicht bestimmt werden, da die Substanz nur als dünner Film an der Kolbenwand anfiel und sich nicht umkristallisieren ließ. Das UV-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 243 und 283 nm und das IR-Spektrum zeigt Absorptionsbanden bei 1666, 1637 und 1615  $\text{cm}^{-1}$ . Die hochauflösende Masse ergibt ein Molekulargewicht von  $m/z = 638.2608$ , was auf die Summenformel  $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8$  hinweist. Die spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$  beträgt  $+11.8^\circ$ .

Die Strukturaufklärung anhand der spektroskopischen Daten gestaltete sich sehr schwierig. Zum einen waren nur sehr geringe Mengen verfügbar. Auch gelang es trotz erheblichen Aufwands nicht, die Substanz rein zu erhalten. Wie die Summenformel schon andeutet, besteht dieses Dimer außerdem aus zwei

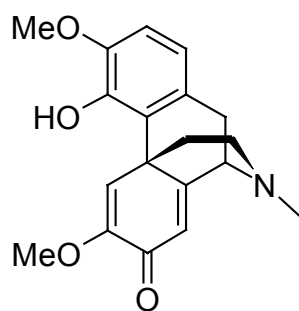
unterschiedlichen Monomeren. Man kann deshalb im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Signalsätze von zwei Substanzen erkennen, die sich jedoch in ihrer Struktur nicht stark unterscheiden. Auffällig ist, dass nur eine *N*-Methylgruppe zu erkennen ist. Darüber hinaus findet man die Singulets von vier Methoxygruppen und sechs Singulets im tiefen Feld. Bei  $\delta_{\text{H}} = 1.62$  und  $1.79$  ppm sieht man zwei Multipletts und im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 2.33 - 3.13$  ppm ein Multiplett von ca. 15 Wasserstoffatomen, die anhand ihrer ähnlichen chemischen Verschiebung und durch Signalaufspaltung höherer Ordnung kaum voneinander zu trennen sind.



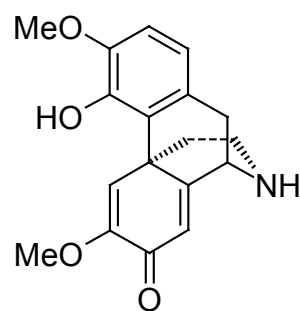
**Abb. 47:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **9**

Durch die Auswertung der  $^{13}\text{C}$ -, DEPT- und HMQC-Spektren erhält man weitere Erkenntnisse über das Alkaloid **9**. Es lassen sich im aliphatischen Bereich gut die Signale von sechs Methylengruppen, der *N*-Methylgruppe, zwei Methingruppen und der vier Methoxygruppen erkennen. Im tiefen Feld lassen sich die sechs Wasserstoffatome den entsprechenden Kohlenstoffatomen zuordnen. Darüber hinaus kann man die Signale von 18 quartären Kohlenstoffatomen erkennen.

Die Strukturaufklärung gelingt nicht anhand dieser Daten und auch nicht anhand des HMBC-Spektrums. Man kann aber mit großer Sicherheit behaupten, dass dieses Dimer erneut aus zwei Morphinandienonen zusammengesetzt ist. Das Fehlen einer *N*-Methylgruppe spricht dafür, dass ein Baustein Norsinoacutin (**5**) ist. Das zweite Molekül könnte erneut Salutaridin (**3a**) sein.

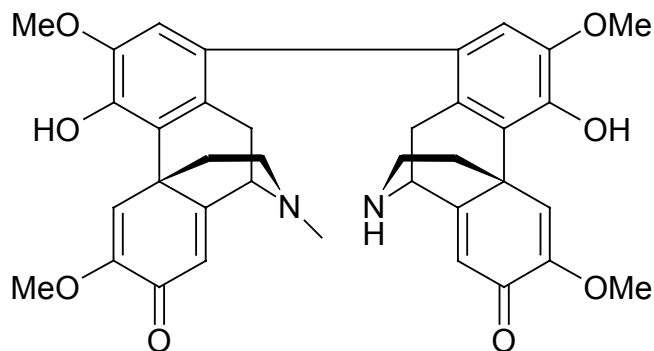


**3a**



**5**

Um diese Annahme zu beweisen wurde versucht, durch Oxidation eines Gemisches dieser beiden Edukte ein Dimer zu erhalten. Mit Kaliumhexacyanoferrat(III) als Reagenz gelang es, das Oxidationsprodukt zu erhalten (siehe Kapitel C.4.7). Das  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektrum sowie das Massenspektrum stimmen mit dem isolierten Alkaloid **9** überein. Die CD-Spektren dieser beiden Substanzen unterscheiden sich aber geringfügig voneinander (vgl. Kapitel E.2.2). Dies kann darin begründet sein, dass die eingewogenen Substanzmengen nicht übereinstimmten. Wahrscheinlicher ist, dass erneut zwei Rotamere von dieser Verbindung existieren. Die absolute Konfiguration konnte mit den in Kapitel C.2.5.3 aufgeführten Methoden nicht aufgeklärt werden, da das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zu unübersichtlich und die isolierten Mengen zu gering sind. Dennoch steht die Konstitution von **9** fest:



**9**



Tab. 6: NMR-Daten [ppm] von Salsinodimerin (**9**) in CDCl<sub>3</sub>

Position der H- und C-Atome	„Salutaridin-Teil“		„Norsinoacutin-Teil“	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H'	<sup>13</sup> C'
1	-	131.4	-	131.2
2	6.49	110.6	6.61	110.2
3	-	145.6	-	145.4
4	-	142.7	-	142.7
5	7.62	120.1	7.58	120.5
6	-	151.1	-	151.0
7	-	181.3	-	181.5
8	6.32	122.3	6.22	120.5
9	3.62	60.8	3.72 - 3.78	54.0
10	2.33 - 2.49 3.13	31.0	2.33 - 2.49 2.83	38.7
11	-	127.0	-	128.1
12	-	124.4	-	124.4
13	-	43.9	-	44.4
14	-	161.0	-	163.5
15	1.79 2.33 - 2.49	37.9	1.62 2.53 - 2.61	42.6
16	2.53 - 2.61 2.66	47.4	2.74 2.89	39.8
NCH <sub>3</sub>	2.40	41.7	-	-
3-OCH <sub>3</sub>	3.84	56.2	3.90	56.3
6-OCH <sub>3</sub>	3.77	54.8	3.77	54.8

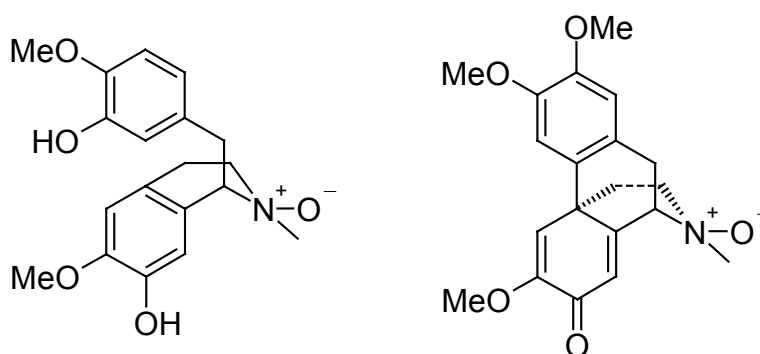
## 2.6 Strukturaufklärung von Salutarin-*N*-oxid

### 2.6.1 Allgemeines über Alkaloid-*N*-oxide

Das Vorkommen von *N*-Oxiden in der Natur ist erst seit relativ kurzer Zeit akzeptiert worden. Die ersten Vertreter wurden zwar schon 1938 isoliert.<sup>55</sup> Viele Jahre wurden *N*-Oxide aber als Kuriosität abgetan. Sie standen im Verdacht, lediglich Artefakte zu sein, da die Aminfunktion leicht z. B. von Luftsauerstoff oxidiert werden kann. Seit 1970 wurde jedoch von einer immer größeren Anzahl von Substanzen berichtet und diese wurden als authentische natürliche Produkte anerkannt.

Inzwischen sind mehr als 200 Alkaloid-*N*-oxide beschrieben worden. Diese Zahl erscheint sehr gering, da dies nur einen Bruchteil der bekannten Alkaloide ausmacht. Die Ursache könnte aber darin begründet sein, dass viele Substanzen bisher unentdeckt geblieben sind. Die hydrophilen nicht-basischen *N*-Oxide unterscheiden sich in ihrem chemisch Verhalten stark von den korrespondierenden Aminen. Daher ist anzunehmen, dass mit den Standardextraktionsverfahren und Reinigungsschritten viele Substanzen einfach übersehen werden. Eine weitere Ursache kann sein, dass *N*-Oxide ebenso leicht wieder reduziert werden können.<sup>56</sup>

Aus der Gruppe der Benzylisochinoline wurden bisher über 50 *N*-Oxide isoliert. So wurden Retikulin-*N*-oxid (**IX**) und verschiedene Morphinan-*N*-oxide gefunden. 1989 wurde mit *O*-Methylpallidin-*N*-oxid (**X**) das erste Morphinandienon-*N*-oxid beschrieben.<sup>57</sup>



**Abb. 48:** Retikulin-*N*-oxid (**IX**) und *O*-Methylpallidin-*N*-oxid (**X**)

### 2.6.2 Salutarin-*N*-oxid

Die spektroskopischen Daten von **10** zeigen eine auffallende Ähnlichkeit mit denen von Salutarin, welches das Hauptalkaloid aus dem Strauch A ist. Dem IR-Spektrum kann man zwei typische Absorptionsbanden bei 1673 und 1641 cm<sup>-1</sup> und eine Schulter bei 1620 cm<sup>-1</sup> entnehmen. Das UV-Spektrum zeigt zwei Absorptionsmaxima

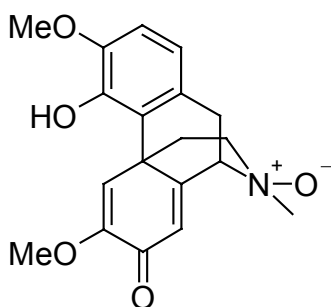
bei 241 und 284 nm. Im Massenspektrum ist ein Molekülpeak bei  $m/z = 343$  zu erkennen. Die typischen Molekülmassen von Benzylisochinolin-Alkaloiden sind  $327 \pm 15$  g/mol. Die Massendifferenz von 16 deutet daher auf ein weiteres Sauerstoffatom hin. Auch das Zerfallsmuster  $343 [M^+] \rightarrow 327 [M^+ - 16] \rightarrow 312 [M^+ - 31]$  erhärtet diese Annahme. Zuerst wird ein Sauerstoffatom abgespalten und man erhält den Molekülpeak von Salutaridin und danach zerfällt dieses Molekül in gewohnter Art und Weise. Aufgrund der hochauflösenden Masse von  $m/z = 343.1418$  wurde eine Summenformel von  $C_{19}H_{21}NO_5$  vorgeschlagen.

Das  $^1H$ -NMR-Spektrum bestätigt eine 3,4-Disubstitution des Ringes A, da die Signale zweier aromatischer Protonen bei  $\delta = 6.80$  und  $6.64$  ppm als Dubletts ( $J = 8.5$  Hz) erscheinen. Typisch für die Morphinandienon-Struktur sind die Resonanzen der beiden anderen stark ins tiefe Feld verschobenen Protonen bei  $\delta = 6.50$  und  $6.46$  ppm. Das Spektrum zeigt außerdem zwei Methoxy-Singulets bei  $\delta = 3.89$  und  $3.76$  ppm, was in Übereinstimmung mit dem Spektrum von Salutaridin ist.

Die Natur des *N*-Oxides wird dagegen durch die Tieffeldverschiebung des *N*-Methylsignals bei  $\delta = 3.33$  ppm (Salutaridin:  $\delta = 2.44$ ) deutlich. Auch die Signale von H-9 bei  $\delta = 4.25$  ppm und der Methylenprotonen an C-16 bei  $\delta = \text{ca. } 3.37$  und  $3.16$  ppm sind im Vergleich zu den Signalen von Salutaridin deutlich ins tiefe Feld verschoben.

Auch im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum zeigt sich der Unterschied zwischen Salutaridin und dem *N*-Oxid. Die größten Abweichungen sind bei der  $NCH_3$ -Gruppe ( $\delta = 58.36$  statt  $41.61$  ppm) sowie beim C-16 ( $\delta = 61.79$  anstelle  $47.01$  ppm) und C-9 ( $\delta = 77.00$  im Vergleich zu  $61.06$  ppm) zu beobachten.

Die genaue Zuordnung der Wasserstoffatome und der Kohlenstoffatome wurde anhand von HMQC- und HMBC-Spektren vorgenommen. Aufgrund dieser Daten konnte die Struktur von Salutarin-*N*-oxid lückenlos aufgeklärt werden:



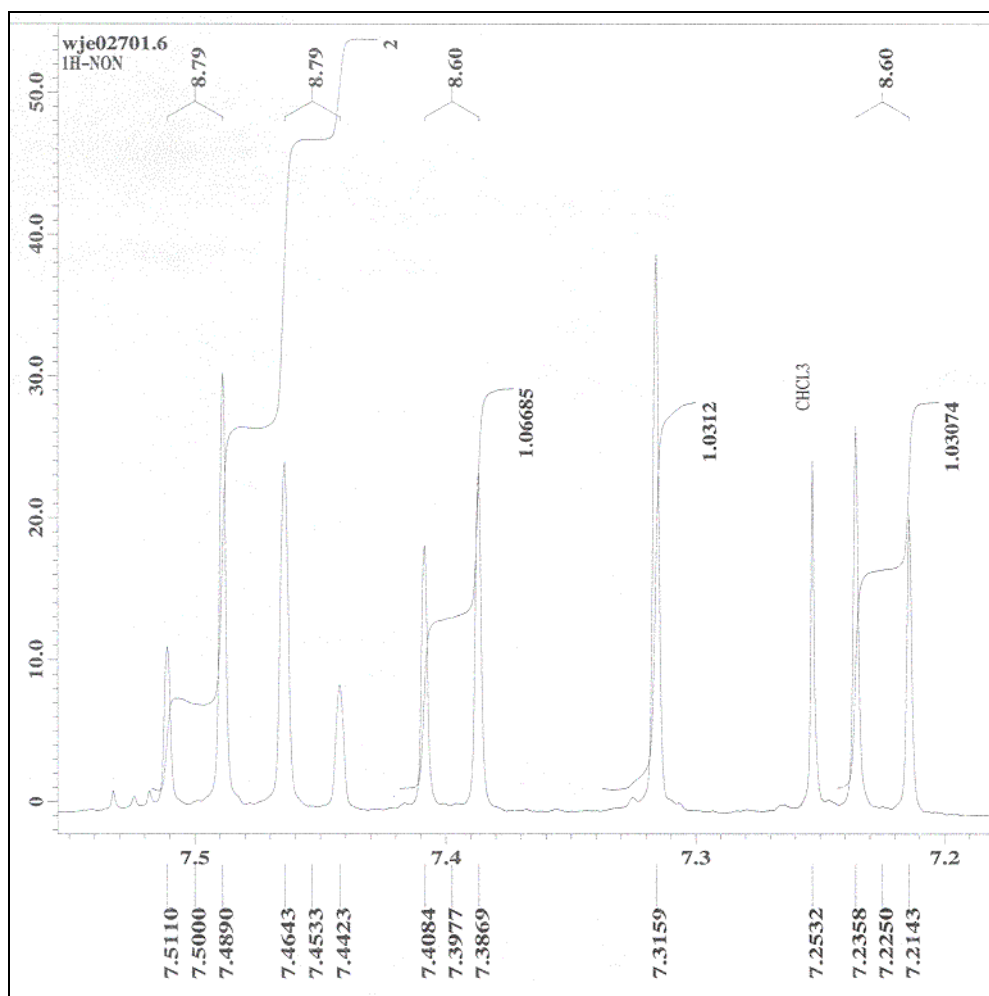
**10**

Bei der Bestimmung der Konfiguration stellte sich heraus, dass ähnlich wie bei Salutarin ein Enantiomergemisch vorliegt. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels chiraler HPLC wird in Kapitel C.5.3 beschrieben. Bisher wurde nur das (*R*)-Enantiomer Salutaridin-*N*-oxid aus *Papaver bracteatum* isoliert.<sup>58</sup> Über die Entstehung von **10** bzw. über die pharmakologische Aktivität ist noch nichts bekannt.

## 2.7 Strukturaufklärung des Phenanthrens Crotoflavol

Das Massenspektrum von **11** zeigt einen Molekülpeak bei  $m/z = 270$  [ $M^+$ ]. Die Massen zweier Fragmente liegen bei [ $M^+ - 15$ ] 255 (-CH<sub>3</sub>) und [ $M^+ - 43$ ] 227 (-CH<sub>3</sub> und -CO), was auf aromatische Methoxygruppen hinweist. Durch Hochauflösung wurde die genaue Masse von  $m/z = 270.0868$  bestimmt und eine Summenformel von C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub> berechnet. Das UV-Spektrum zeigt Maxima bei 260, 285, 315, 345 und 365 nm, was auf ein stark konjugiertes aromatisches System schließen lässt.<sup>59</sup> Im IR-Spektrum treten Banden bei 3459, 1614, 1574, 1515 und 1480 cm<sup>-1</sup> auf. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit anderen Phenanthren-Derivaten.<sup>60</sup>

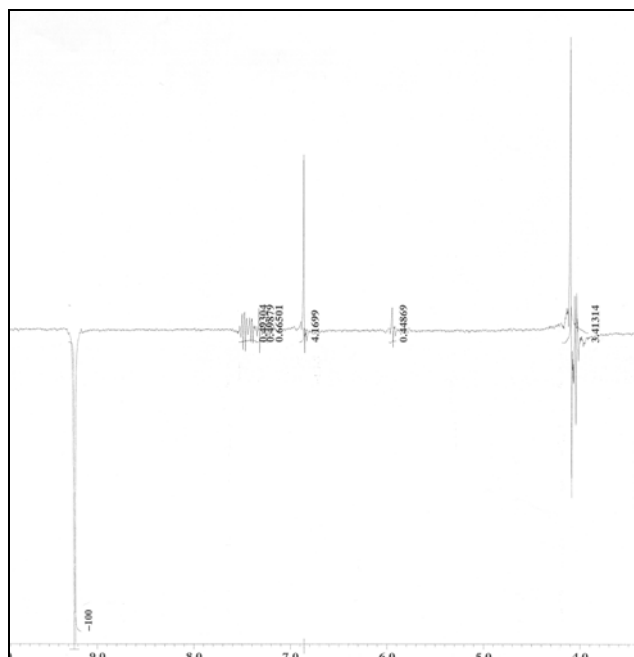
Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zeigt zwei aliphatische und 14 aromatische Kohlenstoffatome an. Im DEPT-Spektrum kann man erkennen, dass davon acht quartäre Kohlenstoffatome sind ( $\delta_C = 146.1, 144.9, 143.6, 142.7, 128.4, 128.0, 124.2, 118.8$  ppm) und sechs mit Wasserstoffatomen verbunden sind. Dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum kann man entnehmen, dass zwei Singulets mit je drei Wasserstoffatomen im aliphatischen Bereich liegen. Anhand des HMQC-Spektrums können diese zwei Kohlenstoffatomen zugeordnet und so als Methoxygruppen (a und b) identifiziert werden (a:  $\delta_H = 4.04$  und  $\delta_C = 57.1$  ppm; b:  $\delta_H = 4.09$  und  $\delta_C = 55.9$  ppm). Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in Verbindung mit HMQC zeigt weiterhin vier Dubletts bei  $\delta_H = 7.23$  ( $J = 8.6$  Hz),  $\delta_C = 110.3$ ;  $\delta_H = 7.40$  ( $J = 8.6$  Hz),  $\delta_C = 119.8$ ;  $\delta_H = 7.45$  ( $J = 8.8$  Hz),  $\delta_C = 124.9$  und  $\delta_H = 7.50$  ( $J = 8.8$  Hz),  $\delta_C = 125.4$  ppm. Darüber hinaus sieht man zwei Singulets bei  $\delta_H = 7.32$  und  $\delta_C = 111.0$  ppm sowie  $\delta_H = 9.23$  und  $\delta_C = 109.3$  ppm. Aufgrund der Kopplungskonstanten, aber auch anhand des Dacheffektes kann man schließen, dass zwei Paare ortho-kuppelnder aromatischer Protonen und zwei isolierte aromatische Protonen im Molekül vorliegen.



**Abb. 49:** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **11**

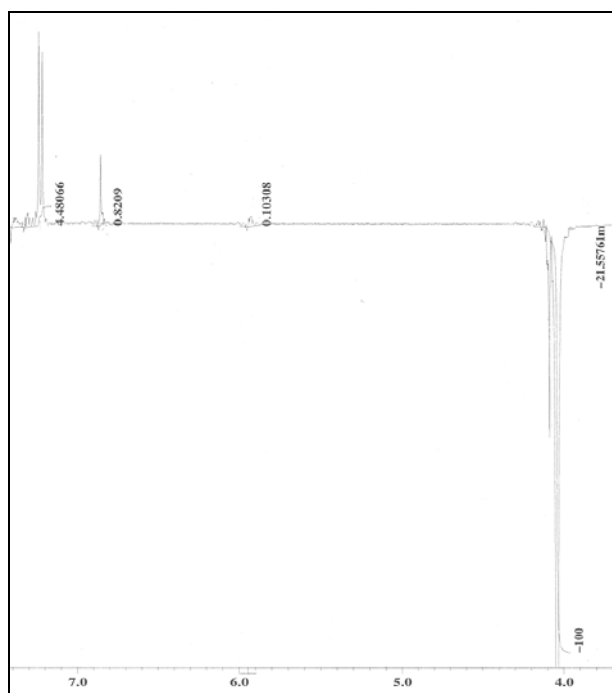
Zusätzlich kann man noch zwei breite Signale erkennen, die nach Zugabe von deuteriertem Wasser verschwinden. Dies deutet auf zwei phenolische Hydroxygruppen (c und d) hin (c:  $\delta_{\text{H}} = 5.93$  ppm und d:  $\delta_{\text{H}} = 6.85$  ppm).

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass es sich bei der isolierten Substanz um ein Phenanthren handelt. Um die Struktur zu beweisen, wurden verschiedene NOE-Experimente durchgeführt. Aufgrund des Ringstrom-Modells sind bei einem Phenanthren die Wasserstoffatome H-4 und H-5 stark entschirmt und liegen bei ca.  $\delta_{\text{H}} = 9$  ppm. Nachdem nur ein Signal in diesem Bereich liegt und dieses noch dazu ein Singulett ist, schien es am geeignetsten, hier mit den Untersuchungen zu beginnen. Bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz von  $\delta_{\text{H}} = 9.23$  ppm vergrößern sich die Signale einer phenolischen Hydroxygruppe ( $\delta_{\text{H}} = 6.85$  ppm) und einer Methoxygruppe ( $\delta_{\text{H}} = 4.09$  ppm).



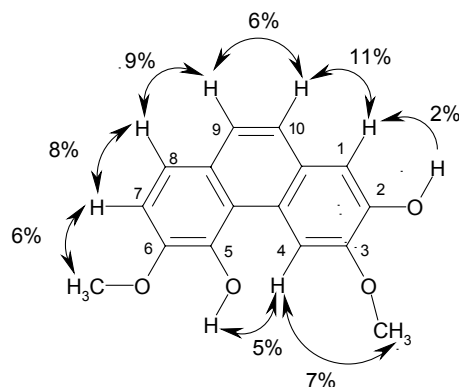
**Abb. 50:** NOE-Spektrum von **11**

Bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenzen dieser beiden Signale zeigt sich kein Effekt. Bei Anregung der zweiten Methoxygruppe (a) vergrößert sich das Signal eines der vier ortho-kuppelnden aromatischen Protonen.



**Abb. 51:** : NOE-Spektrum von **11**

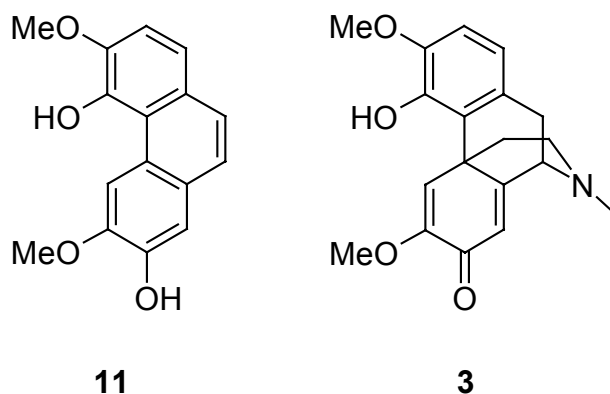
Auf diese Art und Weise wurde dann weiter mit jedem einzelnen Protonensignal ein NOE-Experiment durchgeführt.



**Abb. 52:** Zusammenfassung der NOE-Effekte mit Prozentangabe

Daraus resultiert als Strukturvorschlag das 2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxyphenanthren (**11**). Diese Substanz konnte noch nie aus einer Pflanze isoliert werden und wurde Crotoflavol benannt. Dies ist auch das erste Mal, dass ein Phenanthren aus einer *Croton*-Spezies isoliert wurde.

Aufgrund des Substitutionsmusters dieses Phenanthrens, das sehr starke Ähnlichkeit zu dem von Salutarin (**3**) zeigt, ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die Biosynthese von Crotoflavol über ein Morphinandienon-Derivat erfolgt.



Phenanthrene wurden bisher z. B. aus *Aristolochia cucurbitifolia* (Aristolochiaceae)<sup>61</sup>, aus *Domohinea perrieri* (Euphorbiaceae)<sup>62</sup> oder aus *Bulbophyllum vaginatum* (Orchidaceae)<sup>63</sup> isoliert.

Vertreter dieser Stoffklasse besitzen interessante pharmakologische Aktivitäten. So wurde gezeigt, dass Phenanthrene cytotoxisch auf verschiedene Krebszelllinien wirken.<sup>62</sup> Der ethanolische Extrakt der Pflanze *Catasetum barbatum* LINDLE

(Orchidaceae) wird in der Volksmedizin von Paraguay bei der Behandlung von Asthma verwendet. Die daraus isolierten Phenanthrene zeigen eine entzündungshemmende Wirkung.<sup>64</sup> Manche Phenanthrene besitzen außerdem antibiotische und antimykotische Aktivität.<sup>65</sup> Darüber hinaus zeigen Phenanthrenquinone antiretrovirale Aktivität.<sup>66</sup>



### 3 Spurenanalytik bei weiteren *Croton*-Pflanzen

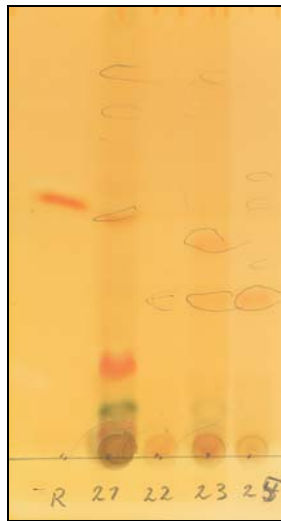
Prof. Dr. M. H. Zenk, Biozentrum – Pharmazie Universität Halle, stellte uns von insgesamt 40 weiteren *Croton*-Pflanzen aus Mittelamerika und der Karibik Bruchstücke von Blättern zur Verfügung. Das Pflanzenmaterial (1 - 80 mg) wurde zerkleinert und mit Methanol einen Tag lang extrahiert. Der Extrakt wurde filtriert, mittels Dünnschichtchromatographie auf Alkaloide untersucht („+“ bzw. „++“ in Tab. 7 bedeutet, dass Alkaloide gefunden wurden) und anschließend zur Trockene eingedampft. Es wurde ein SPE-System mit einer Si-60 Kartusche zur Anreicherung der Alkaloide entwickelt. Die Alkaloidfraktion wurde direkt mittels MS/MS untersucht. Dabei wurden lediglich die Molmassen vorhandener Verbindungen bestimmt. Diese Methode (MS/MS-DI) ist sehr empfindlich und erfasst Spuren im nM Bereich. Anschließend wurden die Alkaloide mittels HPLC-MS/MS aufgetrennt und untersucht. Hierbei wurden mittels eines Scans über den Bereich von 100 - 700 Masseneinheiten sowie verschiedener Fragmentierungsexperimente Molmasse und Zerfallsmuster festgestellt. Die Alkaloide Scoulerin (1), Coreximin (2), Salutarin (3), O-Methylflavinantin (4), Norsinoacutin (5) und Flavinantin (6) wurden als Referenzen verwendet. Stimmt bei einer aus den verschiedenen Proben isolierten Verbindung die Molmasse, der Zerfall im MS/MS und die Retentionszeit mit einer der Referenzen überein, wurden sie als identifiziert angesehen. Die Stereochemie der Alkaloide konnte bei dieser Untersuchung nicht näher beleuchtet werden.

**Tab. 7:** Alkaloid-Untersuchung von 40 *Croton*-Pflanzen

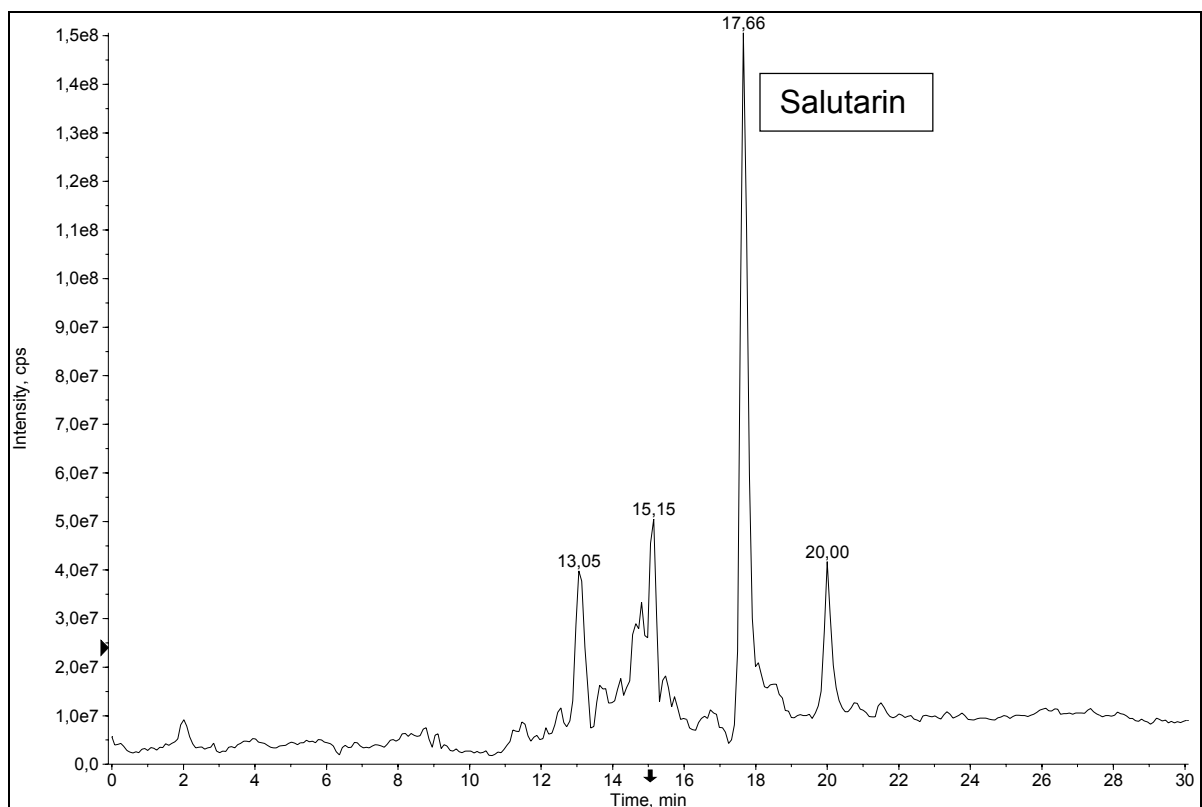
<i>Croton</i> -Art (Chargenbezeichnung)	Einwaage (mg)	DC	Molmassen	HPLC-MS/MS
1: <i>Croton campestris</i> , Brasilien	19.8	-	-	-
2: <i>Croton campestris</i> , Brasilien	80.9	-	-	-
3: <i>Croton campestris</i> , Brasilien	2.7	-	-	-
4: <i>Croton campestris</i> , Brasilien	37.8	+	313, 327, 341	-
5: <i>Croton campestris</i> , Brasilien	40.4	-	-	-
6: <i>Croton campestris</i> , Brasilien	26.6	+	297, 313	-
7: <i>Croton campestris</i> , Brasilien	53.6	-	-	-
8: <i>Croton campestris</i> , Brasilien	18.8	-	-	-
9: <i>Croton ruizianus</i> , Peru	14.2	+	327, 341	-
10: <i>Croton ruizianus</i> , Peru	81.5	+	327, 341	-
11: <i>Croton ruizianus</i> , Peru	20.9	-	-	-
12: <i>Croton flocculosus</i> (Curtiss)	69.6	+	341, 343	-

Allgemeiner Teil

Croton-Art (Chargenbezeichnung)	Einwaage (mg)	DC	Molmassen	HPLC-MS/MS
13: <i>Croton flocculosus</i> (Curtiss)	54.4	+	341, 343	-
14: <i>Croton flocculosus</i> (Curtiss)	1.0	-	327	Salutarin
15: <i>Croton flocculosus</i> (Curtiss)	28.3	++	341, 343	-
16: <i>Croton flavens</i> , St. Vincent	10.6	+	329	-
17: <i>Croton flavens</i> , Barbados	10.9	-	313, 327	Salutarin
18: <i>Croton balsamifera</i> , Barbados	50.1	-	313, 327, 341	Salutarin
19: <i>Croton flavens</i> , Barbuda	6.7	-	327	Salutarin
20: <i>Croton flavens</i> , Antigua	5.6	+	327, 341	Salutarin
21: <i>Croton flavens</i> , St. Bartholomé	48.3	++	327, 341	Salutarin
22: <i>Croton flavens</i> , Grenada	5.8	-	-	-
23: <i>Croton flavens</i> , Cannouan Island	10.6	+	327	-
25: <i>Croton flavens</i> , Isle of Ronde	7.9	+	327	-
26: <i>Croton flavens</i> , Dominica	30.1	++	327, 341, 357	O-Methylflavinantin
27: <i>Croton flavens</i> , Providence	15.3	-	-	-
28: <i>Croton balsamifera</i> , La Désirade	12.1	-	313, 327	-
29: <i>Croton balsamifera</i> , Montserrat	4.3	-	-	-
30: <i>Croton balsamifera</i> , St. Kitts	3.9	-	-	-
31: <i>Croton balsamifera</i> , Guadeloupe	8.1	-	313	Norsinoacutin
54: <i>Croton balsamifera</i> , Guadeloupe	51.6	-	327	-
55: <i>Croton balsamifera</i> , Grenada	23.6	++	341	-
56: <i>Croton balsamifera</i> , Curaçao	27.9	+	341	-
57: <i>Croton balsamifera</i> , Barbuda	34.7	++	313, 327	Norsinoacutin
58: <i>Croton balsamifera</i> , Martinique	17.8	++	327	Flavinantin
59: <i>Croton flocculosus</i> , Martinique	26.7	+	313, 327, 341	-
60: <i>Croton balsamifera</i> , Martinique	35.5	-	-	-
61: <i>Croton balsamifera</i> , Guadeloupe	49.0	-	327, 341	-
62: <i>Croton balsamifera</i> , Guadeloupe	81.3	-	-	-
63: <i>Croton balsamifera</i> , Guadeloupe	80.2	-	-	-
64: <i>Croton flavens</i> , Guadeloupe	43.0	+	327, 341	-



**Abb. 53:** DC-Untersuchung der *Croton*-Pflanzen 21, 22, 23 und 25 mit Salutarin (**3**) als Referenzsubstanz



**Abb. 54:** HPLC-MS/MS-Chromatogramm mit Salutarin (**3**) bei  $t_R = 17.66$  min

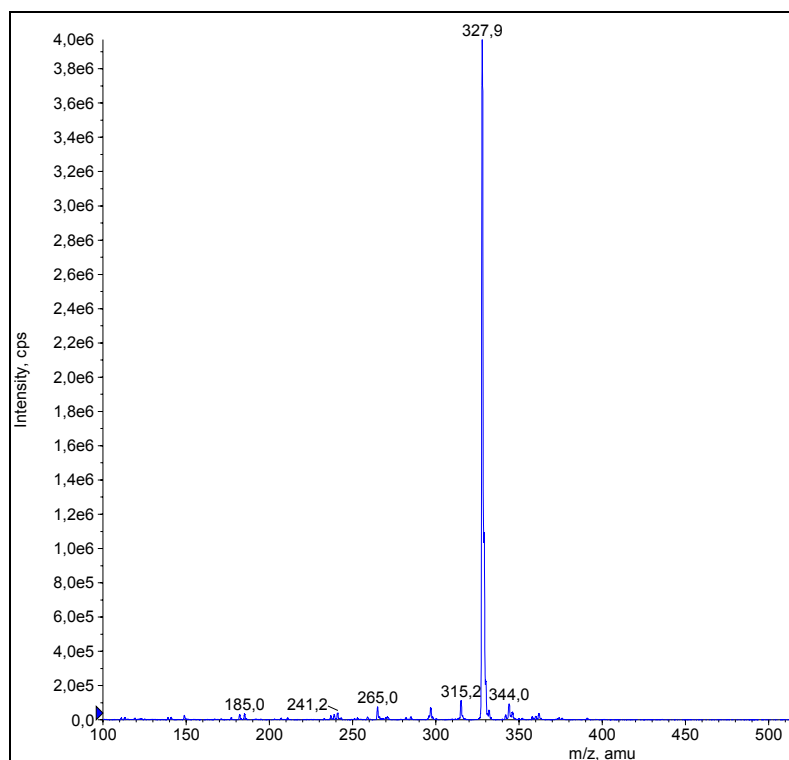


Abb. 55: Molekülpeak von Salutarin (3 mit  $t_R = 17.66$ )

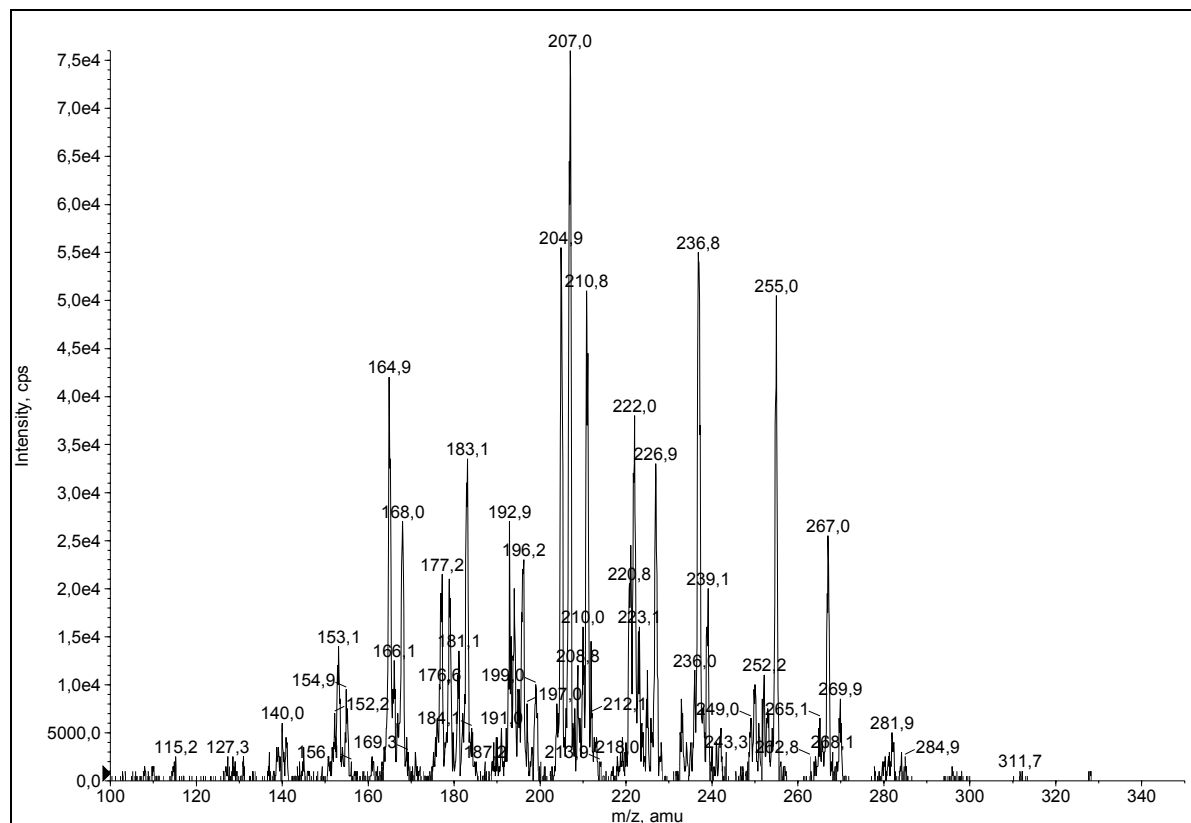
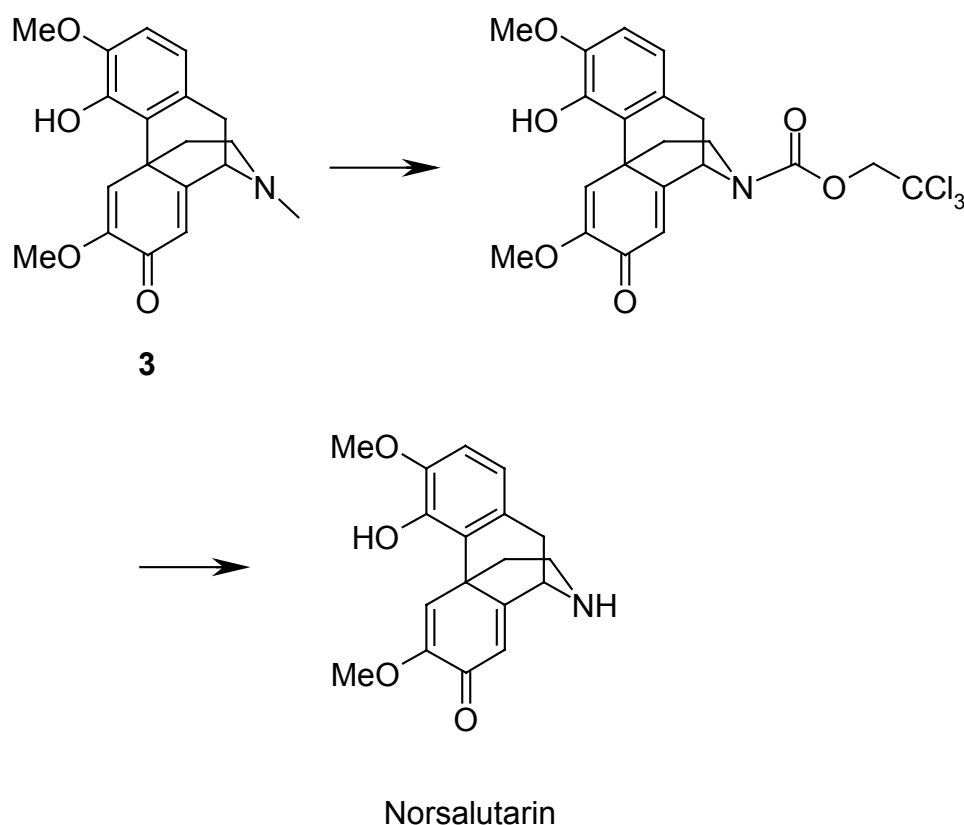


Abb. 56: Zerfallsmuster von Salutarin (3)

## 4 Partialsynthesen

### 4.1 Norsalutarin

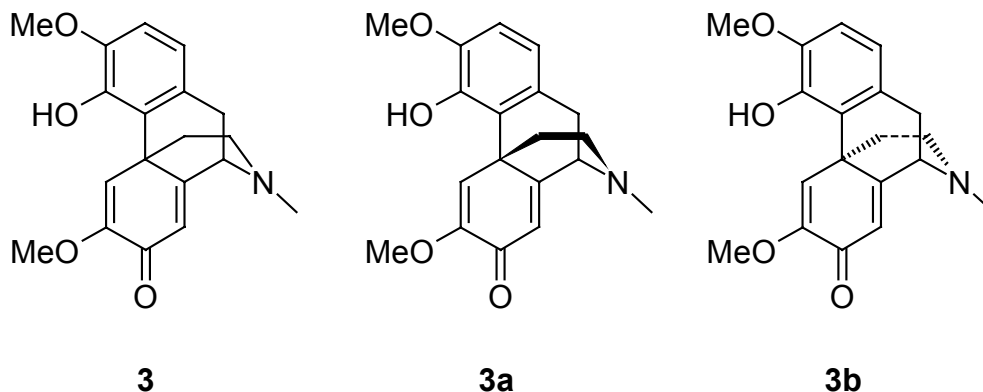
Es ist beschrieben, dass die Art *Croton balsamifera* die Morphinandienone Salutaridin (**3a**) und Norsinoacutin (**5**) enthält.<sup>12</sup> Die Untersuchungen von Strauch A ergaben aber, dass nur das Enantiomergemisch Salutarin (**3**) vorliegt. Es wurde versucht, Norsinoacutin als Vergleichssubstanz zu erhalten, um das chromatographische Verhalten dieser Verbindung zu untersuchen. Damit sollte überprüft werden, ob nicht doch auch Norsinoacutin in der Pflanze vorkommt. Dazu wurde Salutarin mit Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester umgesetzt.<sup>67</sup> Es entstand das demethylierte Trichlorethylcarbammat-Derivat, das reaktiv mit Zink/Eisessig gespalten wurde. Man erhielt so Norsalutarin, das Enantiomergemisch aus Norsalutaridin und Norsinoacutin. Dieses Gemisch konnte mit der analytischen HPLC und einer chiralen Säule getrennt werden (siehe Kapitel C.5.4).



**Abb. 57:** Synthese von Norsalutarin

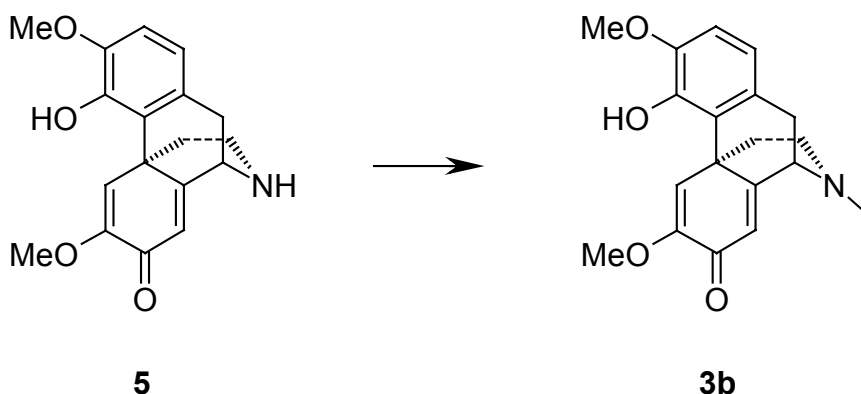
## 4.2 Sinoacutin

Aus den fünf Sträuchern konnten das Enantiomergemisch Salutarin (**3**) und das (*R*)-Enantiomer Salutaridin (**3a**) isoliert werden. Das (*S*)-Enantiomer Sinoacutin (**3b**) konnte weder durch Isolierung noch durch Enantiomerentrennung (siehe Kapitel C.5.5) erhalten werden. Daher sollte dieses Alkaloid zu Vergleichszwecken durch Partialsynthese aus natürlichem Norsinoacutin (**5**) hergestellt werden.



Sekundäre Amine können sehr gut durch Umsetzung mit Formaldehyd in Gegenwart eines Reduktionsmittels *N*-methyliert werden. Im Gegensatz zur Alkylierung mit Methyljodid fallen bei dieser Reaktion keine quartären Ammoniumverbindungen als Nebenprodukte an.

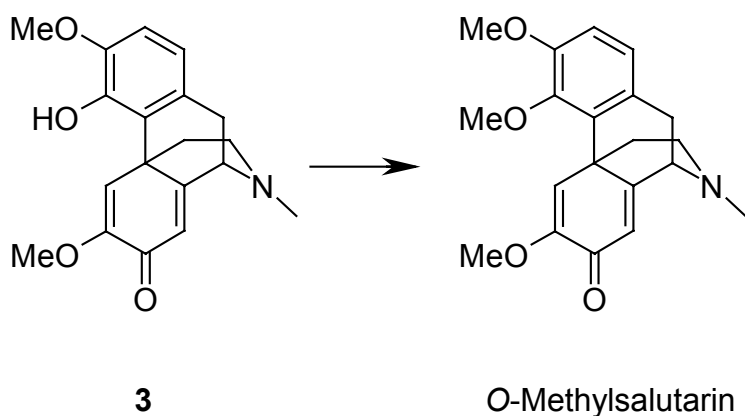
Eine bewährte Methode hierfür ist die Methylierung mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid in Methanol bei pH 5 - 6.<sup>68</sup>



Das so erhaltene Sinoacutin (**3b**) stimmt in allen chemischen und physikalischen Daten mit den Literaturdaten überein.<sup>69</sup>

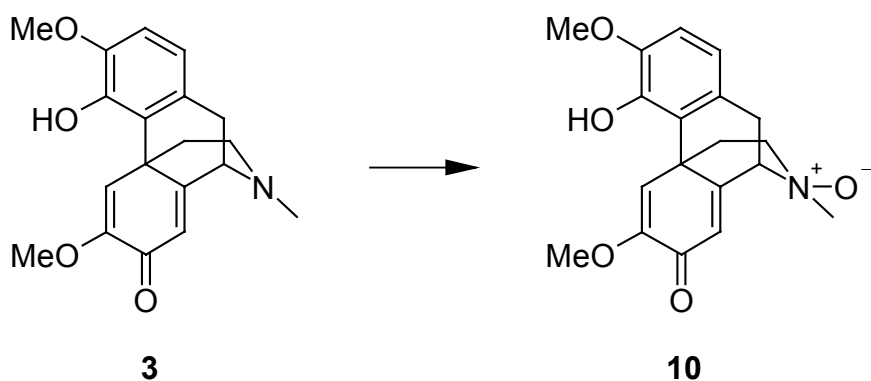
### 4.3 O-Methylsalutarin

Aus dem Strauch A wurde ein Alkaloid, das offensichtlich drei aromatische Methoxygruppen trägt, in sehr geringen Mengen (4 mg) isoliert. Mittels spektroskopischer Methoden gelang es deshalb nicht, die Struktur sicher aufzuklären. Es wurde daher versucht, die Substanz partialsynthetisch aus Salutarin (**3**) herzustellen. Die phenolische Hydroxygruppe von **3** wurde durch Umsetzung mit Diazomethan-Lösung in Diethylether methyliert.<sup>70</sup> Die Umsetzung gelang trotz mehrfacher Wiederholung nur mit sehr geringen Ausbeuten, was an der schlechten Zugänglichkeit der Hydroxygruppe am C-4 liegen könnte. Die physikalischen Daten von O-Methylsalutarin stimmen mit den Literaturwerten voll überein.<sup>71</sup> Beim Vergleich der Spektren von O-Methylsalutarin mit O-Methylflavinantin (**4**) stellte sich heraus, dass diese sehr ähnlich, aber nicht identisch sind. Somit konnte sicher ausgeschlossen werden, dass das isolierte Alkaloid **4** O-Methylsalutarin ist.



### 4.4 Salutarin-N-oxid

Um die Struktur des Alkaloids **10** endgültig zu beweisen, wurde versucht, aus Salutarin das entsprechende N-Oxid partialsynthetisch herzustellen. Dazu wurde **3** bei 0 °C mit 3-Chlorperbenzoesäure versetzt und 30 Minuten gerührt. Die spektralen Daten des partialsynthetischen Produkts stimmen mit **10** überein

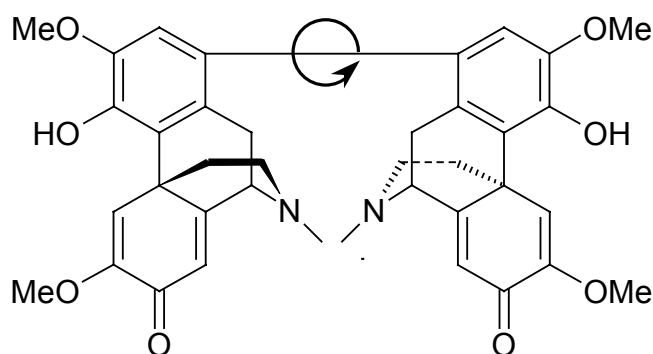


#### 4.5 Salutaridinol (I) und 7-epi-Salutaridinol (II)

Die Partialsynthese dieser beiden epimeren Alkohole aus Salutaridin wird im Zusammenhang mit der Morphinbiosynthese im Kapitel C.5.2.4 besprochen.

#### 4.6 Saludimerin A

Das Alkaloid **7** konnte aufgrund spektroskopischer Methoden nicht zufriedenstellend identifiziert werden. Unklar blieb, ob es sich tatsächlich um ein Dimer handelt und wie das Molekül in 1- und 4-Position substituiert ist. Nachdem ein ähnliches Substitutionsmuster wie bei Salutaridin (**3a**) wahrscheinlich war, wurde versucht, aus dieser Substanz durch chemische Oxidation das Dimer zu erzeugen.<sup>72</sup> Dazu wurde **3a** in wässrigem Ethanol gelöst und mit Silbernitrat-Lösung bei 0 °C versetzt. Nach fünf Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung gestoppt. Der Ansatz wurde mit Natriumcarbonat alkalisiert und das Alkaloid mit Dichlormethan extrahiert. Nach Aufreinigung lag das in 1,1'-Position verknüpfte Dimer vor, das mit dem isolierten Alkaloid **7** in allen spektroskopischen Daten identisch ist.



Saludimerin A (**7**)

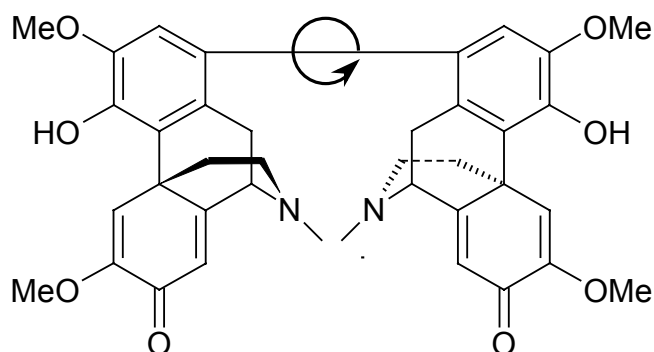
#### 4.7 Saludimerin B und Salsinodimerin

Es wurde versucht, Salsinodimerin partialsynthetisch aus einem Gemisch von Salutaridin (**3a**) und Norsinoacutin (**5**) durch Zugabe von Silbernitrat zu erhalten. Im Gegensatz zu der Dimerisierungsreaktion zu Saludimerin A erfolgte bei diesen Edukten keine Umsetzung. Auch bei Zusatz von wenig Ammoniak wurden die Edukte unverändert wiedergewonnen.

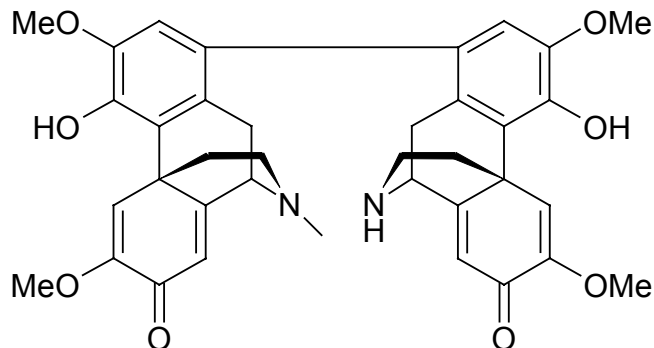
Daher wurde versucht, das Dimer durch Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) ähnlich der Bildung von Pseudomorphin zu erhalten.<sup>73</sup> Dazu wurden Salutaridin und Norsinoacutin zu einer heißen, wässrigen Lösung von Kaliumhydroxid zugegeben und auf Raumtemperatur abgekühlt. Eine wässrige Lösung von



Kaliumhexacyanoferrat(III) wurde innerhalb einer Stunde unter Rühren langsam zugespritzt. Nach 30 Minuten wurde der Ansatz mit 5%iger Essigsäure auf pH 9 gebracht und mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen enthielten neben den beiden Edukten zwei Produkte. Die erste Verbindung konnte als Saludimerin B (**8**) identifiziert werden. Damit konnte die Annahme bestätigt werden, dass es sich bei Saludimerin B um ein Rotamer von Saludimerin A handeln muss. Das zweite Produkt stimmte in allen spektroskopischen Daten mit Salsinodimerin überein. Damit konnte auch die Konstitution von **9** endgültig bewiesen werden.



Saludimerin B **8**



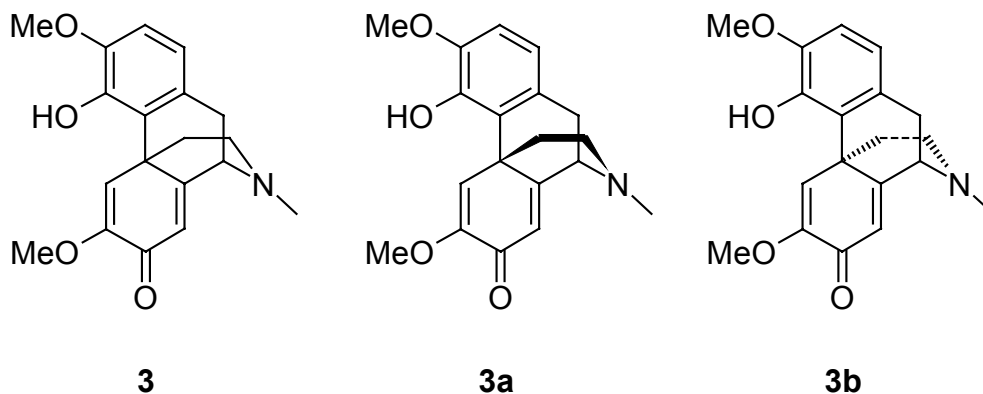
Salsinodimerin **9**

## 5 Stereochemie und Biosynthese der Alkaloide

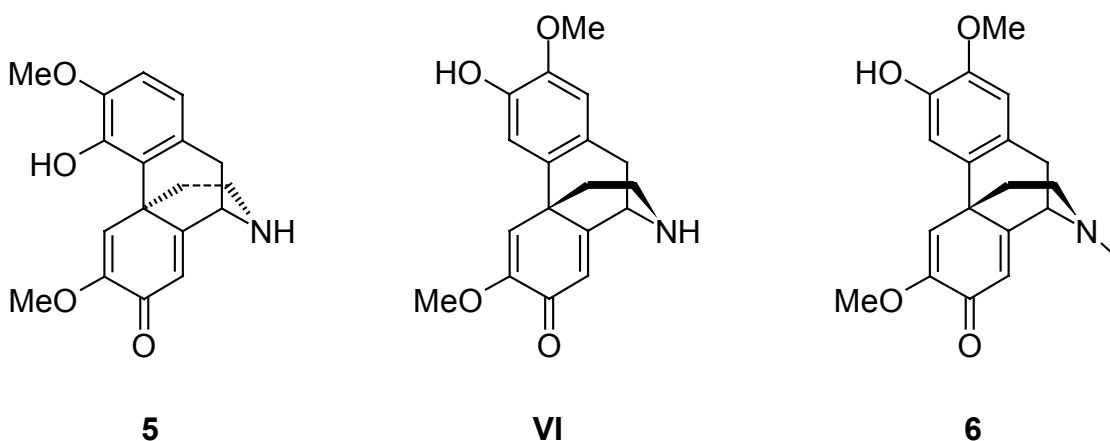
### 5.1 Allgemeines und Aufgabenstellung

*Croton*-Spezies produzieren eine Reihe von Alkaloiden aus dem Benzyloisochinolin-Stoffwechsel (Aporphine, Morphinane etc.). Besonders bemerkenswert an *Croton* ist aber, dass in manchen Spezies spiegelbildlich konfigurierte Morphinandienone nebeneinander vorkommen. Dies ist im Pflanzen- bzw. Tierreich sehr selten, weil von Enzymsystemen normalerweise nur ein Enantiomer produziert wird.

Aus *Croton salutaris* wurden Salutaridin (**3a**) und sein Enantiomer Sinoacutin (**3b**) isoliert. Das Enantiomergemisch wird als Salutarin (**3**) bezeichnet. Es wurden auch die *N*-Demethylderivate Norsalutaridin und Norsinoacutin (**5**) isoliert. Die mengenmäßige Zusammensetzung der Enantiomere ist nicht 50:50 und unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen.<sup>74</sup>



Bei *Croton balsamifera* wurde ein ähnliches Phänomen beobachtet. Es konnten ebenfalls die Morphinandienone Salutaridin und Norsinoacutin isoliert werden.<sup>12</sup> In *Croton flavens* L. wurden Sinoacutin (**3b**) und Norsinoacutin (**5**) aus der einen Reihe und Flavinin (**VI**) und Flavinantin (**6**) aus der anderen Reihe gefunden.<sup>75</sup> Damit werden wiederum beide enantiomere Grundkörper in diesen Pflanzen biosynthetisiert. An dieser Stelle sei noch einmal auf die Problematik bei der Benennung von *Croton*-Spezies hingewiesen (siehe auch Kapitel C.1.1).



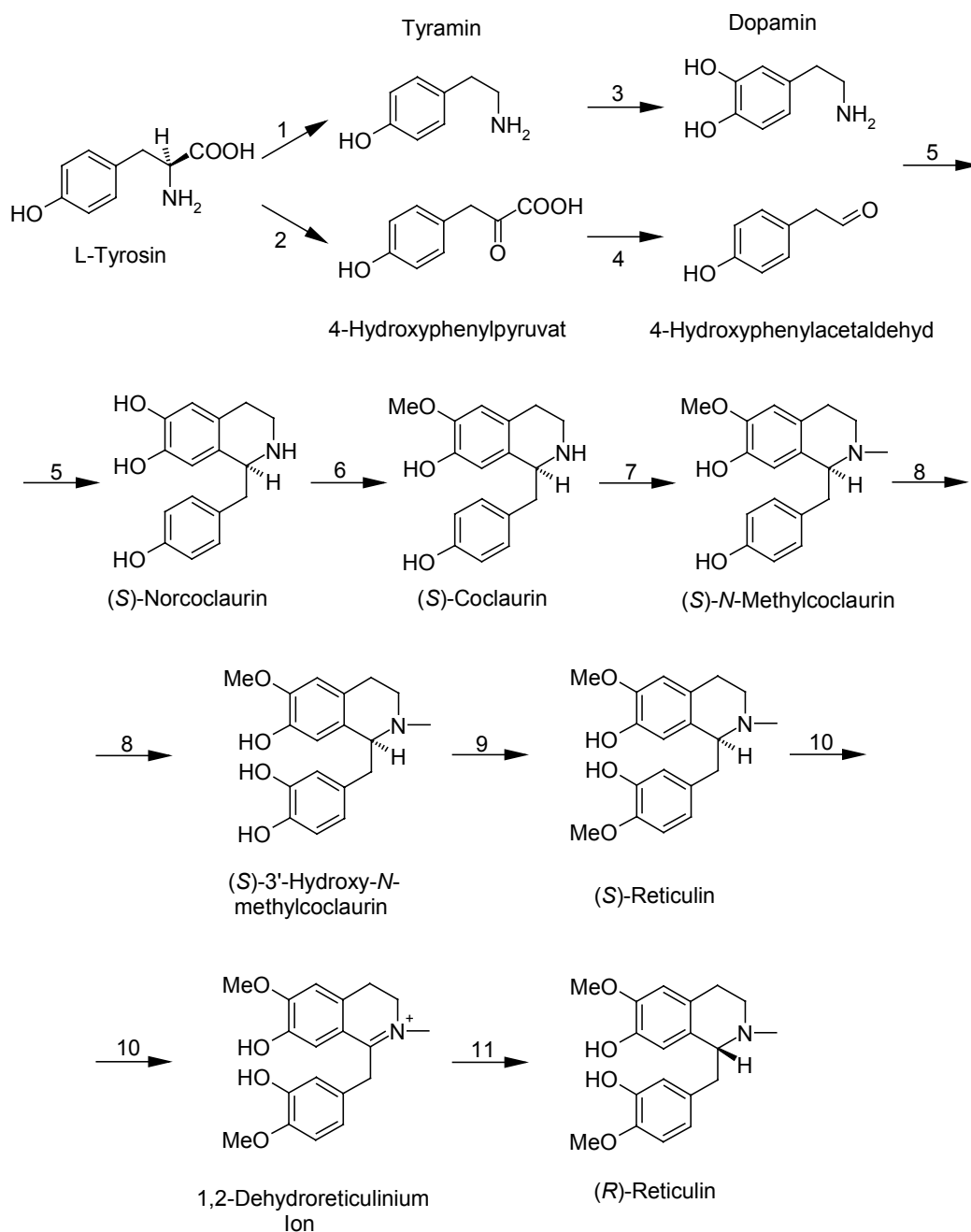
Eine schlüssige Erklärung für dieses Phänomen steht trotz ernsthafter Bemühungen noch aus.<sup>76</sup> Das Auftreten beider spiegelbildlicher Grundkörper in der gleichen Pflanze überrascht, da Zenk und Mitarbeiter sowohl bei *Papaver somniferum* als auch bei Säugerzellen eine absolut stereo- und regioselektive enzymatische Cyclisierung von (*R*)-Retikulin zu Salutaridin nachweisen konnten.<sup>77</sup>

Ein besonderes Augenmerk sollte daher bei dieser Arbeit auf der Stereochemie der *Croton*-Alkaloide liegen. Ziel war es unter anderem, eine *Croton*-Art zu finden, in der spiegelbildlich konfigurierte Morphinan-Grundkörper nebeneinander vorkommen.

## 5.2 Biosynthese der Benzylochinolin-Alkaloide

### 5.2.1 Biosynthese von (*S*)-Retikulin

Die zentrale Biosynthesestufe für die Protoberberine, Morphinan- und Benzylochinolinalkaloide ist das Alkaloid Retikulin. Aus zwei Molekülen der Aminosäure L-Tyrosin wird über mehrere enzymatisch katalysierte Zwischenstufen, die zum Teil absolut stereospezifisch ablaufen, das (*S*)-Enantiomer gebildet. Die Biosynthese des (*S*)-Retikulins ist heute vollständig aufgeklärt und die daran beteiligten Enzyme sind gereinigt und charakterisiert.<sup>78</sup> Dieses wird dann über zwei weitere Schritte in (*R*)-Retikulin umgewandelt.<sup>79</sup>



**Abb. 58:** Die Biosynthese von Retikulin nach Lit.<sup>78</sup>

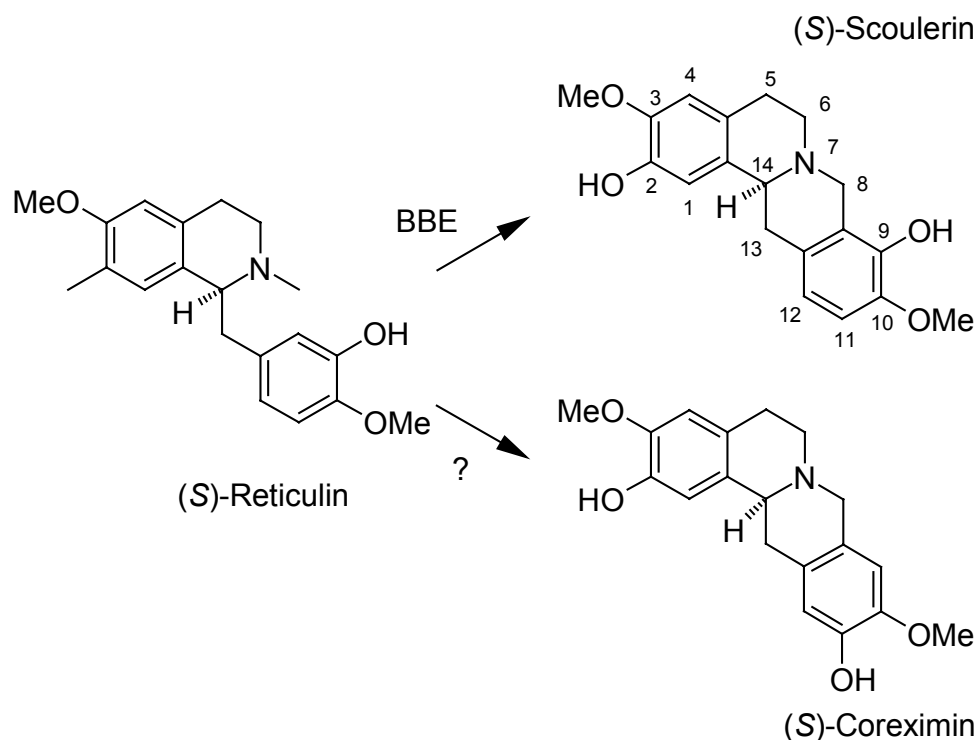
Folgende Enzyme katalysieren die einzelnen Schritte:

1 = L-Tyrosindecaboxylase; 2 = L-Tyrosintransaminase; 3 = Phenolase; 4 = *p*-Hydroxyphenylpyruvatdecarboxylase; 5 = (S)-Norcocclaurinsynthese; 6 = (R,S)-Norcocclaurin-6-*O*-Methyltransferase; 7 = (S)-Cocclaurin-*N*-Methyltransferase; 8 = (R,S)-*N*-Methylcocclaurin-3'-hydroxylase; 9 = 3'-Hydroxy-*N*-Methyl-(S)-cocclaurin-4'-*O*-Methyltransferase; 10 = (S)-Retikulinoxidase; 11 = 1,2-Dehydroretikulinderduktase.

### 5.2.2 Biosynthese der Tetrahydroprotoberberine

(S)-Retikulin wird durch das Berberin Bridge Enzym zu (S)-Scoulerin cyclisiert. Dabei wird die N-Methylgruppe des Retikulins zum C-8 Atom des so entstandenen Tetrahydroprotoberberins.<sup>80</sup> Für die Reaktion ist es essentiell, dass das Edukt (S)-Konfiguration besitzt und dass die Hydroxygruppe in ortho-Position zum Angriffspunkt der Cyclisierung steht. Eine solche Cyclisierung ist durch chemische Synthese momentan nicht durchführbar und auch im Pflanzenreich einzigartig.<sup>81</sup> Scoulerin ist eine wichtige Vorstufe auf dem Weg zur Biosynthese von Berberin.

Die Biosynthese von Coreximim verläuft über einen ähnlichen Mechanismus, aber mit Hilfe eines anderen Enzyms. 1971 konnte bewiesen werden, dass (S)-Retikulin in *Papaver somniferum* durch para-oxidative Kupplung in Coreximim umgewandelt wird.<sup>82</sup> Auch Enzyme aus Rattenleber katalysieren diese Reaktion.<sup>83</sup>



**Abb. 59:** Biosynthese der Tetrahydroprotoberberine

### 5.2.3 Biosynthese der Morphinandienone

Die Umwandlung des 1-Benzyltetrahydroisochinolins Retikulin in die Morphinandienone kommt durch die Ausbildung der C-C-Bindung zwischen den C-Atomen 12 und 13 zustande. Die Hypothese einer solchen intramolekularen oxidativen Phenolkupplung wurde schon 1957 am Beispiel der Biosynthese von Salutaridin aufgestellt.<sup>84</sup> Die Vorstellung, dass dies durch ubiquitär vorkommende

Phenoloxidasen, Tyrosinasen oder Peroxidasen geschieht, kann aber ausgeschlossen werden. Diese Enzyme besitzen keine Stereo- und Substratspezifität. Fütterungsexperimente an *Papaver somniferum* zeigten, dass aus radioaktiv markiertem (*R*)-Retikulin durch regioselektive phenolische Oxidation unter ortho-para-Kupplung Salutaridin entsteht.<sup>85</sup>

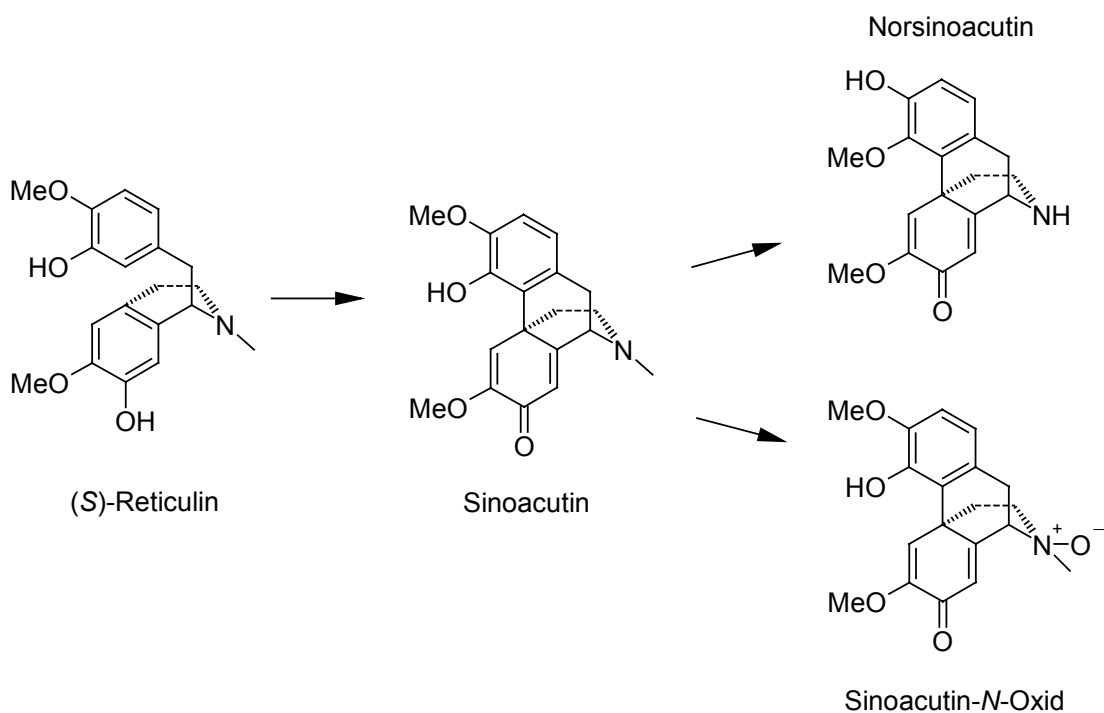
Die enzymatische Aufklärung dieser chemisch nur mit äußerst geringer Ausbeute verlaufenden Reaktion gelang der Arbeitsgruppe Zenk. Die zur Enzymfamilie der Cytochrom P-450-abhängigen Oxidasen gehörende Salutaridin-Synthase katalysiert diese regio- und stereoselektive ortho-para-oxidative Phenolkupplung unter Ausbildung einer C-C-Bindung.<sup>86</sup> Dieses Enzym ist an den Membranen des rauen Endoplasmatischen Retikulums gebunden und gehört zu den elektronenübertragenden Proteinen mit Häm als prosthetischer Gruppe.

Die Biosynthese des Enantiomers von Salutaridin läuft ähnlich ab. Stuart und Graham konnten 1971 beweisen, dass aus (*S*)-Retikulin Sinoacutin gebildet wird. In *Croton flavens* L. wird zudem Sinoacutin leicht zu Norsinoacutin demethyliert. Auch die umgekehrte Reaktion, nämlich die *N*-Methylierung von Norsinoacutin, findet in dieser Pflanze statt.<sup>87</sup>

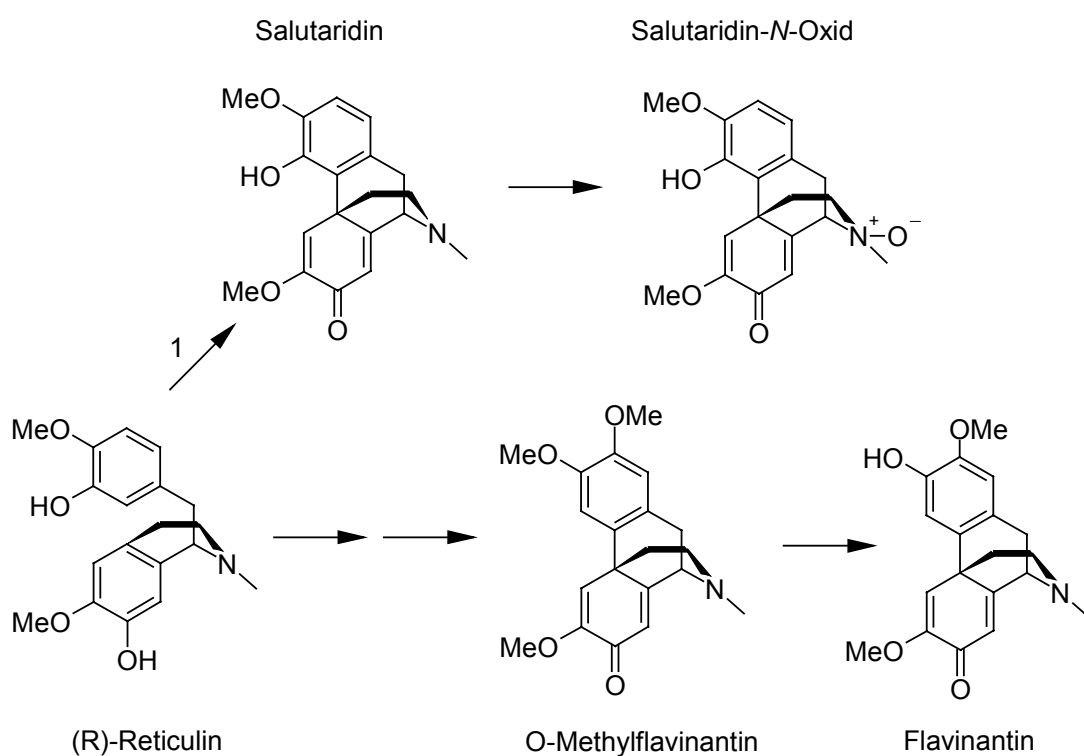
Liegt das Enantiomeregemisch eines Alkaloids vor, kann dies mehrere Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist, dass unterschiedliche Enzymsysteme für die Biosynthese beider Enantiomere in der Pflanze vorhanden sind. Die zweite Variante ist, dass durch ein effektives Oxidations-Reduktionssystem wie bei *Papaver somniferum* (*S*)-Retikulin und (*R*)-Retikulin ineinander übergeführt werden und die beiden Enantiomere unspezifisch bzw. nichtenzymatisch cyclisiert werden.<sup>88</sup> Die letzte Variante ist, dass Retikulin nichtenzymatisch in der Pflanze racemisiert wird und die beiden Enantiomere unspezifisch zu den Morphinandienonen cyclisiert werden.

Die Biosynthese der anderen in der untersuchten Pflanze gefundenen Morphinandienone ist noch nicht so genau aufgeklärt worden wie die von Salutaridin. In seltenen Fällen kann Retikulin durch para-para-oxidative Phenolkupplung zu Isosalutaridin umgewandelt werden.<sup>89</sup> Dieser erste Schritt zu den 2,3-disubstituierten Verbindungen ist in der Regel eine untergeordnete Reaktion. Isosalutaridin kann methyliert werden und man erhält *O*-Methylflavinantin.<sup>90</sup> Flavinantin kann über eine Demethylierung aus *O*-Methylflavinantin entstehen.<sup>76</sup>

Das *N*-Oxid entsteht möglicherweise durch einen unspezifischen Oxidationsmechanismus in der Pflanze.



**Abb. 60:** Biosynthese der (S)-konfigurierten Morphinandienone

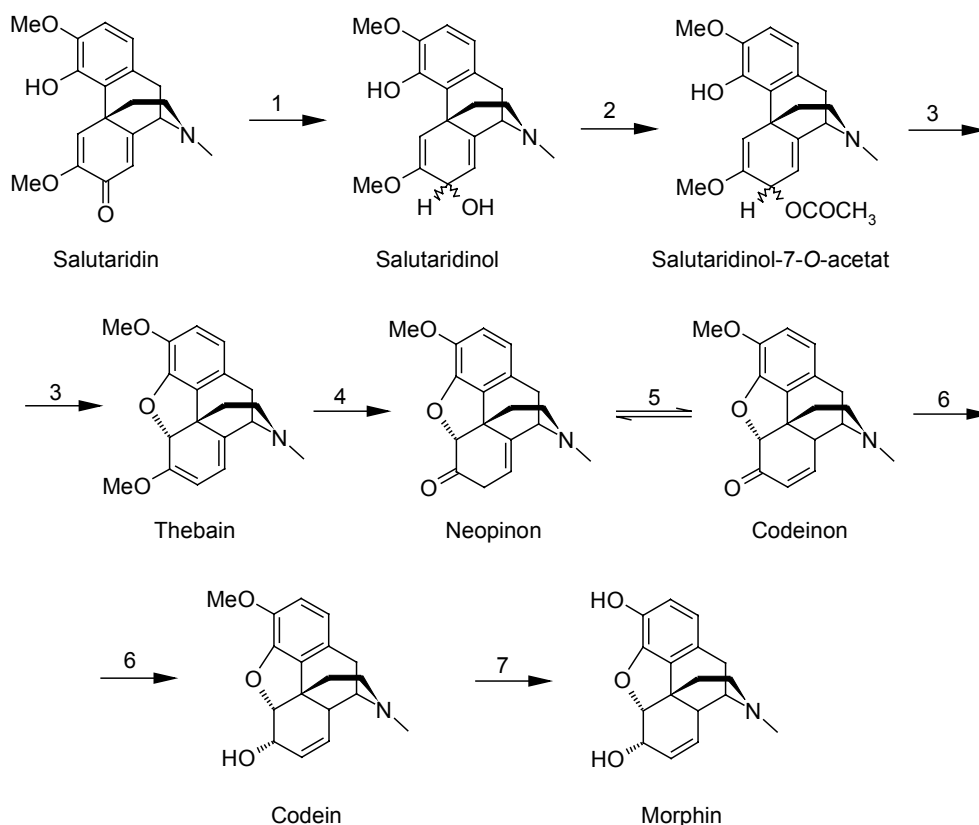


**Abb. 61:** Biosynthese der (R)-konfigurierten Morphinandienone

Einzig bekanntes Enzym: 1 = Salutaridin Synthase

5.2.4 Biosynthese von Thebain, Codein und Morphin

Salutaridin ist eine wichtige Biosynthesevorstufe bei der Bildung der pharmakologisch interessanten Alkaloide Thebain, Codein und Morphin aus *Papaver somniferum*. Der erste Schritt zur Thebainbildung verläuft über eine Reduktion von Salutaridin zu dem Alkohol Salutaridinol. Anschließend wird eine Acetylgruppe übertragen. Dann bildet sich spontan eine Etherbrücke in einer intramolekularen nucleophilen Substitution unter Allylelimination. Durch die Abspaltung der 6-O-Methylgruppe vom Thebain entsteht ein Enol, das zur Ketogruppe des Neopinons tautomerisiert. Die anschließende Isomerisierung zu Codeinon verläuft spontan. Codeinon wird danach zu Codein reduziert und damit dem Gleichgewicht entzogen. Der letzte Schritt ist die Abspaltung der 3-O-Methylgruppe unter Ausbildung der phenolischen OH-Gruppe von Morphin.



**Abb. 62:** Biosynthese von Codein und Morphin nach Lit.<sup>91</sup>

Schritte und Enzyme der Morphin-Biosynthese:

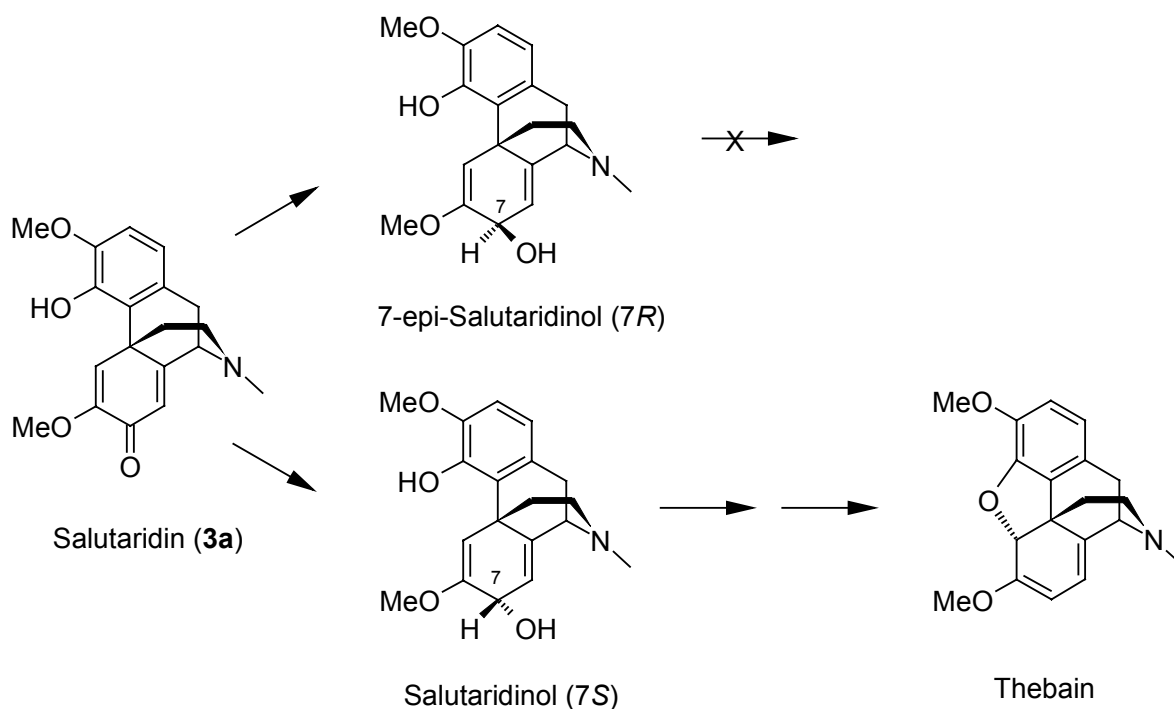
1 = Salutaridinreduktase, 2= Salutaridinolacetyltransferase, 3 läuft spontan ab, 4 = Demethylierung, 5 = Gleichgewichtseinstellung, 6 = Codeinonreduktase, 7 = Demethylierung



### 5.2.5 Synthese von Salutaridinol

Die Biosynthese bleibt bei *Croton flavens* L. auf der Stufe von Salutaridin (**3a**) stehen. Um dies zu beweisen, wurde Salutaridinol als Vergleichssubstanz partialsynthetisch hergestellt. Bei der Reduktion von Salutaridin mit Natriumborhydrid entsteht am C-7 ein neues Stereozentrum und man erhält die Alkohole Salutaridinol und 7-epi-Salutaridinol.

Die präparative Trennung erfolgt durch dreistündiges Digerieren in Ethylacetat bei 50 °C und Stehenlassen über Nacht bei Raumtemperatur. Die abgeschiedenen Kristalle sind identisch mit natürlichem Salutaridinol, welches die Vorstufe für die Biosynthese von Thebain ist.<sup>92</sup>



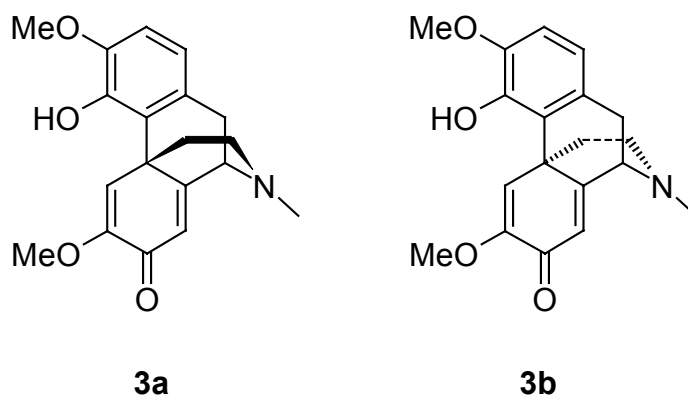
**Abb. 63:** Synthese von Salutaridinol und 7-epi-Salutaridinol

Beide Alkaloide konnten in *Croton flavens* L. nicht gefunden werden. Offensichtlich wird daher bei der Pflanze ähnlich wie auch bei *Sinomenium acutum* dieser Reduktionsschritt unterdrückt.<sup>93</sup>

Das Auffinden einer Pflanze mit sehr hohem Salutaridin-Gehalt ist von großem Interesse für die Suche nach einem biotechnologischen Verfahren zu einer kostengünstigen Produktion von Thebain, Codein und Morphin.

### 5.3 Aufklärung der Stereochemie von Salutarin und Salutaridin

Bei der Untersuchung des Extrakts aus dem *Croton*-Strauch A wurde ein Hauptalkaloid isoliert. Aufgrund der spektroskopischen Daten wurde es als Salutaridin (**3a**) identifiziert. Der Schmelzpunkt und die spezifische Drehung stimmen jedoch nicht mit den Literaturwerten überein.<sup>94</sup> Es lag daher die Vermutung nahe, dass das Enantiomergemisch aus Salutaridin (**3a**) und Sinoacutin (**3b**), also Salutarin (**3**) vorliegt. Dieses Phänomen wurde schon in *Croton salutaris* beobachtet.<sup>74</sup>



Von den Blättern des Strauches A und D, die zu verschiedenen Jahreszeiten geerntet wurden, wurden Extrakte hergestellt und Salutarin (**3**) isoliert. Die Untersuchung der optischen Drehung dieses Alkaloids von den verschiedenen „Chargen“ ergab unterschiedliche  $[\alpha]_D^{20}$ -Werte. Der Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess, ee) wurde als Maß für die enantiomere Reinheit nach folgender Formel bestimmt:

$$ee (\%) = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \times 100$$

$C_R$ : Konzentration des (*R*)-Enantiomers

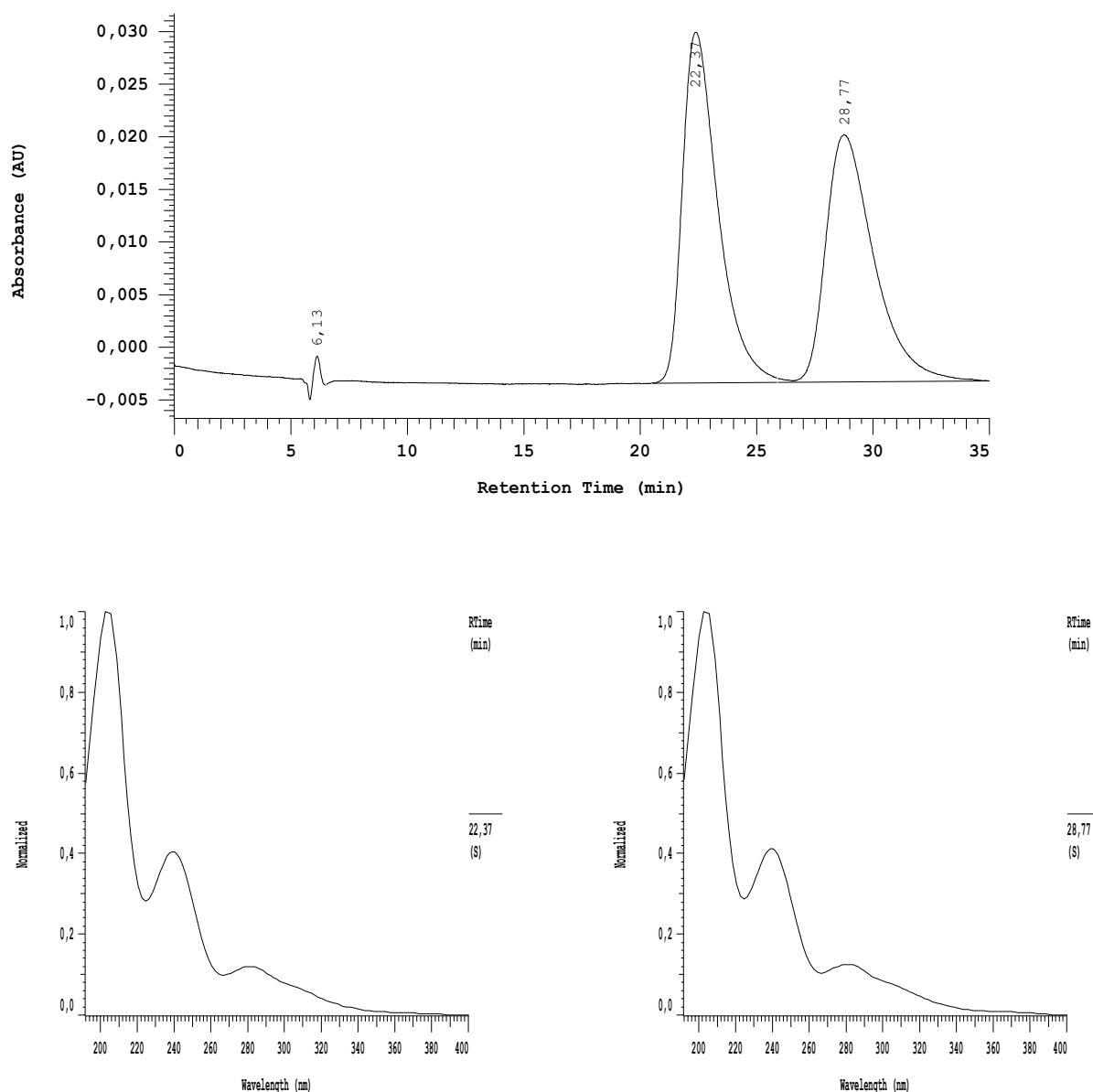
$C_S$ : Konzentration des (*S*)-Enantiomers

Der Enantiomerenüberschuss des rechtsdrehenden Salutaridins (**3a**) lag bei 1 bis 36%.

Das aus Strauch B, C und E isolierte Hauptalkaloid war dagegen das enantiomerenreine Salutaridin (**3a**) mit einer spezifischen Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = +111^\circ$  ( $c = 2.4$ , Methanol; Lit.<sup>95</sup>:  $[\alpha]_D = +108^\circ \pm 8^\circ$ ,  $c = 0.34$ , Ethanol).

## 5.4 Analytische Trennung der Enantiomere

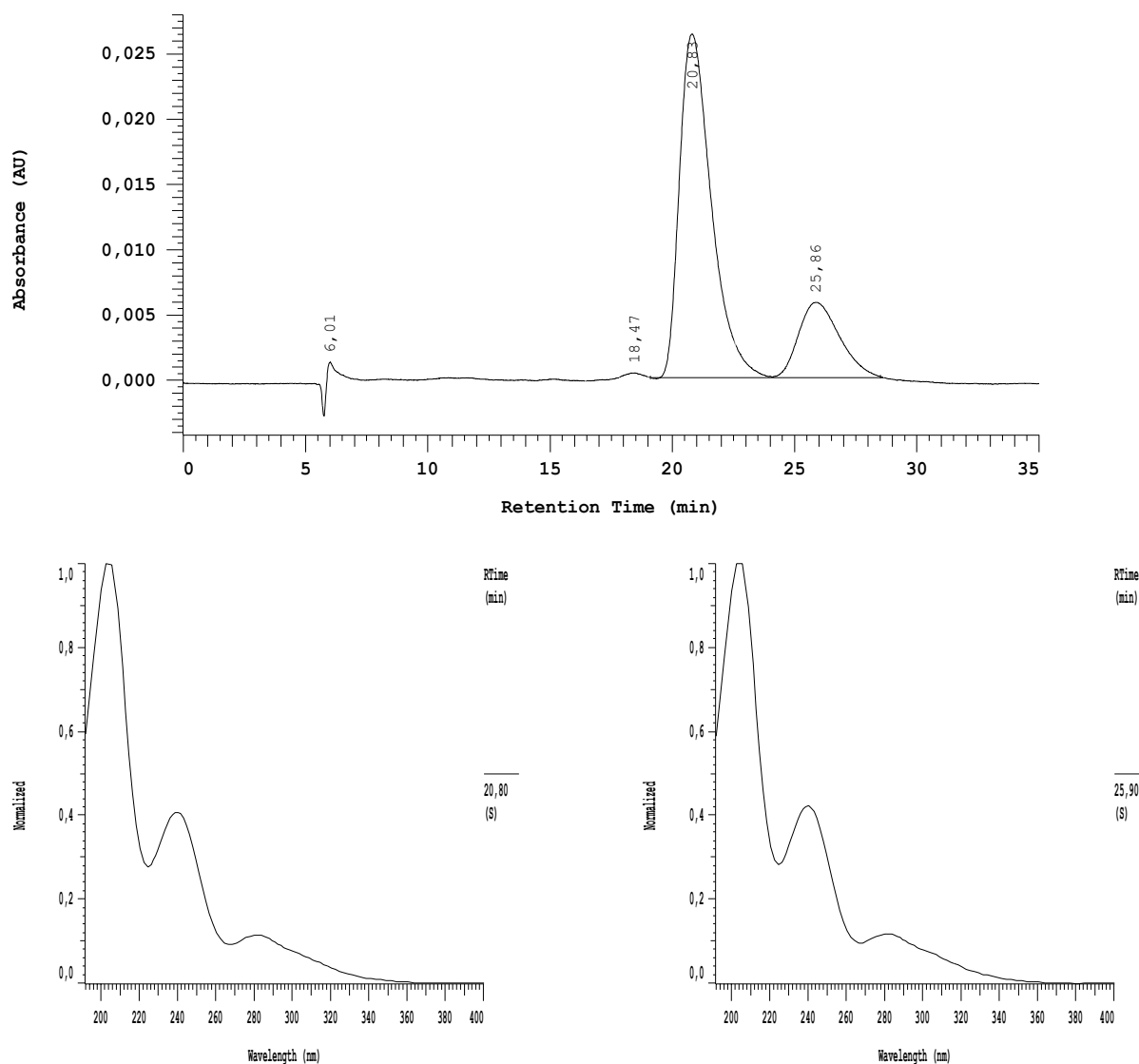
Um dieses Phänomen einfacher und genauer zu untersuchen, wurde eine chirale HPLC-Methode mit DAD-Detektion zur Trennung und Bestimmung der Enantiomere Salutaridin und Sinoacutin entwickelt.<sup>96</sup> Dazu wurde eine chirale Säule (Chiralcel OD-R, 250x4.6 mm I.D.) und eine mobile Phase, bestehend aus 20:80 (v/v) Acetonitril - 0.2 M Natriumperchlorat-Pufferlösung (pH 2, eingestellt mit 60%iger Perchlorsäure), verwendet. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min und die Säule wurde auf 10 °C abgekühlt.



**Abb. 64:** HPLC-Chromatogramm und UV-Spektren von Salutaridin ( $t_R = 22.37$  min) und Sinoacutin ( $t_R = 28.77$  min)

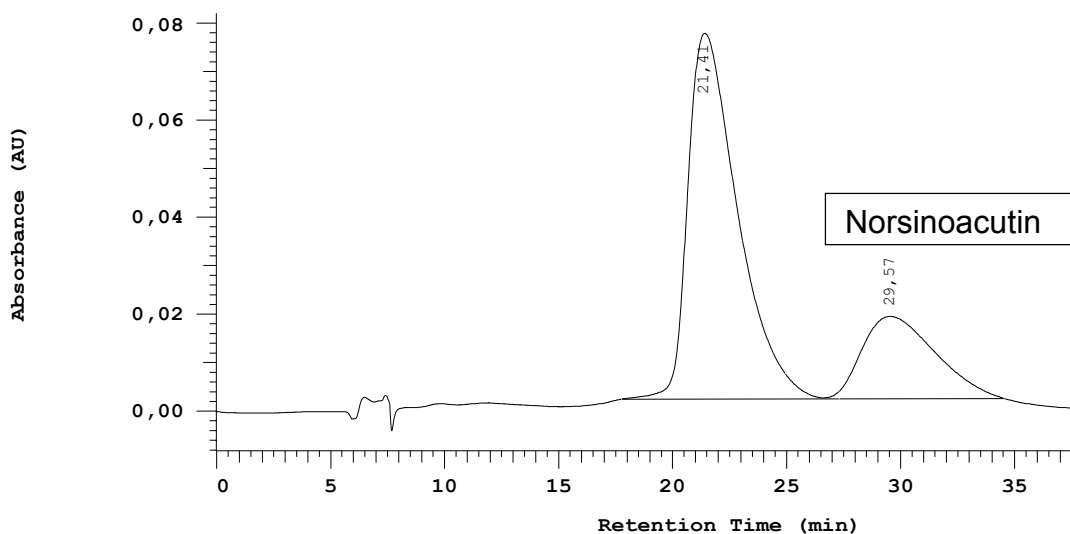
Mit diesem System wurden die isolierten Alkaloide aus den verschiedenen Sträuchern von *Croton flavens* L. untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur dann das Enantiomergemisch Salutarin (**3**) in der Pflanze vorliegt, wenn kein Norsinoacutin (**5**) vorhanden ist. Dies ist in Strauch A und D der Fall. Ist die Pflanze dagegen zu *N*-Demethylierungen befähigt, so wird selektiv und quantitativ nur das (*S*)-Enantiomer Sinoacutin zu Norsinoacutin umgewandelt. Dieses Phänomen kann man in den Sträuchern B, C und E beobachten.

Das aus Strauch A isolierte Salutarin-*N*-oxid wurde ebenfalls auf seine Enantiomerenreinheit hin überprüft. Auch hier zeigte sich, dass ein Gemisch aus dem (*R*)- und (*S*)-Enantiomer vorliegt.



**Abb. 65:** HPLC-Chromatogramm und UV-Spektren von Salutarin-*N*-oxid

Im Chromatogramm aller anderen isolierten Alkaloide erkennt man jeweils nur einen Peak. Nachdem auch die spezifische Drehung mit den Literaturdaten übereinstimmt konnte mit Hilfe der HPLC-Untersuchung gezeigt werden, dass von diesen Verbindungen nur ein Enantiomer in der Pflanze biosynthetisiert wird. Das partialsynthetisch hergestellte Norsalutarin konnte mit dieser chiralen HPLC-Methode ebenfalls getrennt werden und es konnte gezeigt werden, dass in den Pflanzen nur Norsinoacutin (**5**) und nicht das Enantiomergemisch vorliegt.



**Abb. 66:** HPLC-Chromatogramm vom partialsynthetisch hergestellten Norsalutarin

### 5.5 Enantiomertrennung über Kristallisation diastereomerer Salze

Nachdem es gelungen war, das Enantiomergemisch **3** mittels analytischer chiraler HPLC zu trennen, wurde versucht, die beiden Enantiomere auch im präparativen Maßstab aus Salutarin zu erhalten. Dazu wurde Salutarin in Ethylacetat gelöst und mit einer Lösung von (1*R*)-(-)-Campher-10-sulfonsäure in Ethylacetat versetzt. Das Gemisch wurde mit wenig Heptan versetzt und eine Woche bei 8 °C stehen gelassen. Enantiomerenreines Salutaridin-Salz kristallisierte aus. Der Versuch, enantiomerenreines Sinoacutin durch Verwendung der enantiomerenreinen (1*S*)-(+)-Campher-10-sulfonsäure zu erhalten, schlug fehl. Auch bei diesen Bedingungen kristallisierte enantiomerenreines Salutaridin-Salz aus. Dafür gelang die Partialsynthese des enantiomerenreinen Sinoacutins aus Norsinoacutin (siehe Kapitel C.4.2). Die CD-Spektren von Salutaridin und Sinoacutin sind im Anhang abgebildet und stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>97</sup>

Ein weiteres für die Razematspaltung geeignetes Reagenz ist (2*R*,3*R*)-(-)-Di-*O*-benzoylweinsäure-Monohydrat.<sup>98</sup> Versuche, das Enantiomergemisch damit zu trennen, blieben aber erfolglos.

## 6 Pharmakologische Untersuchungen

### 6.1 Externe Untersuchungen

Die isolierten Verbindungen Coreximmin (**2**), Salutarin (**3**), O-Methylflavinantin (**4**), Norsinoacutin (**5**), Flavinantin (**6**) und Crotoflavol (**11**) wurden an den vom Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung in Jena verwalteten „Naturstoffpool“ gegeben. Ergebnisse dazu liegen noch nicht vor.

### 6.2 GABA-Rezeptor Bindungsstudien

Das Alkaloid Salutarin (**3** = Enantiomerengemisch aus Salutaridin und Sinoacutin) verdrängt in synaptischen Membranfraktionen aus Rattengehirnen die [<sup>3</sup>H]-γ-Aminobuttersäure ([<sup>3</sup>H]GABA). Huber et al. beschreiben, dass Salutarin ein partieller Agonist am GABA/Benzodiazepinrezeptor-Komplex ist.<sup>99</sup>

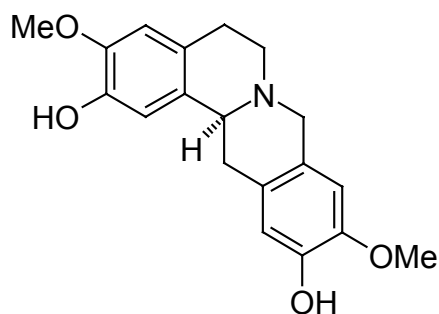
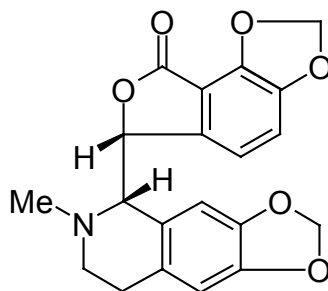
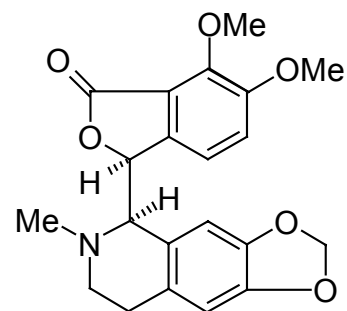
Im Arbeitskreis von Prof. Dr. K. Wanner wurde die Hemmung der Bindung von [<sup>3</sup>H]GABA an GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren in Membranfraktionen aus Rindercortex untersucht. Einige der isolierten Alkaloide wurden zunächst in einer Konzentration von jeweils 100 μM auf ihre Fähigkeit untersucht, die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]GABA zu inhibieren. Die Bindungshemmung der getesteten Verbindungen an den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor ist vernachlässigbar. Daher wurden keine IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Dagegen zeigen einige Substanzen eine deutliche Inhibition der [<sup>3</sup>H]GABA Bindung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Für diese Alkaloide und für die Referenzsubstanzen (+)-Bicucullin und (+)-Hydrastin wurden IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt.

Die Y-Werte (in %) in Tab. 8 geben Mittelwerte (N = Anzahl der Bestimmungen) der verbleibenden spezifischen [<sup>3</sup>H]GABA Bindung an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor in Gegenwart von 100 μM Testsubstanz an. SEM erhält man, wenn die Standardabweichung durch die Wurzel aus der Anzahl der Bestimmungen (hier: N = 3) geteilt wird.

**Tab. 8:** Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]GABA Bindung und IC<sub>50</sub>-Werte einiger Alkaloide am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor

X Labels	GABA <sub>A</sub> Bindung in %		GABA <sub>A</sub> Bindung, IC <sub>50</sub> -Werte [μM]		
	Y	N	Y	SEM	N
Scoulerin (1)	82.250	2	-	-	-
Coreximim (2)	<b>12.800</b>	<b>1</b>	<b>3.173</b>	<b>0.426</b>	<b>3</b>
Salutarin (3)	50.700	2	45.867	11.725	3
Sebiferin (4)	32.400	1	66.467	7.729	3
Norsinoacutin (5)	65.900	2	-	-	-
Flavinantin (6)	41.600	1	78.800	1.041	3
(+)-Bicucullin	-	-	<b>5.822</b>	<b>1.408</b>	<b>3</b>
(+)-Hydrastin	-	-	<b>1.509</b>	<b>0.163</b>	<b>3</b>

Scoulerin (1) und Norsinoacutin (5) zeigten geringe Inhibition der [<sup>3</sup>H]GABA Bindung, weswegen keine weiteren Versuche unternommen wurden. Von den anderen Substanzen (2, 3, 4 und 6) sowie von den zwei Referenzsubstanzen (+)-Bicucullin und (+)-Hydrastin wurden die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass Salutarin (3), Sebiferin (= O-Methylflavinantin 4) und Flavinantin (6) eine mittelmäßige Affinität zum GABA/Benzodiazepinrezeptor-Komplex besitzen. Dagegen hat das Tetrahydroprotoberberin Coreximim (2) eine ausgeprägte Affinität zum GABA<sub>A</sub>-Rezeptor mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 3.2 μM. Dies liegt im Bereich der am stärksten wirksamen Naturstoffe (+)-Bicucullin und (+)-Hydrastin.

**2****(+)-Bicucullin****(+)-Hydrastin**

## 7 Zusammenfassung

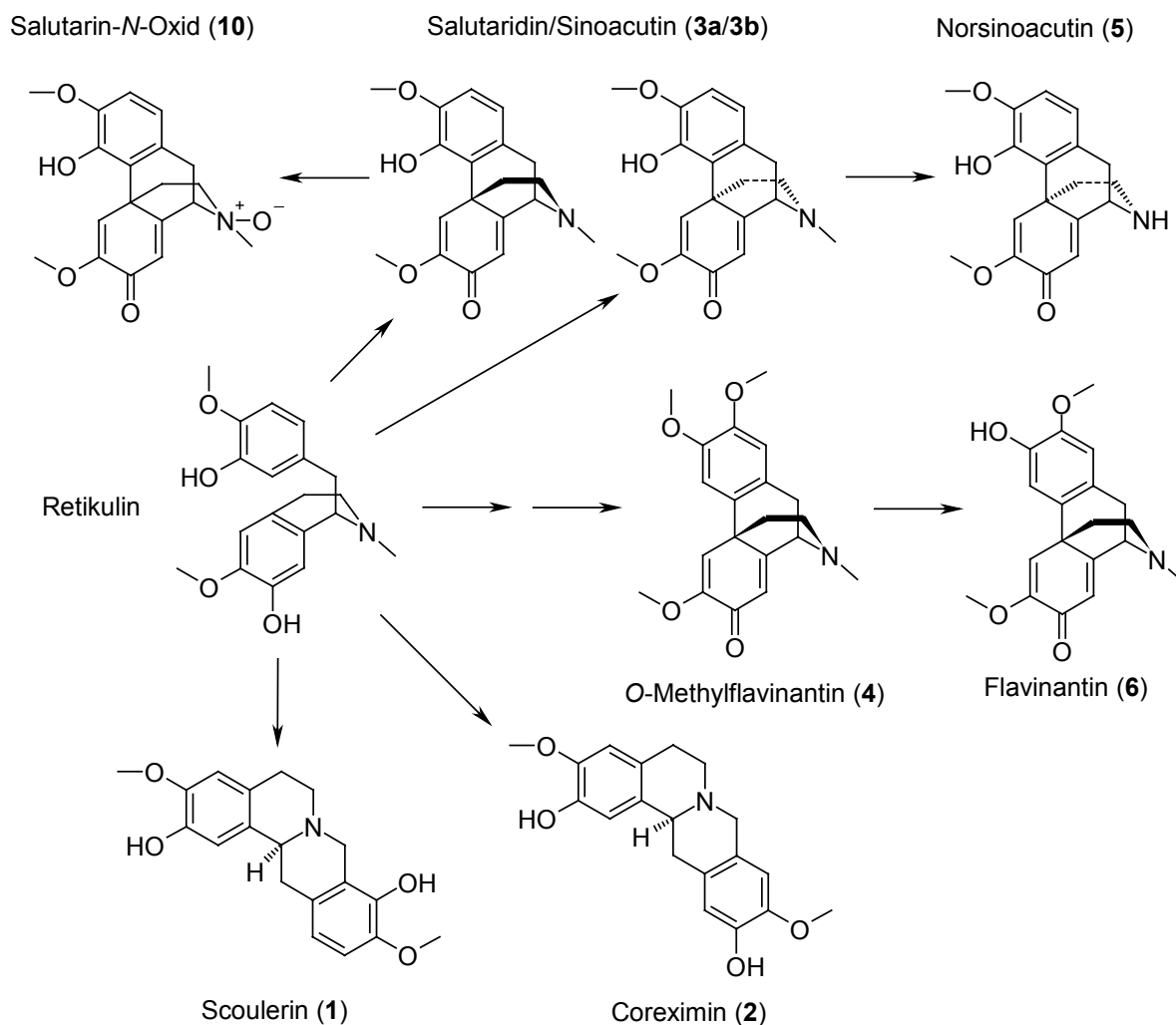
Aus fünf Sträuchern des *Croton flavens* L. von Barbados wurden insgesamt zwölf Verbindungen mit Hilfe von chromatographischen Methoden isoliert, wovon vier neue Naturstoffe darstellen. Die Strukturen wurden aufgeklärt anhand ihrer UV-, IR- und Massenspektren, sowie vor allem anhand der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, DEPT-, APT-, HH-COSY-, NOE-, HMQC- und HMBC-NMR-Spektren. Elf Substanzen gehören der Stoffklasse der Alkaloide an. Ein Tetrahydroprotoberberin-Grundgerüst besitzen Scoulerin (**1**) und Coreximin (**2**). Die beiden Substanzen unterscheiden sich nur in der Anordnung einer Hydroxygruppe. Bei der Biosynthese aus Retikulin wird durch das "Berberine Bridge Enzym" die *N*-Methylgruppe zur Cyclisierung oxidiert. Dies ist erst der zweite Bericht, dass Tetrahydroprotoberberine aus einer *Croton*-Spezies isoliert wurden.

Fünf weitere Verbindungen gehören der Stoffklasse der Morphinandienone an. Aus drei Sträuchern wurde das (*R*)-konfigurierte Salutaridin (**3a**) isoliert. Die phytochemischen Untersuchungen von zwei weiteren Sträuchern haben dagegen ergeben, dass sowohl Salutaridin (**3a**) als auch sein Spiegelbild-Isomer Sinoacutin (**3b**) vorkommen. Das Enantiomerengemisch hat den Namen Salutarin (**3**). Die Besonderheit liegt nun darin, dass in ein und derselben Pflanze von einem Naturstoff beide Enantiomere gebildet werden. Dieses Phänomen ist im Pflanzen- bzw. Tierreich sehr selten. Für die Untersuchung des Enantiomerenüberschusses von Salutaridin, der je nach Strauch und Jahreszeit zwischen 1 und 100% schwankt, wurde eine HPLC-Methode mit chiraler Säule (Chiralcel OD-R, 20:80 Acetonitril – 0.2 M Natriumperchlorat-Puffer pH 2) entwickelt.

Ein weiterer Inhaltsstoff ist das *N*-Demethylderivat Norsinoacutin (**5**). Diese Verbindung ist nur in Sträuchern zu finden, die enantiomerenreines Salutaridin (**3a**) und nicht das Enantiomerengemisch Salutarin (**3**) enthalten. Es liegt der Schluss nahe, dass diese Pflanzen ein Enzym besitzen, das selektiv und quantitativ das (*S*)-konfigurierte Sinoacutin *N*-demethylieren kann. Norsinoacutin, Salutaridin und Salutarin entstehen durch ortho-para-oxidative Kupplung der Biosynthesestufe Retikulin. In seltenen Fällen findet auch eine para-para-oxidative Kupplung statt und es entstehen in 2,3-Position disubstituierte Morphinandienone. Zu dieser Verbindungsklasse gehören *O*-Methylflavinantin (**4**) und Flavinantin (**6**), die sich nur in einer Hydroxy- bzw. Methoxygruppe in 3-Position unterscheiden.

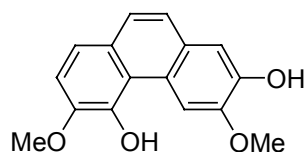
Aus einem der Sträucher wurde neben dem Hauptalkaloid Salutarin (**3**) auch dessen *N*-Oxid (**10**) isoliert. Diese Verbindung liegt ebenfalls als Enantiomerengemisch vor und lässt sich durch die entwickelte HPLC-Methode mit einer chiralen Säule auftrennen.





**Abb. 67:** Biosynthese und Struktur der monomeren Alkaloide

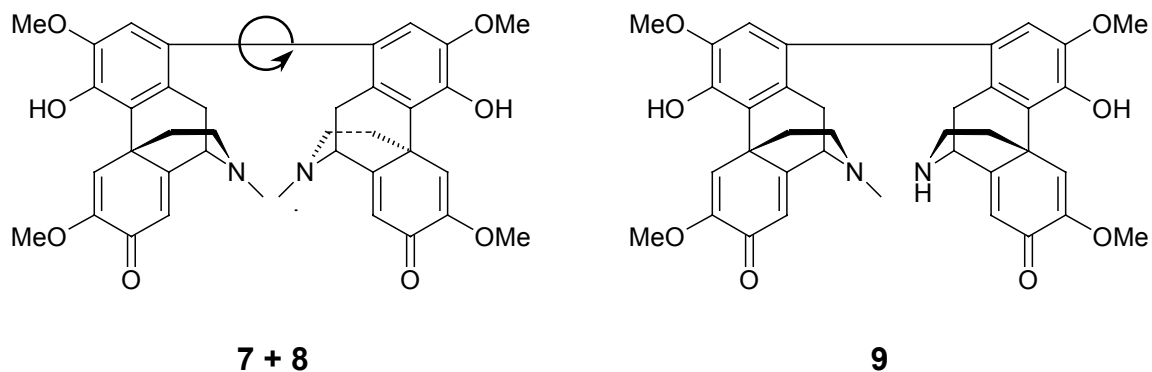
In diesem Strauch wurde außerdem ein neuer Naturstoff gefunden. Es gelang die Strukturaufklärung des Phenanthrens Crotoflavol (11). Dies ist der erste Bericht über das Vorkommen eines Phenanthrens in *Croton*-Spezies.



11

Darüber hinaus konnten drei weitere neue Naturstoffe isoliert und identifiziert werden. In einem der Sträucher liegen Morphinandienon-Dimere vor. Durch oxidative 1,1'-Kupplung von zwei Salutaridin-Molekülen entstehen die beiden Rotamere Saludimerin A und B (7 und 8), welche auf Grund der eingeschränkten Rotation

entlang der Biarylachse unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften aufweisen. Die absolute Konfiguration konnte durch aufwendige CD- und ROESY-Studien aufgeklärt werden. Das dritte Dimer Salsinodimerin (**9**) enthält eine Salutaridin- und eine Norsinoacutin-Einheit. Mit diesen drei Verbindungen konnten zum ersten Mal C-C-verknüpfte Morphinandienon-Dimere aus Pflanzen isoliert werden.



**Tab. 9:** Überblick über das Vorkommen der isolierten Verbindungen (die neuen Naturstoffe sind **fett** gedruckt) in den unterschiedlichen *Croton*-Sträuchern

Isolierte Substanzen	Strauch A	Strauch B+C	Strauch D	Strauch E
Scoulerin ( <b>1</b> )	+	?	?	+
Coreximim ( <b>2</b> )	+	?	?	+
Salutarin ( <b>3</b> )	+	-	+	-
Salutaridin ( <b>3a</b> )	-	+	-	+
O-Methylflavinantin ( <b>4</b> )	+	+	+	+
Norsinoacutin ( <b>5</b> )	-	+	-	+
Flavinantin ( <b>6</b> )	-	+	+	+
<b>Saludimerin A (7)</b>	-	-	-	<b>+</b>
<b>Saludimerin B (8)</b>	-	-	-	<b>+</b>
<b>Salsinodimerin (9)</b>	-	-	-	<b>+</b>
Salutarin-N-oxid ( <b>10</b> )	+	-	-	-
<b>Crotoflavol (11)</b>	<b>+</b>	-	-	-

Zum Strukturbeweis wurden Partialsynthesen durchgeführt. Dabei sind besonders die oxidativen Kupplungen zu den Dimeren hervorzuheben. Milde Oxidation von enantiomerenreinem Salutaridin (**3a**) mit Silbernitrat-Lösung in Ethanol lieferte Saludimerin A (**7**). Andererseits erhält man bei der Oxidation eines Gemisches aus Salutaridin und Norsinoacutin (**5**) mit Kaliumhexacyanoferrat(III) die dimeren Alkaloide Saludimerin B (**8**) und Salsinodimerin (**9**).

Aus dem Enantiomergemisch Salutarin (**3**) wurde mit Diazomethan der *O*-Methylether hergestellt, welcher das gleiche Molekulargewicht hat wie die isolierte Verbindung *O*-Methylflavinantin (**4**). Es konnte dadurch gezeigt werden, dass *O*-Methylflavinantin in 2,3-Position disubstituiert sein muss, wohingegen das synthetische *O*-Methylsalutarin in 3,4-Position die Methoxygruppen trägt.

Ebenfalls aus Salutarin wurde mit Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester das *N*-Norderivat zugänglich. Mittels chiraler HPLC-Methode konnte das Enantiomergemisch Norsalutaridin und Norsinoacutin aufgetrennt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die isolierte Verbindung **5** enantiomerenreines Norsinoacutin ist.

Aus den fünf untersuchten Sträuchern konnten sowohl (*R*)-konfiguriertes Salutaridin (**3a**) als auch das Enantiomergemisch Salutarin (**3**) isoliert werden. Mittels Razematspaltung über Kristallisation diastereomerer Salze konnte Salutaridin enantiomerenrein erhalten werden. Das (*S*)-konfigurierte Sinoacutin (**3b**) war dadurch aber nicht zugänglich. Daher wurde aus Norsinoacutin (**5**) durch *N*-Methylierung mit Formaldehyd und dem Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid das linksdrehende Enantiomer Sinoacutin synthetisiert.

Salutaridin ist eine wichtige Vorstufe bei der Biosynthese von Thebain, Codein und Morphin. Es wurden daher die Stereochemie, die Biosynthese und die pharmakologischen Eigenschaften dieser Substanz näher beleuchtet. Wie schon beschrieben, konnte sowohl enantiomerenreines Salutaridin (**3a**), als auch das Enantiomergemisch Salutarin (**3**) isoliert werden. Nur Salutaridin wird in Thebain, Codein und Morphin umgewandelt. Eine Zwischenstufe ist dabei Salutaridinol. Dieses wichtige Intermediat wurde partialsynthetisch aus Salutarin durch Reduktion der Dienon-Funktion zum Alkohol erhalten. Dabei entstehen zwei epimere Alkohole, die sich gut trennen lassen. Nur Salutaridinol und nicht 7-epi-Salutaridinol wird bei der Biosynthese weiter verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass in *Croton flavens* L. keiner dieser Alkohole vorliegt und damit das notwendige Enzymsystem für den Reduktionsschritt fehlen muss.

Es ist beschrieben, dass Salutarin (**3**) ein partieller Agonist am GABA/Benzodiazepinrezeptor-Komplex im Rattenhirn ist. Daher wurden die Substanzen Scoulerin (**1**), Coreximin (**2**), Salutarin (**3**), O-Methylflavinantin (**4**), Norsinoacutin (**5**) und Flavinantoin (**6**) auf ihre Fähigkeit untersucht, [<sup>3</sup>H]GABA Bindung am GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor zu inhibieren. Unsere Untersuchungen zeigen, dass alle Substanzen nur eine geringe Affinität an den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor besitzen. Salutarin (**3**) inhibiert nur schwach die spezifische [<sup>3</sup>H]GABA Bindung an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Dagegen zeigt das Tetrahydroprotoberberin Coreximin (**2**) eine deutliche Affinität zum GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 3.2 µM liegt die Hemmung der [<sup>3</sup>H]GABA Bindung im Bereich der potentesten Naturstoffe (+)-Bicucullin und (+)-Hydrastin.

## D. Experimenteller Teil

### 1 Herkunft des Drogenmaterials

Die untersuchten Pflanzen von *Croton flavens* L. wurden von Prof. Dr. M. H. Zenk, Biozentrum – Pharmazie, Universität Halle, und von Prof. Dr. J. Grau, Botanischer Garten München, auf Barbados gesammelt und identifiziert. Es wurden fünf verschiedene Pflanzen (Strauch A - E) im Gewächshaus des Departments für Pharmazie - Zentrum für Pharmaforschung kultiviert, deren Blätter jeweils untersucht wurden.

### 2 Allgemeine Angaben

Es wurden handelsübliche Lösungsmittel verwendet und durch Destillation gereinigt. Für die HPLC wurde gradient grade Qualität der Firma Merck bei den Lösungsmitteln verwendet. Wasser für die HPLC wurde durch Destillation von demineralisiertem Wasser gewonnen.

Schmelzpunkte: Die Schmelzpunkte wurden mit dem Büchi Schmelzpunktbestimmungsapparat B-540 ermittelt und sind nicht korrigiert.

Drehwinkel: Die Drehwinkel wurden mit dem Perkin-Elmer 241 Polarimeter bestimmt. Die Substanzkonzentration und das verwendete Lösungsmittel werden bei den jeweiligen Bestimmungen angegeben.

UV-Spektren: Die Spektren wurden mit dem UV/Vis - Spektrometer Jasco V - 530 aufgenommen. Als Lösungsmittel diente Methanol mit HPLC-Qualität.

IR-Spektren: Die Feststoffe wurden als Kaliumbromid-Presslinge mit dem Jasco FT-IR 410 vermessen.

CD-Spektren: Die Substanzen wurden in Methanol gelöst und mit dem ISA CD6 Spektrometer, sowie mit dem Jobin Yvon Model CD6 Spektrometer vermessen.

EI- und CI-Massenspektren: Die Spektren wurden mit dem Massenspektrometer Hewlett Packard 59827A mit folgenden Techniken aufgenommen: Elektronenstrahl-Ionisation (EI) bei 70 eV Anregungsenergie oder Chemische Ionisation (CI) mit Methan als Reaktandgas.

MS/MS-DI: Von den monomeren Alkaloiden wurden die Molmassen und das Zerfallsmuster durch Direkteinspritzung in das API 2000 ESI-MS/MS von Applied Biosystems bestimmt.

NMR-Spektren: Die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, DEPT-, APT-, HH-COSY-, NOE-, HMQC- und HMBC-Spektren wurden mit den Kernresonanzspektrometern Joel JNM-GX 400 und JNM-ECP 400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz), sowie Jeol JNM-ECP 500 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz) aufgenommen. Die ROESY-Experimente wurden am Bruker DMX 600 Kernresonanzspektrometer durchgeführt.

Die angegebenen Zahlenwerte beziehen sich auf die  $\delta$ -Skala mit Tetramethylsilan (TMS) als internen Standard ( $\delta = 0.00$  ppm). Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) werden in ppm, die Kopplungskonstanten ( $J$ ) in Hz angegeben. Als Lösungsmittel wurden  $\text{CDCl}_3$  und  $d_6$ -DMSO verwendet.

Dünnschichtchromatographie (DC): Benutzt wurden Fertigfolien Polygram SIL G/UV<sub>254</sub> (Schichtdicke 0.2 mm; Format 40 x 80 mm) der Firma Macherey-Nagel. Folgende Fließmittelsysteme wurden verwendet:

Fließmittel 1: Ethylacetat

Fließmittel 2: Ethylacetat / Methanol / Ammoniak 85:10:5

Fließmittel 3: Methanol / Ethylacetat / Ammoniak 85:10:5

Die Angegebenen  $R_f$ -Werte sind nur als Richtwerte zu verstehen, da sich bei ammoniakhaltigen Fließmitteln die  $R_f$ -Werte bereits nach einmaligem Öffnen der Chromatographiekammer verändern können.

Die Detektion erfolgte durch Betrachten unter der UV-Lampe (254 nm und 365 nm), sowie durch Besprühen mit geeigneten Reagenzien:

Reagenz 1: **Dragendorffs Reagenz** nach Munier und Macheboeuf:

0.85 g basisches Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst (Lösung A). 8 g Kaliumiodid werden in 30 ml Wasser gelöst (Lösung B). Die beiden Vorratslösungen werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

Reagenz 2: **Eisen(III)-chlorid-Reagenz**:

10 g Eisen(III)-chlorid werden in 100 ml Wasser gelöst.

Flash-Säulenchromatographie (FSC): Als Sorbens wurde Kieselgel 60, Korngröße 0,040-0,063 mm der Firma Merck verwendet. Die Fließmittelsysteme finden sich bei der Beschreibung der einzelnen Verbindungen. Bei den angegebenen Mischungsverhältnissen handelt es sich um Volumenanteile.

**Tab. 10:** Säulendimensionen, Beladung und Fraktionierung

Durchmesser	Kieselgel	Aufgetragene Substanzmenge	Volumengröße der Fraktionen
10 mm	ca. 8 g	bis ca. 30 mg	5 ml
20 mm	ca. 25 g	bis ca. 100 mg	10 ml
25 mm	ca. 40 g	bis ca. 200 mg	20 ml
35 mm	ca. 100 g	bis ca. 500 mg	20 ml
45 mm	ca. 200 g	bis ca. 1 g	50 ml
65 mm	ca. 350 g	bis ca. 3 g	70 ml
75 mm	ca. 500 g	bis ca. 5 g	70 ml

Analytische HPLC:

Gerät: Merck Lachrom, Interface D-7000, Pumpe L-7100, Autosampler L-7250, Säulenofen L-7350, Dioden Array Detektor L-7455, Lösungsmittelentgaser L-7612.

Software: HPLC-System Manager Version 3.1.1

**System 1** zur Alkaloidanalytik:

Säule: LiChroCART 250-4, LiChrospher 100, RP-18 (5 µm).

Fließmittel: Laufmittel A: dest. Wasser / Ammoniumcarbonat 2%  
 Laufmittel B: Methanol (LiChrosolv gradient grade, Firma Merck)  
 Laufmittel C: Acetonitril (LiChrosolv gradient grade, Firma Merck)

**Tab. 11:** Gradientensystem

Zeit	LM A	LM B	LM C
0,0	90	5	5
20,0	30	20	50
25,0	30	20	50
25,1	90	5	5

Flussrate: 1 ml/min

Temp.: 30 °C

Detektor: 277 nm

Laufzeit: 30 min

**System 2** zur Enantiomerentrennung:

Säule: Chiralcel OD-R

Fließmittel: 20/80 Acetonitril / 0.2 M Natriumperchlorat- Puffer pH 2

Flussrate: 0.5 ml/min

Temp.: 10 °C

Detektor: 277 nm

Laufzeit: 35 Minuten

HPLC-MS/MS: Die dimeren Morphinandienone ließen sich nicht mit dem Massenspektrometer Hewlett Packard 59827A vermessen. Daher wurden diese Spektren mit einem HPLC-MS/MS-Gerät aufgenommen: Agilent HP1100 HPLC-System gekoppelt mit Applied Biosystems API 2000 ESI-MS/MS.

Auch die Untersuchungen zur Spurenanalytik bei weiteren *Croton*-Pflanzen wurden an diesem Gerät durchgeführt:



**System 3** zur Spurenanalytik bei weiteren *Croton*-Pflanzen:

Säule: Waters XTerra MS C<sub>18</sub> 2.1x150 mm (3.5 µm).

Fließmittel: Laufmittel A: dest. Wasser / Ammoniumcarbonat 2%  
Laufmittel B: Methanol (LiChrosolv gradient grade, Firma Merck)  
Laufmittel C: Acetonitril (LiChrosolv gradient grade, Firma Merck)

**Tab. 12:** Gradientensystem

Zeit	LM A	LM B	LM C
0,0	90	5	5
20,0	30	20	50
25,0	30	20	50
25,1	90	5	5

Flussrate: 0.2 ml/min

Temp.: 25 °C

Detektion: ESI positive mode, Totalionenchromatogramm von 100 - 700  
Masseneinheiten

Laufzeit: 30 min

### 3 Isolierung der Inhaltsstoffe

#### 3.1 Phytochemische Untersuchungen des *Croton*-Strauches A

Es wurden mehrfach ca. 500 g frische Blätter des Strauches A gesammelt und die Inhaltsstoffe nach einem Standardverfahren extrahiert. Dazu wurden die Blätter portionsweise in einem Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren und zerkleinert. Die Bruchstücke wurden in einen 2000 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 1.5 l Methanol versetzt. Danach wurde das Gemisch mit einem Ultra-Turrax auf höchster Stufe 5 min homogenisiert. Die Suspension wurde in eine Soxhlett-Apparatur überführt und 2 Tage lang mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde einrotiert und man erhielt ca. 20 g Rohextrakt. Dieser wurde nach zwei Methoden weiterverarbeitet.

##### **Methode 1:**

Es wurden 1000 ml 5%ige Essigsäure zum Rohextrakt gegeben und dreimal mit je 500 ml Petrolether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden verworfen. Die Wasserphase wurde mit Natriumcarbonat auf pH 8 - 9 gebracht. Dann wurde viermal mit je 750 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Es wurden 4.86 Gramm Rohextrakt erhalten. Dieser wurde auf Kieselgel aufgezogen und mittels FSC fraktioniert (Ethylacetat / Ethanol 1:1). Es wurden dreißig 100 ml-Fractionen aufgefangen. Nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung wurden drei Hauptfraktionen (Kolben 3, Kolben 5-12 und Kolben 13-30) gebildet und zur Trockene eingedampft.

Der Rückstand der ersten Hauptfraktion wurde in wenig Methanol aufgenommen und kurz mit Ultraschall behandelt. Es blieb ein weißer unlöslicher Rest zurück, der abgetrennt wurde. Dieser Rückstand (7.6 mg) konnte als Coreximmin (**2**) identifiziert werden. Das Filtrat wurde mittels FSC (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 94:1:5 und Dichlormethan / Methanol 99:1) weiter aufgetrennt. Es konnten in der Reihenfolge ihrer Elution das noch nicht bekannte Phenanthren Crotoflavol (**11** / 4.7 mg) sowie die Tetrahydroprotoberberine Scoulerin (**1** / 14 mg) und Coreximmin (**2** / 20 mg) isoliert werden.

Die zweite Hauptfraktion bestand aus 3.2 g Salutarin (**3**), dem Enantiomeregemisch aus Salutaridin (**3a**) und Sinoacutin (**3b**).

Der Rückstand der dritten Hauptfraktion wurde in 250 ml 2N Natronlauge aufgenommen und dreimal mit je 250 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten

organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, einrotiert und man erhielt das Morphinandienon O-Methylflavinantin (**4** / 4 mg). Die wässrige Phase wurde mit 2N Salzsäure neutralisiert, mit Natriumcarbonat auf pH 8 - 9 gebracht und dreimal mit je 500 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und man erhielt noch einmal 41 mg des Morphinandienons Salutarin (**3**).

### **Methode 2:**

Der Rohextrakt (20 g) aus einem zweiten Ansatz wurde mit 100 ml Ethylacetat versetzt und im Ultraschallbad behandelt. Die löslichen Bestandteile wurden einer FSC mit Gradientensystem unterworfen und in 100 ml Fraktionen eingeteilt. Eluiert wurde mit: 1.5 l Ethylacetat, 2 l Ethylacetat / Ethyldimethylamin 95:5, 1 l Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 70:35:5, 1 l Methanol / Ethyldimethylamin 95:5 und 1 l Methanol. Die Fraktionen, die durch Spülen mit Ethylacetat erhalten wurden, enthielten nicht wie erwartet das Phenanthren Crotoflavol. Die Fraktionen 17 bis 56 enthielten die schon bekannten Substanzen Scoulerin (**1**), Coreximin (**2**), Salutarin (**3**) und O-Methylflavinantin (**4**). Die Fraktionen 57 - 62 wurden vereinigt und noch einmal mittels FSC (Methanol) gereinigt. Es wurde das Morphinandienon Salutarin-N-Oxid (**10** / 22 mg) isoliert.

Sowohl Salutarin als auch Salutarin-N-Oxid sind Enantiomeregemische. Dies wurde durch die Untersuchung des Drehwinkels bzw. mittels chiraler HPLC-Methode nachgewiesen (siehe Kapitel C.5.3).

### 3.2 Inhaltsstoff-Screening der *Croton*-Sträucher B - D

Aufgrund der Größe dieser *Croton*-Sträucher stand nur wenig Pflanzenmaterial zur Verfügung. Zwischen 20 und 25 g frische Blätter wurden mit jeweils 400 ml Methanol versetzt und mit einem Ultra-Turrax 5 Minuten zerkleinert. Bei Raumtemperatur wurden die Ansätze einen Tag lang gerührt und die Blätter extrahiert. Es wurde abfiltriert und das Extraktionsmittel abgedampft. Aus Strauch B wurden 1.6 g Rohextrakt erhalten, aus Strauch C 2.2 g und aus Strauch D 1 g. Die Rohextrakte wurden mit jeweils 100 ml 5%iger Essigsäure versetzt und dreimal mit je 100 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden nach DC-Überprüfung verworfen. Die wässrigen Phasen wurden mit Natriumcarbonat auf pH 9 gebracht und dreimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen der drei Ansätze wurden jeweils mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Aus Strauch B wurden auf diese Art 125 mg Alkaloidgemisch gewonnen. Mittels FSC (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 80:5:5) wurden daraus die Alkaloide Salutaridin (**3a**), O-Methylflavinantin (**4**), Norsinoacutin (**5**) und Flavinantin (**6**) isoliert. Das Alkaloidgemisch aus Strauch C (144 mg) enthielt die gleichen Verbindungen wie Strauch B. Der Extrakt aus Strauch D (197 mg) wurde ebenfalls mittels FSC (Dichlormethan / Methanol 95:5) aufgereinigt und enthielt die Alkaloide Salutarin (**3**), O-Methylflavinantin (**4**) und Flavinantin (**6**).

### 3.3 Phytochemische Untersuchungen des *Croton*-Strauches E

Ein weiterer Strauch starb aufgrund von Wurzelfäule ab, und es wurden alle Blätter abgeerntet. Insgesamt 885 Gramm frische Blätter wurden portionsweise in einem Dewar mit flüssigem Stickstoff eingefroren und zerkleinert. Der Extrakt wurde wie oben beschrieben (D 3.1) hergestellt. Es wurden 3.3 Gramm Rohextrakt erhalten. Die gesamte Menge wurde mittels FSC fraktioniert. Als Laufmittel wurde ein Gradient verwendet: 1 l Dichlormethan / Methanol 99:1, 1 l Dichlormethan / Methanol 98:2, 1 l Dichlormethan / Methanol 97:3, 1 l Dichlormethan / Methanol 95:5, 1 l Dichlormethan / Methanol 90:10, 1 l Dichlormethan / Methanol 50:50, 1 l Methanol. Es wurden 76 Fraktionen (mit jeweils 70 ml) gebildet und nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung in folgende Hauptfraktionen eingeteilt:

Hauptfraktionen	Fraktionen	Mengen (mg)
X	71 - 76	230
IX	67 - 70	284
VIII	61 - 66	149
VII	53 - 60	320
VI	52	28
V	43 - 51	270
IV	31 - 42	950
III	28 - 30	213
II	22 - 27	113
I	19 - 21	100

Die einzelnen Hauptfraktionen wurden weiter aufgereinigt:

Die Hauptfraktion X wurde einer FSC unterworfen (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 80:15:5). Die Fraktionen 12 -17 (132 mg, A) sowie 18 - 34 (90 mg, B) wurden jeweils vereinigt. A wurde erneut mittels FSC aufgereinigt (Dichlormethan / Methanol 80:20). Die Fraktionen 19 - 21 enthielten das noch unbekannte Saludimerin B (**8** / 30 mg). Aus den Fraktionen 24 - 29 konnte das ebenfalls nicht bekannte Salsinodimerin (**9** / 23 mg) isoliert werden. Die Fraktionen 22 und 23 enthielten beide Substanzen (42 mg) und wurden daher noch einmal wie A chromatographiert. Die Fraktionen 11 und 12 enthielten Saludimerin B (**8** / 24 mg) und die Fraktionen 13 - 19 Salsinodimerin (**9** / 17 mg). Die Fraktionen, die **8** enthielten, und die Fraktionen, die **9** enthielten, wurden vereinigt und jeweils erneut mittels FSC aufgereinigt (Dichlormethan / Methanol 80:20). Es wurden 41 mg reines **8** und 32 mg sauberes **9** gewonnen.

Die Hauptfraktion IX wurde mittels FSC (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 85:10:5) weiter fraktioniert. Die Fraktionen 10 - 16 enthielten Norsinoacutin (**5** / 39 mg). Die Fraktionen 19 - 26 das Dimer Saludimerin A (**7** / 90 mg).

Die Hauptfraktion VIII wurde chromatographiert (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 85:10:5). Die Fraktionen 8 - 14 enthielten Norsinoacutin (**5** / 96 mg) und die Fraktionen 15 - 28 Saludimerin A (**7** / 45 mg). Die beiden Fraktionen, die **7** enthielten, wurden vereinigt und erneut mittels FSC aufgereinigt (Dichlormethan / Methanol 90:10). Es wurden 93 mg reines **7** isoliert.

Die beiden Fraktionen, die Norsinoacutin (**5**) enthielten, und die Hauptfraktion VII wurden vereinigt und zusammen mittels FSC aufgereinigt (Dichlormethan / Methanol 95:5). Es wurden 393 mg sauberes Norsinoacutin (**5**) isoliert.

Hauptfraktion VI, die Norsinoacutin (**5**) und Flavinantin (**6**) enthielt, wurde nicht weiter aufgereinigt und wurde als Referenz für HPLC-Versuche verwendet.

Die Hauptfraktion V wurde mittels FSC (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 91:4:5) aufgereinigt. Die Fraktionen 9 - 10 enthielten Salutaridin (**3a** / 26 mg), die Fraktionen 11 - 15 Salutaridin und O-Methylflavinantin (**3a** + **4** / 26 mg) und die Fraktionen 17 - 30 Flavinantin (**6** / 205 mg).

Die Fraktionen 11 bis 15 wurden mit Hauptfraktion IV vereinigt und eingedampft. Es wurden 100 ml 2N Natronlauge zugegeben und viermal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden abgetrennt (C). Die wässrige Phase wurde mit konzentrierter HCl auf pH 8 - 9 gebracht und dreimal mit 150 ml

Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden abgetrennt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft (450 mg). Der Rückstand wurde mittels FSC (Dichlormethan/Methanol 90:10) gereinigt und man erhielt 405 mg reines Salutaridin (**3a**). Zusammen mit Fraktionen 9 und 10 aus Hauptfraktion V konnten 431 mg Salutaridin (**3a**) isoliert werden.

Die organischen Phasen (C) wurden einmal mit destilliertem Wasser ausgeschüttelt und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Ganze wurde mit Hauptfraktion III vereinigt und eingedampft (598 mg). Nach Reinigung durch FSC (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 93:2:5) erhielt man 464 mg reines O-Methylflavanitin (**4**).

Die Hauptfraktion II wurde mittels FSC (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 94:1:5) gereinigt und man erhielt 58 mg reines Coreximin (**2**).

Die Hauptfraktion I wurde mehrfach chromatographiert (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 94:1:5 und Dichlormethan / Methanol 99:1) und es wurden 18 mg sauberes Scoulerin (**1**) erhalten.

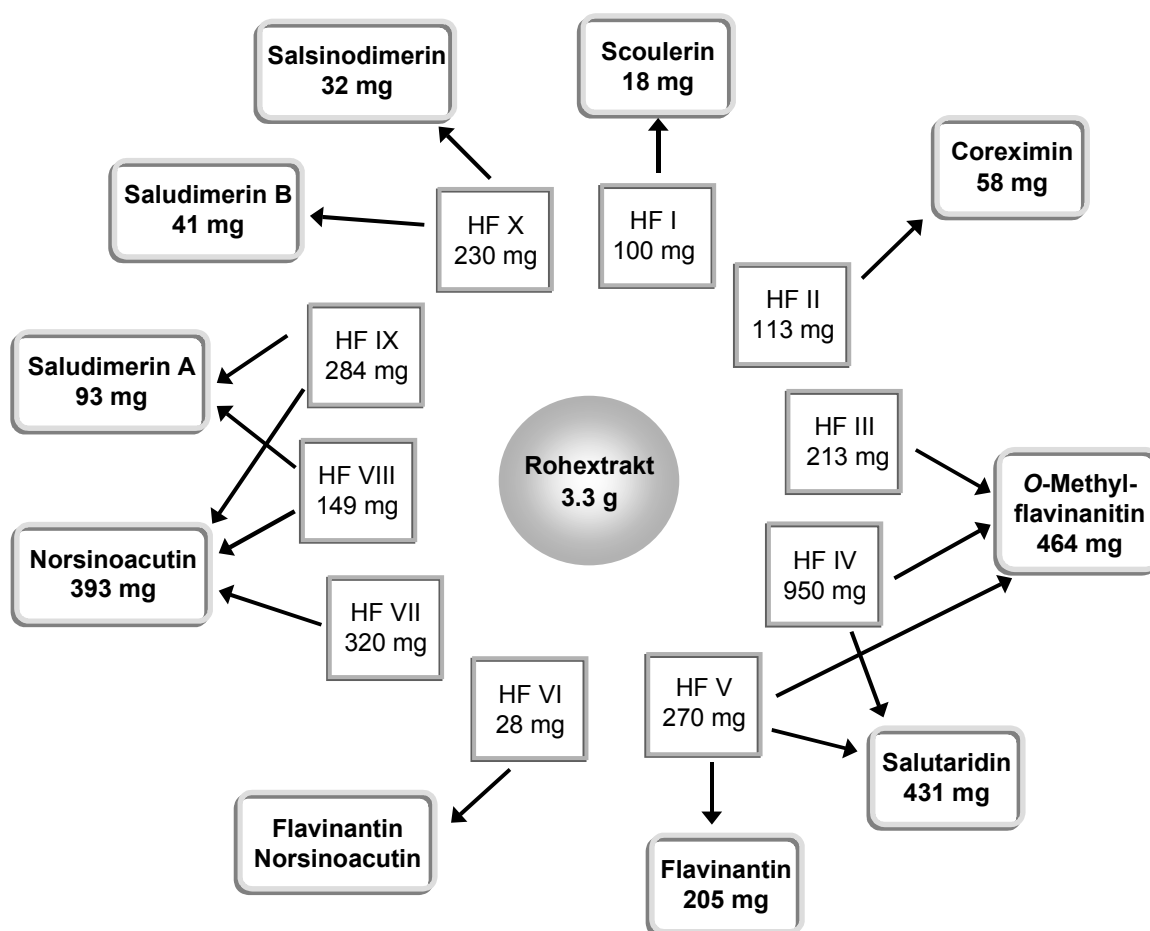


Abb. 68: Inhaltsstoffe aus Strauch E

## 4 Spurenanalytik bei weiteren *Croton*-Pflanzen

Blattbruchstücke von 40 verschiedenen *Croton*-Pflanzen wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 25 ml Methanol versetzt. Die Blätter wurden mit einem Ultra-Turrax zerkleinert, 24 Stunden durch Schütteln bei Raumtemperatur extrahiert und abfiltriert. Das Filtrat wurde dünnschichtchromatographisch mit dem Laufmittelsystem 1 auf Alkaloide untersucht. Anschließend wurde der Extrakt am Rotationsverdampfer eingeeengt und einer Festphasenextraktion (SPE) unterzogen.

SPE-System:

1. SPE-Kartusche (Fa. Separtis: Isolute Si-60, 25 mg, 1 ml) mit 2 ml Ethylacetat spülen.
2. Trockenextrakt in 0.5 ml Ethylacetat aufnehmen, zwei Minuten in das Ultraschallbad stellen und auftragen.
3. Kolben mit 0.5 ml Ethylacetat nachspülen und auftragen.
4. SPE-Kartusche mit 0.5 ml Ethylacetat spülen.
5. Die Alkaloide mit 1 ml Ethylacetat / EDMA 95:5 eluieren.  
→ Das Eluat wird in einem 5 ml Kolben gesammelt (= Alkaloidfraktion).
6. Mit 1 ml Methanol Kartusche vollständig waschen.

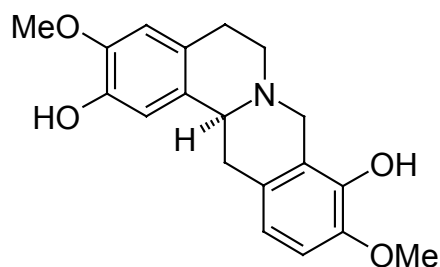
Die Alkaloidfraktion wurde zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in ein HPLC-Vial überführt, indem der Kolben zweimal mit je 150  $\mu$ l Dichlormethan gespült wurde. Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff abgeblasen. Der Rückstand wurde in 30  $\mu$ l Methanol aufgenommen. Davon wurden 3  $\mu$ l direkt in das API 2000 ESI-MS/MS von Applied Biosystems eingespritzt und die Molmassen der isolierten Alkaloide bestimmt. Anschließend wurden 5  $\mu$ l in das HPLC-MS/MS-Gerät injiziert und mit der Methode zur Spurenanalytik bei weiteren *Croton*-Pflanzen (siehe Kapitel D.2) untersucht. Molmassen, Zerfallsmuster im MS/MS und Retentionszeiten von Scoulerin (**1**), Coreximmin (**2**), Salutarin (**3**), *O*-Methylflavinantin (**4**), Norsinoacutin (**5**) und Flavinantin (**6**) wurden bestimmt und mit denen der isolierten Verbindungen verglichen. Anhand dieser drei Parameter wurden einzelne Alkaloide aus den 40 *Croton*-Pflanzen identifiziert.

## 5 Physikalische Daten der isolierten Verbindungen

### 5.1 Protoberberine

#### 5.1.1 Scoulerin

(-)-(S)-2,9-Dihydroxy-3,10-dimethoxytetrahydroprotoberberin (**1**)

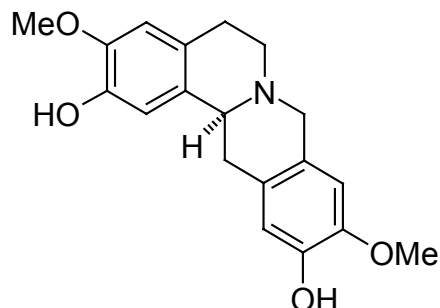


Aussehen:	weißes Pulver
Summenformel:	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>
Schmelzpunkt:	198 - 200 °C (Lit. <sup>27</sup> : 204 °C).
Drehwinkel:	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> = - 346° (c = 0.1, MeOH; Lit. <sup>24</sup> : [α] <sub>D</sub> <sup>21</sup> = - 355°, c = 0.2, MeOH).
R <sub>f</sub> -Wert:	0.90 (LM 2).
UV:	λ <sub>max</sub> [nm (ε)] = 284 (3.79).
IR:	ν <sub>max</sub> (cm <sup>-1</sup> ) = 3418, 2933, 2837, 1672, 1620, 1592, 1512, 1498.
EI-MS:	m/z (%) = 327 [M <sup>+</sup> ] (100), 178 (92), 150 (36).
HR-MS:	m/z = 327.1537 (berechnet für C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> : 327.1471).
<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ):	δ (ppm) = 2.61 - 2.68 (m, 2 H, H-5a + H-6a), 2.81 (dd, J = 15.8 Hz, J = 11.3 Hz, 1 H, H-13a); 3.12 - 3.27 (m, 3 H, H-5b, H-6b + 13b); 3.49 - 3.56 (m, 2 H, H-14 + H-8a); 3.87 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ); 3.88 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ); 4.23 (d, J = 15.6 Hz, 1 H, H-8b); 6.60 (s, 1 H, H-4); 6.67 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, H-12); 6.73 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, H-11); 6.83 (s, 1 H, H-1).
<sup>13</sup> C-NMR (CDCl <sub>3</sub> ):	δ (ppm) = 29.2 (C-5); 36.3 (C-13); 51.5 (C-6); 53.5 (C-8); 55.9 (C-3- + C-10-OCH <sub>3</sub> ); 56.1 (C-3- + C-10-OCH <sub>3</sub> ); 59.2 (C-14); 108.9 (C-11); 110.6 (C-4); 111.3 (C-1); 119.3 (C-12); 121.2 (C-8a); 126.1 (C-4a); 128.1 (C-12a); 130.6 (C-14a); 141.4 (C-9); 143.9 (C-2 + C-10); 145.0 (C-3).



5.1.2 Coreximin

(-)-(S)-2,11-Dihydroxy-3,10-dimethoxytetrahydroprotoberberin (2)



Aussehen: weißes Pulver

Summenformel:  $C_{19}H_{21}NO_4$

Schmelzpunkt: 248 - 250 °C (Lit.<sup>27</sup>: 254 - 256 °C).

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = -123^\circ$  (c = 0.6, MeOH; Lit.<sup>28</sup>:  $[\alpha]_D^{25} = -128^\circ$ , c = 0.25, MeOH).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.85 (LM 2).

UV:  $\lambda_{max}$  [nm (ε)] = 288 (3.95).

IR:  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3475, 2963, 2934, 2889, 2795, 2585, 1730, 1611, 1537, 1444.

EI-MS: m/z (%) = 327 [M<sup>+</sup>] (78), 178 (100), 150 (72).

CI-MS: m/z (%) = 328 [M<sup>+</sup> + 1] (100).

HR-MS: m/z = 327.1530 (berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>: 327.1471).

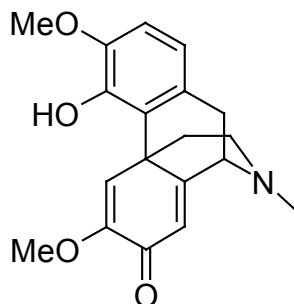
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO):  $\delta$  (ppm) = 2.41 (m, 1 H, H-6a); 2.47 (m, 1 H, H-13a), 2.72 (d, J = 15.7 Hz, 1 H, H-5a); 2.89 (m, 1 H, H-5b); 3.02 (dd, J = 9.5 Hz, J = 5.4 Hz, 1 H, H-6b); 3.09 (dd, J = 16 Hz, J = 3.7 Hz, 1 H, H-13b); 3.34 (m, 1 H, H-14); 3.44 (d, J = 14.5 Hz, 1 H, H-8a); 3.72 (s, 3 H, C-9-OCH<sub>3</sub>); 3.74 (s, 3 H, C-3-OCH<sub>3</sub>); 3.81 (d, J = 14.5 Hz, 1 H, H-8b); 6.55 (s, 1 H, H-12); 6.61 (s, 1 H, H-9); 6.63 (s, 1 H, H-4); 6.69 (s, 1 H, H-1); 8.66 (br, 1 H, OH); 8.69 (br, 1 H, OH).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO):  $\delta$  (ppm) = 28.4 (C-5); 35.6 (C-13); 51.0 (C-6); 55.4 (C-3- + C-10-OCH<sub>3</sub>); 55.6 (C-3- + C-10-OCH<sub>3</sub>); 57.6 (C-8); 59.0 (C-14); 109.6 (C-9); 111.7 (C-4); 112.3 (C-1); 115.1 (C-12); 124.6 (C-4a); 124.8 (C-8a); 126.3 (C-12a); 130.0 (C-14a); 144.5 (C-2/11); 144.6 (C-2/11); 145.8 (C-3 + C-10).

## 5.2 Morphinandienone

### 5.2.1 Salutarin

#### 4-Hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon (**3**)



Aussehen: weißes Pulver

Summenformel:  $C_{19}H_{21}NO_4$

Schmelzpunkt: 206 - 208 °C (Lit.<sup>27</sup>: 222 - 224 °C).

$R_f$ -Wert: 0.55 (LM 2).

UV:  $\lambda_{max}$  [nm ( $\epsilon$ )] = 241 (4.30); 280 (3.79).

IR:  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3450, 3004, 2946, 2840, 1673, 1643, 1614, 1584.

EI-MS:  $m/z$  (%) = 327 [ $M^+$ ] (100), 312 (70), 299 (22), 284 (26).

CI-MS:  $m/z$  (%) = 328 [ $M^+ + 1$ ] (100).

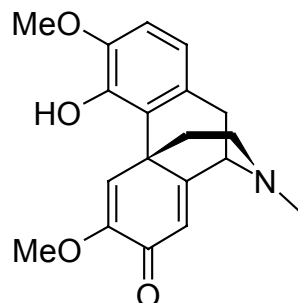
HR-MS:  $m/z$  = 327.1515 (berechnet für  $C_{19}H_{21}NO_4$ : 327.1471).

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.77 (m, 1 H, H-15a); 2.39 (m, 1 H, H-15b); 2.44 (s, 3 H,  $NCH_3$ ); 2.49 (dd,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 3.1$  Hz, 1 H, H-16a); 2.61 (dd,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 3.0$  Hz, H-16b); 2.97 (dd,  $J = 17.6$  Hz,  $J = 5.6$  Hz, 1 H, H-10a); 3.34 (d,  $J = 17.6$  Hz, 1 H, H-10b); 3.69 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1 H, H-9); 3.74 (s, 3 H, C-6- $OCH_3$ ); 3.86 (s, 3 H, C-3- $OCH_3$ ); 6.32 (s, 1 H, H-8); 6.65 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H, H-1); 6.74 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H, H-2); 7.60 (s, 1 H, H-5).

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 32.6 (C-10); 37.7 (C-15); 41.6 ( $NCH_3$ ); 43.7 (C-13); 47.0 (C-16); 54.8 (C-6- $OCH_3$ ); 56.3 (C-3- $OCH_3$ ); 61.1 (C-9); 109.6 (C-2); 118.7 (C-1); 120.7 (C-5); 122.1 (C-8); 124.0 (C-12); 129.6 (C-11); 143.5 (C-4); 145.5 (C-3); 150.9 (C-6); 161.8 (C-14); 181.4 (C-7).

5.2.2 Salutaridin

(+)-(R)-4-Hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon (**3a**)



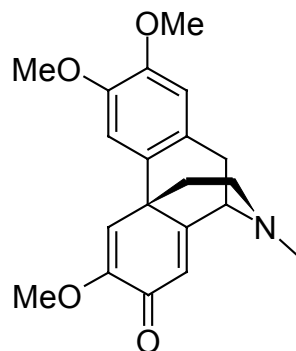
Die spektralen Daten stimmen voll mit denen von Salutaridin (**3**) überein. Die Substanz unterscheidet sich in folgenden Eigenschaften:

Schmelzpunkt: 195 - 197 °C (Lit.<sup>27</sup>: 197 - 198 °C).

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = +111^\circ$  (c = 2.4, MeOH; Lit.<sup>95</sup>:  $[\alpha]_D = +108^\circ \pm 8^\circ$ , c = 0.34, EtOH).

5.2.3 O-Methylflavinantin

(-)-(R)-2,3,6-Trimethoxymorphinandienon (**4**)



Aussehen: weißes Pulver

Summenformel:  $C_{20}H_{23}NO_4$

Schmelzpunkt: 109 - 111 °C (Lit.<sup>27</sup>: 112 - 113 °C).

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$  (c = 0.2, Chloroform; Lit.<sup>41</sup>:  $[\alpha]_D^{24} = -13^\circ$ , Chloroform).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.5 (LM 2).

UV:  $\lambda_{max}$  [nm (ε)] = 238 (4.17); 283 (3.80).

IR:  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3593, 3486, 3002, 2930, 2.836, 2766, 1727, 1664, 1635, 1615, 1517.

EI-MS: m/z (%) = 341 [M<sup>+</sup>] (100), 326 (42), 313 (23), 298 (40).

CI-MS: m/z (%) = 342 [M<sup>+</sup> + 1] (100).

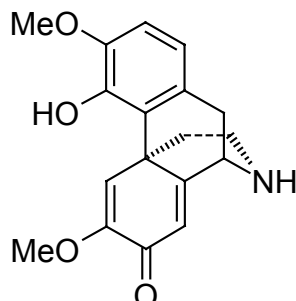
HR-MS: m/z = 341.1617 (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>: 341.1627).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.85 (m, 1 H, H-15a); 1.95 (m, 1 H, H-15b); 2.47 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>); 2.49 - 2.63 (m, 2 H, H-16a+b); 3.04 (dd, J = 17.8 Hz, J = 6.1 Hz, 1 H, H-10a); 3.35 (d, J = 17.8 Hz, 1 H, H-10b); 3.69 (d, J = 6.1 Hz, 1 H, H-9); 3.81 (s, 3 H, C-6-OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3 H, C-2-OCH<sub>3</sub>); 3.89 (s, 3 H, C-3-OCH<sub>3</sub>); 6.32 (s, 1 H, H-8); 6.37 (s, 1 H, H-5); 6.63 (s, 1 H, H-1); 6.82 (s, 1 H, H-4).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 32.7 (C-10); 41.3 (C-15); 41.8 (NCH<sub>3</sub>); 42.3 (C-13); 45.8 (C-16); 55.2 (C-6-OCH<sub>3</sub>); 56.0 (C-2/3-OCH<sub>3</sub>); 56.4 (C-2/3-OCH<sub>3</sub>); 60.9 (C-9); 108.8 (C-4); 110.5 (C-1); 118.9 (C-5); 122.2 (C-8); 128.9 (C-11); 130.1 (C-12); 148.1 (C-2/3); 148.4 (C-2/3); 151.5 (C-6); 161.8 (C-14); 181.0 (C-7).

5.2.4 Norsinoacutin

(-)-(R)-N-Nor-4-hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon (**5**)



Aussehen: weißes Pulver

Summenformel:  $C_{18}H_{19}NO_4$

Schmelzpunkt: 119 - 121 °C (Lit.<sup>27</sup>: 113 - 115 °C).

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = -91^\circ$  (c = 6.7, MeOH; Lit<sup>13</sup>:  $[\alpha]_D^{16} = -107^\circ$ , EtOH).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.45 (LM 2).

UV:  $\lambda_{max}$  [nm (ε)] = 241 (4.25); 279 (3.85).

IR:  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3303, 2940, 2839, 1666, 1638, 1614, 1483.

EI-MS: m/z (%) = 313 [M<sup>+</sup>] (56), 298 (25), 285 (100), 270 (30).

CI-MS: m/z (%) = 314 [M<sup>+</sup> + 1] (100).

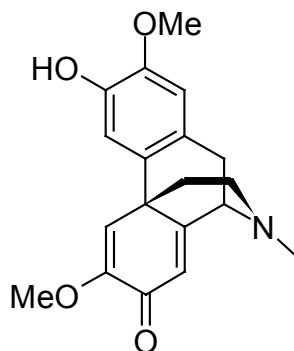
HR-MS: m/z = 313.1392 (berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>: 313.1314).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.57 (m, 1 H, H-15a); 2.52 (d, J = 12.6 Hz, 1 H, H-15b); 2.71 - 2.87 (m, 2 H, H-16a + 16b); 3.14 (d, J = 17.3 Hz, 1 H, H-10a); 3.34 (dd, J = 17.3 Hz, J = 6.0 Hz, 1 H, H-10b); 3.73 (s, 3 H, C-6-OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3 H, C-3-OCH<sub>3</sub>); 3.91 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, H-9); 6.27 (s, 1 H, H-8); 6.65 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-1); 6.75 (s, J = 8.4 Hz, 1 H, H-2); 7.60 (s, 1 H, H-5).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 39.0 (C-10); 39.6 (C-16); 43.0 (C-15); 44.3 (C-13); 54.4 (C-9); 54.8 (C-6-OCH<sub>3</sub>); 56.3 (C-3-OCH<sub>3</sub>); 109.6 (C-2); 118.8 (C-1); 120.5 (C-8); 121.1 (C-5); 123.8 (C-12); 129.9 (C-11); 143.5 (C-4); 145.5 (C-3); 150.9 (C-6); 164.1 (C-14); 181.6 (C-7).

5.2.5 Flavinantin

(+)-(R)-3-Hydroxy-2,6-dimethoxymorphinandienon (**6**)



Aussehen: weißes Pulver

Summenformel:  $C_{19}H_{21}NO_4$

Schmelzpunkt: 128 - 130 °C (Lit.<sup>27</sup>: 130 - 132 °C).

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = -20.6^\circ$  (c = 6.7, MeOH; Lit.<sup>75</sup>:  $[\alpha] = -14.5^\circ$ , c = 1.1, EtOH).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.5 (LM 2).

UV:  $\lambda_{\max}$  [nm (ε)] = 239 (4.22); 286 (3.90).

IR:  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3399, 2938, 2842, 1664, 1634, 1622, 1512.

EI-MS: m/z (%) = 327 [M<sup>+</sup>] (100), 312 (44), 299 (42), 284 (66).

CI-MS: m/z (%) = 328 [M<sup>+</sup> + 1] (100).

HR-MS: m/z = 327.1529 (berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>: 327.1471).

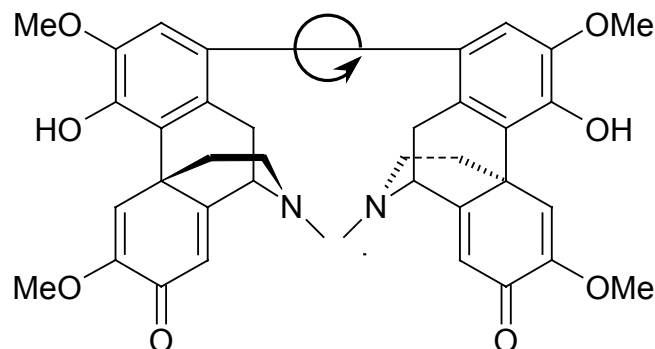
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.83 (d, J = 10.7 Hz, 1 H, H-15a); 1.92 (m, 1 H, H-15b); 2.46 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>); 2.53 - 2.63 (m, 2 H, H-16a+b); 3.04 (dd, J = 17.6 Hz, J = 6.1 Hz, 1 H, H-10a); 3.34 (d, J = 17.6 Hz, 1 H, H-10b); 3.69 (d, J = 6.1 Hz, 1 H, H-9); 3.79 (s, 3 H, C-6-OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3 H, C-2-OCH<sub>3</sub>); 6.32 (s, 1 H, H-8); 6.35 (s, 1 H, H-5); 6.61 (s, 1 H, H-1); 6.92 (s, 1 H, H-4).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 32.8 (C-10); 41.3 (C-15); 41.8 (NCH<sub>3</sub>); 42.3 (C-13); 45.8 (C-16); 55.1 (C-6-OCH<sub>3</sub>); 56.0 (C-2-OCH<sub>3</sub>); 61.0 (C-9); 109.8 (C-4); 111.4 (C-1); 119.2 (C-5); 122.3 (C-8); 127.7 (C-11); 130.8 (C-12); 144.7 (C-3); 145.9 (C-2); 151.4 (C-6); 161.7 (C-14); 181.1 (C-7).

### 5.3 Dimere der Morphinandienone

#### 5.3.1 Saludimerin A

(*P*)-1,1'-Bi-(+)-(*R*)-4-Hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienonyl (7)



Aussehen: weißes Pulver

Summenformel:  $C_{38}H_{40}N_2O_8$

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 220 °C.

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = -219^\circ$  (c = 1.7 mg, MeOH).

R<sub>F</sub>-Wert: 0.45 (LM 2).

UV:  $\lambda_{\max}$  [nm (ε)] = 241 (4.56); 283 (4.08).

IR:  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3423, 2935, 2843, 1670, 1642, 1618, 1470, 1439.

LC-MS: m/z (%) = 653 [M<sup>+</sup> + 1] (100).

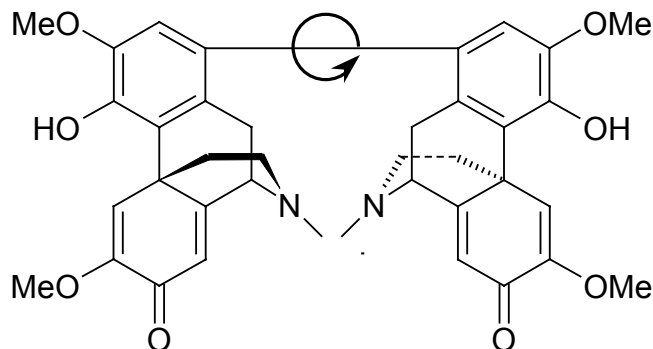
HR-MS: m/z = 652.2759 (berechnet für  $C_{38}H_{40}N_2O_8$ : 652.2785).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.78 (m, 1 H, H-15a); 2.26 (m, 1 H, H-10a); 2.29 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>); 2.41 - 2.51 (m, 2 H, H-15b + H-16a); 2.62 (dd, J = 12.1 Hz, J = 4.0 Hz, 1 H, H-16b); 2.84 (d, J = 18.3 Hz, 1 H, H-10b); 3.57 (d, J = 5.1 Hz, 1 H, H-9); 3.78 (s, 3 H, C-6-OCH<sub>3</sub>); 3.91 (s, 3 H, C-3-OCH<sub>3</sub>); 6.26 (s, 5/6 H, C-4 OH); 6.30 (s, 1 H, H-8); 6.59 (s, 1 H, H-2); 7.56 (s, 1 H, H-5).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 31.1 (C-10); 37.6 (C-15); 41.7 (NCH<sub>3</sub>); 43.9 (C-13); 47.3 (C-16); 54.9 (C-6-OCH<sub>3</sub>); 56.4 (C-3-OCH<sub>3</sub>); 60.6 (C-9); 110.1 (C-2); 120.3 (C-5); 122.1 (C-8); 124.6 (C-12); 127.8 (C-11); 131.6 (C-1); 142.8 (C-4); 145.6 (C-3); 151.1 (C-6); 161.5 (C-14); 181.5 (C-7).

5.3.2 Saludimerin B

(*M*)-1,1'-Bi-(+)-(*R*)-4-Hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienonyl (**8**)



Aussehen: weißes Pulver

Summenformel:  $C_{38}H_{40}N_2O_8$

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 225 °C.

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = -154^\circ$  (c = 1.4 mg, MeOH).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.40 (LM 2).

UV:  $\lambda_{\max}$  [nm (ε)] = 244 (4.54); 283 (4.07).

IR:  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3434, 2938, 2840, 1668, 1638, 1611, 1471.

LC-MS: m/z (%) = 653 [M<sup>+</sup> + 1] (100).

HR-MS: m/z = 652.2781 (berechnet für  $C_{38}H_{40}N_2O_8$ : 652.2785).

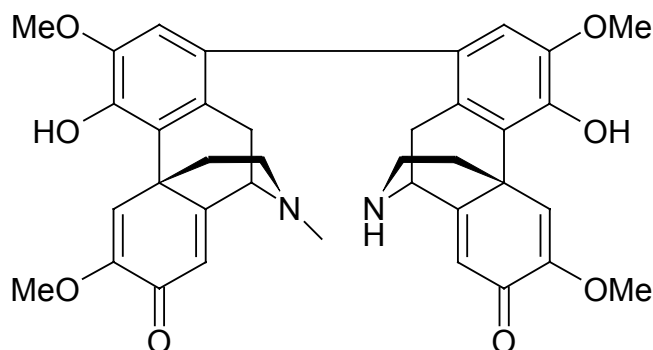
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.74 - 1.81 (m, 1 H, H-15a); 2.33 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>); 2.37 (d, J = 12.6 Hz, 1 H, H-15b); 2.52 - 2.61 (m, 2 H, H-16); 2.65-2.67 (m, 2 H, H-10); 3.51 (d, J = 2.9 Hz, 1 H, H-9); 3.70 (s, 3 H, C-6-OCH<sub>3</sub>); 3.77 (s, 3 H, C-3-OCH<sub>3</sub>); 6.24 (s, 1 H, H-8); 6.44 (s, 1 H, H-2); 7.53 (s, 1 H, H-5).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 33.0 (C-10); 37.5 (C-15); 42.0 (NCH<sub>3</sub>); 44.0 (C-13); 47.1 (C-16); 55.0 (C-6-OCH<sub>3</sub>); 56.4 (C-3-OCH<sub>3</sub>); 61.0 (C-9); 111.1 (C-2); 120.5 (C-5); 122.4 (C-8); 124.7 (C-12); 127.1 (C-11); 131.1 (C-1); 142.8 (C-4); 145.6 (C-3); 151.1 (C-6); 161.3 (C-14); 181.5 (C-7).



5.3.3 Salsinodimerin

1-[-](*R*)-*N*-Nor-4-hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon-1'-yl]-(+)-(*R*)-4-hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon (**9**)



Aussehen: amorpher Film

Summenformel:  $C_{37}H_{38}N_2O_8$

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = +11.8^\circ$  ( $c = 1.7$  mg, MeOH).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.35 (LM 2).

UV:  $\lambda_{max}$  [nm ( $\epsilon$ )] = 243 (4.51); 283 (4.05).

IR:  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3432, 2939, 2847, 1666, 1637, 1615, 1471, 1440.

LC-MS:  $m/z$  (%) = 639 [ $M^+ + 1$ ] (100).

HR-MS:  $m/z = 638.2608$  (berechnet für  $C_{37}H_{38}N_2O_8$ : 638.2628).

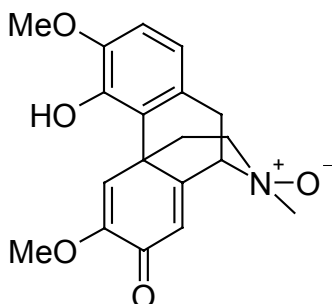
$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.62 (dt,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 4.6$  Hz, 1 H, H-15a'); 1.79 (dt,  $J = 12.4$  Hz,  $J = 4.7$  Hz, 1 H, H-15a); 2.33 - 2.49 (m, 6 H, H-10a, H-10a', H-15b +  $NCH_3$ ); 2.53 - 2.61 (m, 2 H, H-15b' + H-16a); 2.66 (dt,  $J = 12.4$  Hz,  $J = 3.2$  Hz, 1 H, H-16b); 2.74 (dt,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 2.9$  Hz, 1 H, H-16a'); 2.83 (dd,  $J = 17.9$  Hz,  $J = 6.3$  Hz, 1 H, H-10b'); 2.89 (m, 1 H, H-16b'); 3.13 (d,  $J = 18.1$  Hz, 1 H, H-10b); 3.62 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1 H, H-9); 3.72 - 3.78 (m, 7 H, H-9', C-6- + C-6'- $OCH_3$ ); 3.84 (s, 3 H, C-3- $OCH_3$ ); 3.90 (s, 3 H, C-3'- $OCH_3$ ); 6.22 (s, 1 H, H-8'); 6.32 (s, 1 H, H-8); 6.49 (s, 1 H, H-2); 6.61 (s, 1 H, H-2'); 7.58 (s, 1 H, H-5'); 7.62 (s, 1 H, H-5).

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 31.0 (C-10); 37.9 (C-15); 38.7 (C-10'); 39.8 (C-16'); 41.7 ( $NCH_3$ ); 42.6 (C-15'); 43.9 (C-13); 44.4 (C-13'); 47.4 (C-16); 54.0 (C-9'); 54.8 (C-6- + C-6'- $OCH_3$ ); 56.2 (C-3- $OCH_3$ ); 56.3 (C-3'- $OCH_3$ ); 60.8 (C-9); 110.2 (C-2'); 110.6 (C-2); 120.1 (C-5); 120.5 (C-5' + C-8'); 122.3 (C-8); 124.4 (C-12); 124.4 (C-12');

127.0 (C-11); 128.1 (C-11'); 131.2 (C-1'); 131.4 (C-1); 142.7 (C-4 + C-4'); 145.4 (C-3'); 145.6 (C-3); 151.0 (C-6'); 151.1 (C-6); 161.0 (C-14); 163.5 (C-14'); 181.3 (C-7); 181.5 (C-7').

## 5.4 Salutarin-*N*-oxid

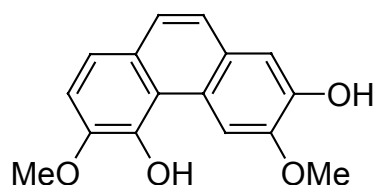
### 4-Hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon-*N*-oxid (**10**)



- Aussehen: amorpher Film
- Summenformel:  $C_{19}H_{21}NO_5$
- R<sub>f</sub>-Wert: 0.05 (LM 2), 0.45 (LM 3).
- UV:  $\lambda_{\max}$  [nm ( $\epsilon$ )] = 241 (4.12), 284 (3.68).
- IR:  $\nu_{\max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3426, 2958, 2848, 1673, 1641, 1487.
- EI-MS:  $m/z$  (%) = 343 [ $M^+$ ] (12), 327 (52), 312 (43), 299 (30), 284 (71), 270 (100), 255 (92).
- CI-MS:  $m/z$  (%) = 344 [ $M^+ + 1$ ] (100).
- HR-MS:  $m/z$  = 343.1418 (berechnet für  $C_{19}H_{21}NO_5$ : 343.1420).
- $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.35 (d,  $J$  = 13.0 Hz, 1 H, H-15a); 2.64 (dt,  $J$  = 13.0 Hz,  $J$  = 4.1 Hz, 1 H, H-15b); 3.16 (m, 1 H, H-16a); 3.25 - 3.37 (m, 5 H, H-10a, H-16b +  $NCH_3$ ); 3.48 (dd,  $J$  = 17.6 Hz,  $J$  = 5.0 Hz, 1 H, H-10b); 3.76 (s, 3 H, C-6- $OCH_3$ ); 3.89 (s, 3 H, C-3- $OCH_3$ ); 4.25 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 1 H, H-9); 6.46 (s, 1 H, H-8); 6.64 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, H-1); 6.80 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H, H-2); 7.50 (s, 1 H, H-5).
- $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 33.5 (C-15); 36.4 (C-10); 42.3 (C-13); 55.3 (C-6- $OCH_3$ ); 56.6 (C-3- $OCH_3$ ); 58.4 ( $NCH_3$ ); 61.8 (C-16); 77.0 (C-9); 110.7 (C-2); 118.9 (C-1); 119.1 (C-5); 124.5 (C-12); 125.0 (C-11); 127.0 (C-8); 144.3 (C-4); 147.0 (C-3); 151.6 (C-6); 155.5 (C-14); 180.4 (C-7).

## 5.5 Crotoflavol

### 2,5-Dihydroxy-3,6-dimethoxyphenanthren (11)



Aussehen: gelbes Pulver

Summenformel:  $C_{16}H_{14}O_4$

Schmelzpunkt: 160 - 162 °C.

$R_f$ -Wert: 0.5 (LM 1), 0.95 (LM 2).

UV:  $\lambda_{\max}$  (nm) = 260, 285, 315, 345, 365.

IR:  $\nu_{\max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3459, 1614, 1574, 1515, 1480.

EI-MS:  $m/z$  (%) = 270 [ $M^+$ ] (100), 255 (84), 227 (20), 184 (11), 149 (50).

CI-MS:  $m/z$  (%) = 271 [ $M^+ + 1$ ] (100).

HR-MS:  $m/z$  = 270.0868 (berechnet für  $C_{16}H_{14}O_4$ : 270.0892).

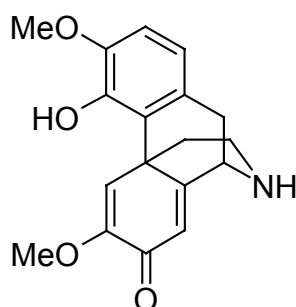
$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.04 (s, 1H, C-6 OMe); 4.09 (s, 1H, C-3 OMe); 5.93 (s, 1H, C-2 OH); 6.85 (s, 1H, C-5 OH); 7.23 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, H-7); 7.32 (s, 1H, H-1); 7.40 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, H-8); 7.45 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-10); 7.50 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H-9); 9.23 (s, 1H, H-4).

$^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.9 (C-3 OMe) 57.1 (C-6 OMe); 109.3 (C-4); 110.3 (C-7); 111.0 (C-1); 118.8 (C-4b); 119.8 (C-8); 124.2 (C-4a); 124.9 (C-10); 125.4 (C-9); 128.0 (C-8a); 128.4 (C-10a); 142.7 (C-5); 143.6 (C-6); 144.9 (C-2); 146.1 (C-3).

## 6 Partialsynthesen

### 6.1 Norsalutarin

#### *N*-Nor-4-hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon



Es werden 0.10 g (0.31 mmol) Salutarin (**3**) und 0.6 g Kaliumhydrogencarbonat in 10 ml Chloroform gerührt. 0.30 ml (2.2 mmol) Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester werden zugespritzt. Die Suspension wird einen Tag unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird mit 10 ml Wasser versetzt und mit 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt und eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml Methanol aufgenommen und mit einer wässrigen Lösung aus 191.5 mg Kaliumhydroxid und 356 mg Kaliumhydrogencarbonat versetzt. Der Ansatz wird mit Stickstoff begast und einen Tag gerührt. Die Lösung wird mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Am Rotationsverdampfer wird das Methanol abgezogen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 20 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden abgetrennt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird mit 8 ml 90%iger Essigsäure und 250 mg Zinkstaub versetzt und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird eingedampft und mittels FSC (Dichlormethan / Methanol 90: 5) gereinigt.

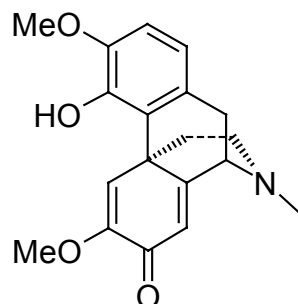
Ausbeute: 12 mg (13%)

Summenformel:  $C_{18}H_{19}NO_4$

Massenspektrum,  $^1H$ -NMR und  $^{13}C$ -NMR stimmen mit den Daten des isolierten Norsinoacutins (**5**) überein.

## 6.2 Sinoacutin

### (-)-(S)-4-Hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon (**3b**)



0.17 g (0.54 mmol) Norsinoacutin (**5**) in 15 ml Methanol werden mit 0.2 ml Formaldehydlösung (36.5% in Wasser) versetzt. Dann gibt man portionsweise 80 mg (1.3 mmol) Natriumcyanoborhydrid zu. Das Gemisch wird mit Eisessig auf pH 5 - 6 eingestellt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der Ansatz am Rotationsverdampfer (Wasserbad maximal 40 °C) eingengt, bis die Lösung milchig-trüb wird. Nach Zugabe von 7.5 ml 2N-Salzsäure und 10 ml Wasser extrahiert man zweimal mit je 40 ml Diethylether. Die wässrige Phase wird anschließend mit 2N-Natronlauge alkalisiert und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft.

Ausbeute: 163 mg (92%)

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>

Aussehen: weißes Pulver

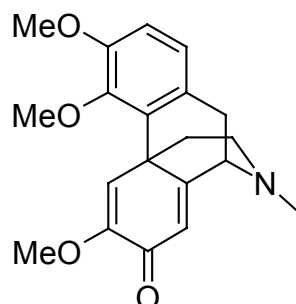
Schmelzpunkt: 196 - 198 °C (Lit.<sup>27</sup>: 198 °C).

Drehwinkel:  $[\alpha]_D^{20} = -112^\circ$  (c = 2.1 mg, MeOH; Lit.<sup>27</sup>:  $[\alpha]_D^{16} = -122^\circ$ , EtOH).

Massenspektrum, <sup>1</sup>H-NMR-Daten und <sup>13</sup>C-NMR-Daten stimmen mit denen von isoliertem Salutarin (**3**) überein. Das CD-Spektrum von **3b** ist genau spiegelbildlich zu dem von Alkaloid **3a** (siehe Anhang E.2.2).

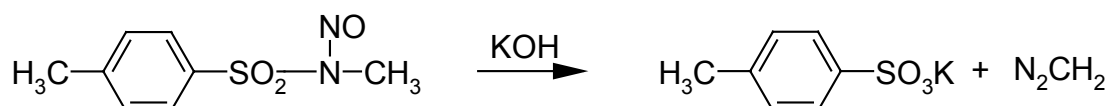
### 6.3 O-Methylsalutarin

#### 3,4,6-Trimethoxymorphinandienon



Es werden 0.10 g (0.31 mmol) Salutarin (**3**) in einen getrockneten Kolben eingewogen und in 50 ml trockenem Diethylether gelöst. Bei Raumtemperatur wird unter Rühren so viel etherische Diazomethan-Lösung zugegeben, bis eine schwache Gelbfärbung bestehen bleibt und sich kein Stickstoff mehr entwickelt. Der Ansatz wird eingedampft und der Rückstand in 30 ml Ether aufgenommen. Anschließend wäscht man einmal mit verdünnter Natronlauge und zweimal mit Wasser. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft.

Darstellung der etherischen Diazomethan-Lösung:



4.3 g *p*-Toluolsulfonsäure-*N*-nitrosomethylamid werden in 25 ml Diethylether gelöst. Die Lösung wird in einen Tropftrichter überführt und langsam einer Lösung aus 1 g Kaliumhydroxid in 1.5 ml Wasser, 5 ml Ethanol und 5 ml Diethylether zugetropft. Der Ether wird überdestilliert in einen Kolben, in dem 1 g Kaliumhydroxidplättchen vorgelegt sind und der im Eisbad steht. Die etherische Diazomethan-Lösung wird im Kühlschrank gelagert.

Ausbeute: 18 mg (18%)

Aussehen: weißes Pulver

Summenformel: C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>

R<sub>f</sub>-Wert: 0.6 (LM 1).

EI-MS: m/z (%) = 341 [M<sup>+</sup>] (100), 326 (65), 313 (40), 298 (43), 282 (22).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.83 (dt, *J* = 12.4 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H-15a); 2.21 (d, *J* = 12.8 Hz, 1 H, H-15b); 2.47 (m, 4 H, NCH<sub>3</sub> + H-16a); 2.60 (m, 1 H, H-16b); 3.00 (dd, *J* = 17.6 Hz, *J* = 5.6 Hz, 1 H, H-10a); 3.33 (d, *J* = 17.6 Hz, 1 H, H-10b); 3.69 (d, *J* = 5.6 Hz, 1 H, H-9); 3.80 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>); 3.93 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>); 6.33 (s, 1 H, H-8); 6.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, H-1/2); 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, H-1/2); 7.28 (s, 1 H, H-5).

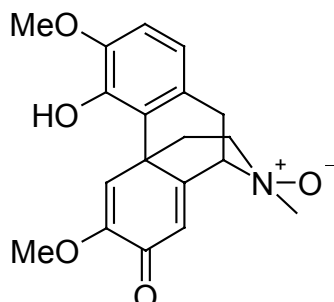
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 32.9 (C-10); 39.1 (C-15); 41.7 (NCH<sub>3</sub>); 43.9 (C-13); 46.8 (C-16); 54.9 (OCH<sub>3</sub>); 55.9 (OCH<sub>3</sub>); 60.9 (OCH<sub>3</sub>); 61.0 (C-9); 111.8 (C-2); 120.8 (C-1); 122.4 (C-5); 123.3 (C-8); 129.5 (C-12); 131.8 (C-11); 151.1 und zweimal 151.9 (C-2/3/6); 161.6 (C-14); 181.4 (C-7).

Die spektroskopischen Daten stimmen voll mit denen in Lit.<sup>71</sup> überein.



## 6.4 Salutarin-*N*-oxid

### 4-Hydroxy-3,6-dimethoxymorphinandienon-*N*-oxid (**10**)



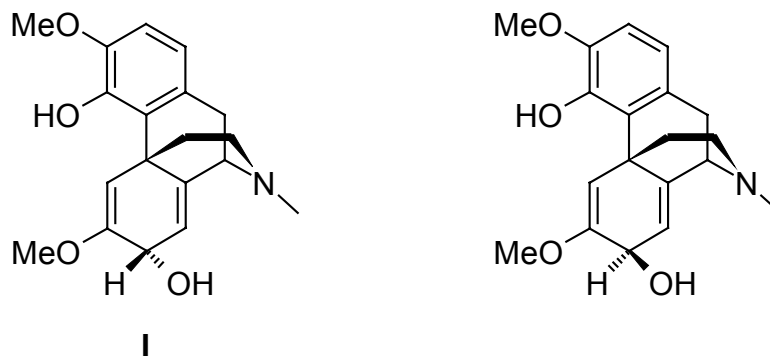
Zu einer eisgekühlten Lösung von 0.14 g (0.81 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure in 30 ml Chloroform werden langsam unter Rühren 0.21 g (0.64 mmol) Salutarin (**3**) in 10 ml Chloroform zugetropft. Nach 30 Minuten werden 0.5 ml Ethyldimethylamin zugegeben. Der Ansatz wird zur Trockene eingedampft und mittels FSC (Methanol) gereinigt.

Ausbeute: 145 mg (66%)

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>

Massenspektrum, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) stimmen voll mit den Daten von isoliertem Salutarin-*N*-oxid (**10**) überein.

## 6.5 Salutaridinol (I) und 7-epi-Salutaridinol (II)



Enantiomerenreines Salutaridin (**3a**, 150 mg, 0.46 mmol) wird in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 420 mg (11 mmol) Natriumborhydrid zunächst zwei Stunden bei 0 °C und dann weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in 20 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft.

Die Trennung der beiden epimeren Alkohole erfolgt durch dreistündiges Digerieren (gelegentliches Umrühren mit einem Glasstab) in 17 ml Ethylacetat bei 50 °C und Stehenlassen über Nacht bei Raumtemperatur. Die abgeschiedenen Kristalle sind mit Salutaridinol identisch. Das verbliebene Ethylacetat-Filtrat wird eingedampft und besteht aus einem Gemisch von Salutaridinol und 7-epi-Salutaridinol (92 mg).

Ausbeute Salutaridinol: 47 mg (31%)

Aussehen: weißes Pulver

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>

R<sub>f</sub>-Wert: 0.6 (LM 1).

EI-MS: m/z (%) = 329 [M<sup>+</sup>] (44), 311 (100), 296 (70), 268 (29), 254 (28).

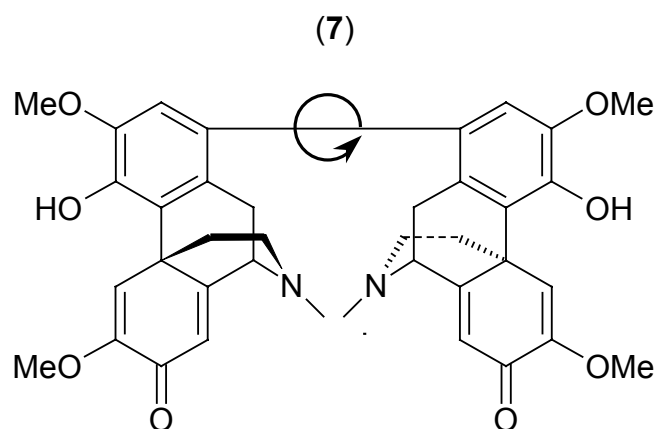
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.70 (dt, *J* = 12.6 Hz, *J* = 4.7 Hz, 1 H, H-15a); 2.11 (d, *J* = 12.6 Hz, 1 H, H-15b); 2.33 (dt, *J* = 12.6 Hz, *J* = 3.3 Hz, 1 H, H-16a); 2.42 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>); 2.55 (m, 1 H, H-16b); 2.90 (dd, *J* = 17.4 Hz, *J* = 5.6 Hz, 1 H, H-10a); 3.21 (d, *J* = 17.4 Hz, 1 H, H-10b); 3.50 (d, *J* = 5.6 Hz, 1 H,

H-9); 3.69 (s, 3 H, C-6 OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3 H, C-3 OCH<sub>3</sub>); 4.63 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1 H, H-7); 5.82 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1 H, H-8); 6.05 (s, br, 1 H, OH); 6.38 (s, 1 H, H-5); 6.60 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, H-1); 6.69 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, H-2).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  (ppm) = 30.03 (C-10); 38.01 (C-15); 39.74 (C-13); 40.94 (NCH<sub>3</sub>); 46.75 (C-16); 53.25 (C-6 OCH<sub>3</sub>); 55.17 (C-3 OCH<sub>3</sub>); 60.10 (C-9); 62.72 (C-7); 101.15 (C-5); 107.70 (C-2); 116.90 (C-8); 117.61 (C-1); 126.05 (C-12); 129.50 (C-11); 141.22 (C-13); 142.03 (C-4); 143.96 (C-3); 152.16 (C-6).

## 6.6 Saludimerin A



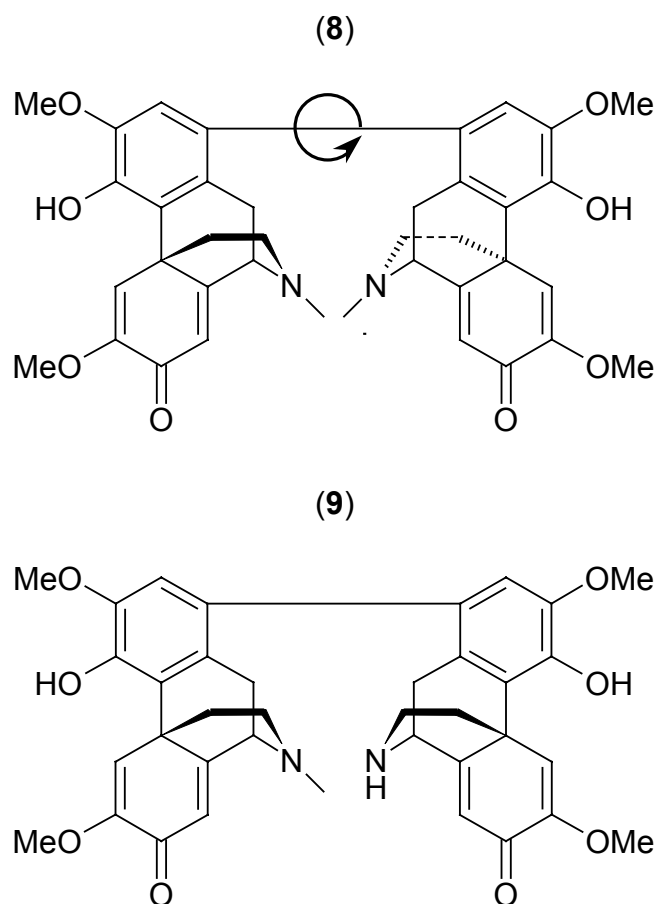
Eine Lösung von 34 mg (0.10 mmol) Salutaridin (**3a**) in 5 ml wässrigem Ethanol (50%ig) wird auf 0 °C abgekühlt. Es werden 27 mg (0.16 mmol) Silbernitrat in 1 ml Wasser zugegeben. Nach fünf Minuten wird 1 ml gesättigte Natriumchlorid-Lösung zugegeben. Der Ansatz wird mit Natriumcarbonat alkalisiert (pH 8 - 9) und dreimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird mittels FSC (Dichlormethan / Methanol 90:10) gereinigt.

Ausbeute: 20 mg (59%)

Summenformel:  $C_{38}H_{40}N_2O_8$

Massenspektrum,  $^1H$ -NMR- und  $^{13}C$ -NMR-Daten sowie CD-Spektrum stimmen voll mit denen von natürlichem Saludimerin A (**7**) überein.

6.7 Saludimerin B und Salsinodimerin



60 mg (0.18 mmol) Salutaridin (**3a**) und 30 mg (0.10 mmol) Norsinoacutin (**5**) werden zu einer heißen Lösung von 30 mg (0.54 mmol) Kaliumhydroxid in 15 ml Wasser zugegeben und auf Raumtemperatur abgekühlt. Eine Lösung von 90 mg (0.27 mmol) Kaliumhexacyanoferrat(III) in 10 ml Wasser wird innerhalb von einer Stunde unter Rühren langsam zugespritzt. Es wird noch weitere 30 Minuten gerührt. Der Ansatz wird mit 5%iger Essigsäure auf pH 9 gebracht und dreimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden abgetrennt, vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird zweimal mittels FSC (Ethylacetat / Methanol / Ethyldimethylamin 90:10:5 und Dichlormethan / Methanol 85:5) aufgereinigt.

Ausbeute Saludimerin B (**8**): 10 mg (17%)

Ausbeute Salsinodimerin (**9**): 6.6 mg (11%)

Massenspektren,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  und CD-Spektren stimmen mit denen der isolierten Alkaloide **8** und **9** überein.

## 7 Bindung an GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in einer Konzentration von jeweils 100 µM auf ihre Fähigkeit, die Bindung von [<sup>3</sup>H]GABA an GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren zu inhibieren, geprüft. Die angegebenen %-Werte geben Mittelwerte der in Gegenwart von 100 µM Testsubstanz ermittelten spezifischen [<sup>3</sup>H]GABA Bindung an. Für Substanzen, die eine deutliche Inhibition der [<sup>3</sup>H]GABA Bindung zeigten, wurden IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt.

**GABA<sub>A</sub>:** Die Bindung an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren erfolgte wie beschrieben.<sup>100</sup>

**GABA<sub>B</sub>:** Membranpräparation (in Anlehnung an Lit.<sup>101</sup>):

Rindercortex (bevorzugt das "Graue" davon) wurde im zehnfachen Volumen 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.4 mit einem Potter S (Braun) homogenisiert (800 rpm, 8 Passagen). Das Homogenat wurde bei 2200 rpm in einem Sorvall SLA1000 Rotor (= 650 x g) 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 8900 rpm (SLA1000, 10000 x g) 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet („fluffy layer“) wurde mit Hilfe eines Polytrons (Kinematica) im gleichen Volumen aqua bidest homogenisiert und 10 min bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde das Material bei 7700 rpm (SLA1000, 8000 x g) 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde im gleichen Volumen 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7.4 resuspendiert (Polytron) und bei 12400 rpm (SLA1000, 20000 x g) 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die resultierenden Pellets wurden schließlich in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7.4 resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Am Versuchstag wurde eine Portion aufgetaut bei 20000 rpm (SS34, 48000 x g) 30 min bei 4 °C zentrifugiert und in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 resuspendiert.

[<sup>3</sup>H]GABA Bindung (in Anlehnung an Lit.<sup>102</sup>):

Aliquots der Membranpräparation (ca. 200 µg Protein) wurden in Gegenwart von 40 µM Isoguvacin und 2.5 mM Calciumchlorid mit 15 nM [<sup>3</sup>H]GABA (1.11 TBq/mmol, Biotrend) in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 in einem Probenvolumen von 250 µL für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden 5 min bei 50000 x g in einer Biofuge Stratos (Haereus) zentrifugiert. Das Waschen der Pellets sowie die Messung der Radioaktivität erfolgte wie für GABA<sub>A</sub> beschrieben. Die nicht spezifische Bindung wurde in Gegenwart von 100 µM (±)-Baclofen bestimmt.

## 8 Enantiomerentrennung über Kristallisation diastereomerer Salze

0.13 g (0.40 mmol) Salutarin (**3**) werden in 25 ml Ethylacetat gelöst. 70 mg (0.30 mmol) (1*R*)-(-)-Campher-10-sulfonsäure werden in 4 ml Ethylacetat gelöst und zur Alkaloidlösung zugegeben. Es werden 10 ml Heptan zugegeben und eine Woche bei 8 °C stehen gelassen. Es kristallisieren 0.11 g des enantiomerenreinen Salzes von Salutaridin (**3a**) aus. Die Enantiomerenreinheit wurde überprüft mit der chiralen HPLC-Methode.

Bei Verwendung von (1*S*)-(+)-Campher-10-sulfonsäure kristallisiert ebenfalls das Salz von Salutaridin aus (0.11 g).

## E. Anhang

### 1 Verzeichnis der Abkürzungen

APT	Attached Proton Test
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Circulardichroismus
CDCl <sub>3</sub>	Deuteriochloroform
CI	Chemische Ionisation
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Tag
δ	chemische Verschiebung
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss in %)
EI	Elektronenstoßionisation
EtOH	Ethanol
FSC	Flashsäulenchromatographie
g	Gramm
HCl	Salzsäure
HF	Hauptfraktion
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Connectivities
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
HPLC	high performance liquid chromatography



## Verzeichnis der Abkürzungen

---

Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Konzentration des Inhibitors bei 50%iger Enzymhemmung
IR	Infrarot-Spektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Lit.	Literatur
M	mol/l
m/z	Masse pro Ladungseinheit
Me	Methyl
MeOD	Deuteromethanol
MeOH	Methanol
ml	Milliliter
min	Minute
MS	Massenspektroskopie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
<i>p</i> -	para
ppm	parts per million
( <i>R</i> )	( <i>R</i> )-konfiguriertes Chiralitätszentrum nach <i>Cahn, Ingold und Prelog</i>
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
ROESY	Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
rpm	rounds per minute
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
( <i>S</i> )	( <i>S</i> )-konfiguriertes Chiralitätszentrum nach <i>Cahn, Ingold und Prelog</i>
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert (standard error of the mean)
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
TBq	Tetabecquerel
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett-Spektroskopie
z. B.	zum Beispiel

## 2 Spektrenanhang

### 2.1 NMR-Spektren

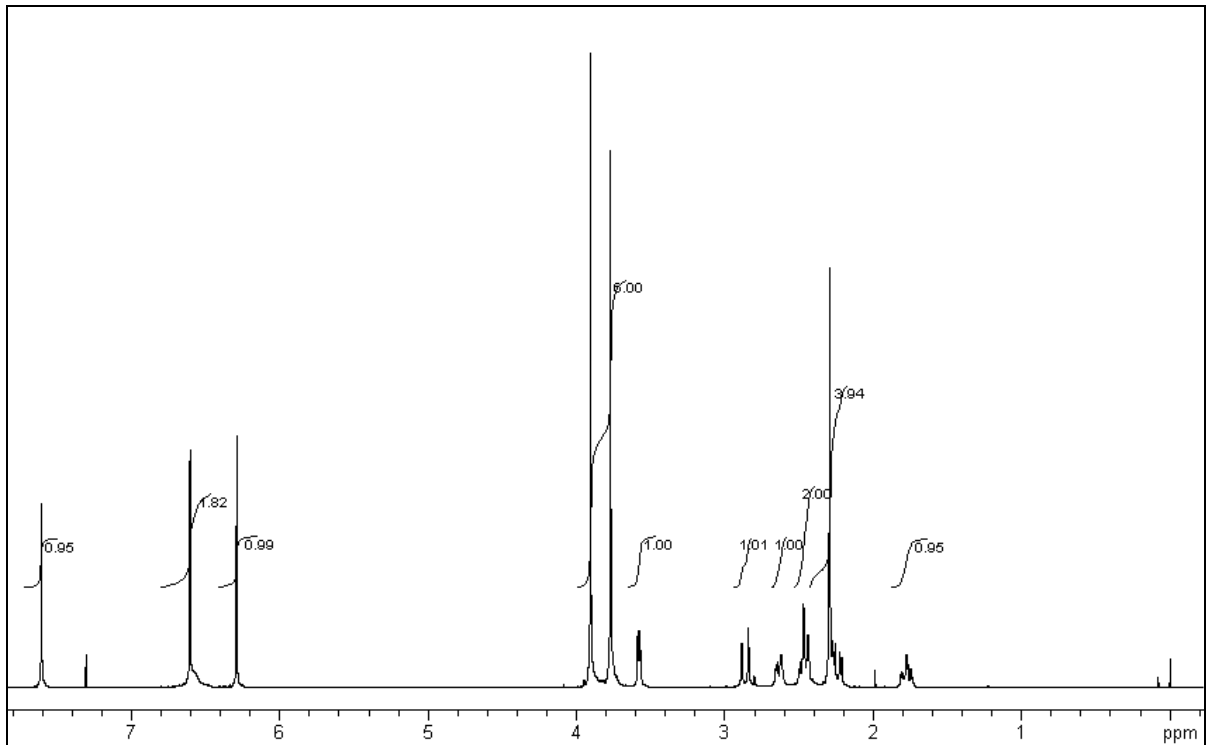


Abb. 69: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Saludimerin A (7)

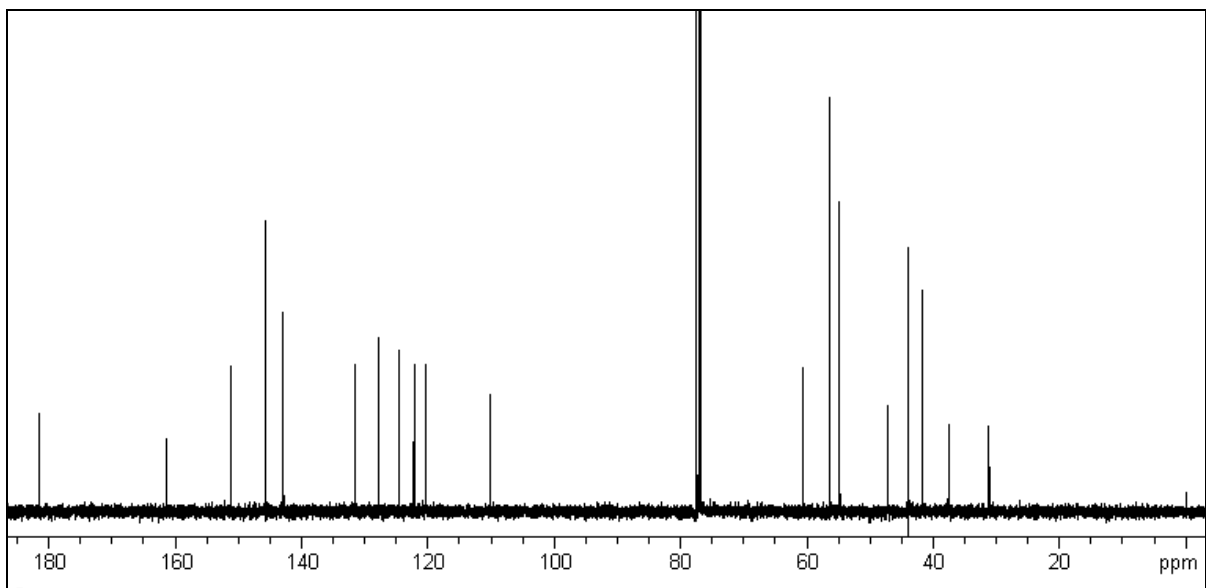


Abb. 70: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Saludimerin A (7)

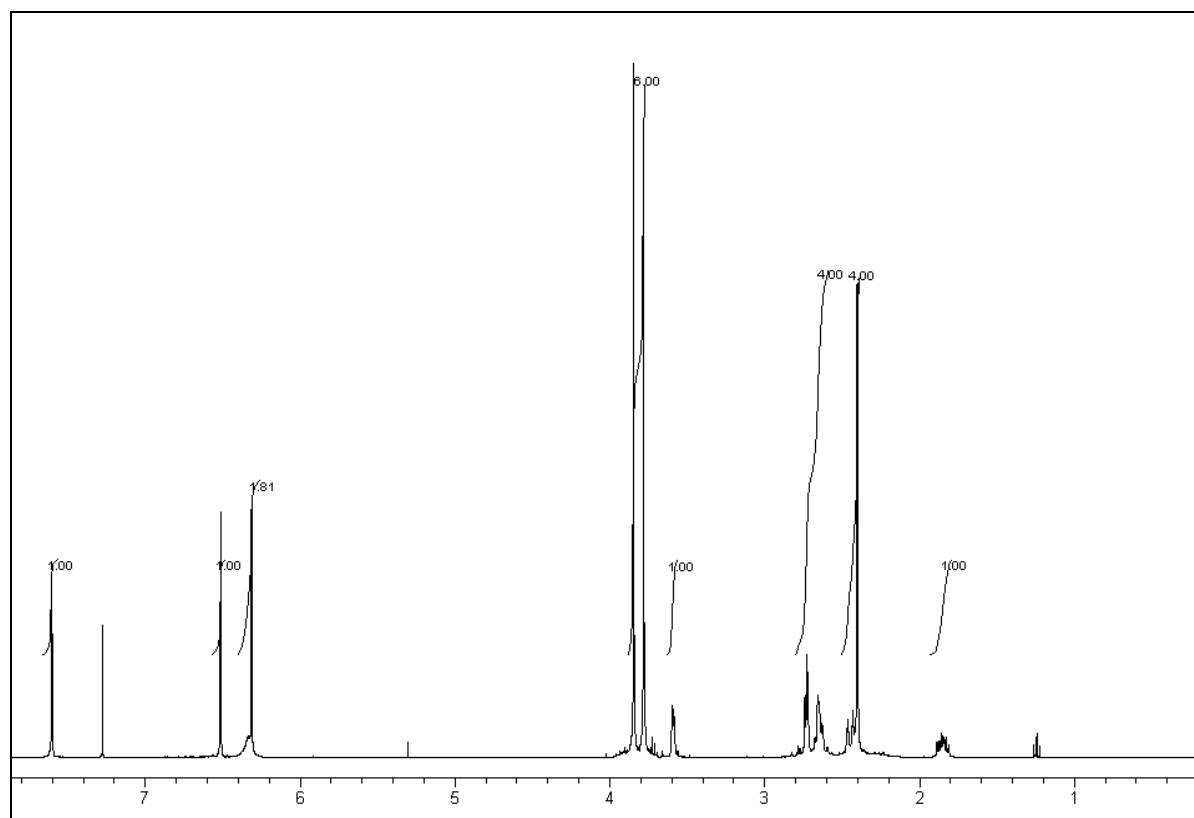


Abb. 71:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Saludimerin B (8)

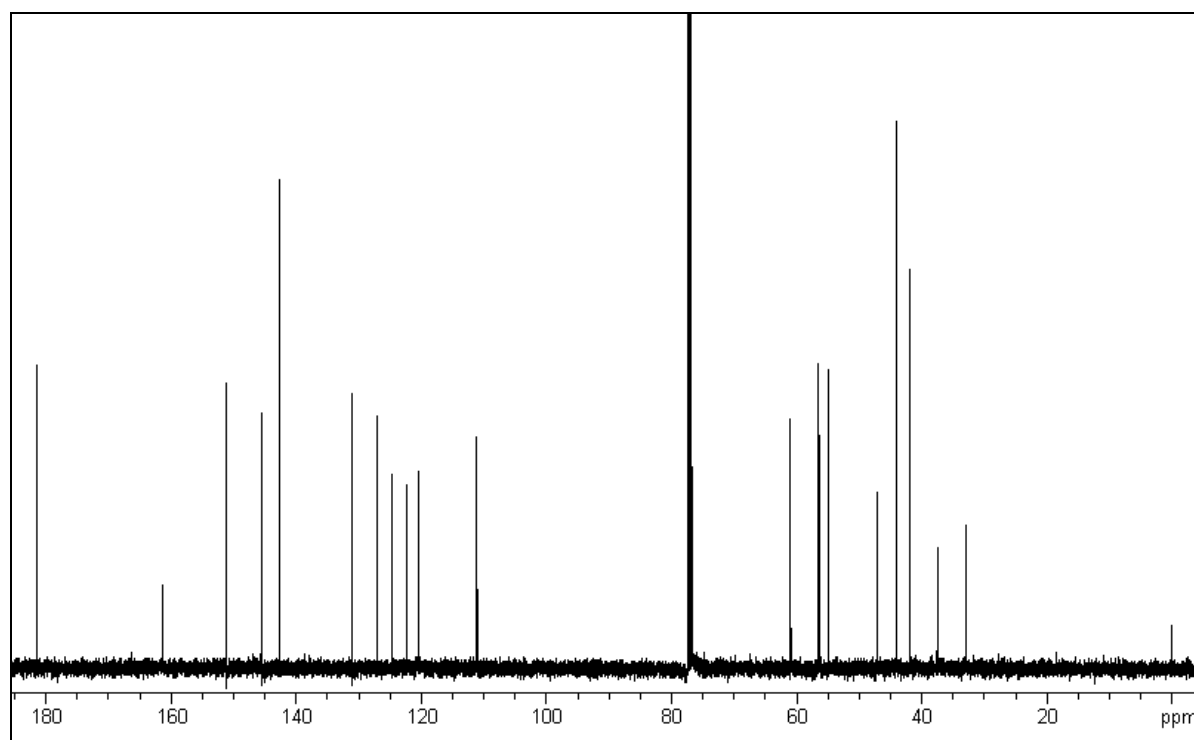


Abb. 72:  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Saludimerin B (8)

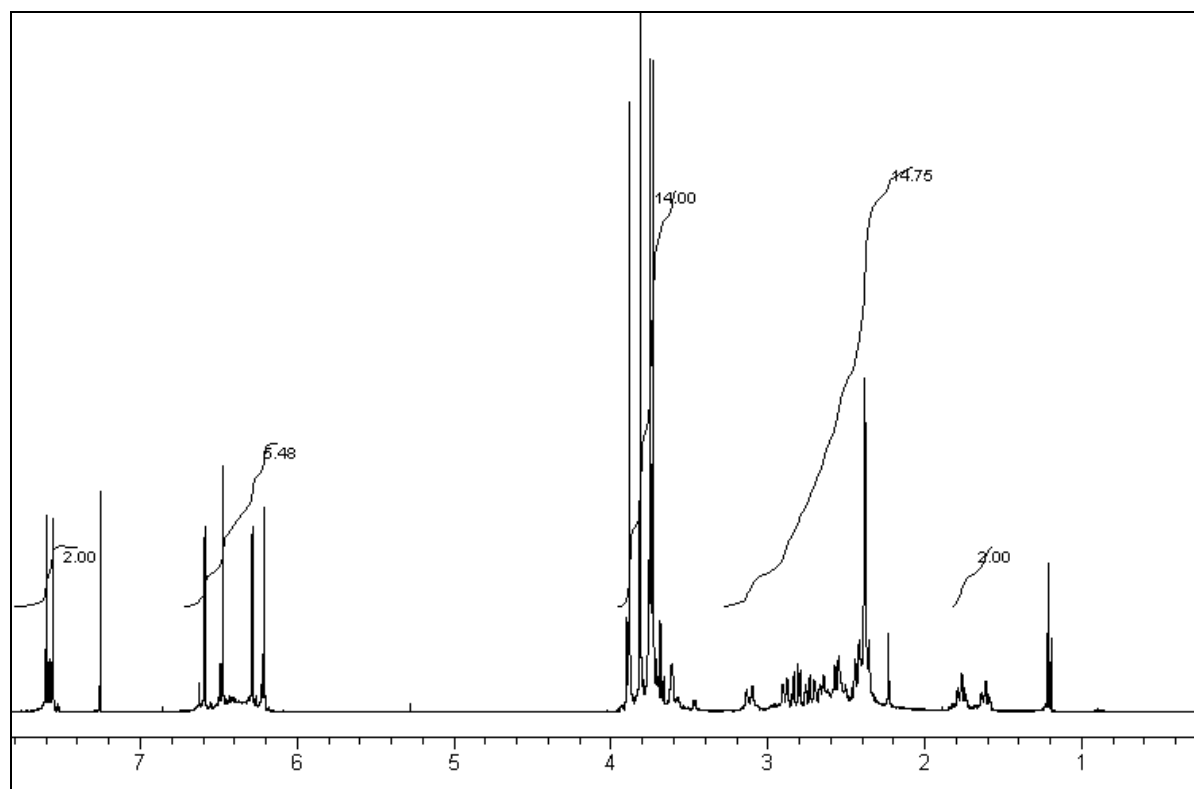


Abb. 73:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Salsinodimerin (9)

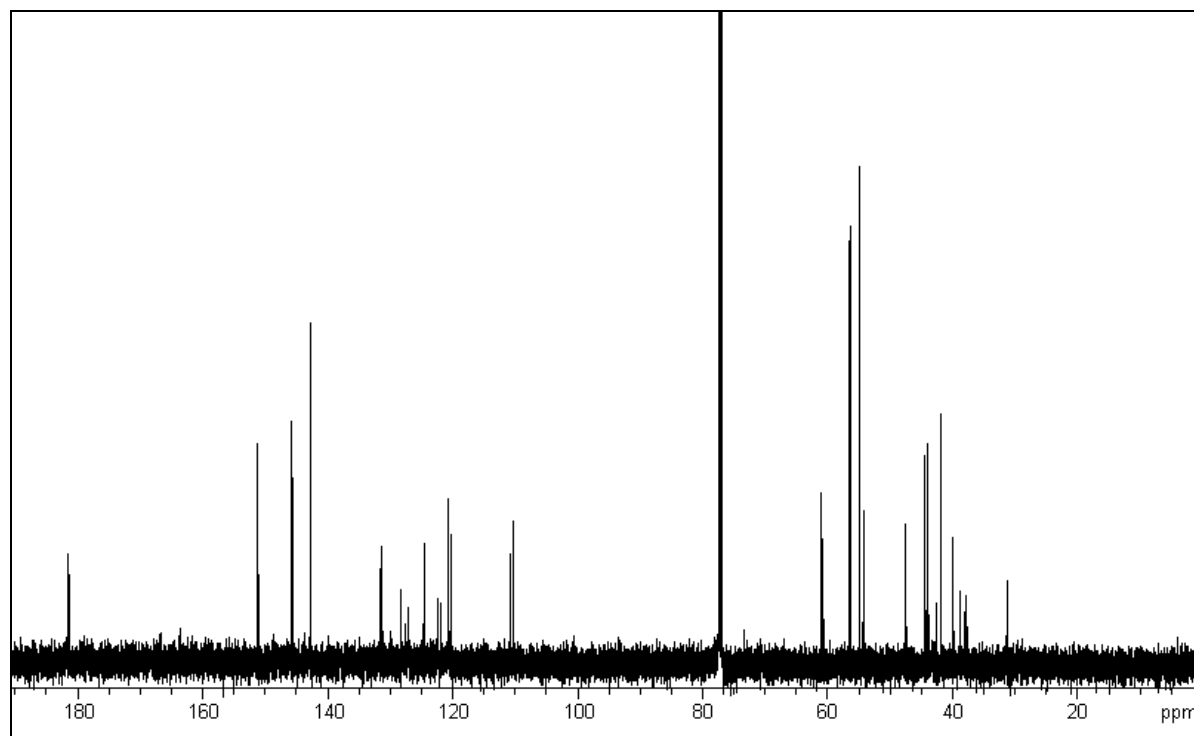


Abb. 74:  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Salsinodimerin (9)

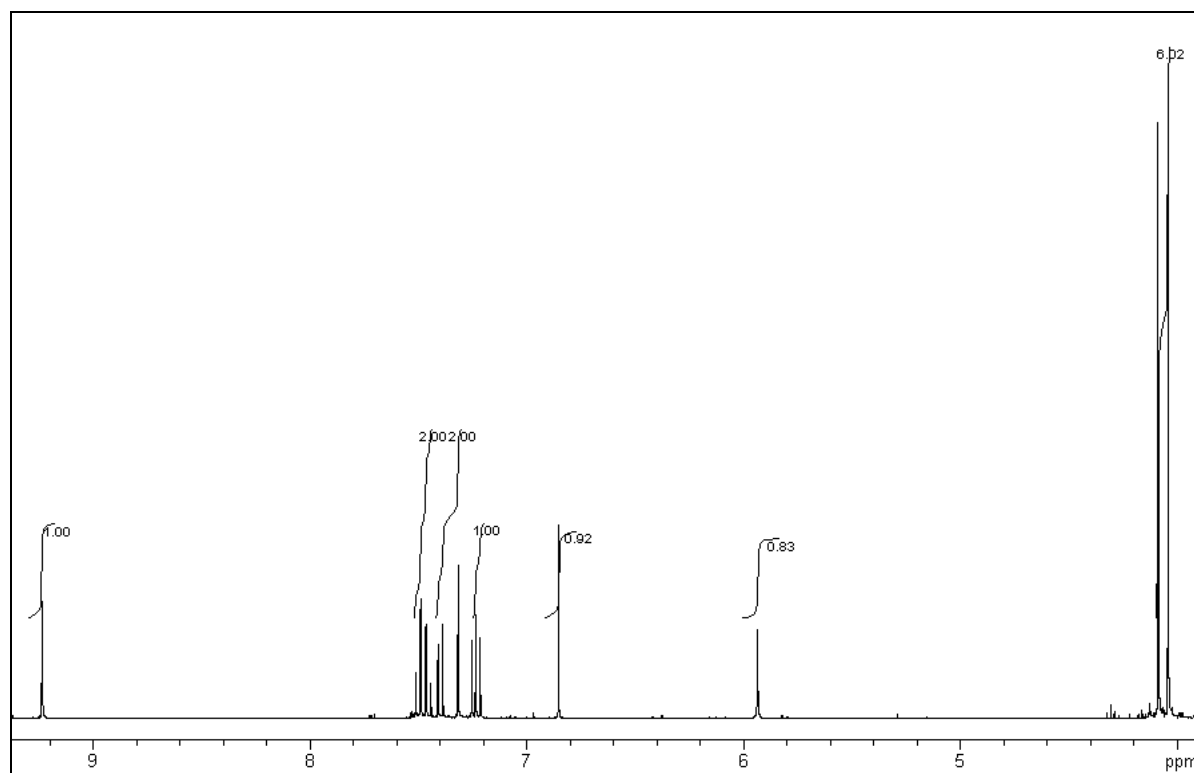


Abb. 75:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Crotoflavol (11)

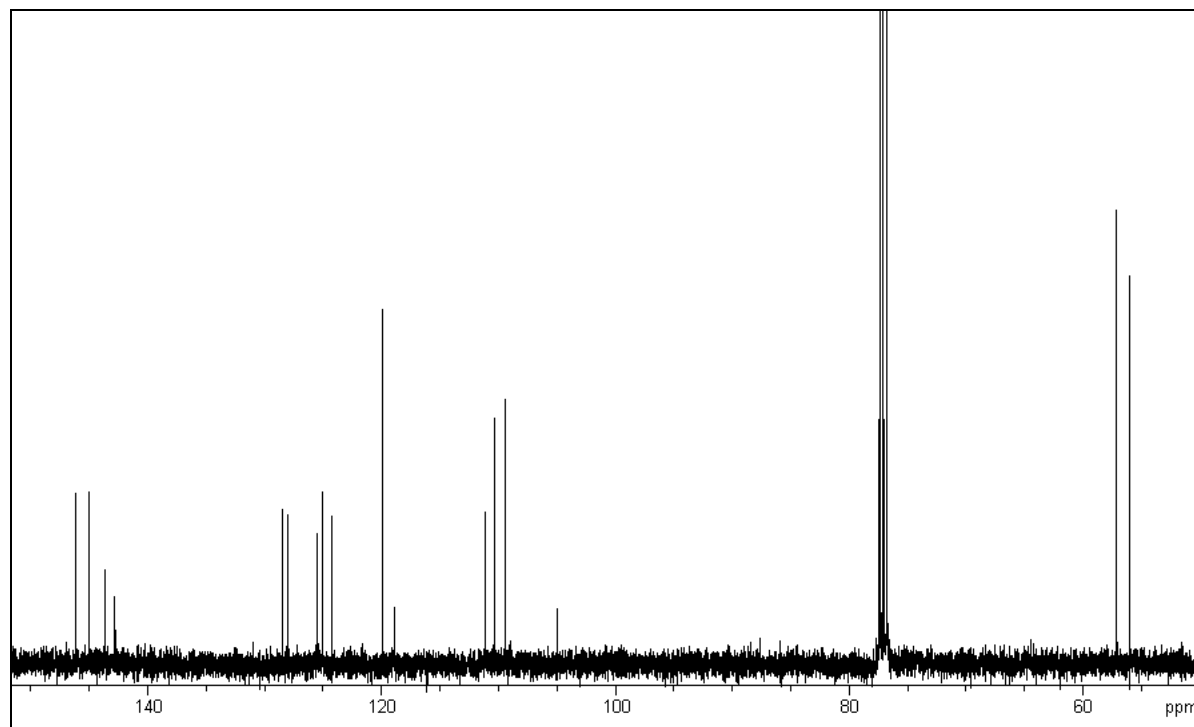
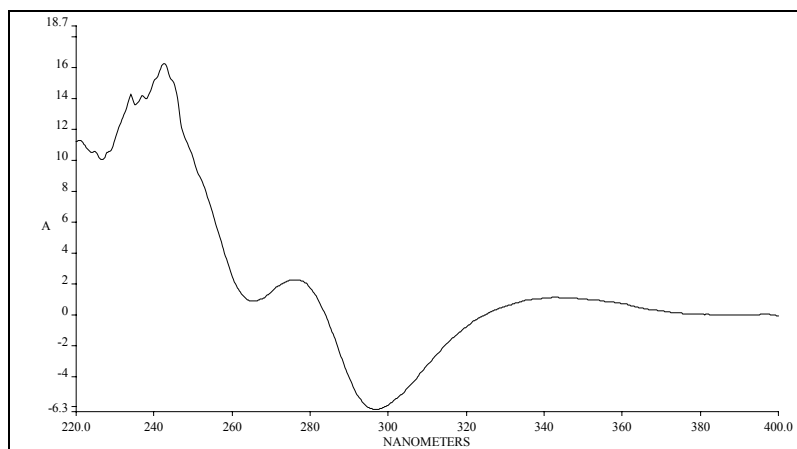
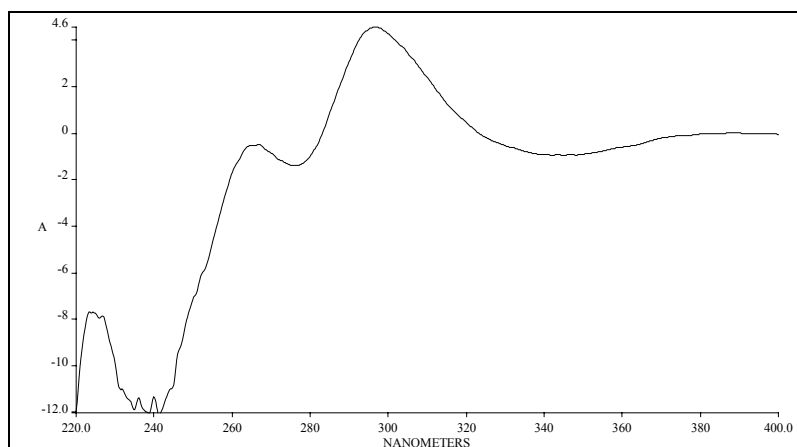


Abb. 76:  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Crotoflavol (11)

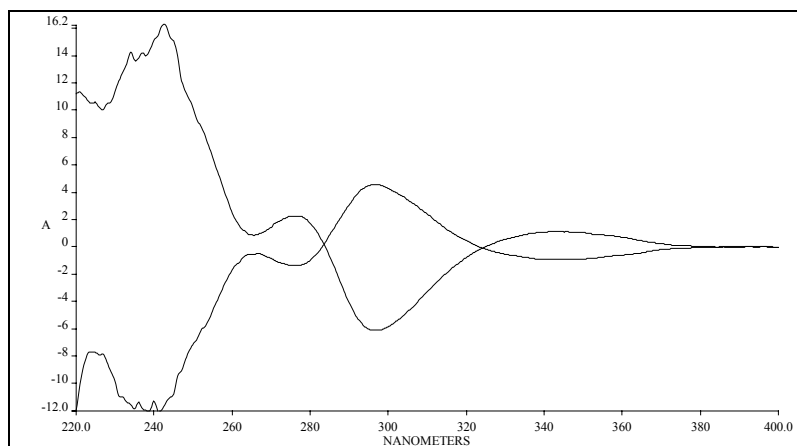
## 2.2 CD-Spektren



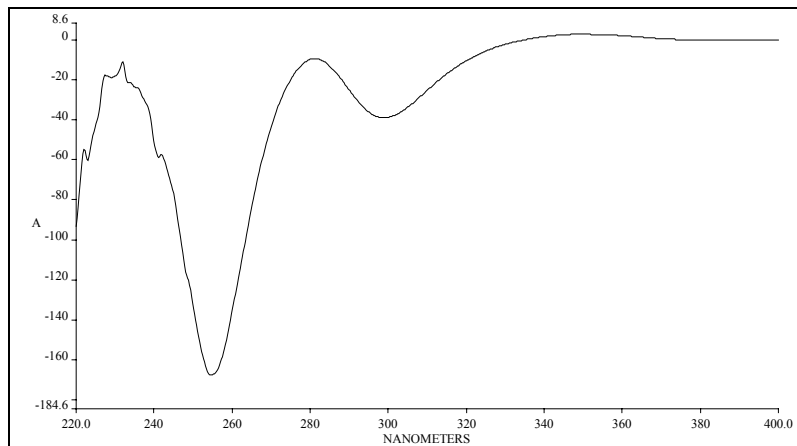
**Abb. 77: Salutaridin (3a)**



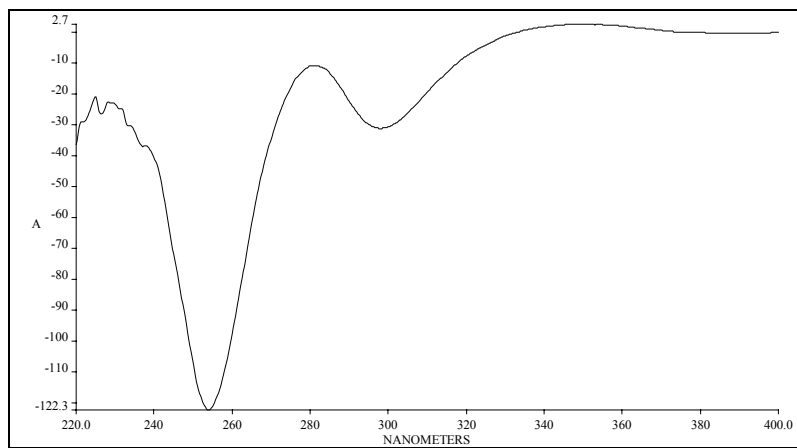
**Abb. 78: Sinoacutin (3b)**



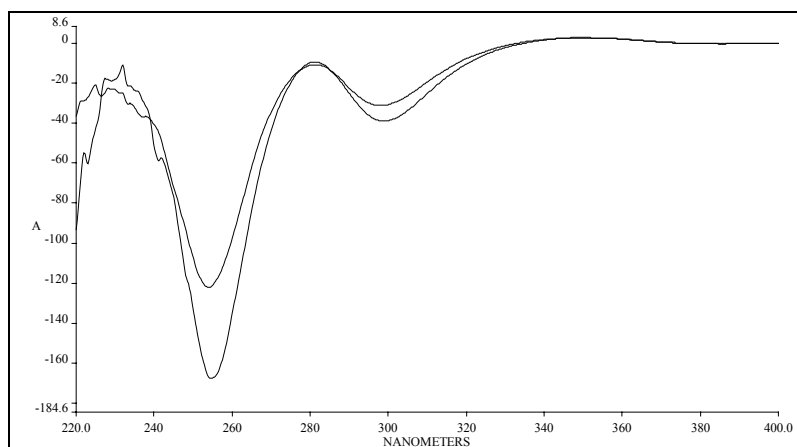
**Abb. 79: Salutaridin (3a) und Sinoacutin (3b)**



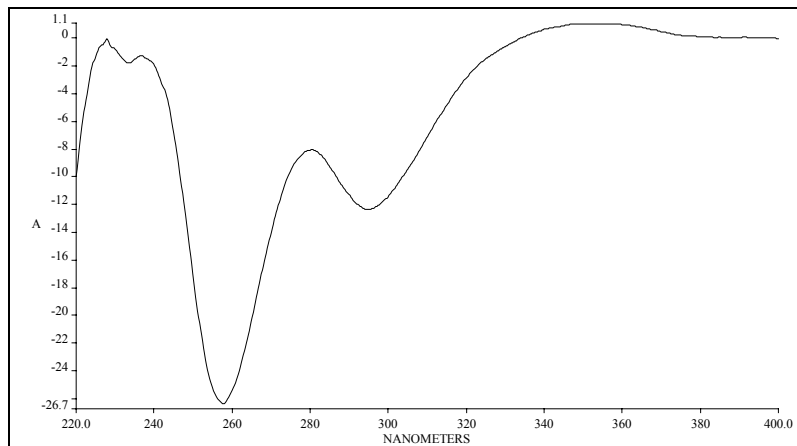
**Abb. 80:** isoliertes Saludimerin A (7)



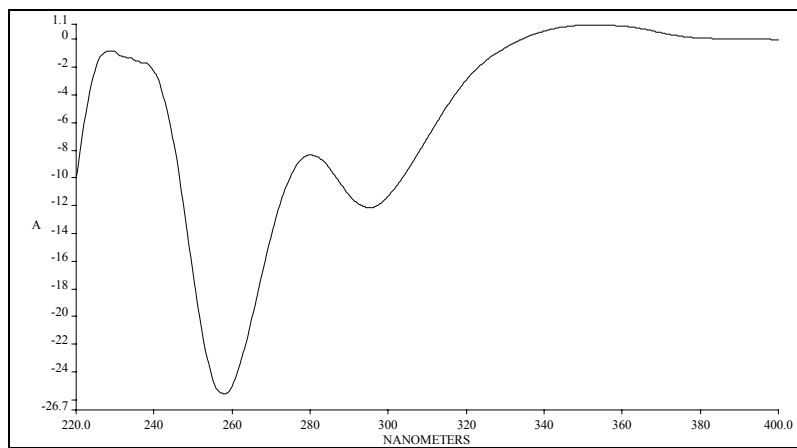
**Abb. 81:** synthetisches Saludimerin A (7)



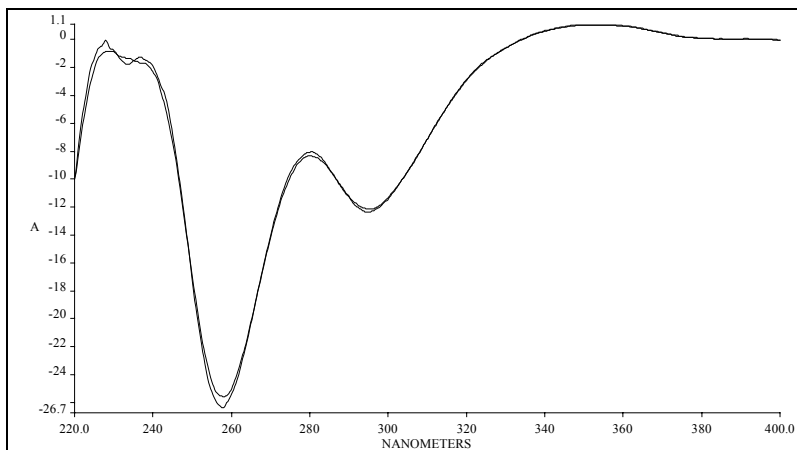
**Abb. 82:** natürliches + synthetisches Saludimerin A



**Abb. 83:** isoliertes Saludimerin B (8)

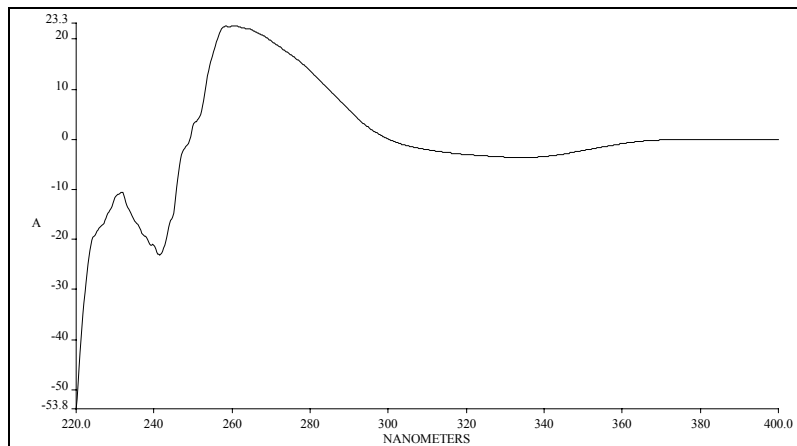


**Abb. 84:** synthetisches Saludimerin B (8)

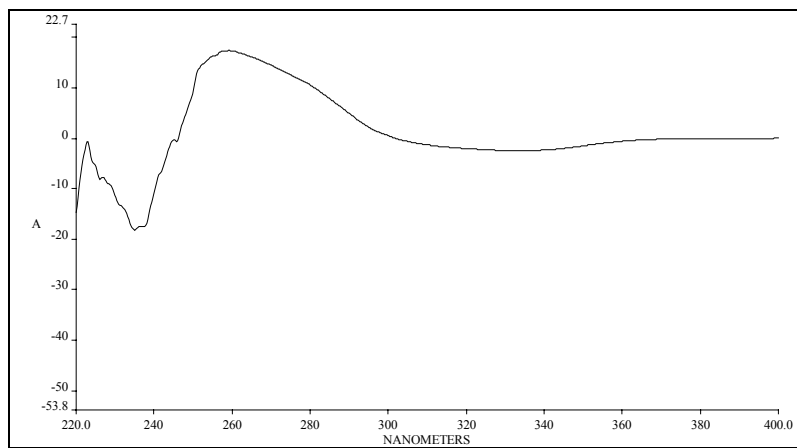


**Abb. 85:** natürliches + synthetisches Saludimerin B

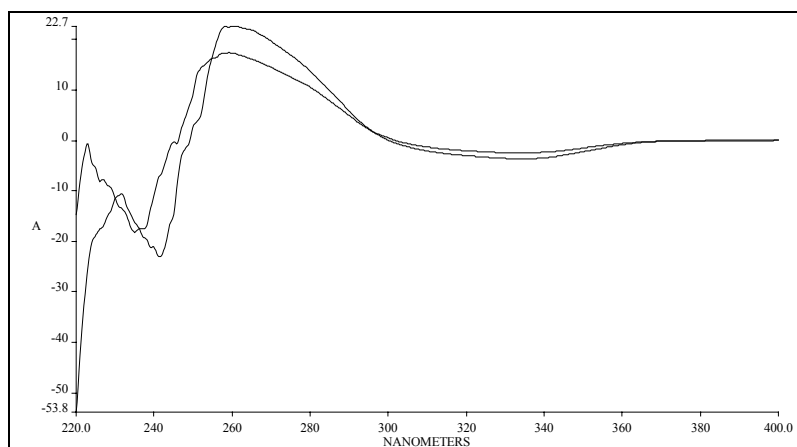




**Abb. 86:** natürliches Salsinodimerin (9)



**Abb. 87:** synthetisches Salsinodimerin (9)



**Abb. 88:** natürliches und synthetisches Salsinodimerin

### 3 Literaturverzeichnis

- 1 N. Farnsworth, R. Blomster, W. Messmer, *Lloydia* **1969**, 32, 1-28
- 2 K. Stuart, *Rev. Latinoamer. Quim.* **1970**, 1, 140-143
- 3 a) L. Haynes, K. Stuart, *J. Chem. Soc.* **1963**, 1784-1793; b) L. Haynes, K. Stuart, D. Barton, G. Kirby, *J. Chem. Soc. (C)* **1966**, 1676-1679; c) L. Hynes, G. Husbands, K. Stuart, *J. Chem. Soc. (C)* **1966**, 1680-1685; d) L. Hynes, G. Husbands, K. Stuart, *J. Chem. Soc. (C)* **1968**, 951-957; e) K. Stuart, D. Byfield, C. Chambers, G. Husbands, *J. Chem. Soc. (C)* **1970**, 1228-1230; f) K. Stuart, L. Graham, *Phytochemistry* **1973**, 12, 1973-1975; g) K. Stuart, R. Woo-Ming, *Phytochemistry* **1969**, 8, 777-780
- 4 R. Bertolo, L. Scarpati, *Phytochemistry* **1979**, 18, 520
- 5 A. Amaral, R. Barnes, *Planta Med.* **1997**, 63, 485
- 6 A. Amaral, R. Barnes, *Phytochemistry* **1998**, 47, 1445-1447
- 7 K. Stuart, D. Byfield, *Phytochemistry* **1971**, 10, 460-462
- 8 E. Hecker, *Naturwissenschaften* **1967**, 54, 282-284
- 9 S. El-Mekkawy, M. Meselhy, N. Nakamura, M. Hattori, T. Kawahata, T. Otake, *Phytochemistry* **2000**, 53, 457-464
- 10 W. Blaschek, R. Hänsel, K. Keller, J. Reichling, H. Rimpler, G. Schneider, Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Folgeband 2, Drogen A-K, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York **1998**, 5. Auflage, 450-481
- 11 D. Frohne, U. Jensen, Systematik des Pflanzenreiches, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart **1998**, 5. Auflage
- 12 C. Chambers, L. Haynes, K. Stuart, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1966**, 449
- 13 K. Stuart, C. Chambers, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 30, 2879-2882
- 14 C. Chambers, K. Stuart, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1968**, 328-329
- 15 J. Charris, J. Dominguez, C. de la Rosa, C. Caro, *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, 28, 795-797
- 16 E. Hecker, *Naturwissenschaften* **1978**, 65, 640-648
- 17 E. Hecker, *Naturwissenschaften* **1984**, 71, 259-261
- 18 J. Milo, A. Levy, D. Palevitch, *J. Chromatogr.* **1988**, 452, 563 - 570
- 19 H. Boit, Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960, Akademie Verlag Berlin **1961**, 330-346

- 20 H. Wagner, *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart **1999**, 6. Auflage, 233
- 21 R. Manske, *The Alkaloids*, Academic Press New York **1967**, Vol. 9, 41-155
- 22 a) F. Bohlmann, *Angew. Chem.* **1957**, 69, 641-642; b) F. Bohlmann, *Chem. Ber.* **1958**, 91, 2157-2167
- 23 C. Chen, D. MacLean, *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 2501-2506
- 24 K. Haisova, J. Slavik, L. Dolejs, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1973**, 38, 3312-3320
- 25 a) R. Manske, *Can. J. Research* **1936**, 14B, 347-353; b) R. Manske, *Can. J. Research* **1938**, 16B, 153-157
- 26 E. Brochmann-Hanssen, B. Nielsen, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 20, 2261-2263
- 27 I. Southon, J. Buckingham, *Dictionary of Alkaloids*, Chapman and Hall Ltd London New York **1989**
- 28 M. El-Kawi, D. Slatkin, P. Schiff Jr., *J. Nat. Prod.* **1984**, 47, 459-464
- 29 a) R. Manske, *Can. J. Research* **1938**, 16B, 81-90; b) R. Manske, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 4796-4797; c) R. Manske, W. Ashford, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 5144-5145
- 30 L. Kühn, S. Pfeifer, *Pharmazie* **1965**, 20, 659-680
- 31 G. Blasko, G. Cordell, *Heterocycles* **1988**, 27, 1269-1300
- 32 K. Stuart, *Chem. Rev.* **1971**, 71, 48-72
- 33 D. Wheeler, T. Kinstle, K. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 4494-4501
- 34 R. Barnes, M. Gilbert, *Bol. Inst. Quim. Agric.* **1959**, 58, 1-3
- 35 H. Meshulam, D. Lavie, *Phytochemistry* **1980**, 19, 2633-2635
- 36 T. Kametani, K. Fukumoto, F. Satoh, H. Yagi, *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, 520-523
- 37 I. Bick, H. Leow, N. Preston, J. Wright, *Aust. J. Chem.* **1973**, 26, 455-459
- 38 A. Tackie, D. Dwuma-Badu, J. Knapp, D. Slatkin, P. Schiff Jr., *Phytochemistry* **1974**, 13, 2884-2885
- 39 M. Sivakumaran, K. Gopinath, *Indian J. Chem.* **1976**, 14B, 150-151
- 40 D. Bhakuni, A. Singh, *Tetrahedron* **1979**, 35, 2365-2367
- 41 a) F. Roblot, R. Hocquemiller, A. Cave, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1984**, 139-141; b) H. Hara, S. Komoriya, T. Miyashita, O. Hoshino, *Tetrahedron Asymm.* **1995**, 6, 1683-1692

- 42 B. Noamesi, E. Gyang, *Planta Med.* **1980**, *38*, 138-143
- 43 S. Piacente, M. Belisario, H. del Castillo, C. Pizza, V. de Feo, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 318-322
- 44 S. Hemingway, J. Phillipson, R. Verpoorte, *J. Nat. Prod.* **1981**, *44*, 67 - 74
- 45 a) J. Kobayashi, Y. Hirasawa, N. Yoshida, H. Morita, , *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9069-9073; b) T. Al-Howiriny, M. Zemaitis, C Gao, C. Hadden, G. Martin, F. Lin, P. Schiff Jr., *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 819-822
- 46 G. Sariyar, A. Freyer, H. Guinaudeau, M. Shamma, *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1383-1386
- 47 R. Manske, *The Alkaloids*, Academic Press New York **1971**, Vol. 13, 58
- 48 M. Oki, *Angew. Chem.* **1976**, *88*, 67-74
- 49 E. Eliel, S. Wilen, L. Mander, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc. New York **1994**, 1119
- 50 H. Scharf, H. Buschmann, *Stereochemie in der organischen Synthese*, Ralf Bünthe, Aachen, Libri Books on Demand **2000**, 197
- 51 G. Bringmann, K. Gulden, Y. Hallock, K. Manfredi, J. Cardellina II, M. Boyd, B. Kramer, J. Fleischhauer, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7807-7814
- 52 K. Nakanishi, N. Berova, R. Woody, *The Exciton Chirality Method in Circular Dichroism, Principles and Applications*, VCH Publishers New York **1994**
- 53 P. Schreier, M. Herderich, H. Humpf, W. Schwab, *Natural Product Analysis*, Vieweg Wiesbaden **1998**, 195-212
- 54 G. Bringmann, J. Mühlbacher, C. Repges, J. Fleischhauer, *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 1273-1278
- 55 G. Clemo, H. Ilwain, *J. Chem. Soc.* **1938**, 479
- 56 A. Albin, *Heterocycles* **1992**, *34*, 1973-2002
- 57 a) D. Tojo, C. Domingo, L. Castedo, *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 415-416; b) D. Tojo, C. Domingo, L. Castedo, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1005-1010
- 58 G. Saryar, H. Gülgeze, B. Gözler, *Planta Med.* **1992**, *58*, 368-369
- 59 C. Honda, M. Yamaki, *Phytochemistry* **2000**, *53*, 987-990
- 60 a) Y. Leong, L. Harrison, A. Powell, *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1237-1241; b) S. Estrada, R. Toscano, R. Mata, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1175-1178
- 61 T. Wu, Y. Leu, Y. Chan, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 571-573

- 62 L. Long, S. Lee, H. Chai, P. Rasoanaiv, Q. Gao, H. Navarro, M. Wall, M. Wani, N. Farnsworth, G. Cordell, J. Pezzuto, A. Kinghorn, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15663-15670
- 63 Y. Leong, C. Kang, L. Harrison, A. Powell, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 157-165
- 64 M. Shimizu, H. Shogawa, T. Hayashi, M. Arisawa, S. Suzuki, M. Yoshizaki, N. Morita, E. Ferro, I. Basualdo, L. Berganza, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 4447-4452
- 65 M. Fisch, B. Flick, J. Arditti, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 437-441
- 66 G. Kraus, A. Melekhov, S. Carpenter, Y. Wannemuhler, J. Petrich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 9-11
- 67 T. Montzka, J. Matiskella, R. Partyka, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 1325-1327
- 68 J. Cannon, T. Lee, J. Beres, H. Goldman, *J. Heterocyclic. Chem.* **1980**, *17*, 1633-1636
- 69 N. Kashiwaba, S. Morooka, M. Kimura, M. Ono, J. Toda, H. Suzuki, T. Sano, *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 476 - 480
- 70 S. Johns, J. Lamberton, A. Sioumis, *Aust. J. Chem.* **1966**, *19*, 2331-2338
- 71 M. Kupchan, C. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5623-5625
- 72 J. Minamikawa, I. Iijima, A. Brossi, *Heterocycles* **1978**, *10*, 79-84
- 73 K. Bentley, S. Dyke, *J. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 2574-2577
- 74 R. Barnes, O. Soeiro, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 543-544
- 75 K. Stuart, C. Chambers, D. Byfield, *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, 1681-1684
- 76 K. Stuart, L. Graham, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1967-1972
- 77 T. Amann, M. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *30*, 3675-3678
- 78 R. Stadler, M. Zenk, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 555-562
- 79 W. De-Eknamkul, M. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4855-4858
- 80 P. Steffens, N. Nagakura, M. Zenk, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2577-2583
- 81 T. Kutchan, H. Dittrich, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 24475-24481
- 82 E. Brochmann-Hanssen, C. Fu, G. Zanati, *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60*, 873-878
- 83 T. Kametani, M. Ihara, K. Takahashi, *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 1588-1589
- 84 D. Barton, T. Cohen, „Festschrift Arthur Stoll“, Birkhäuser, Basel, **1957**, 117
- 85 D. Barton, G. Kirby, W. Steglich, G. Thomas, A. Battersby, T. Dobson, H. Ramuz, *J. Chem. Soc.* **1965**, 2423-2438

- 86 R. Gerardy, M. Zenk, *Phytochemistry* **1993**, 32, 79-86
- 87 K. Stuart, L. Graham, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 392
- 88 A. Battersby, D. Foulkes, R. Binks, *J. Chem. Soc.* **1965**, 3323-3332
- 89 K. Stuart, V. Teetz, B. Frank, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1969**, 333
- 90 D. Bhakuni, V. Mangla, A. Singh, R. Kapil, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 267-269
- 91 R. Wilhelm, Demethylierung von Thebain in ausdifferenzierten Pflanzen, pflanzlichen Zellsuspensionskulturen, Pilzen und Mikroorganismen, Dissertation **1996**, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 92 S. Löffler, Norcoclaurin: Das zentrale Zwischenprodukt in der Biosynthese der Benzylisochinolin-Alkaloide, Dissertation **1988**, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 93 D. Barton, A. Kirby, G. Kirby, *J. Chem. Soc. (C)* **1968**, 929-936
- 94 S. Pfeifer, L. Kühn, *Pharmazie* **1968**, 23, 267 - 281
- 95 K. Délenk-Heydenreich, S. Pfeifer, *Pharmazie* **1969**, 24, 635 - 645
- 96 E. Ameyibor, J. Stewart, *J. Chromatogr. B* **1996**, 686, 297 - 300
- 97 T. Kametani, M. Ihara, K. Fukumoto, H. Yagi, *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, 2030 - 2033
- 98 a) H. Brunner, W. Pieronczyk, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 655-656; b) M. Acs, E. Fogassy, F. Faigl, *Tetrahedron* **1985**, 41, 2465-2470
- 99 J. Kardos, G. Blasko, M. Simonyi, C. Szantay, *Arzneim.-Forsch. / Drug Res.* **1984**, 34, 1758-9
- 100 P. Gmeiner, E. Hummel, C. Haubmann, G. Höfner, *Arch. Pharm.* **1995**, 328, 265-268
- 101 H. Nakayasu, M. Nishikawa, H. Mizutani, H. Kimura, K. Kuriyama, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 8659-8664
- 102 a) M. Facklam, N.G. Bowery, *Br. J. Pharmacol.* **1993**, 110, 1291-1296; b) N.G. Bowery, D.R. Hill, A.L. Hudson, *Br. J. Pharmacol.* **1983**, 78, 191-206; c) Y. Ohmori, M. Hirouchi, J. Taguchi, K. Kuriyama, *J. Neurochem.* **1990**, 54, 80-85

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation:

W. Eisenreich, F. Bracher, *Nat. Prod. Lett.* **2001**, 15, 147-150

Posterpräsentationen

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Münster, 4.-7.10.2000

W. Eisenreich, F. Bracher: Alkaloids from *Croton balsamifera*

*Arch. Pharm. Pharm Med. Chem.* **2000**, 333, Suppl. 2, 42

BioLog 2000, München, 18.11.2000

W. Eisenreich, F. Bracher: Alkaloide aus *Croton balsamifera*

14. Irseer Naturstofftage der DECHEMA, Irsee, 20.-22.02.2002

F.Bracher, W. Eisenreich: Dimere Morphinandienon-Alkaloide aus *Croton flavens* L.

## Lebenslauf

---

---

Name:	Wolfram Eisenreich
Geburtsdatum:	11. Februar 1974
Geburtsort:	München
Nationalität:	deutsch
Eltern:	Antonia Eisenreich, geb. Buchner, Lehrerin Georg Eisenreich, Jurist, Regierungsdirektor

---

---

1980 - 1981	Grundschule an der Droste-Hülshoff-Straße, München
1981 - 1984	Grundschule Thoner Espan, Nürnberg
1984 - 1986	Willstätter Gymnasium, Nürnberg
1986 - 1988	Erasmus Gymnasium, Amberg
1988 - 1993	Ludwigs-Gymnasium, München
1993 - 1998	Pharmaziestudium an der LMU München
Frühjahr 1994	8-wöchige Famulatur in der Apotheke am Hauptzollamt
09/1995	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/1997	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/1997 - 04/1998	Praktikum bei der Firma Sankyo Pharma in München
05/1998 - 10/1998	Praktikum in der St. Hubertus-Apotheke in München
12/1998	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
22.12.1999	Approbation als Apotheker
10/1994	4-wöchiges Praktikum bei Luitpold Pharma in München
Frühjahr 1995	4-wöchige Tätigkeit als studentische Hilfskraft an der LMU München
Frühjahr 1996	4-wöchige Tätigkeit als studentische Hilfskraft an der LMU München
Seit 04/1997	Kongressmitarbeiter bei der Firma Protina in Ismaning
Seit 02/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der LMU München
Seit 02/1999	Anfertigung einer Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. F. Bracher am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der LMU München
Seit 02/1999	Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik
1996 - 1997	Begabtenstipendium der Hanns-Seidel-Stiftung
06/2000 - 04/2002	Online-Stipendium von e-fellows
07/2000 - 04/2002	Promotionsstipendium der Hanns-Seidel-Stiftung