



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Vergleichende phytochemische Studien bei Vertretern von  
*Psychotria* s. l. aus dem Esquinas Regenwald in Costa  
Rica unter besonderer Berücksichtigung von *Carapichea*  
*affinis*

Verfasser

Martin Bernhard

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 438

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Botanik (Stzw) UniStG

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Prof. Dr. Harald Greger



# Inhalt

|         |                                                          |    |
|---------|----------------------------------------------------------|----|
| 1.      | Einleitung .....                                         | 1  |
| 2.      | Systematik und Morphologie .....                         | 3  |
| 2.1     | Die Ordnung Gentianales Juss. ex Bercht. & J.Presl ..... | 3  |
| 2.2     | Die Familie der Rubiaceae Juss.....                      | 4  |
| 2.3     | Die Gattung <i>Psychotria</i> L.....                     | 5  |
| 2.4     | Die Gattung <i>Carapichea</i> Aubl. ....                 | 7  |
| 2.5     | <i>Carapichea affinis</i> (Standl.) Andersson.....       | 10 |
| 3.      | Stoffklassen aus <i>Psychotria</i> s. l. ....            | 13 |
| 3.1     | Einteilung der Stoffklassen .....                        | 13 |
| 3.2     | Iridoid-Glykoside.....                                   | 16 |
| 3.3     | Tryptamin-Alkaloide .....                                | 18 |
| 3.3.1   | Mono-, di- und oligomere Tryptamine .....                | 18 |
| 3.3.2   | Tryptamin-Iridoid-Alkaloide .....                        | 22 |
| 3.4     | Dopamin-Iridoid-Alkaloide .....                          | 24 |
| 4.      | Material und Methode .....                               | 27 |
| 4.1     | Sammelgebiet.....                                        | 27 |
| 4.2     | Sammlung des Pflanzenmaterials .....                     | 29 |
| 4.3     | Extraktion des Pflanzenmaterials .....                   | 34 |
| 4.4     | Stoffauftrennung .....                                   | 35 |
| 4.4.1   | Flüssig-Flüssig-Extraktion.....                          | 35 |
| 4.4.2   | Kristallisation.....                                     | 36 |
| 4.4.3   | Säulenchromatographie.....                               | 36 |
| 4.4.3.1 | Kieselgelsäule .....                                     | 36 |
| 4.4.3.2 | Sephadex-Gelsäule .....                                  | 37 |

|         |                                                                       |    |
|---------|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4.3.3 | MPLC-Trennung .....                                                   | 38 |
| 4.4.4   | Präparative Dünnschichtchromatographie .....                          | 39 |
| 4.5     | Analytik .....                                                        | 40 |
| 4.5.1   | Analytische Dünnschichtchromatographie .....                          | 40 |
| 4.5.2   | HPLC- UV-VIS .....                                                    | 41 |
| 4.5.3   | NMR .....                                                             | 42 |
| 4.5.4   | MS .....                                                              | 42 |
| 5.      | Ergebnisse .....                                                      | 42 |
| 5.1     | Vergleichende phytochemische Analyse von <i>Psychotria</i> s. l. .... | 42 |
| 5.2     | Phytochemische Analyse von <i>C. affinis</i> .....                    | 46 |
| 6.      | Diskussion .....                                                      | 50 |
|         | Anhang .....                                                          | 53 |
|         | Datenblätter                                                          |    |
|         | Herbarbelege                                                          |    |
|         | Literaturverzeichnis                                                  |    |
|         | Danksagung                                                            |    |
|         | Curriculum vitae                                                      |    |
|         | Zusammenfassung                                                       |    |
|         | Abstract                                                              |    |
|         | Publikation des Autors zu <i>C. affinis</i>                           |    |

**Abkürzungen:**

|      |                                    |
|------|------------------------------------|
| APW  | Angiosperm Phylogeny Group Website |
| DMT  | N,N-Dimethyltryptamin              |
| IPNI | International Plant Names Index    |
| MMT  | Monomethyltryptamin                |



# 1. Einleitung

Die Familie der Kaffeeengewächse (Rubiaceae) ist weltweit verbreitet, die größte Diversität erreicht sie dabei in den tropischen Tieflandregionen Südamerikas. Sie umfasst rund 13.000 Arten (DAVIS et al., 2009). *Psychotria* L. ist mit rund 2.000 Arten (TAYLOR, 2005) die größte Gattung innerhalb dieser Familie. Jüngste molekularbiologische Untersuchungen (NEPOKROEFF et al., 1999; ANDERSSON, 2002a) hinterfragen die systematische Einteilung der Gattung. Dabei kam es zu Ausgliederungen diverser Taxa wie *Ronabea* (TAYLOR, 2004b), *Notopleura* (TAYLOR, 2001) und *Carapichea* (ANDERSSON, 2002b). Die Vertreter dieser wiedereingeführten Gattung *Carapichea* scheinen näher mit *Geophila* und *Hymenocoelus* verwandt zu sein, als mit den übrigen Arten der Gattung *Psychotria* L. (NEPOKROEFF et al., 1999; ANDERSSON, 2002b).

Phytochemisch wird *Psychotria* vor allem durch Tryptamin-Iridoid- und Polyindolin-Alkaloide sowie Iridoide charakterisiert. Durch die Akkumulation des halluzinogenen Dimethyltryptamin (DMT) nimmt *P. viridis* Ruiz & Pav. eine chemische Sonderstellung ein und hat im südamerikanischen Raum eine große kulturelle Bedeutung. Abweichend ist auch die Alkaloidausstattung von *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (= *Psychotria ipecacuanha*). Sie wird durch die Ausbildung von Dopamin-Iridoid-Alkaloiden charakterisiert. Als südamerikanische Brechwurzel galt sie früher durch das amöbizide und zytotoxische Emetin als Wunderdroge.

In der vorliegenden Arbeit soll durch breit angelegte phytochemische Vergleiche costaricanischer *Psychotria*-Arten und Vertretern von kürzlich ausgegliederten Gattungen ein Überblick über die Verteilung der charakteristischen Stoffklassen gegeben werden. Den Schwerpunkt bilden aber phytochemische Analysen bei *Psychotria borucana* (Ant.Molina) C.M. Taylor &

W.C. Burger, die kürzlich aufgrund von morphologischen Befunden und DNA-Vergleichen in eine eigene Gattung *Carapichea* gestellt wurde.

## 2. Systematik und Morphologie

### 2.1 Die Ordnung Gentianales Juss. ex Bercht. & J.Presl

Die Abgrenzung der Ordnung Gentianales Juss. ex Bercht. & J.Presl beschäftigt die Botanik seit annähernd 200 Jahren. Bentham und Hooker sprachen 1856 der Ordnung die Familien Apocynaceae, Asclepiadaceae, Gentianaceae, Loganiaceae, Oleaceae und Salvadoraceae zu. Der erste Autor, der die Familie der Rubiaceae in die Nähe der Caprifoliaceae gestellt und in die Ordnung Gentianales eingegliedert hat war Wagenitz (1959). Dahlgren bestätigte

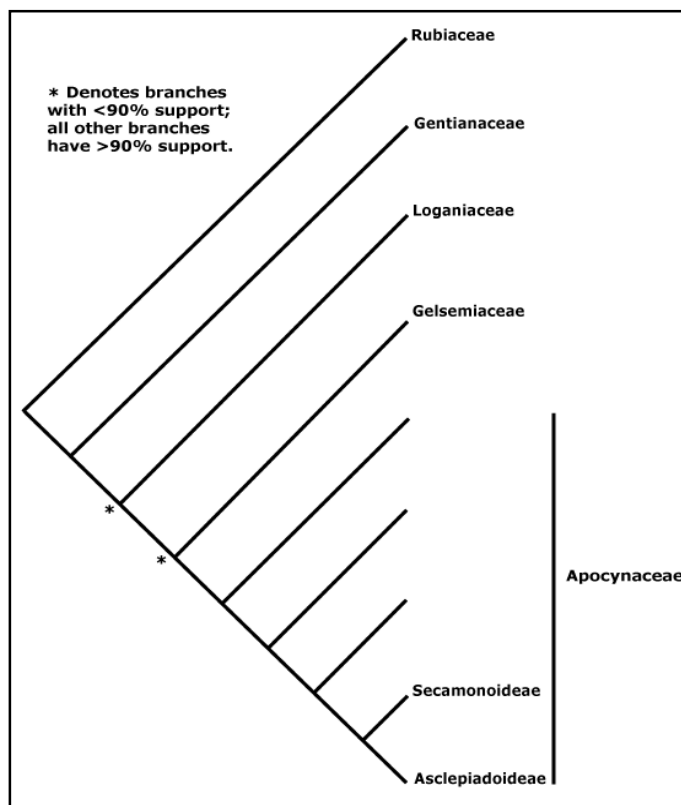


Abbildung 1: Die Ordnung Gentianales (APW, 2011)

die Eingliederung der Rubiaceae, während Cronquist sie nicht akzeptierte (NICHOLAS & BAIJNATH, 1994). Neue molekularbiologische Daten begründen eine Aufteilung der monophyletischen Ordnung Gentianales in fünf Familien: Apocynaceae, Gelsemiaceae, Gentianaceae, Loganiaceae und Rubiaceae (BACKLUND, 2000). Diese können in zwei unterschiedliche evolutionäre

Linien aufgespalten werden, mit der monophyletischen Familie der Rubiaceae (BREMER & ERIKSSON, 2009) als Schwestergruppe der übrigen vier Familien (BREMER, 1996; BREMER & ERIKSSON, 2009; APW, 2011). Gemeinsam für die

Ordnung Gentianales ist, mit wenigen Ausnahmen, eine gegenständige, ganzrandige Beblätterung mit Stipeln und eine Endospermbildung durch freie Kernteilung mit nachfolgendem Zellwandaufbau (BACKLUND, 2000).

## 2.2 Die Familie der Rubiaceae Juss.



**Abbildung 2:** Verbreitung der Rubiaceae (APW, 2011)

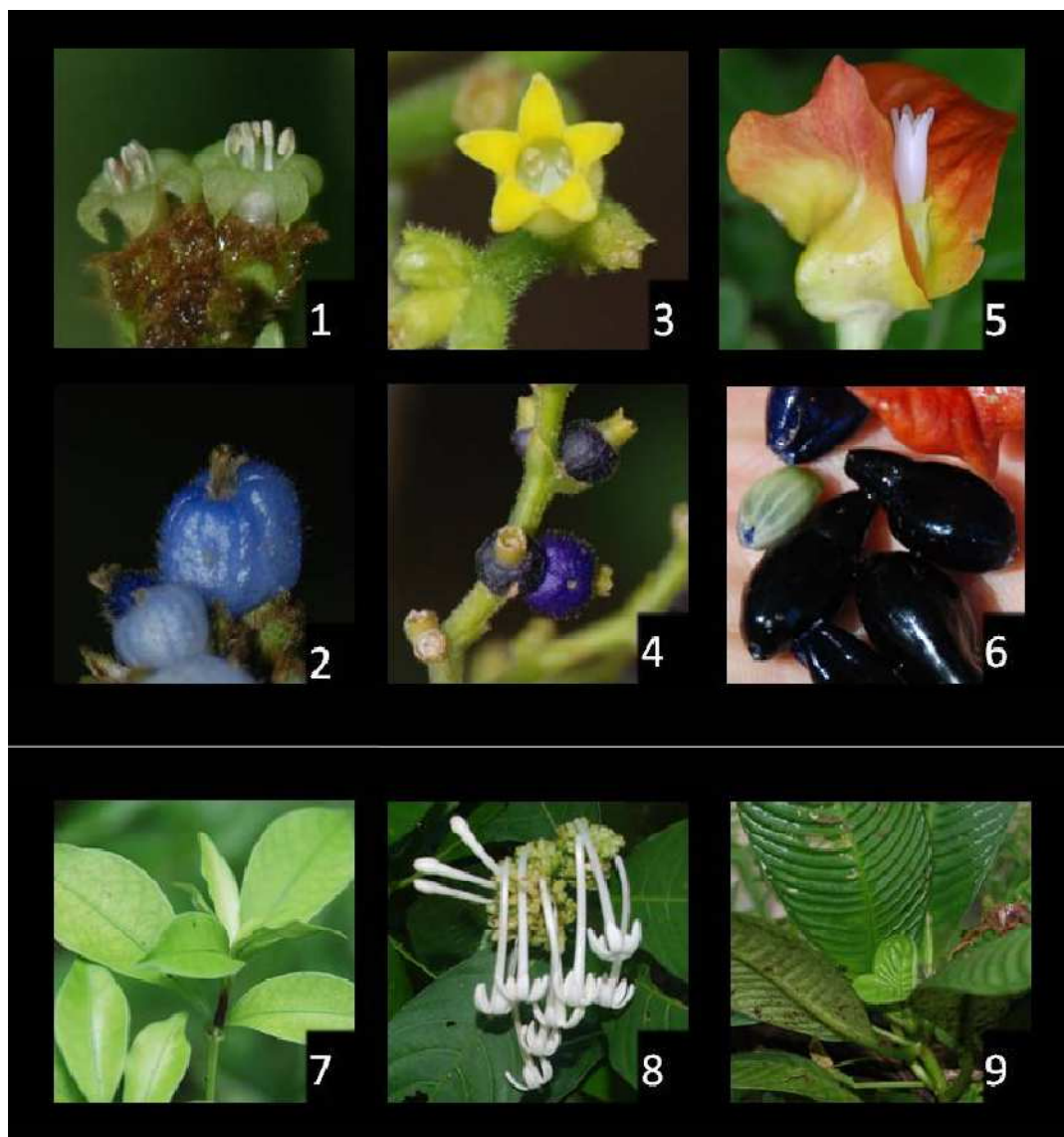
Die Familie der Rubiaceae Jussieu ist mit über 13.000 Arten in mehr als 600 Gattungen eine der größten des Pflanzenreichs (DELPRETE, 2004). Sie ist nahezu weltweit verbreitet (Abb. 2). In der Geschichte dieser Familie gab es etliche Versuche, eine natürliche Gruppierung vorzunehmen. Neuesten molekularbiologischen Daten zufolge lässt sich eine Aufteilung in die vier Zweige Coptosapelteae, Luculieae, Rubioideae und Cinchonoideae *plus* Ixoroideae durchführen (BREMER & ERIKSSON, 2009). Die Unterfamilie der Rubioideae kann man weiters, den Untersuchungen von BREMER & MANEN (2000) und RAZAFIMANDIMBISON et al. (2008) folgend, in die *Psychotrieae alliance* und die *Spermacoceae alliance* unterteilen, begleitet von vier kleineren Triben, den Ophiorrhizeae, Urophylleae, Lasiantheae und Coussareeae. Die Schwierigkeiten der Klassifikation innerhalb dieser Unterfamilie (Rubioideae) liegen darin, dass sie 11 der 20 größten Gattungen der Familie beinhaltet, was rund 40% der Rubiaceae-Arten (BREMER & ERIKSSON, 2009) ausmacht. Die *Psychotrieae alliance* beinhaltet die Triben Psychotrieae, Schradereae, Morindeae s. l., Gaertnereae und Craterispermeae (BREMER & MANEN, 2000). Die Tribus Psychotrieae gliedert sich nach ROBBRECHT & MANEN (2006) in die Triben Psychotrieae s. str. und Palicoureae. Die Gattung *Psychotria* L., mit etwa 2.000

Arten, ist die größte Gattung der Tribus Psychotrieae. s. str. (BREMER, 1996; BREMER & MANEN, 2000; ROBBRECHT & MANEN, 2006) und dementsprechend mannigfaltig in ihrer Morphologie (TAYLOR, 1996; 2001).

## 2.3 Die Gattung *Psychotria* L.

Die Gattung *Psychotria* L. ist mit rund 2.000 Arten (TAYLOR, 2005) eine der größten Gattungen im Pflanzenreich. Zahlreiche Aus- und Wiedereingliederungen diverser Taxa in die Gattung belegen die Schwierigkeiten, mit denen eine Klassifizierung dieser hochgradig paraphyletischen Gruppe einhergeht. NEPOKROEFF et al. (1999) schlugen eine Aufspaltung in zwei Großgruppen vor: *Psychotria* s. str. (zusammengesetzt aus *P.* subg. *Psychotria* und *P.* subg. *Tetramerae*), und eine Gruppe mit Vertretern aus *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*, vereint mit der Gattung *Palicourea* Aubl. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wird der Begriff *Psychotria* s. l. für die Gesamtheit der im Laufe der Zeit in das Taxon integrierten Arten, inklusive der Arten der Gattung *Palicourea* Aubl., verwendet. Die Bezeichnung *Psychotria* s. str. beinhaltet hier, nach NEPOKROEFF et al. (1999), die Untergattungen *Psychotria* und *Tetramerae*, und schließt *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* und *Palicourea* Aubl. wie auch die restlichen jüngst aus dem Taxon ausgegliederten Gattungen aus. Diese Ausgliederungen aus *Psychotria* L. betreffen die Gattungen *Ronabea* Aubl. (TAYLOR, 2004b), *Notopleura* (Benth. & Hook. F.) Bremek. (TAYLOR, 2001), *Margaritopsis* C.Wright (TAYLOR, 2005) und *Carapichea* Aubl. (ANDERSSON, 2002b). Das aus *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* und *Palicourea* Aubl. gebildete neue Taxon wird als *Heteropsychotria* plus *Palicourea* bezeichnet, da der von NEPOKROEFF et al. (1999) vorgeschlagene Namen *Psychotrophum* aufgrund der Prioritätsregeln nicht anwendbar ist (DAVIS et al., 2001).

*Psychotria* subg. *Psychotria* ist pantropisch verbreitet, mit einem Umfang von etwa 200 Arten (TAYLOR, 2005). Der verbleibende Rest, *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*, ist neotropisch verbreitet und umfasst rund 600 Arten (TAYLOR, 2005). Durch die Neukombination *Heteropsychotria* plus *Palicourea* ergibt sich eine pantropische Verbreitung (TAYLOR, 1997; NEPOKROEFF et al., 1999; ANDERSSON, 2002a). Vertreter der Gattung *Psychotria* s. str. zeichnen sich vor allem durch nicht-persistente Stipel und Pyrene ohne Keimspalten aus sowie durch die durchwegs roten Früchte, während in der Gruppe *Heteropsychotria* plus *Palicourea* die Farbe der Früchte vielfältig ist und persistente Stipel sowie Pyrene mit Keimspalten vorzufinden sind. (TAYLOR, 1996; 1997).



**Abbildung 3:** 1 und 2 *Psychotria pilosa*, Blüten und Früchte; 3 und 4 *P. solitudinum*, Blüten und Früchte; 5 und 6 *P. elata*, Blüte und Früchte; 7 *P. chagrensis*; 8 *Palicourea tetragona*; 9: *Notopleura polyphlebia*. 1-6, 8, 9: *P.* subg. *Heteropsychotria*; 7: *P.* subg. *Psychotria*; Fotos: M. Bernhard

## 2.4 Die Gattung *Carapichea* Aubl.

Die Gattung *Carapichea* Aubl. gehört zu den jüngst aus *Psychotria* s. l. ausgegliederten Taxa (ANDERSSON, 2002b). Da die Vertreter dieser Gattung Raphiden aufweisen, wurden sie der Unterfamilie der Rubioideen zugeordnet. Der Einteilung von ROBBRECHT & MANEN (2006) folgend, welche die bis dato anerkannte Tribus Psychotrieae in die Triben Psychotrieae s. str. und Palicoureae aufspalteten, zählt *Carapichea* zur Tribus Palicoureae.

Die Gattung *Carapichea* war ursprünglich von AUBLET (1775) beschrieben worden, welcher ihr die neu entdeckte Art *C. guianensis* zu Grunde legte. De Candolle übernahm und erweiterte die Gattung im Jahr 1830. Richard, im selben Jahr, und im Jahr 1873 auch Hooker, schrieben die Arten auf Grund der köpfchenartigen, von charakteristischen Hochblättern umgebenen Infloreszenz, der Gattung *Cephaelis* zu (NEPOKROEFF et al., 1999) und erkannten *Carapichea* als Gattung nicht an. Selbst Bremekamp befürwortete diesen Transfer (ANDERSSON, 2002b). Als STEYERMARK (1975) die Gattung *Cephaelis* in die Gattung *Psychotria* integrierte, waren davon natürlich auch die Arten der ehemaligen Gattung *Carapichea* betroffen, welche er jedoch als eigene *Sektion Carapichea*, innerhalb des Taxons *Psychotria* subg. *Heteropsychotria*, abgrenzte (ANDERSSON, 2002b). In der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts verblieben die Arten als Mitglieder der Gattung *Psychotria*.

In jüngerer Zeit zeigten die molekularbiologischen Untersuchungen von NEPOKROEFF et al. (1999), dass sich innerhalb der Gattung *Psychotria* ein zwei Arten umfassender Zweig (*P. borucana* und *P. ipecacuana*) ausmachen lässt, der nähere Verwandtschaft zu den Gattungen *Geophila* und *Hymenocoelus* aufweist als zu den übrigen Arten der Gattung *Psychotria*, welcher die beiden Arten seit Steyermark zugeschrieben worden waren. Nepokroeff schlug daraufhin die Ausgliederung des Zweigs vor (NEPOKROEFF et al., 1999). Doch erst als

ANDERSSON (2002b) eine dritte Art, *Psychotria ligularis* var. *carapichea* (Poir.) Steyerm. (= *P. carapichea* (Steyerm.) Delprete = *Carapichea guianensis* Aubl.), diesem speziellen Zweig zuordnen konnte, erhielt der, in den Rang einer Gattung gehobene Zweig einen Namen: *Carapichea* Aubl. Bei *Psychotria ligularis* var. *carapichea* handelte es sich nämlich um jene Art, welche von Aublet gut 300 Jahre zuvor als *Carapichea guianensis* erstbeschrieben worden war, und von der auch der Typusbeleg stammt. Andersson begründete damit die Wiedereinführung der Gattung *Carapichea*. Diese umfasst mittlerweile über 20 Arten und ist pantropisch verbreitet (TAYLOR, 2008), wenngleich ihre größte Vielfalt in Südamerika zu finden ist:

*“The center of species diversity is in northeastern South America, and this together with the morphological variation suggests that Carapichea may be a relatively older group.”* (TAYLOR, 2008)

Folgende Arten sind bislang in der Gattung *Carapichea* akzeptiert (THE PLANT LIST, 2011):

*Carapichea affinis* (Standl.) L.Andersson

*Carapichea dolichophylla* (Standl.) C.M.Taylor, basierend auf *Cephaelis dolichophylla* Standl.;

*Carapichea guianensis* Aubl.

*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L.Andersson

*Carapichea ligularis* (Rudge) Delprete

*Carapichea lucida* J.G.Jardim & Zappi

*Carapichea* weist die familientypischen Merkmale der Rubiaceen auf: allen voran die gegenständige Beblätterung mit ganzrandigen, ungeteilten Blattspreiten in Kombination mit der Ausbildung von Stipeln. Dazu kommt das Auftreten von Raphiden als Merkmal der Unterfamilie der Rubioideae. *Carapichea* lässt sich jedoch als Gattung morphologisch nur äußerst schwer von verwandten Gattungen abgrenzen. Auch die früher als wichtiges Merkmal eingestufte Struktur der Pyrene gilt mittlerweile nicht mehr als aussagekräftig. Zweifel an der natürlichen Gruppierung der Gattung kommen jedoch dadurch nicht auf, da es auch in nah verwandten Gattungen starke Variationen der morphologischen Merkmale gibt und letztlich das Zusammenspiel von Morphologie, molekularbiologischen und chemosystematischen Daten genügend Rechtfertigungen für eine Ausgliederung aus *Psychotria* L. bieten. Das am ehesten diagnostisch verwertbare Merkmal zur Unterscheidung der Gattung von verwandten Taxa dürften die Stipel sein: Diese sind bei *Carapichea* interpetiolar und nie drüsig behaart, dabei entweder persistent, oder, wenn abfallend, dann auf charakteristische Weise gelb-grau-bräunlich abtrocknend und nach und nach fragmentierend. Diese fragmentierende Abtrocknung findet man zwar auch bei *Margaritopsis*, jedoch sind deren Stipel drüsig behaart (TAYLOR, 2005). Ebenfalls charakteristisch für *Carapichea* ist eine terminale Infloreszenz mit sitzenden Blüten, angeordnet in Gruppen oder Köpfchen und fleischigen Früchten. Allgemein ist die Infloreszenz- und Blütenmorphologie jedoch vielgestaltig und als diagnostisches Gattungsmerkmal daher kaum tauglich. Ein weiteres, allen bislang der Gattung *Carapichea* zugeordneten Arten, gemeinsames Merkmal ist die Dunkelfärbung des Pflanzenmaterials bei Trocknung/Herbarisierung. Dies könnte ein Hinweis auf gattungsspezifische Inhaltsstoffe, wie z.B. Iridoide, sein. Jedoch findet sich diese Färbung auch in nah verwandten Gattungen und sie kann daher nicht zur Abgrenzung herangezogen werden.

## 2.5 *Carapichea affinis* (Standl.) Andersson

*Carapichea affinis* wurde im Jahr 1930 zunächst als *Cephaelis affinis* Standl. beschrieben. Zum damaligen Zeitpunkt hatte die Gattung *Carapichea* bereits ihre Akzeptanz eingebüßt, und es überrascht auf Grund der Infloreszenzmorphologie nicht, dass Standley sie der Gattung *Cephaelis* zuordnete (NEPOKROEFF et al., 1999; ANDERSSON, 2002b). Im Jahr 1953 wiederum wurde eine Art beschrieben, welche den Namen *Cephaelis borucana* Ant. Molina erhielt. Diese wurde in der Folge ab 1993 als *Psychotria borucana* (Ant.Molina) C.M. Taylor & W.C. Burger geführt. Es handelte sich aber bei *Cephaelis borucana* Ant. Molina keineswegs um eine Neubeschreibung, sondern um dieselbe Art, die bereits 1930 als *Cephaelis affinis* Standl. erstbeschrieben worden war. Scheinbar trat dieser Sachverhalt erst im Laufe der Wiedereinführung der Gattung *Carapichea* zu Tage und das IPNI führt zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch beide Beschreibungslinien getrennt an (IPNI, 2011), ohne einen Querverweis darauf zu geben, dass es sich bei *Psychotria borucana* (Ant.Molina) C.M. Taylor & W.C. Burger um ein Synonym von *Carapichea affinis* (Standl.) Andersson handelt (THE PLANT LIST, 2011).

Zusammenfassend ist also *Carapichea affinis* (Standl.) Andersson der derzeit akzeptierte Name der Art, basierend auf dem Basionym *Cephaelis affinis* Standl., wobei *Psychotria borucana* (Ant.Molina) C.M. Taylor & W.C. Burger, und das diesem zu Grunde liegende *Cephaelis borucana* Ant.Molina, Synonyme sind.

*C. affinis* ist ein Strauch oder Halbstrauch, der 1,5 m bis 3 m hoch wird. Die Stipel sind ovat, bis zu 18 mm lang, nicht drüsig und besitzen eine Parallelnervatur. Die Blätter sind unbehaart, breitelliptisch, dunkelgrün an der Blattoberseite und unterseits heller, ledrig, bis 30 cm lang und bis 14 cm breit, mit 8-12 Lateralnerven auf jeder Seite (Abb. 4,6). Die Infloreszenzen sind terminal und capitat, bis zu 5 cm breit und der Pedunculus kann 7-20 cm lang sein (Abb. 5, 7). Die Blüten sind stark geclustert, mit einer 1-3 mm langen Calyx. Die Corolla ist

röhrenförmig und weiß bis meist lavendelfarben, die Röhre kann bis zu 18 mm lang sein und besitzt ca. 3 mm lange, spitze Lappen. Die Früchte von *C. affinis* sind rundlich bis länglich, ca 8 mm im Durchmesser und in reifem Zustand von violetter Farbe (Abb. 7). Die Pyrene besitzen zahlreiche Rippen (BURGER & TAYLOR, 1993). *C. affinis* kommt im Süden Costa Ricas, in Ecuador und Peru vor und gedeiht in immergrünen Regenwäldern zwischen 50 m und 500 m Seehöhe.



**Abbildung 4:** *C. affinis*. Blattoberseite dunkelgrün, Unterseite heller; Foto: M. Bernhard



**Abbildung 5:** Köpfchenartiger Fruchtstand von *C. affinis* mit charakteristischen Hochblättern; Foto: M. Bernhard



**Abbildung 6:** *C. affinis*, im Regenwald der Österreicher; Foto: M. Bernhard



**Abbildung 7:** Fruchtende *C. affinis*; Foto: M. Bernhard

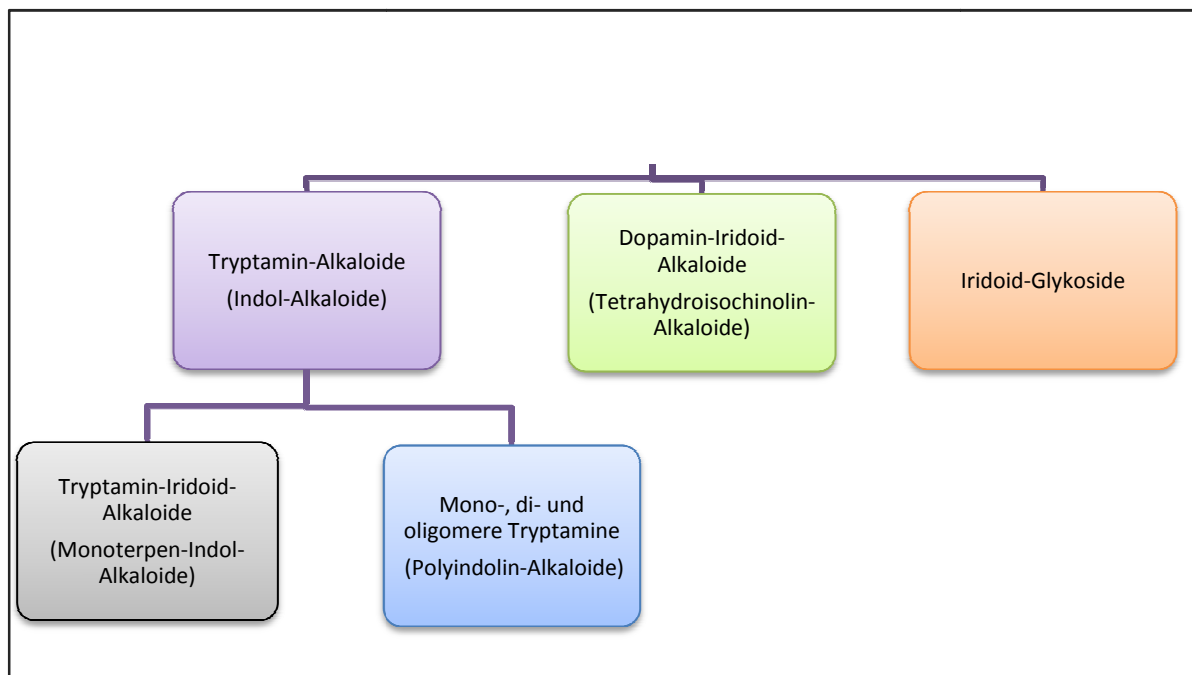
### 3. Stoffklassen aus *Psychotria* s. l.

#### 3.1 Einteilung der Stoffklassen

Die Gattung *Psychotria* erfährt durch die wachsende Zahl phytochemischer Arbeiten eine solide Basis für eine chemotaxonomische Gliederung, wobei als systematisch besonders signifikante Inhaltsstoffe Alkaloide und/oder Iridoid-Glykoside herangezogen werden (SOLIS et al., 1995; LOPES et al., 2004; BERNHARD et al., 2011; BERGER et al., 2011; PLAGG, in Vorbereitung). Demnach sind bei den Alkaloiden vor allem Derivate des Tryptamins weit verbreitet, die mit einer Iridoid-Einheit verbunden sind. Darüber hinaus gibt es aber auch Tryptamin-Derivate, die durch Polymerisation zu Polyindolin-Alkaloiden umgebaut wurden. Chemotaxonomisch bemerkenswert ist das seltenere Auftreten von Dopamin-Iridoid-Alkaloiden, wo, wie beim bekannten Emetin, noch eine zweites Dopamin an die Iridoideinheit angefügt wird. Jede dieser Gruppen wird im Folgenden näher besprochen.

N,N-Dimethyltryptamin (DMT) ist der Hauptinhaltsstoff der bekannten *P. viridis*, die im Amazonasgebiet für spirituelle Zwecke genutzt wird (McKENNA et al., 1984). In der vorliegenden Arbeit wird DMT der Gruppe der monomeren Tryptamin-Alkaloide zugeordnet.

Abb. 8 und 9 geben einen Überblick über die wichtigen Stoffklassen und ihre biosynthetischen Zusammenhänge.



**Abbildung 8:** Die dominanten Stoffklassen im Überblick

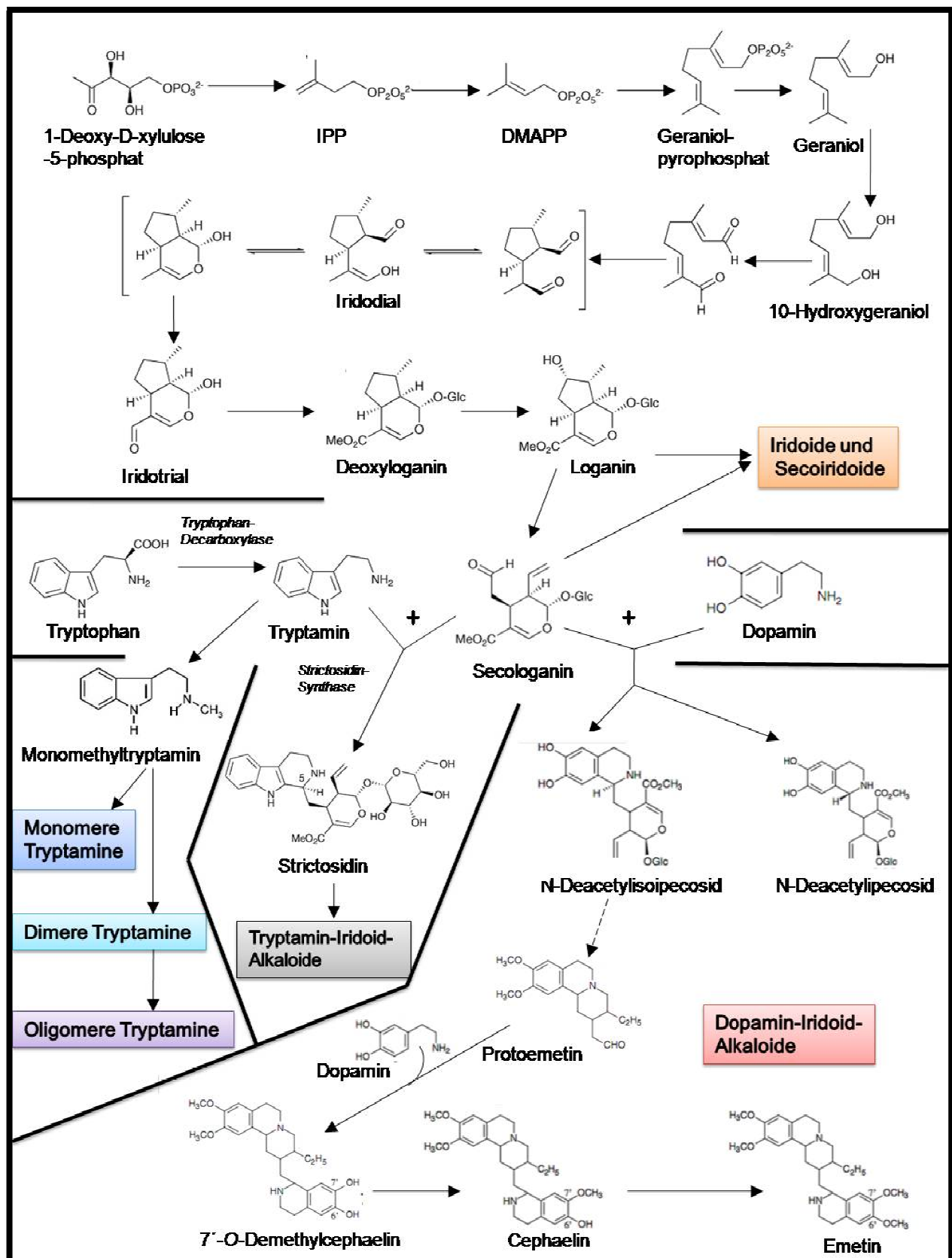
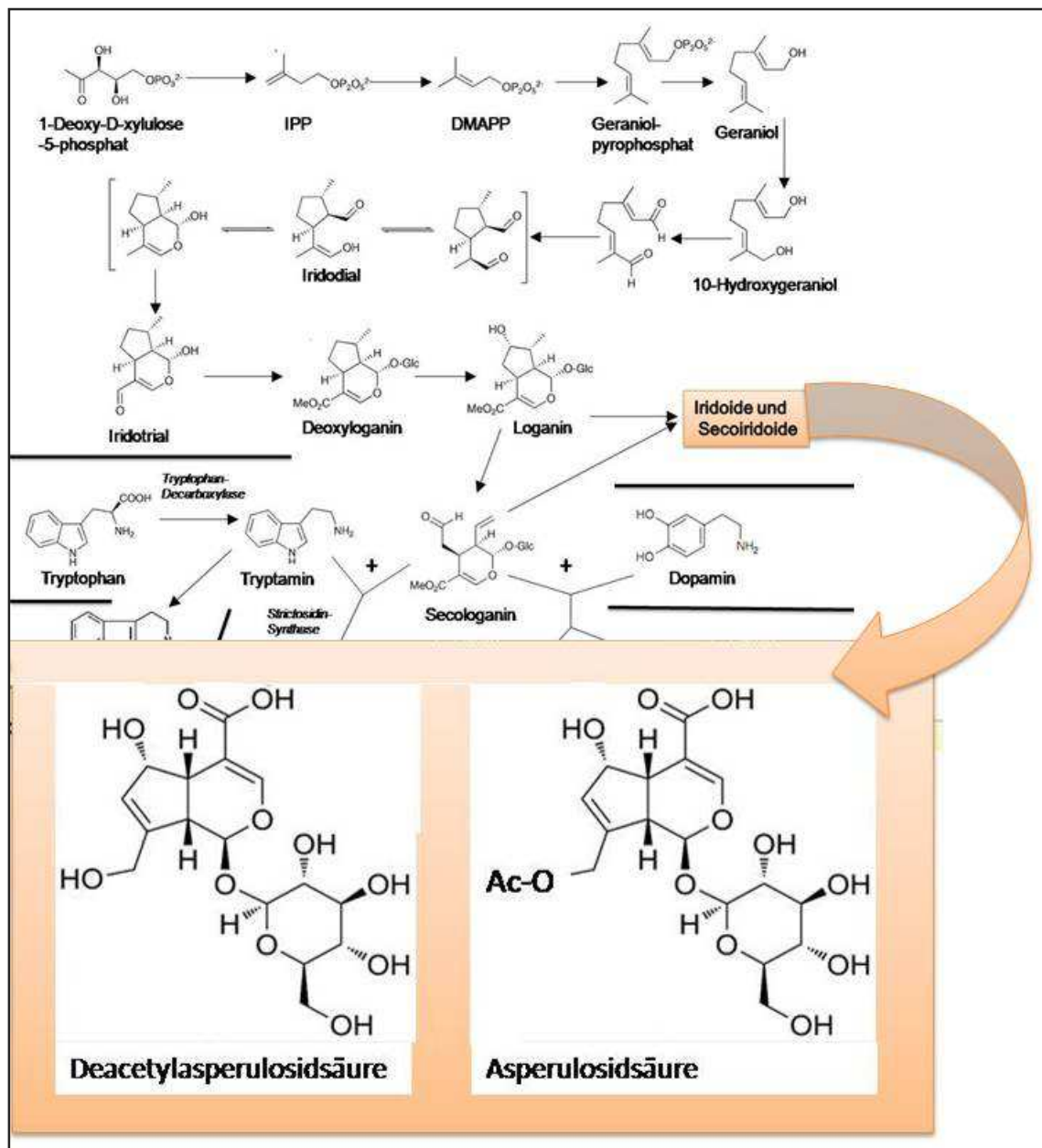


Abbildung 9: Die Biosynthese der dominanten Stoffklassen aus *Psychotria* s. l. vereinfacht dargestellt, modifiziert nach CHEONG et al., 2011, O'CONNOR & MARESH, 2006.

### 3.2 Iridoid-Glykoside

Iridoide lassen sich vom Terpenstoffwechsel ableiten und sind oft durch das Auftreten von Halbacetal- und Cyclopentanringen charakterisiert. Sie werden häufig als Glykoside akkumuliert. Oxidative Ringöffnung lässt aus dem Iridoid das Secoiridoide entstehen. Die Biosynthese des Loganin ist in Abb. 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** Die Biosynthese der Iridoid-Glykoside mit repräsentativen Stoffen aus *Psychotria* s. l., modifiziert nach O'CONNOR & MARESH, 2006.

Die Biosynthesewege der über 2500 natürlich vorkommenden Iridoide sind mittlerweile durch markierte Molekularbausteine sehr gut erforscht worden und es zeigen sich klare Unterschiede bei den Biosyntheserouten sowohl auf Ordnungs- als auch auf Familienniveau (SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001). Dadurch ergibt sich eine wichtige chemosystematische Bedeutung dieser Stoffklasse, wobei aber im Falle von *Psychotria* s. l. erst eine relativ geringe Anzahl an Untersuchungen vorliegen. Bei den alkaloidfreien Arten der Gattung *Psychotria* findet sich vornehmlich das Iridoid Asperulosid und/ oder dessen Derivate (BERGER et al., 2011). Inwiefern hier das Enzym Strictosidin-Synthase inaktiv oder fehlend ist, muss erst durch weitere Untersuchungen gezeigt werden. Nachgewiesen wurde die Substanzklasse der Iridoide bislang in mehreren Arten der Gattung *Psychotria*, wie etwa *P. leiocarpa* Cham. & Schltdl. (LOPES et al., 2004), *P. asiatica* L., *P. serpens* L. und *P. manillensis* Bartl. ex DC. (INOUE et al., 1988) sowie *P. poeppigiana* Müll.Arg. (FASSHUBER, 2011; PLAGG, in Vorbereitung). In den meisten Arten, in welchen Tryptamin-Iridoid-Alkaloide oder Dopamin-Iridoid-Alkaloide nachgewiesen wurden, ist Secologanin als Ausgangsstoff der Strictosidinsynthese bzw. der Dopamin-Iridoid-Alkaloidsynthese festgestellt worden. Es darf angenommen werden, dass einige weitere Arten der Gattung *Psychotria* Iridoide enthalten. Da sich aber bei Vortests das Interesse meist nur auf das Auffinden von Alkaloiden beschränkte, ist ihr weiteres Vorkommen nicht immer berücksichtigt worden.

Die Bioaktivität dieser Stoffklasse wurde bereits vielfach untersucht und es scheint dabei das Aglykon als „aktivierte“ Form zu fungieren. Die Hydrolyse des Glykosids könnte demnach als Schlüsselvorgang für die vielfältige Wirkung dieser Stoffklasse anzusehen sein (DOBLER et al., 2011). Nach der Abspaltung des Zuckers wirkt das Iridoid als alkylierendes Agens, welches imstande ist, kovalent durch Iminbildung an nucleophile Seitenketten zu binden und dadurch Proteine, Aminosäuren und Nukleinsäuren zu denaturieren (DOBLER et al., 2011). So erklärt

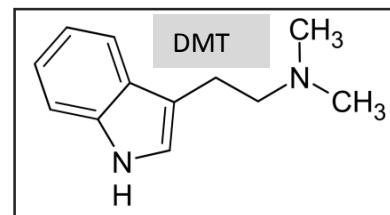
es sich, dass bei Iridoiden antibakterielle, antifungale, antioxidative, antiprotozoische sowie hepatoprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (DINDA et al., 2009). Ebenso bestätigt wurde eine Verzögerung der Larvenentwicklung von *Spodoptera eridania* bei Verfütterung von geringen Mengen an Iridoid-Glykosiden (PUTTICK et al., 1988).

### 3.3 Tryptamin-Alkaloide

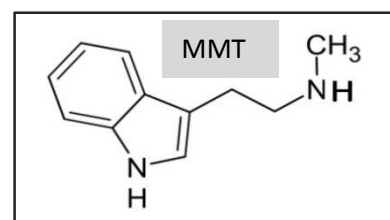
#### 3.3.1 Mono-, di- und oligomere Tryptamine

##### Monomere Tryptamine

Zu den einfachen Derivaten der monomeren Tryptamine zählt das MMT (Monomethyltryptamin, Abb. 12) sowie das besser bekannte DMT (Dimethyltryptamin, Abb. 11), welches neben den Rubiaceae noch in den Fabaceae und den Poaceae gefunden wurde. Seinen hohen Bekanntheitsgrad hat DMT als psychoaktiver Inhaltsstoff des im Amazonasbecken zu spirituellen Zwecken zubereiteten Mischgetränks *Ayahuasca* erlangt. Biosynthetisch kann man hier von einfachen, am freien Stickstoff methylierten Tryptaminabkömmlingen sprechen. Die bislang einzige Art aus der Gattung *Psychotria*, in welcher monomere Tryptamin-Derivate gesichert nachgewiesen wurden, ist *Psychotria viridis*. RIVIER & LINDGREN (1972) beschreiben hier DMT als Hauptinhaltsstoff und weisen Spuren von MMT sowie 2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin nach. Allerdings wurden von Rivier & Lindgren auch in *P. carthagenensis* Jacq. die



**Abbildung 11:** Die Struktur des N,N-Dimethyl-Tryptamin

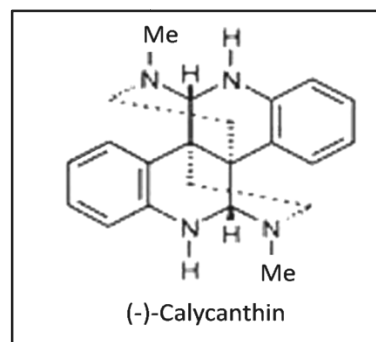


**Abbildung 12:** Die Struktur des N-Methyl-Tryptamin

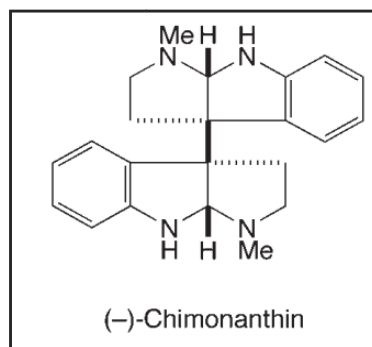
selben Stoffe nachgewiesen (RIVIER & LINDGREN, 1972). McKENNA et al. (1984) bestätigten das Vorkommen von DMT in *P. viridis*, konnten aber in *P. carthagenensis* überhaupt keine Alkaloide detektieren; was auch von LOPES et al., (2004) bestätigt wurde. Auch eigene DC-Analysen ergaben im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei *P. carthagenensis* mit Dragendorff-Reagenz keine positive Alkaloid-Reaktion. Damit besteht der Verdacht, dass es sich bei der von Rivier & Lindgren untersuchten Art nicht um *P. carthagenensis* gehandelt hat und *P. viridis* vorläufig die einzige gesicherte Quelle monomerer Tryptamin-Derivate innerhalb der Gattung *Psychotria* bleibt.

### Dimere Tryptamine

Diese Stoffe werden oft als Cyclotryptamine oder Pyrrolidinindolin-Alkaloide bezeichnet. Ihre Erforschung begann 1888 mit der Isolierung von (+)-Calycanthin aus *Calycanthus glaucus* Willd. (Abb. 13). Die Struktur dieser Verbindung konnte allerdings erst in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts aufgeklärt werden (STEVEN & OVERMAN, 2007). Der mögliche Biosyntheseweg der dimeren Tryptamin-Alkaloide durch oxidative  $\beta$ - $\beta'$ -Dimerisierung, dargestellt in Abb. 15, ist durch die typischen C<sub>3a</sub>- oder C<sub>7</sub>-Verknüpfungsmuster anzunehmen. Dieser Biosyntheseweg ist derselbe wie bei den nachfolgend besprochenen trimeren oder oligomeren Polyindolin-Alkaloiden. Neben ihrem Vorkommen in den Rubiaceae findet man dimere Tryptamin-Derivate auch in den Calycanthaceae und den Celastraceae (STEVEN & OVERMAN, 2007).

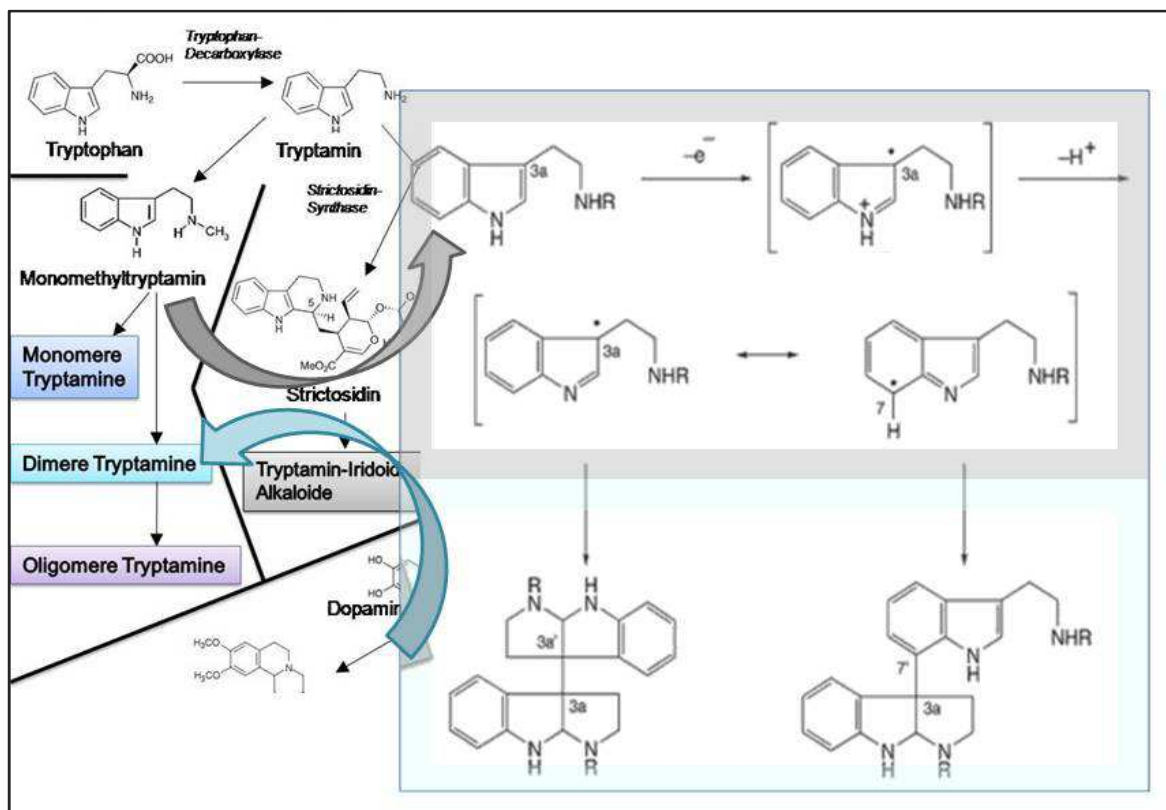


**Abbildung 13:** Struktur des (-)-Calycanthins



**Abbildung 14:** Die Struktur des (-)-Chimonanthins

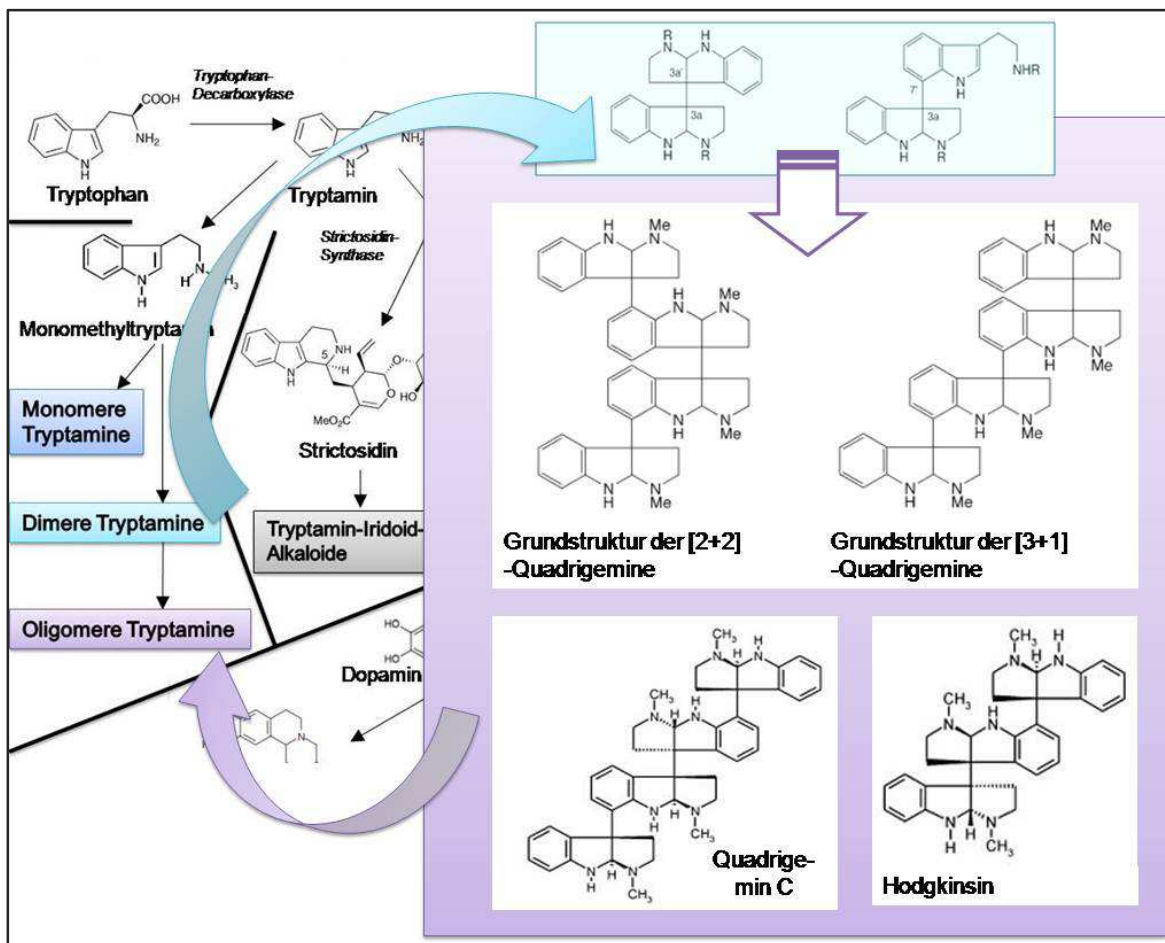
Innerhalb der Gattung *Psychotria* wurde diese Stoffklasse bislang in fünf Arten nachgewiesen und innerhalb der Gattung *Palicourea* in drei weiteren Arten: Dimere vom Calycanthin-Typ fand man in *Palicourea coriacea* (Cham.) K.Schum. (DA SILVA et al., 2008), *Palicourea ovalis* Standl. (DE GARCIA et al., 1997), *Psychotria glomerulata* (Donn.Sm.) Steyerm. (SOLIS et al., 1997), *Psychotria colorata* (Willd. ex Schult.) Müll.Arg. (VEROTTA et al., 1998; 1999), *Psychotria muscosa* (Jacq.) Steyerm. (VEROTTA et al., 1999) und *Psychotria domingensis* Jacq. (RIPPERGER, 1982), Dimere vom Chimonanthin-Typ (Abb. 14) wurden ebenfalls in *Psychotria domingensis* (RIPPERGER, 1982), *Psychotria muscosa* (VEROTTA et al., 1999), *Psychotria colorata* (VEROTTA et al., 1998; 1999) und in *Psychotria lyciiflora* (Baill.) Schltr. (JANNIC et al., 1999) beschrieben. Auch in *Palicourea alpina* (Sw.) DC. wurden dimere Tryptamin-Derivate nachgewiesen (STUART & WOO MING 1974), wobei allerdings offen bleibt, ob es sich bei Calycanthin wirklich um einen Naturstoff handelt (STEVEN & OVERMAN, 2007). Chimonanthin wandelt sich nämlich unter sauren Bedingungen sehr leicht in das thermodynamisch stabilere Calycanthin um.



**Abbildung 15:** Die Biosynthese der dimeren Tryptamin-Alkaloide ausgehend von MMT mit den bislang gefundenen C<sub>3a</sub> und C<sub>7</sub> Verknüpfungsmustern, modifiziert nach STEVEN & OVERMAN, 2007

## Oligomere Tryptamine (Polyindolin-Alkaloide)

Diese Stoffklasse wird oft auch als Cyclotryptamine oder Pyrrolidinindolin-Alkaloide bezeichnet. Es handelt sich dabei um komplexe Naturstoffe, in denen Monomethyltryptamin-Einheiten zu Trimeren oder Oligomeren höherer Ordnung verknüpft werden.



**Abbildung 16:** Die Biosynthese der Polyindolin-Alkaloide ausgehend von unterschiedlich verknüpften Tryptamin-Dimeren, mit den Grundstrukturen der Quadrigimine und dem in *Psychotria* häufigen trimeren Hodgkinsin; modifiziert nach STEVEN & OVERMAN, 2007.

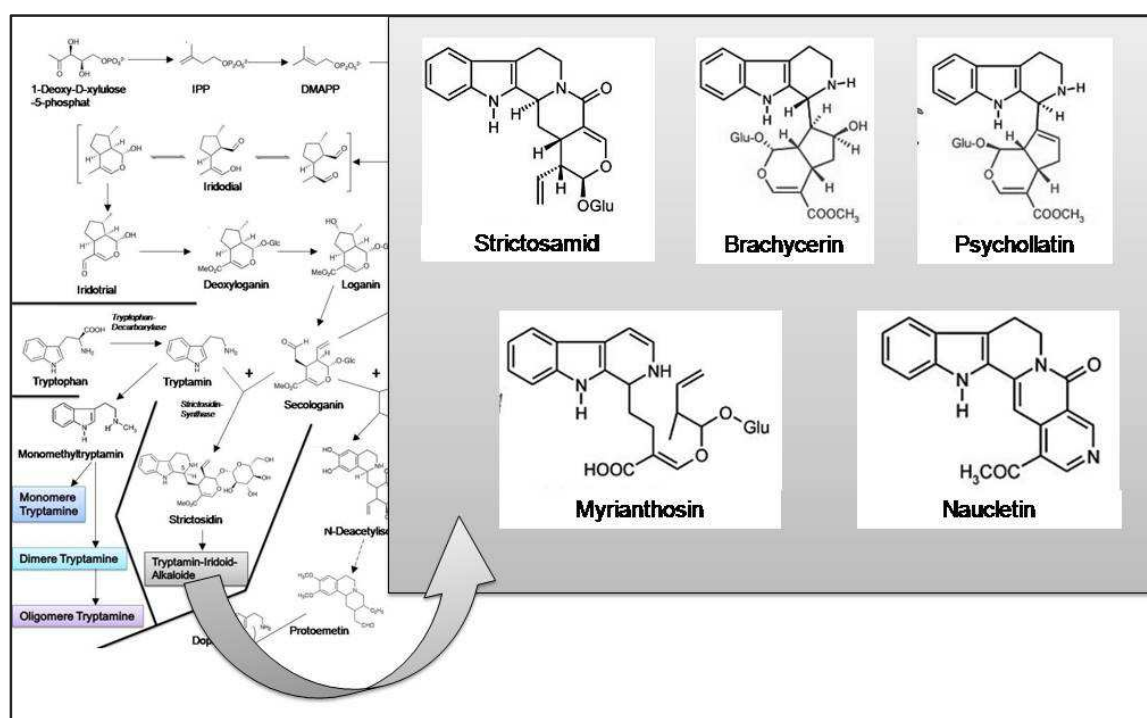
Die Biosynthese knüpft an jene der dimeren Tryptamin-Alkaloide an, welche im vorigen Kapitel besprochen wurden: zusätzliche Einheiten werden an das Dimer angeknüpft, sodass Polyindoline entstehen (Abb. 16). Das in *Psychotria*-Arten am häufigsten vorkommende neunringige Polyindolin-Alkaloid

ist Hodgkinsin. Es wurde z. B. in *P. colorata* (AMADOR et al., 2000, VEROTTA et al., 1998; 1999) und *P. lyciiflora* (JANNIC et al., 1999) nachgewiesen. Aus *Psychotria oleoides* (Baill.) Schltr. konnten eine große Zahl weiterer Polyindoline, wie etwa das Quadrigemin C und das Quadrigemin D (=Psycholein) isoliert werden (JANNIC et al., 1999). Polyindoline wurden auch in *P. rostrata* Blume (TAKAYAMA et al., 2004) nachgewiesen. Quadrigemin C und D waren die ersten nicht-peptidischen Inhibitoren von Somatostatin (RAMAHEFARIZO et al., 1995; STEVEN & OVERMAN, 2007), einem regulatorisch bedeutsamen Wirbeltierhormon, und Quadrigemin C zeigte zusätzlich antibakterielle Eigenschaften (SAAD et al., 1995). Psycholein (Quadrigemin D) entsteht sehr leicht aus dem Einwirken von Säure auf Quadrigemin C (VEROTTA et al., 1999), womit sich die Frage stellt, ob Psycholein ein Naturstoff ist oder nur ein Artefakt, das bei der Extraktion oder Trennung entstanden ist.

### 3.3.2 Tryptamin-Iridoid-Alkaloide

Diese Stoffe werden auch als Monoterpen-Indol-Alkaloide oder als Iridoid-Indol-Alkaloide bezeichnet und spielen in *Psychotria* s. l. eine bedeutende Rolle (PORTO et al., 2009). Biosynthetisch wird hier Tryptamin meist mit dem Iridoid Secologanin verbunden, wobei das Enzym Strictosidin-Synthase eine zentrale Rolle spielt. Das entstandene Strictosidin ist die Ausgangssubstanz, aus welcher sich die gesamte Stoffklasse ableiten lässt. Auch mehrere Iridoide können mit einem Tryptamin verknüpft sein (PAUL et al., 2002). Ganz allgemein sind heute bereits über 2500 Derivate dieser Stoffklasse beschrieben worden, hauptsächlich aus den drei Familien Apocynaceae, Loganiaceae und Rubiaceae (SZABÒ, 2008). Chemosystematisch bedeutsam ist einerseits das Vorhandensein einer aktiven Strictosidin-Synthase, andererseits zeigen auch verschiedene Modifikationen in

der Struktur dieser Alkaloide eine molekulare Evolution. In *Psychotria* s. l. wurden Tryptamin-Iridoid-Alkaloide bisher in über 20 Arten nachgewiesen, z. B. in *P. umbellata* Thonn. (KERBER et al., 2008), *P. brachyceras* Müll.Arg. (KERBER et al., 2001), und *P. suterella* Müll.Arg. (VAN DE SANTOS et al., 2001).



**Abbildung17:** Die Biosynthese der Tryptamin-Iridoid-Alkaloide (vereinfacht) mit repräsentativen Stoffen aus *Psychotria* s. l.

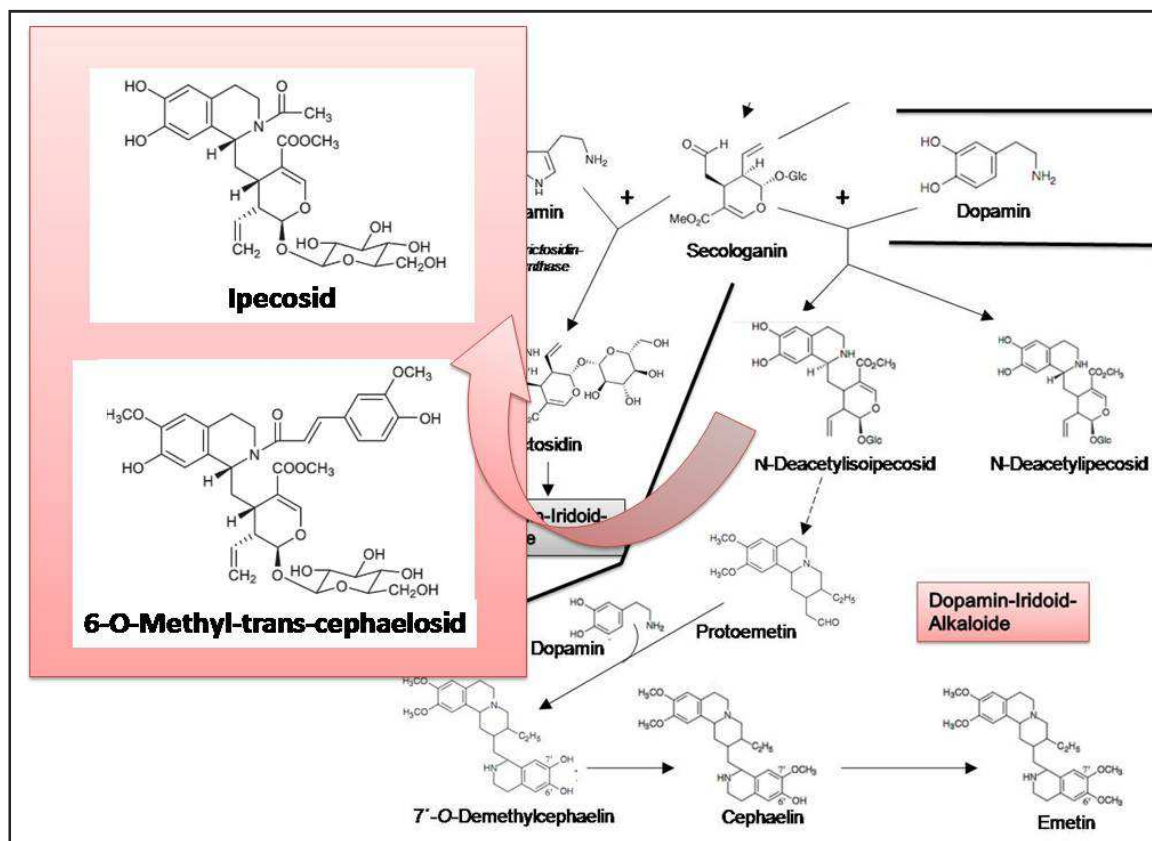
Auch aus der Gattung *Palicourea* sind Derivate dieser Stoffklasse aus verschiedenen Arten beschrieben worden, z. B. in *P. crocea* (Sw.) Schult. (NARINE et al., 2009), *P. alpina* (Sw.) DC. (STUART & WOO-MING, 1974) und *P. marcgravii* A.St.-Hil. (NARINE & MAXWELL, 2009). Viele Derivate aus anderen Pflanzenfamilien sind mittlerweile gut untersucht und werden medizinisch eingesetzt, wie etwa die bekannten Stoffe Vincristin als Mitosehemmer in der Chemotherapie zur Krebsbehandlung oder Ajmalin zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen. Von den in *Psychotria* s. l. gefundenen Stoffen konnte z. B. bei Strictosidinsäure aus *P. myriantha* Müll.Arg. eine antichemotaktische Aktivität nachgewiesen werden

(SIMÕES-PIRES et al., 2006) und der Rohextrakt dieser Pflanze zeigte eine analgetische Wirkung bei Mäusen (BOTH et al., 2002a). Weiters konnte eine opioid-ähnliche Wirkung des Umbellatin aus *P. brachypoda* (= *P. umbellata*) (LEAL & ELISABETSKY, 1996; BOTH et al., 2002b) sowie eine auf Mäuse hoch toxische Wirkung des Rohextrakts aus *P. pupigera* Schltdl. (= *P. nemorosa* Gardner) nachgewiesen werden (BOTH et al., 2002a). Ob diese Wirkung allerdings auf den Tryptamin-Iridoid-Alkaloiden beruht, ist nicht verifizierbar und bedarf weiterer Analysen. Es wird hier nur die Anwesenheit von Stoffen mit einem Indolchromophor und solchen mit einem  $\beta$ -Carbolinchromophor beschrieben, ohne jedoch die genaue Struktur der Reinstoffe aufgeklärt zu haben.

### 3.4 Dopamin-Iridoid-Alkaloide

Diese Stoffklasse leitet sich biosynthetisch von Dopamin ab und ist in *Psychotria* bisher nur in wenigen Arten festgestellt worden. Sie führen durch die Anlagerung vom Iridoid Secologanin zu Ipecosiden. Eine Verknüpfung des Ipecosids mit einer weiteren Dopamin-Einheit führt schließlich zu den bekannten Emetin-Alkaloiden (WIEGREBE et al., 1984; ITOH et al., 1999, 2002; CHEONG et al., 2011).

Die Biosynthese der Emetinalkaloide führt zunächst zu N-Desactyl-Ipecosid und N-Desacetyl-Isoipecosid (Abb.18). Davon abzuleiten sind dann durch unterschiedliche Acylierung des Stickstoffs entweder Ipecoside oder Cephaeloside und das neue Borucosid (BERNHARD et al., 2011). Eine zusätzliche Anlagerung von Dopamin führt dann zu den medizinisch bekannten Stoffen Emetin und Cephaelin.



**Abbildung 18:** Die Biosynthese der Dopamin-Iridoid-Alkaloide ausgehend von Dopamin und Secologanin, über N-Deacetylisopecosid. Mit Ipecosiden im roten Rahmen, links oben. Modifiziert nach CHEONG et al., 2011.

Emetinalkaloide wurden bislang in drei Pflanzenfamilien entdeckt: den Alangiaceae, den Icacinaceae und den Rubiaceae (WIEGREBE et al., 1984). In letzterer Familie konnte bislang in zwei Arten aus *Psychotria* s. l. das Vorhandensein dieser Stoffklasse nachgewiesen werden: in *Psychotria klugii* (MUHAMMAD et al., 2003) und in der pharmazeutisch gut bekannten und gut erforschten Brechwurzel *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L.Andersson (= *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Standl. = *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A.Rich.) (ITOH et al., 1999; 2002). Diese wurde erst 2002 in die wiedereingeführte Gattung *Carapichea* eingegliedert (ANDERSSON, 2002b). Emetin und dessen Derivate haben eine lange Geschichte: 1658 wurde die Brechwurzel von Piso nach Europa gebracht und diente daraufhin am Hof von Louis XIV als Heilmittel (ROGERS, 1912). Die Isolierung des Emetins aus der Ipecac genannten Droge gelang 1817 den Naturstoffchemikern Pelletier und Magendie (MAGENDIE & PELLETIER, 1817). Diese konnten darüber hinaus auch andere wichtige Naturstoffe, wie Chinin und

Strychnin erstmals isolieren. Emetin zeigte in Studien bislang vielfältige Bioaktivität, so konnte eine antiparasitische und antivirale Wirkung nachgewiesen werden wie auch eine Inhibition der Protein-, DNA- und RNA-Synthese (AKINBOYE & BAKARE, 2011; MUHAMMAD et al., 2003). Nicht zuletzt wurde es sehr lange pharmazeutisch als Expektorans und Emetikum genutzt. Dabei scheinen als Schlüssel für die Struktur-Wirkungs-Beziehung dieser Verbindung einerseits die spezifische Konfiguration der Stickstoffe zu sein, andererseits dürften auch die vorhandenen Methoxygruppen eine große Bedeutung für die enorme biologische Wirksamkeit dieses Stoffes haben (AKINBOYE & BAKARE, 2011).

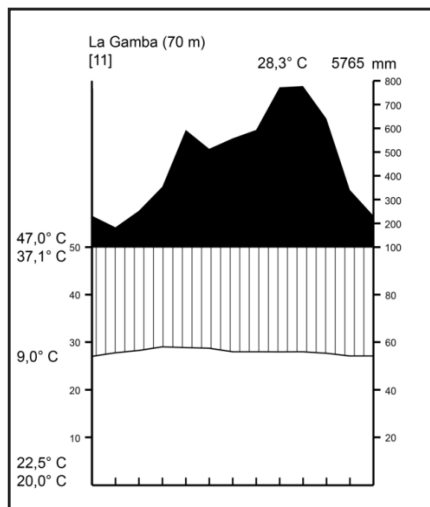
## 4. Material und Methode

### 4.1 Sammelgebiet

Costa Rica erstreckt sich über eine Fläche von 51060 km<sup>2</sup> im Herzen der Landbrücke zwischen Nord- und Südamerika, begrenzt vom Atlantischen Ozean im Nordosten und dem Pazifischen Ozean im Westen und Südwesten. Weiters teilt es sich im Norden die Grenze mit Nicaragua sowie im Süden bzw. Südosten jene mit Panama. Heute zählt die Republik Costa Rica 4,5 Millionen Einwohner und der Lebensstandard ist, gemessen am lateinamerikanischen Durchschnitt, relativ hoch. Das Land wird in 7 Provinzen unterteilt: Alajuela, Cartago, Guanacaste, Heredia, Limón, Puntarenas sowie die Hauptstadt San José. Die wirtschaftlich bedeutendsten Einnahmequellen sind einerseits die Landwirtschaft mit den Hauptexportprodukten wie Bananen, Ananas, Kaffee, Melonen oder Zucker und andererseits der Tourismus, der, bedingt durch die beeindruckende Biodiversität Costa Ricas, prädestiniert für einen Devisenmagneten im Sektor des Öko- und Erlebnisurlaubs ist (THE WORLD FACTBOOK, 2011).

Die enorme Vielfalt von schätzungsweise über 500.000 Arten (INBIO, 2011), welche in dem verhältnismäßig kleinen Land zu finden sind, lässt sich durch mehrere Faktoren begründen. Einerseits bedeutsam hierfür ist die geografische Lage des Landes inmitten zweier Ozeane und die geologische Situation, welche an der Grenzlinie der Cocos-Platte, der Karibischen Platte sowie der Nordamerikanischen und der Nazca-Platte einen Vulkangürtel entstehen ließ mit entsprechender Aktivität, reichlich vulkanischem Substrat sowie einem ausgeprägten Höhengradienten. Andererseits begünstigt auch das tropische Klima mit einer niederschlagsreicheren Zeit im Sommer und einer trockeneren Periode im Winter, wobei die Niederschläge innerhalb des Landes stark divergieren und die Trockenperiode auch fehlen kann, die

Ausbildung zahlloser unterschiedlicher Ökosysteme. Um den daraus erwachsenen biologischen Reichtum zu bewahren, haben sowohl private als auch staatliche Institutionen Initiativen ins Leben gerufen, sodass mittlerweile mehr als 25% des Landes in verschiedene Schutzgebiete (*Àreas de conservaciòn*) eingegliedert wurden, welche in einem zentralen System (SINAC- *Sistema nacional de àreas de conservaciòn de Costa Rica* in Zusammenarbeit mit CONAGEBIO- *Comisiòn Nacional de Gestión de la Biodiversidad*) verwaltet werden (INBIO, 2011).



**Abbildung 19:** Klimadiagramm von La Gamba; WEISSENHOFER, 2005

La Gamba ist ein kleines Dorf, gelegen bei 8°42' N und 83°13' W und in 70 m Meereshöhe im Südwesten der Provinz Puntarenas, nahe dem Golfo Dulce und der Hafenstadt Golfito. Beim fast an das Dorf heranreichenden *Bosque Esquinas* handelt es sich um einen perhumiden Tieflandregenwald, der sich ausgehend von Seehöhe bis zu seiner höchsten Erhebung, dem *Cerro Nicuesa*, von 579 m erstreckt. Er liegt größtenteils zwischen 8°27'- 8°41' N und 83°15'- 83°45' W. Charakterisiert wird er durch

das Fehlen einer ausgeprägten Trockenzeit und einen Jahresniederschlag von mehr als 5000 mm, vergleichbar mit dem auf der Halbinsel Osa westlich des Golfo Dulce gelegenen *Parque Nacional Corcovado* (HUBER, 2005). Die Luftfeuchtigkeit ist ganzjährig sehr hoch mit durchschnittlichen Werten über 97% innerhalb des Primärwaldes (HUBER, 2005). Der *Bosque Esquinas* ist mit 142 km<sup>2</sup> und seinen rund 3.000 Pflanzenarten einer der artenreichsten Wälder der Erde (WEISSENHOFER, 2005) und wurde 1999 zum Nationalpark *Piedras Blancas* umgewandelt. Dieser ist Teil des biologischen Korridors Osa, einem Projekt zur Verbindung der beiden Nationalparks Corcovado und Piedras Blancas mittels eines Schutzgebietes, der *Golfo Dulce Forest Reserve*, mit einer Größe von 592 km<sup>2</sup>, welche wesentlich zur Erhaltung der Biodiversität beiträgt. Bisher wurden im Gebiet um die Halbinsel Osa und den Golfo Dulce über 3.000 Gefäßpflanzenarten aus über 200 Familien erfasst, darunter auch



**Abbildung 20:** Der biologische Korridor Osa im Südwesten von Costa Rica verbindet den Corcovado mit dem Piedras Blancas Nationalpark; INBIO, 2011

139 endemische Arten (INBIO, 2011). Arten der *Psychotria* s. l.-Gruppe sind im Gebiet stark vertreten (WILL & KIEHN, 2008).

Der Verein „Regenwald der Österreicher“ unter der Initiative von Michael Schnitzler kaufte im Laufe der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts aus Spendengeldern eine am Rande des Regenwaldes gelegene

Finca, um sie in eine biologische Forschungsstation umzuwandeln. Der Rest der Spendengelder wurde in den Schutz des *Bosque Esquinas* investiert, um Grundstücke freizukaufen. Durch weitere Spenden konnte bis zum heutigen Zeitpunkt die Forschungsstation modernisiert und ausgebaut sowie über 4.000 ha des Regenwaldes freigekauft werden (REGENWALD DER ÖSTERREICHER, 2011).

## 4.2 Sammlung des Pflanzenmaterials

Jedes in dieser Diplomarbeit gesammelte Individuum wurde mit einer eigenen Sammelnummer versehen und mit mindestens zwei Herbarbelegen dokumentiert. Die fortlaufenden Sammelnummern ermöglichen spätere Rückschlüsse auf Divergenzen der chemischen Muster innerhalb von Arten, auf Populations- und Individuenebene. Von allen Arten wurden die Laubblätter gesammelt und zusätzlich, soweit möglich, die Stammrinde. Des weiteren konnte bei vielen Arten auch die Wurzelrinde gewonnen werden sowie, falls vorhanden, Früchte oder Blüten. Das Pflanzenmaterial wurde im Trockenschrank der Tropenstation bei annähernd 35°C fast gänzlich getrocknet. Die Resttrocknung erfolgte dann im klimatisierten Labor der

Tropenstation bei 28°C und geringer Luftfeuchtigkeit, bevor sie in Papiersäcken verpackt und für den Transport nach Wien bereit gemacht wurden. Herbarbelege kamen einerseits in das Herbar (WU) zur Archivierung nach Wien, andererseits wurden Duplikate in das *Museo Nacional de Costa Rica* nach San José gebracht. Die Ausfuhr erfolgte unter Genehmigung des *Ministerio del Ambiente y Energia* mit der Nummer DGV5-801-2008 .



**Abbildung 21:** Gesammelte Vertreter der *Psychotria* s. l. bei ihrer Archivierung in der Tropenstation La Gamba. Foto: M. Bernhard

Die Liste der gesammelten Arten:

*Carapichea affinis* (Standl.) L.Andersson (= *Psychotria borucana* (Ant.Molina) C.M.

Taylor & W.C. Burger)

*Notopleura macrophylla* (Ruiz & Pav.) C.M.Taylor (= *Psychotria macrophylla* Ruiz & Pav.)

*Notopleura polyphlebia* (Donn.Sm.) C.M.Taylor (= *Psychotria polyphlebia* Donn.Sm.)

*Palicourea tetragona* (Donn Sm.) C.M. Taylor & Lorence (= *Psychotria chiapensis* Standl.)

*Psychotria acuminata* Benth.

*Psychotria buchtienii* (H.J.P.Winkl.) Standl.

*Psychotria capitata* Ruiz & Pav.

*Psychotria chagrensis* Standl.

*Psychotria cooperi* Standl.

*Psychotria deflexa* DC.

*Psychotria elata* (Sw.) Hammel

*Psychotria marginata* Sw.

*Psychotria mortoniana* Standl.

*Psychotria pilosa* Ruiz & Pav.

*Psychotria poeppigiana* Müll.Arg.

*Psychotria racemosa* Rich.

*Psychotria solitudinum* Standl.

*Ronabea latifolia* Aubl. (= *Psychotria erecta* (Aubl.) Standl. & Steyererm.)

Eine genaue Zusammenstellung der gesammelten Individuen bzw. der jeweils gesammelten Organe mit dem dazugehörigen Trockengewicht ist in Tab. 1 dargestellt. Herkünfte von *Carapichea affinis*, die im Rahmen dieser Diplomarbeit genauer untersucht wurden, sind grau unterlegt.

**Tabelle 1:** Gesammelte Individuen mit Trockengewicht der jeweiligen Pflanzenorgane

| Nr.  |      |     | Art               |                    | Blätter | Wurzel | Stamm  | Inflo-<br>reszenz | Früch-<br>te |
|------|------|-----|-------------------|--------------------|---------|--------|--------|-------------------|--------------|
| HG24 | 0708 | 14  | <i>Psychotria</i> | <i>acuminata</i>   | 41 g    | 21 g   | 15 g   |                   |              |
| HG24 | 0708 | 15  | <i>Psychotria</i> | <i>acuminata</i>   | 18 g    | 7 g    | 5 g    |                   |              |
| HG24 | 0708 | 2   | <i>Psychotria</i> | <i>acuminata</i>   | 56 g    | 18 g   | 7 g    |                   |              |
| HG20 | 0708 | 9   | <i>Psychotria</i> | <i>acuminata</i>   | 58 g    | 20 g   | 8,5 g  |                   | 21 g         |
| HG20 | 0708 | 1   | <i>Psychotria</i> | <i>acuminata</i>   | 23 g    | 23 g   | 3 g    |                   |              |
| HG19 | 0708 | 1   | <i>Carapichea</i> | <i>affinis</i>     | 9 g     |        | 4 g    |                   |              |
| HG20 | 0708 | 5   | <i>Carapichea</i> | <i>affinis</i>     | 33 g    |        | 16 g   |                   |              |
| HG20 | 0708 | 4   | <i>Carapichea</i> | <i>affinis</i>     | 16 g    | 19 g   | 11 g   |                   |              |
| HG19 | 0708 | 2   | <i>Carapichea</i> | <i>affinis</i>     | 30 g    |        | 8 g    |                   |              |
| HG20 | 0708 | 6   | <i>Carapichea</i> | <i>affinis</i>     | 41 g    | 16 g   | 35 g   |                   |              |
| HG24 | 0708 | 9   | <i>Psychotria</i> | <i>capitata</i>    | 16 g    | 2,7 g  | 7 g    |                   |              |
| HG24 | 0708 | 16  | <i>Psychotria</i> | <i>capitata</i>    | 18 g    |        |        |                   |              |
| HG24 | 0708 | 12  | <i>Psychotria</i> | <i>capitata</i>    | 37 g    |        |        |                   |              |
| HG19 | 0708 | 6   | <i>Psychotria</i> | <i>capitata</i>    | 19 g    |        | 7 g    |                   |              |
| HG26 | 0708 | 5   | <i>Psychotria</i> | <i>capitata</i>    | 40 g    |        | 8 g    |                   |              |
| HG24 | 0708 | 11  | <i>Psychotria</i> | <i>capitata</i>    | 149 g   |        | 20 g   |                   |              |
| HG19 | 0708 | 12  | <i>Psychotria</i> | <i>capitata</i>    | 65 g    |        | 3,3 g  |                   |              |
| HG19 | 0708 | 12  | <i>Psychotria</i> | <i>capitata</i>    | 74 g    |        |        |                   |              |
| HG23 | 0708 | 2   | <i>Psychotria</i> | <i>chagrensis</i>  | 3 g     |        | 1,5 g  |                   |              |
| HG22 | 0708 | 8   | <i>Psychotria</i> | <i>chagrensis</i>  | 20 g    | 32 g   | 4 g    |                   |              |
| HG26 | 0708 | 2   | <i>Psychotria</i> | <i>chagrensis</i>  | 26 g    | 12 g   | 3 g    |                   |              |
| HG28 | 0708 | 1   | <i>Psychotria</i> | <i>chiapensis</i>  | 57 g    |        |        | 8 g               |              |
| HG19 | 0708 | 13  | <i>Psychotria</i> | <i>chiapensis</i>  | 84 g    |        |        | 7,5 g             |              |
| HG22 | 0708 | 10  | <i>Psychotria</i> | <i>deflexa</i>     | 18 g    |        | 1 g    |                   |              |
| HG22 | 0708 | 1   | <i>Psychotria</i> | <i>deflexa</i>     | 22 g    |        | 2 g    |                   |              |
| HG24 | 0708 | 1   | <i>Psychotria</i> | <i>elata</i>       | 142 g   |        | 38 g   | 27 g              |              |
| HG24 | 0708 | 1   | <i>Psychotria</i> | <i>elata</i>       | 138 g   |        | 44,5 g | 33 g              |              |
| HG20 | 0708 | 8   | <i>Ronabea</i>    | <i>latifolia</i>   | 171 g   | 59 g   | 42 g   |                   | 16 g         |
| HG29 | 0708 | 2   | <i>Psychotria</i> | <i>macrophylla</i> | 8 g     | 22 g   |        |                   |              |
| HG30 | 0708 | 3   | <i>Psychotria</i> | <i>marginata</i>   | 14 g    |        |        |                   |              |
| HG24 | 0708 | 7   | <i>Psychotria</i> | <i>mortoniana</i>  | 87 g    |        |        | 16,5 g            |              |
| HG24 | 0708 | 7   | <i>Psychotria</i> | <i>mortoniana</i>  | 58 g    |        | 50 g   |                   |              |
| HG24 | 0708 | 3-5 | <i>Psychotria</i> | <i>mortoniana</i>  | 69+49 g |        |        |                   |              |
| HG24 | 0708 | 8/1 | <i>Psychotria</i> | <i>buchtienii</i>  | 84 g    |        |        |                   |              |
| HG24 | 0708 | 8/2 | <i>Psychotria</i> | <i>buchtienii</i>  | 98 g    |        | 26 g   |                   |              |
| HG26 | 0708 | 7   | <i>Psychotria</i> | <i>buchtienii</i>  | 134 g   |        |        |                   |              |
| HG26 | 0708 | 6   | <i>Psychotria</i> | <i>pilosa</i>      | 25 g    | 22 g   |        | 8 g               |              |
| HG19 | 0708 | 8   | <i>Psychotria</i> | <i>pilosa</i>      | 63 g    |        | 18 g   | 6 g               |              |

| Nr.  |      |    | Art               |                    | Blätter | Wurzel | Stamm  | Inflo-<br>reszenz | Früch-<br>te |
|------|------|----|-------------------|--------------------|---------|--------|--------|-------------------|--------------|
| HG19 | 0708 | 7  | <i>Psychotria</i> | <i>pilosa</i>      | 63 g    |        | 14,4 g | 5,25 g            |              |
| HG20 | 0708 | 7  | <i>Psychotria</i> | <i>pilosa</i>      | 44 g    | 23 g   | 26 g   | 3,5 g             |              |
| HG30 | 0708 | 1  | <i>Psychotria</i> | <i>poepigiana</i>  | 154 g   | 27 g   | 21 g   | 23 g              |              |
| HG26 | 0708 | 1  | <i>Psychotria</i> | <i>poepigiana</i>  | 28 g    | 8 g    | 5,5 g  |                   |              |
| HG30 | 0708 | 2  | <i>Psychotria</i> | <i>poepigiana</i>  | 10 g    | 4 g    | 7 g    |                   |              |
| HG29 | 0708 | 6  | <i>Notopleura</i> | <i>polyphlebia</i> | 10 g    | 8 g    | 9 g    |                   |              |
| HG29 | 0708 | 4  | <i>Notopleura</i> | <i>polyphlebia</i> | 3 g     |        |        |                   |              |
| HG31 | 0708 | 12 | <i>Psychotria</i> | <i>racemosa</i>    | 31 g    |        | 4,4 g  |                   |              |
| HG31 | 0708 | 11 | <i>Psychotria</i> | <i>racemosa</i>    | 12 g    |        |        |                   |              |
| HG19 | 0708 | 9  | <i>Psychotria</i> | <i>racemosa</i>    | 36 g    |        |        |                   |              |
| HG26 | 0708 | 3  | <i>Psychotria</i> | <i>solitudinum</i> | 92 g    |        | 12 g   |                   |              |
| HG26 | 0708 | 3  | <i>Psychotria</i> | <i>solitudinum</i> | 111 g   |        |        |                   |              |
| HG20 | 0708 | 2  | <i>Psychotria</i> | <i>solitudinum</i> | 166 g   | 78 g   | 57 g   |                   | 3,5 g        |
| HG19 | 0708 | 3  | <i>Psychotria</i> | <i>solitudinum</i> | 68 g    |        | 11 g   | 2,25 g            |              |
| HG30 | 0708 | 5  | <i>Psychotria</i> | <i>cooperi</i>     | 26 g    |        |        |                   |              |
| HG19 | 0708 | 11 | <i>Psychotria</i> | <i>buchtienii</i>  | 54 g    |        |        |                   |              |
| HG24 | 0708 | 10 | <i>Psychotria</i> | <i>buchtienii</i>  | 38 g    |        |        |                   |              |
| HG24 | 0708 | 13 | <i>Psychotria</i> | <i>buchtienii</i>  | 74 g    |        |        |                   |              |
| HG19 | 0708 | 10 | <i>Psychotria</i> | <i>sp.</i>         | 27 g    |        | 6 g    |                   |              |



Abbildung 22: Herbarisierung von *C. affinis* im Zuge der Sammelreise. Foto: M. Bernhard

### 4.3 Extraktion des Pflanzenmaterials

Das Pflanzenmaterial wurde mittels eines handelsüblichen Mixers zerkleinert, mit Methanol überschichtet und lichtgeschützt 7 Tage bei Raumtemperatur extrahiert. Darauf folgte die Abfiltrierung und eine zweite und dritte Extraktion mit demselben Zeitrahmen. Der Extrakt wurde daraufhin zur Trockene eingengt und in wenig MeOH aufgenommen. Der so erhaltene Rohextrakt wurde weiterverarbeitet bzw. bei -19°C gelagert. Für die vergleichende Untersuchung der Rohextrakte wurden die in Tab. 2 aufgelisteten Individuen in der angeführten Konzentration eingesetzt.

**Tabelle 2:** Individuen deren Rohextrakte einer vergleichenden, phytochemischen Untersuchung unterzogen wurden.

| Sammelnummer | Art                                                          | Trockengewicht/MeOH |
|--------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|
| HG2207081    | <i>Psychotria deflexa</i> DC.                                | 5 g / 5 ml          |
| HG2407087    | <i>Psychotria mortoniana</i> Standl.                         | 5 g / 5 ml          |
| HG3007082    | <i>Psychotria poeppigiana</i> Müll.Arg.                      | 10 g / 20 ml        |
| HG19070812   | <i>Psychotria capitata</i> Ruiz & Pav.                       | 5 g / 6 ml          |
| HG2407081    | <i>Psychotria elata</i> (Sw.) Hammel                         | 10 g / 10 ml        |
| HG2407082    | <i>Psychotria acuminata</i> Benth.                           | 10 g / 10 ml        |
| HG1907087    | <i>Psychotria pilosa</i> Ruiz & Pav.                         | 10 g / 10 ml        |
| HG2607082    | <i>Psychotria chagensis</i> Standl.                          | 5 g / 10ml          |
| HG2607087    | <i>Psychotria buchtienii</i> (H.J.P.Winkl.) Standl.          | 10 g / 10 ml        |
| HG1907083    | <i>Psychotria solitudinum</i> Standl.                        | 5 g / 10ml          |
| HG31070811   | <i>Psychotria racemosa</i> Rich.                             | 5 g / 10 ml         |
| HG2907086    | <i>Notopleura polyphlebia</i> (Donn.Sm.) C.M.Taylor          | 5 g / 10 ml         |
| HG1907082    | <i>Carapichea affinis</i> (Standl.) L.Andersson              | 10 g / 10 ml        |
| HG19070813   | <i>Palicourea tetragona</i> (Donn Sm.) C.M. Taylor & Lorence | 10 g / 10 ml        |
| HG2007088    | <i>Ronabea latifolia</i> Aubl.                               | 10 g / 10 ml        |

Zu vergleichenden Untersuchungen der verschiedenen Organe von *C. affinis* wurden je 5 g Trockenmaterial der Aufsammlung HG2007084 extrahiert und nach Einengen in je 10 ml MeOH in Lösung gebracht. Diese wurden dann einer analytischen DC und einer HPLC-UV-Messung unterzogen. Vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Individuen von *C. affinis* wurden mit derselben Menge an Trockenmaterial und Analyseverfahren durchgeführt.

Zur Stoffaufklärung von *C. affinis* wurden 14 g Wurzelrinde der Aufsammlung HG2007084 extrahiert und mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion laut folgendem Kapitel weiterverarbeitet. Dieselbe Vorgehensweise wurde mit 35 g Blattmaterial der Aufsammlung HG2007086 vorgenommen.

## 4.4 Stoffauftrennung

### 4.4.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Um die unterschiedliche Löslichkeit der im Rohextrakt enthaltenen Stoffe bzw. Stoffklassen auszunutzen wurden mehrere Schritte einer Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde der methanolische Rohextrakt zur Trockene gebracht, in etwa 100 ml Wasser gelöst und in einem Scheidetrichter 5 Mal mit je 50 ml  $\text{CHCl}_3$  extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden zur Trockene gebracht und, in etwas MeOH gelöst, als Chloroformphase weiterverarbeitet bzw. im Gefrierschrank aufbewahrt. Die im Scheidetrichter verbliebene Wasserphase wurde in weiterer Folge noch 5 Mal mit je 50 ml EtOAc bzw. bis zum Erreichen einer farblosen EtOAc-Phase extrahiert und die vereinigten Extrakte eingeeengt, in Methanol gelöst und als Ethylacetatphase weiterverarbeitet bzw. gelagert. Die verbliebene Wasserphase wurde

ebenfalls zur Trockene gebracht und, in etwas Methanol gelöst, kühl gelagert bzw. weiter analysiert.

#### 4.4.2 Kristallisation

Um aus kleinen Mengen schwer trennbarer Stoffgemische Reinsubstanzen zu erhalten kann manchmal auch fraktionierte Kristallisation zielführend sein. Hier wurde aus ausgewählten Fraktionen eine gesättigte Lösung aus leicht gewärmtem MeOH langsam auf Raumtemperatur gebracht, gefolgt von einer lichtgeschützten Diffusion von Diethylether in die methanolische Lösung. Es entstand dabei ein amorpher oder mikrokristalliner Niederschlag. Diese Präzipitation wurde durch Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes getrennt und zur weiteren Auftrennung verwendet. So wurde aus den Trockensäulenfraktionen 11-13 aus der Wurzelrinde von *C. affinis* (HG2007084) eine kristalline Ausfällung erreicht. Durch nachfolgende präparative DC wurden dann daraus die Reinstoffe gewonnen.

#### 4.4.3 Säulenchromatographie

##### 4.4.3.1 Kieselgelsäule

Um eine grobe Auftrennung größerer Mengen des Extraktes bzw. der Fraktion zu erreichen wurde eine drucklose Säule angefertigt. Diese basiert auf dem Prinzip der adsorptiven Trennung, der Verteilung von Stoffen zwischen mobiler und stationärer Phase bedingt durch ihre Adsorption. Als stationäre Phase diente Kieselgel (Merck® Silicagel 60, 0.2-0.5), welches in der mobilen Phase aufgeschlämmt und in die 20 mm dicke und 800 mm lange Säule gefüllt wurde.

In der vorliegenden Untersuchung wurde auf diese Weise die Wasserphase des Wurzelextrakts von *C. affinis* (HG2007084) mit 800 ml eines konstanten Eluents ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH, 85 : 15) getrennt. Sie wurden zu zwei Portionen vereinigt, wobei die Fraktionen 11-13 durch Präzipitation und die Fraktionen 14-18 mit präparativer DC getrennt wurden.

Bei der Wasserphase aus den Blättern von *C. affinis* (HG2007086) fand eine Gradientenelution statt. Hier war reines  $\text{CHCl}_3$  der Ausgangseluent und es wurde bis zu einem Anteil von 60%  $\text{CHCl}_3$  in 10%-Schritten der MeOH-Anteil gesteigert, wobei mit je 100 ml eluiert wurde. Darauf folgten 20%-Schritte beim Verhältnis der beiden Solventien mit stetiger Zunahme des Methanolgehalts und damit der Polarität, bis abschließend mit der Elution von 200 ml reinem Methanol der Trennungsvorgang abgeschlossen wurde. Bei beiden Trennungen wurde mit einer Geschwindigkeit von einem Tropfen/Sekunde eluiert und das Eluat in 30 ml-Fractionen aufgefangen, woraus sich eine Anzahl von etwa 30 Fraktionen ergab. Aufgrund einer analytischen DC wurde die Reinheit der Fraktionen überprüft und gegebenenfalls wieder vereinigt. In Konzentrationen von 1 mg/ml oder 5 mg/ml wurden sie in MeOH für die weitere Bearbeitung gelöst.

#### 4.4.3.2 Sephadex-Gelsäule

Dieses Auftrennungsverfahren, das im Unterschied zur adsorptiven Trennung der Silicagelsäule auf einem Größenausschlussprinzip beruht, verwendet als stationäre Phase meist modifizierte Dextrane. Dabei wurde Sephadex LH-20 (GE Healthcare) in einer Säule von 900 mm Länge und 40 mm Durchmesser eingesetzt. Damit wurde die Wasserphase des Blattmaterials von *C. affinis* (HG2007086) getrennt. Dazu wurden 550 mg in Form einer im Laufmittel gesättigten Lösung auf die Säule aufgetragen und bei konstanter mobiler Phase von  $\text{CHCl}_3$  : MeOH im Volumsverhältnis von 85 : 15 eluiert. Es wurde in 15 ml-Fractionen geschnitten bis 500 ml des

Eluats durch die Säule gelaufen waren. Dann wurden noch zwei Mal mit je 100 ml nachgespült und die erhaltenen 35 Fraktionen mit DC überprüft. Die vereinigten Fraktionen 13-15 (260 mg) wurden mit einer ReversedPhase-MPLC weiter getrennt. Die restlichen Fraktionen nach DC-Analyse teilweise vereinigt und, wie oben angeführt, in Konzentrationen von 1 mg/ml oder 5 mg/ml für die weitere Bearbeitung in MeOH gelöst.

#### 4.4.3.3 MPLC-Trennung

Die in den vorangegangenen Trennungen erhaltenen Fraktionen 13-15 wurden mit einer präparativen RP-MPLC-Säule weiter aufgetrennt. Hierbei kam eine Lobar Glassäule der Dimensionen 440×37 mm befüllt mit Merck® Kieselgel RP-18 zum Einsatz. Den Druck von 2,0 - 3,0 bar generierte eine Taumelkolbenpumpe QD-1 SSY (1-10 bar) von Fluid Metering Inc.®, bei einer Flussrate von 30 ml/min. Die Fraktionen wurden noch zusätzlich mit einem UV-VIS Detektor gemessen (ISCO UA-6), um das Auftreten charakteristischer Chromophore zu ermitteln. Die Zusammensetzung der mobilen Phase ist aus Tab. 3 zu entnehmen, wobei je 150 ml jedes Laufmittelgemisches durch die Säule gepumpt wurden.

**Tabelle 3:** Laufmittelgemische der MPLC-Analyse von *C. affinis*.

| Laufmittelgemisch ml | Wasser (%) | Methanol (%) | Ethylacetat (%) | Chloroform (%) |
|----------------------|------------|--------------|-----------------|----------------|
| 150                  | 80         | 20           |                 |                |
| 150                  | 70         | 30           |                 |                |
| 150                  | 60         | 40           |                 |                |
| 150                  | 50         | 50           |                 |                |
| 150                  | 30         | 70           |                 |                |
| 150                  | 10         | 90           |                 |                |
| 150                  |            | 100          |                 |                |
| 150                  |            | 50           | 50              |                |
| 150                  |            |              | 100             |                |
| 150                  |            |              |                 | 100            |

Fraktioniert wurde nach Detektion von Substanzen durch den UV-VIS Detektor oder bei Erreichen eines gewissen Volumens in 5-50 ml Einheiten, woraus sich 42 Fraktionen mit einem durchschnittlichen Volumen von 35 ml ergaben, lediglich die Fraktionen 41 und 42 wiesen 100 ml Volumen auf. Die so gewonnenen Fraktionen wurden auf dieselbe Weise weiterverarbeitet wie bei den vorhin beschriebenen drucklosen präparativen Säulen. Nach analytischer DC wurden entsprechende Fraktionen vereinigt, zur Trockene gebracht und in etwas Methanol kühl gelagert. Dies betraf vor allem die Fraktionen 29-41, welche mittels präparativer DC weiter aufgereinigt wurden.

#### 4.4.4 Präparative Dünnschichtchromatographie

Eine weitere Trennung bzw. Reinigung der Stoffe erfolgte mit präparativer DC. Dabei wurden Kieselgelplatten (Merck® Silica gel 60 F<sub>254</sub> 20×20 cm) verwendet. Das Laufmittel wurde der Löslichkeit des entsprechenden Stoffgemisches angepasst. Nach dem Besprühen mit Dragendorff-Reagenz und UV-Detektion wurden die jeweiligen Banden ausgekratzt, mit MeOH aus dem Kieselgel gelöst und nach Trocknung und Gewichtsbestimmung weiter analysiert. Zur Anwendung kam diese Methode bei Präzipitaten aus den Trockensäulefraktionen 11-13 der Wurzelrinde von *C. affinis* (HG2007084), an den Trockensäulefraktionen 14-18 derselben Aufsammlung, sowie an den MPLC-Fraktionen 29-41 des Blattmaterials der Aufsammlung *C. affinis* (HG2007086).

## 4.5 Analytik

### 4.5.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Bei der analytischen DC kamen Glasplatten der Firma Merck (Merck® Silicagel 60 F<sub>254</sub>) zum Einsatz. Als Laufmittel für „Master“-Chromatogramme hat sich ein Gemisch aus CHCl<sub>3</sub> : MeOH : NH<sub>4</sub>OH in MeOH (25%) im Verhältnis von 80 : 20 : 1 bewährt. Die Rohextrakte wurden dabei in methanolischer Lösung mit gleichen Konzentrationen verglichen. Als Vergleichssubstanz diente DMT, welches aus *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. isoliert wurde (Abb. 23). Da bei *Carapichea affinis* auch ohne Ammoniak keine Verschlechterung der Trennleistung bemerkbar war, wurde hier nur mit CHCl<sub>3</sub> : MeOH (85 : 15) getrennt. Die Säulenfraktionen wurden meist in einer Konzentration von 1 mg/ml mit einer mobilen Phase von CHCl<sub>3</sub> : MeOH (80 : 20), (85 : 15) oder (90 : 10) getrennt. Die Auswertung erfolgte im UV-Licht und durch Besprühen mit Dragendorff- und Ehrlich-Reagenz. Für die Überprüfung von Reinstoffen wurde außerdem noch mit Anisaldehyd besprüht.

Zubereitung und Anwendung der Sprühreagenzien in der DC:

1) Dragendorff-Reagenz:

Lösung A: 0,85 g basisches Bismutnitrat  
+ 40 ml H<sub>2</sub>O  
+ 10 ml CH<sub>3</sub>COOH

Lösung B: 20 g Kaliumjodid  
+ 50 ml H<sub>2</sub>O

Lösung A + Lösung B + 50 ml CH<sub>3</sub>COOH + 400 ml H<sub>2</sub>O

Nachweis für tertiäre Amine und heterocyclische Stickstoffverbindungen.

Entwicklung bei Raumtemperatur ohne Nachbehandlung.

2) Ehrlich-Reagenz:

0,5 g Dimethylaminobenzaldehyd  
+ 25 ml konz. HCl  
+ 25 ml Ethanol

Nachweis für primäre aromatische Amine. Entwicklung durch Erwärmen ohne Nachbehandlung.

3) Anisaldehyd-Sprühreagenz:

85 ml MeOH  
+ 10 ml CH<sub>3</sub>COOH  
+ 8 ml konz. Schwefelsäure  
+ 0,5 ml Anisaldehyd

Nachweis für eine breite Gruppe an Naturstoffen mit unterschiedlichen Farbraktionen. Entwicklung durch Erwärmen ohne Nachbehandlung.

#### 4.5.2 HPLC- UV-VIS

Als Analysegerät diente ein Hewlett Packard 1090 Series II, die UV-Detektion erfolgte mittels eines Dioden-Array-Detektors (DAD) bei 230 nm. Getrennt wurde in einer Hypersil BDS Säule (C-18, 5 µm, 250 x 4,6 mm) mit MeOH (mit einem linearen Gradienten von 40-100%) in wässrigem Puffer (0,01 M Ammoniumacetat) und Start bei 40:60 MeOH : Ammoniumacetat, bei einer Durchflussrate von 1 ml/min. Die HPLC-DAD Analyse wurde bei vergleichenden Untersuchungen der Rohextrakte innerhalb des *Psychotria*-Komplexes angewendet, diente aber auch zur analytischen Erfassung der UV-Spektren der Fraktionen aus den präparativen Säulentrennungen und der Reinstoffe.

#### 4.5.3 NMR

NMR-Spektren wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Wien mit einem Bruker DRX-400 AVANCE Spektrometer bei 400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) oder 100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) bei 298,1 K unter Topspin 2.1 in deuteriertem  $\text{CHCl}_3$  oder MeOH gemessen. Die Interpretation der Spektren erfolgte durch Ass. Prof. Dr. Lothar Brecker und Mag. Hannes Faßhuber.

#### 4.5.4 MS

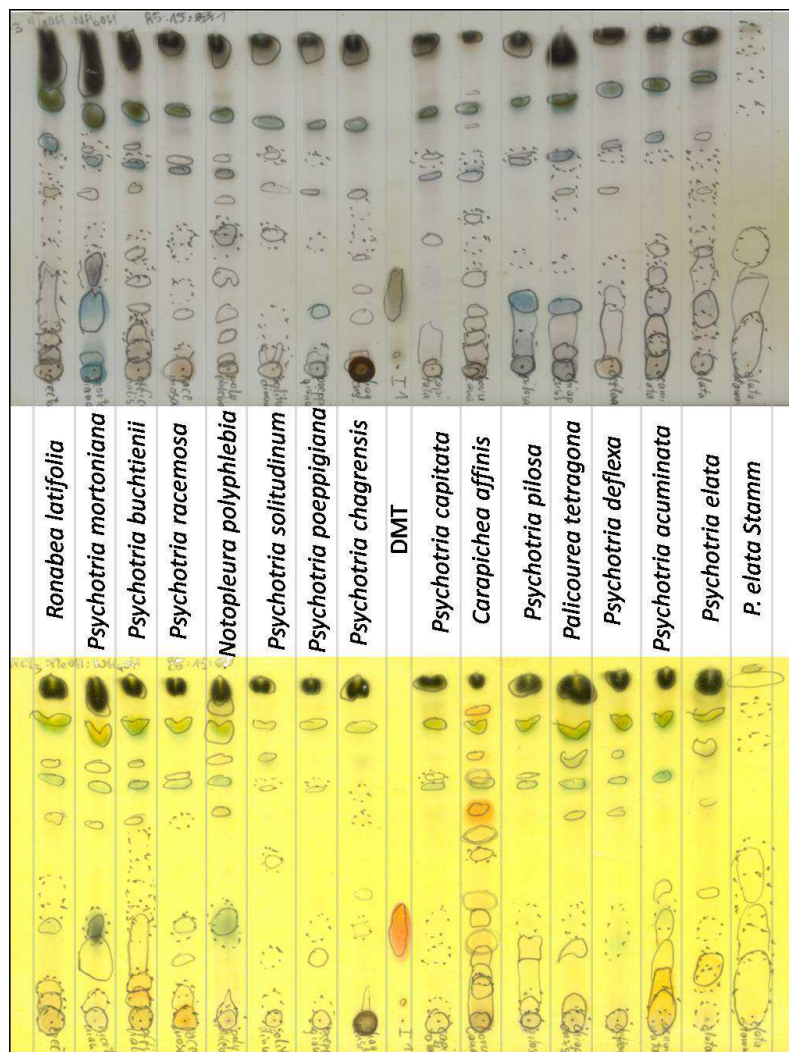
Massenspektrometrische Daten wurden mit einem 900S (Finnigan MAT) Massenspektrometer unter Elektrospray-Ionisation (ESI) erhalten und von Prof. Dr. W. Robien am Institut für Organische Chemie ausgewertet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Vergleichende phytochemische Analyse von *Psychotria* s. l.

Der Vergleich der DC- und HPLC-UV-Profile der Rohextrakte lieferte Hinweise auf unterscheidbare Gruppen innerhalb von *Psychotria* s. l. Es fielen zunächst *Psychotria buchtienii*, *P. acuminata*, *P. elata* sowie *P. racemosa* durch stark polare Dragendorff-positive Spots auf. Vergleichende HPLC-DAD Analysen dieser Rohextrakte zeigten charakteristische UV-Spektren, die auf die Anwesenheit eines Indol-Chromophors schließen ließen. FASSHUBER konnte in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit in *P. elata* das Tryptamin-Iridoid-Alkaloid Strictosidin nachweisen

(2011). Gleichzeitig wurden in einer weiteren Diplomarbeit in *P. buchtienii* Strictosidin und Strictosidinsäure nachgewiesen. Im Rahmen dieser Zusammenarbeit wurde aus *P.*



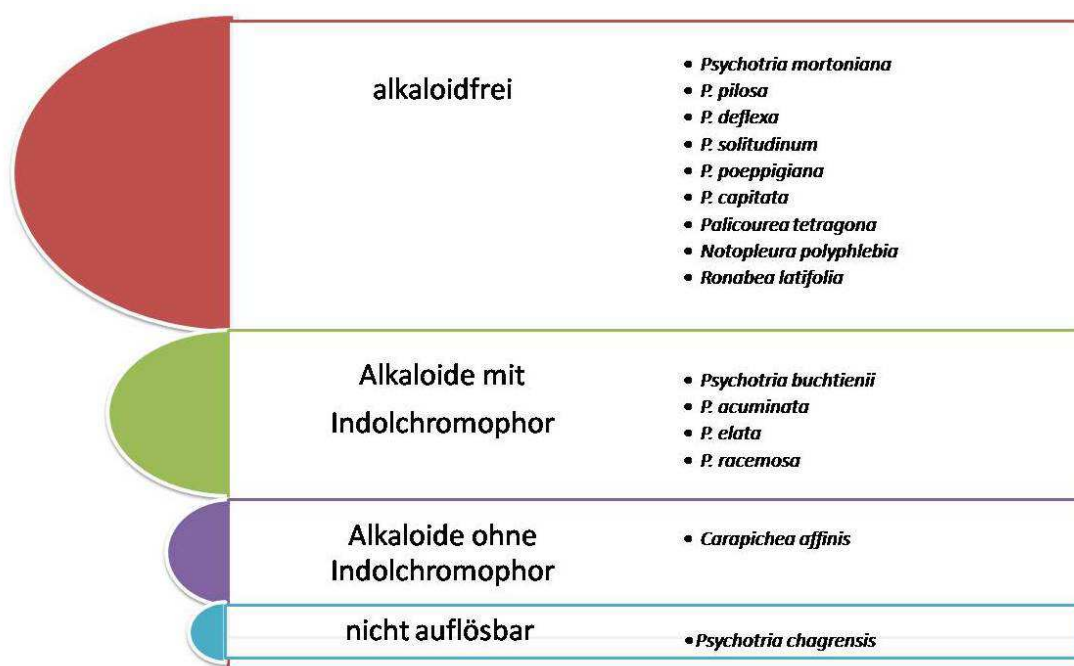
**Abbildung 23:** Vergleichende DC-Analyse der 15 Vertreter von *Psychotria* s. l. mit DMT als Vergleichsstoff. Im Bild oben: Nachbehandelt mit Ehrlichs-Reagenz. Im Bild unten: Nachbehandelt mit Dragendorff-Reagenz.

*racemosa* auch das nahe verwandte Palicosid festgestellt (PLAGG, in Vorbereitung). In *P. acuminata* wurden mehrere Derivate mit einem Indol-Chromophor detektiert. Sie wurden in einer nachfolgenden Diplomarbeit von Andreas Berger isoliert und die Strukturen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Organische Chemie aufgeklärt. Auch hier handelt es sich um Tryptamin-Iridoid-Alkaloi- de (BERGER, in Vorbereitung). Somit konnten in vier von fünfzehn Arten

Substanzen dieser Stoffklasse nachgewiesen werden. Darüber hinaus gab es aber noch eine Reihe von DC-Fraktionen, die keine positive Dragendorff-Reaktion zeigten. In Tabelle 4 und Abb. 24 wurden die Ergebnisse der DC- (Reaktion mit Dragendorff-Reagenz) und HPLC-Untersuchungen zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Dragendorff-Reaktion und Präsenz von Indolchromophoren im UV-Spektrum der 15 untersuchten Arten.

| Sammelnummer | Art                                                               | Dragendorff-positiv | Indol-chromophor |
|--------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------|
| HG2207081    | <i>Psychotria deflexa</i> DC.                                     | nein                | nein             |
| HG2407087    | <i>Psychotria mortoniana</i> Standl.                              | nein                | nein             |
| HG3007082    | <i>Psychotria poeppigiana</i> Müll.Arg.                           | nein                | nein             |
| HG19070812   | <i>Psychotria capitata</i> Ruiz & Pav.                            | nein                | nein             |
| HG2407081    | <i>Psychotria elata</i> (Sw.) Hammel                              | ja                  | ja               |
| HG2407082    | <i>Psychotria acuminata</i> Benth.                                | ja                  | ja               |
| HG1907087    | <i>Psychotria pilosa</i> Ruiz & Pav.                              | nein                | nein             |
| HG2607082    | <i>Psychotria chagrensis</i> Standl.                              | nein                | nein             |
| HG2607087    | <i>Psychotria buchtienii</i> (H.J.P.Winkl.) Standl.               | ja                  | ja               |
| HG1907083    | <i>Psychotria solitudinum</i> Standl.                             | nein                | nein             |
| HG31070811   | <i>Psychotria racemosa</i> Rich.                                  | ja                  | ja               |
| HG2907086    | <i>Notopleura polyphlebia</i> (Donn.Sm.)<br>C.M.Taylor            | nein                | nein             |
| HG1907082    | <i>Carapichea affinis</i> (Standl.) L.Andersson                   | ja                  | nein             |
| HG19070813   | <i>Palicourea tetragona</i> (Donn Sm.) C.M. Tay-<br>lor & Lorence | nein                | nein             |
| HG2007088    | <i>Ronabea latifolia</i> Aubl.                                    | nein                | nein             |

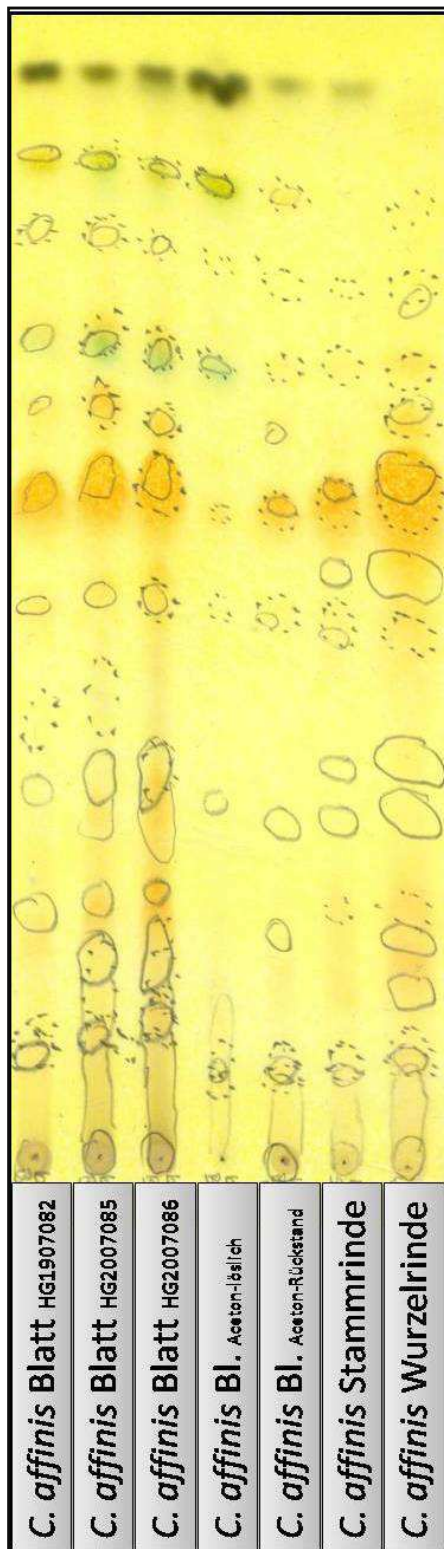


**Abbildung 24:** Gruppierung der 15 untersuchten Vertreter aus *Psychotria* s. l. nach DC- und HPLC-DAD-Analyse

Deutlich verschieden erwies sich das HPLC-DAD Profil von *P. chagrensis*, die einzige Vertreterin aus der Untergattung *Psychotria*. Hier konnte keine zufriedenstellende Trennung erreicht werden. Eine Reihe von kaum getrennten Peaks zeigte ein uniformes UV-Spektrum, das auf oligomere Catechine schließen läßt.

Ebenso abweichend und mit keiner der anderen 14 Arten vergleichbar war in diesen Voruntersuchungen der Rohextrakt von *Carapichea affinis* (= *Psychotria borucana*), welcher auf der DC eine größere Menge an unpolaren, Dragendorff-positiven Spots aufwies. Die Betrachtung des HPLC-UV Spektrums zeigte keine der in der Gattung *Psychotria* häufigen Indolstrukturen. Somit wird auch aus phytochemischer Sicht die auf molekularbiologischen Daten beruhende Abspaltung von *Psychotria* (ANDERSSON et al., 2002b) bekräftigt. Genauere phytochemische Analysen werden nun zeigen müssen, wieweit die Strukturen der Stoffe mit denen der bekannten *C. ipecacuanha* (ITOH et al., 1999; 2002) übereinstimmen und so von chemotaxonomischer Bedeutung sind.

## 5.2 Phytochemische Analyse von *C. affinis*

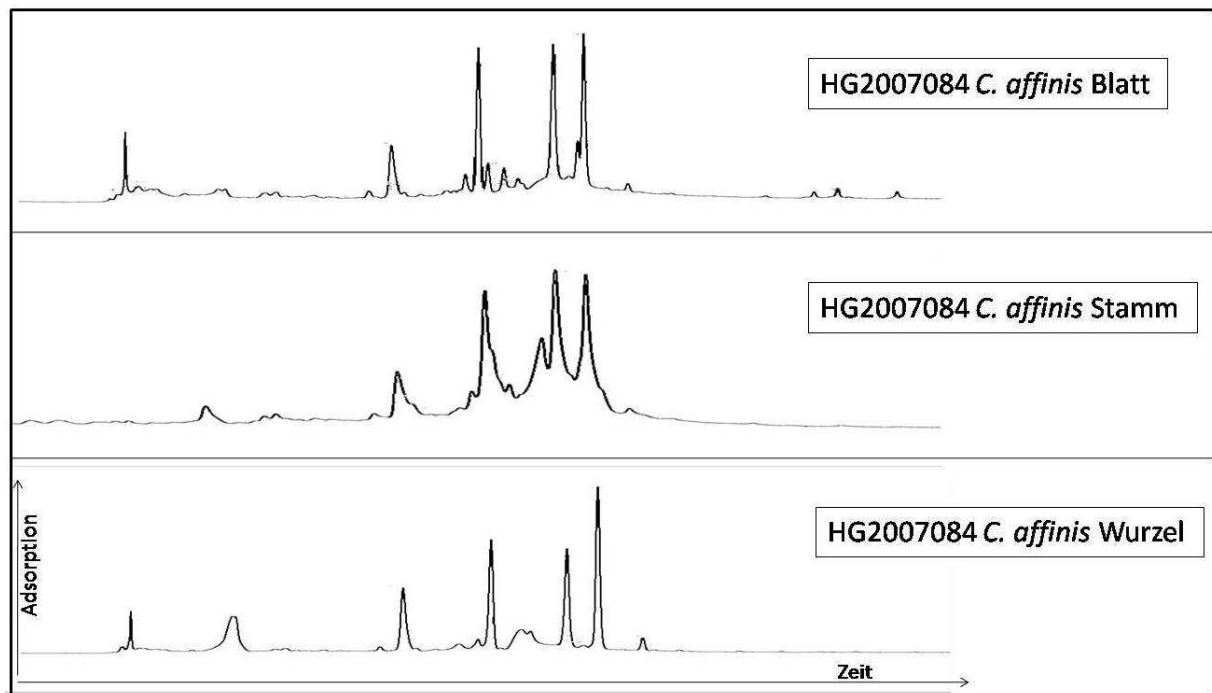


**Abbildung 25:** DC-Analyse verschiedener Organe, bzw. Aufsammlungen, von *C. affinis* nach Entwickeln mit Dragendorff-Reagenz.

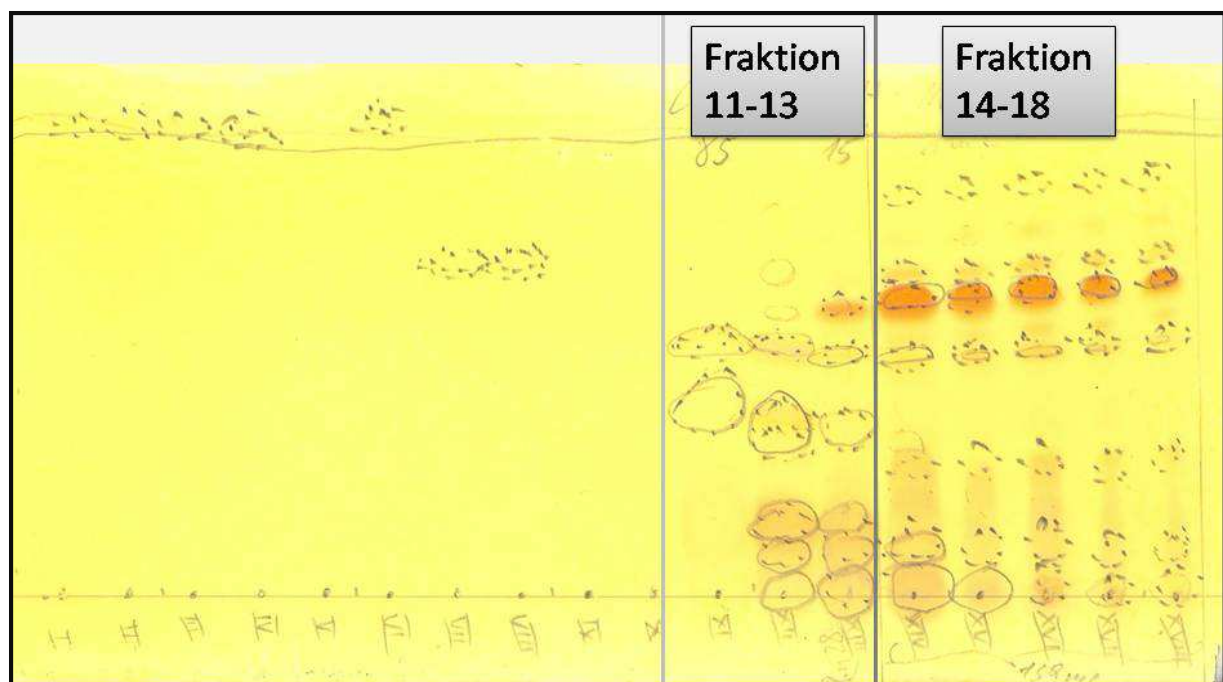
Der Vergleich der Gesamtextrakte von *C. affinis* mittels analytischer DC und HPLC-DAD-Analyse erbrachte keine nennenswerten Differenzen, weder auf Individuenniveau noch auf Populationsebene. Die Alkaloide waren konstant in allen, im Kapitel Material und Methode angeführten, Aufsammlungen gleichermaßen zu finden.

Auch das, zum Zeitpunkt der Aufsammlung, fruchtende Individuum HG2007086 (siehe Herbarbeleg im Anhang) unterschied sich im Alkaloidmuster nicht von den übrigen Individuen (Abb. 25).

Der Unterschied zwischen den verschiedenen Organen (Blatt, Stammrinde und Wurzelrinde) fiel ebenfalls sehr gering aus: Qualitativ gab es keine Differenzen, quantitativ zeigte die Wurzelrinde eine etwas höhere Alkaloid-Akkumulation als das Blatt- und Stammmaterial (Abb. 25 und 26).



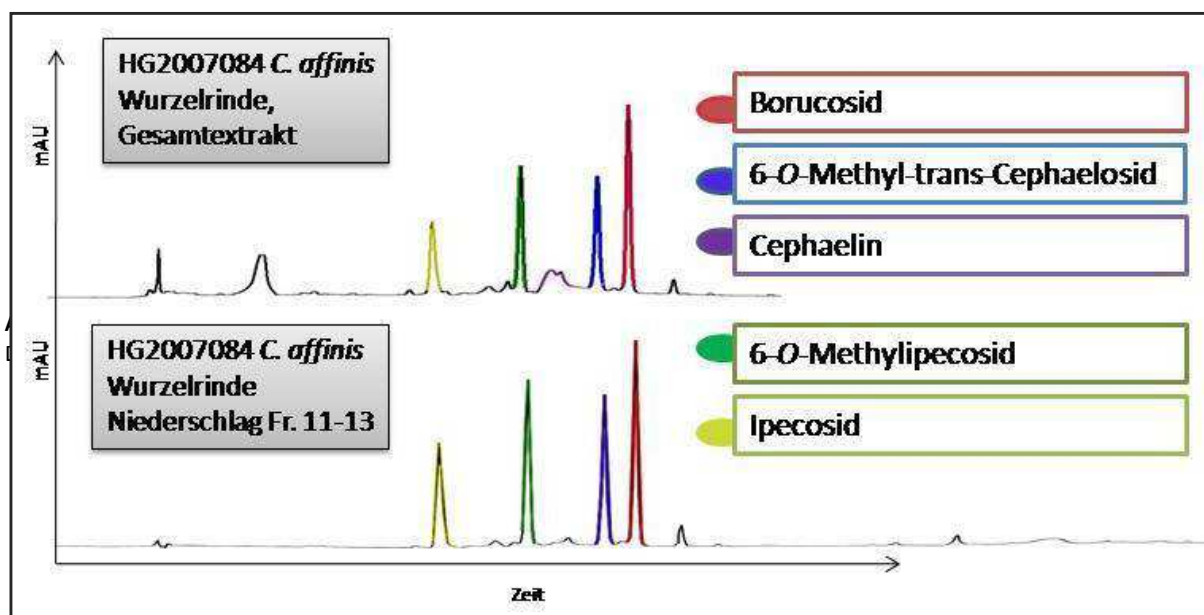
**Abbildung 26:** HPLC- Profile der verschiedenen Organe von *C. affinis* im Vergleich



**Abbildung 27:** DC-Analyse der Trockensäulefraktionen von *C. affinis* HG2007084 Wurzel, nachbehandelt mit Dragendorff-Reagenz. Fraktionen 11-13 mit den polaren Stoffen, 14-18 enthalten das Hauptalkaloid

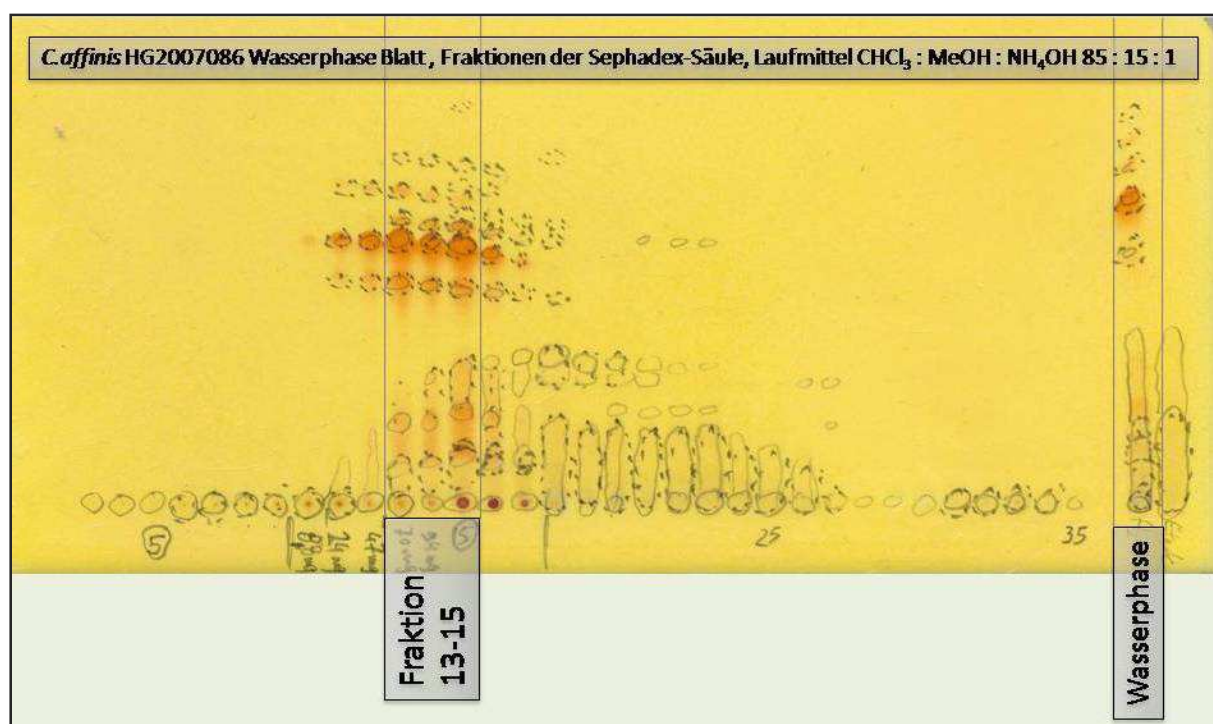
Besonders geeignet für eine präparative Trennung auf einer Trockensäule erwies sich die Aufsammlung HG2007084 (Abb. 27). Ein amorpher, weißer Niederschlag (30 mg) aus den Fraktionen 11-13 wurde mit DC analysiert und wies bei  $\text{CHCl}_3$  : MeOH 80 : 20 zwei Dragendorff-positive Spots auf. Die Löslichkeit des Präzipitats lag in MeOH bei Raumtemperatur bei etwa 2 mg/ml, in Wasser war die Löslichkeit desselben weitaus höher. HPLC-UV-Analysen des Niederschlags ergaben, dass ein Stoffgemisch aus mindestens vier Substanzen mit zwei völlig unterschiedlichen UV-Spektren vorlag. Aufgeteilt auf drei präparative DC-Platten wurden aus diesem in MeOH gelösten Niederschlag mit  $\text{CHCl}_3$  : MeOH, 80 : 20, vier Reinstoffe isoliert. Diese wurden nach DC- und HPLC-DAD-Überprüfung am Institut für Organische Chemie der Universität Wien aufgeklärt. Es handelte sich dabei um 3,6 mg Ipecosid, 4,5 mg 6-*O*-Methylipecosid, 3,5 mg 6-*O*-Methyl-trans-Cephaelosid und 5 mg Borucosid, wobei letzteres ein neu beschriebenes Kaffeesäure-Derivat aus der Gruppe der Dopamin-Iridoid-Alkaloide darstellt (BERNHARD et al., 2011).

Aus den vereinigten Trockensäulen-Fractionen 14-18 der Wurzelrinde von HG2007084 konnten durch präparative DC bei  $\text{CHCl}_3$  : MeOH, 90 : 10, 20 mg Cephaelin sowie 4,4 mg Emetin isoliert werden.



**Abbildung 28:** HPLC-Profil des Rohextrakts und des Wurzelrinden-Niederschlags der Trockensäulenfraktion 11-13 von *C. affinis* HG2007084 mit isolierten Stoffen (farblich hinterlegt). Cephaelin ist im Niederschlag nicht nachweisbar.

Die Wasserphase des Blattmaterials von HG2007086 ergab nach Fraktionierung mit Sephadex 260 mg der vereinigten Fraktionen 13-15. Davon wurden 200 mg auf eine RP-MPLC aufgetragen. Unter den so erhaltenen MPLC-Fractionen traten die Fraktionen 29-41 hervor, welche mit zwei präparativen DC-Platten weiter aufgereinigt wurden. Pro Platte wurden dabei 10 mg des Substanzgemisches aufgetragen, woraus 1,2 mg reines Emetin und in geringen Mengen zwei weitere Stoffe isoliert wurden, deren Strukturen bisher noch nicht aufgeklärt werden konnten.



**Abbildung 29:** DC-Analyse der Sephadex-Fractionen der Wasserphase von *C. affinis*, mit der Wasserphase des Gesamtextrakts als Vergleich.

## 6. Diskussion

Die Ergebnisse der phytochemischen Analysen an *Psychotria* s. l. zeigen, dass DMT in keiner der untersuchten Arten detektierbar ist (siehe Abb. 23). Damit bleibt *Psychotria viridis* weiterhin die einzige Quelle dieser Substanz innerhalb der Gattung. Die orientierenden HPLC-DAD-Vergleiche deuten auf die Präsenz von Tryptamin-Iridoid-Alkaloiden in *Psychotria buchtienii*, *P. acuminata*, *P. elata* und *P. racemosa* hin. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der gleichzeitig durchgeführten Untersuchungen (FASSHUBER, 2011; BERGER, in Vorbereitung; PLAGG, in Vorbereitung). Alle vier genannten Arten zählen zu der neu eingeführten Verwandtschaftsgruppe *Heteropsychotria* plus *Palicourea* Aubl., für welche diese Stoffklasse charakteristisch sein dürfte (PLAGG, in Vorbereitung). Die alkaloidfreien Arten *Psychotria mertoniana*, *P. solitudinum*, *P. poeppigiana*, *P. capitata*, *P. pilosa*, *P. deflexa*, *Palicourea tetragona*, *Notopleura polyphlebia* und *Ronabea latifolia* repräsentieren verschiedene Entwicklungslinien innerhalb der *Psychotria* s. l.-Gruppe (NEPOKROEFF et al., 1999; TAYLOR, 2001; 2004b). Vergleiche von HPLC-UV Profilen lassen unterschiedliche Stoffausstattungen erwarten: Hier ließen sich aber neben der fehlenden Alkaloid-Akkumulation keine gemeinsamen Stoffmuster erkennen. *Notopleura polyphlebia*, *Psychotria pilosa*, *P. capitata*, *P. mertoniana*, *P. solitudinum* und *Palicourea tetragona* wurden bisher noch nicht chemisch untersucht.

Wie bereits kürzlich bei einem HPLC-UV Vergleich von 20 verschiedenen Arten von *Psychotria* s. l. gezeigt wurde, unterschied sich *P. borucana* deutlich durch das Auftreten von Dopamin-Iridoid Alkaloiden (BERNHARD et al., 2011). Mit übereinstimmenden DNA-Daten und morphologischen Merkmalen sprechen nun auch phytochemische Befunde für eine Abspaltung als eigene Gattung. Zusammen mit der bekannten südamerikanischen Brechwurzel *P. ipecacuanha* wurde *P. borucana* nun in eine eigene Gattung *Carapichea* gestellt (ANDERSSON,

2002b). Im Gegensatz zu den weiterverbreiteten Tryptamin-Iridoid Alkaloiden akkumulieren die beiden *Carapichea*-Arten Dopamin-Iridoid-Alkaloide. Nachgewiesen wurden in *C. affinis* (= *Psychotria borucana*) die Inhaltsstoffe Cephaelin und Emetin, sowie Ipecosid und 6-*O*-Methylipecosid mit den entsprechenden N-*O*-Methylkaffeat-Derivaten, mit Borucosid als neu beschriebener Substanz (BERNHARD et al., 2011).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse sollte, bei chemotaxonomischer Betrachtung, auch die Positionierung von *P. klugii* neu überdacht werden. Die Anwesenheit von Dopamin-Iridoid-Alkaloiden in dieser Art (MUHAMMAD et al., 2003) würde für eine enge Verwandtschaft mit der Gattung *Carapichea* sprechen, bisher ist aber noch keine taxonomische Umstellung dieser Art erfolgt. Besonders interessant wäre nun eine phytochemische Untersuchung aller anderen Arten, die kürzlich zur Gattung *Carapichea* gestellt wurden. Die gravierenden Unterschiede in der Biosynthese zu Tryptamin- oder Dopamin-Iridoid-Alkaloiden stellen jedenfalls ein wichtiges Differenzierungsmerkmal dar.



## Anhang

Datenblätter

Herbarbelege

Literaturverzeichnis

Danksagung

Curriculum vitae

Zusammenfassung

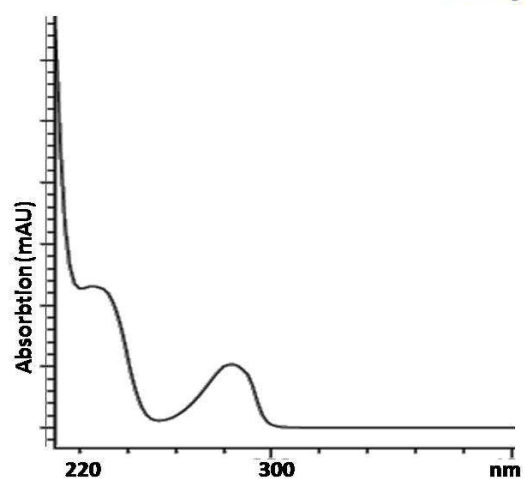
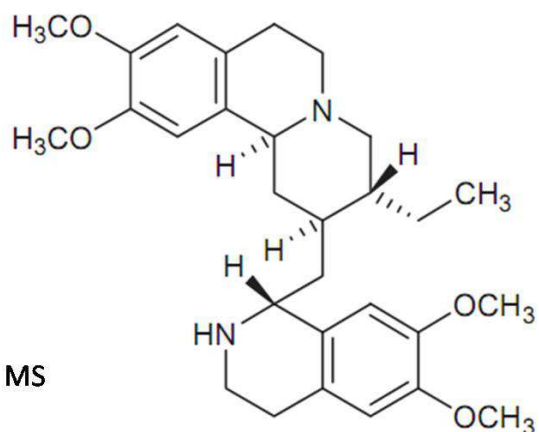
Abstract

Publikation des Autors zu *C. affinis*



# Emetin

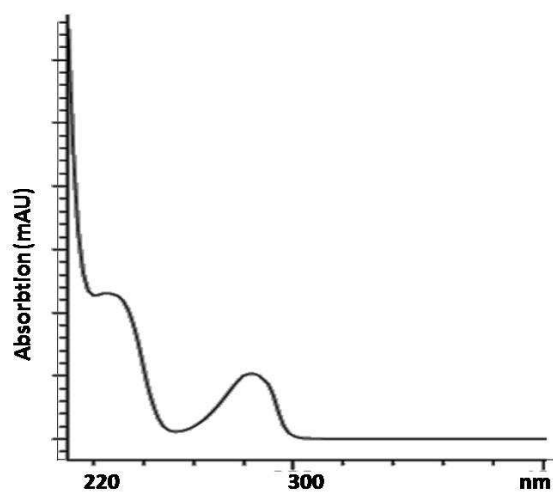
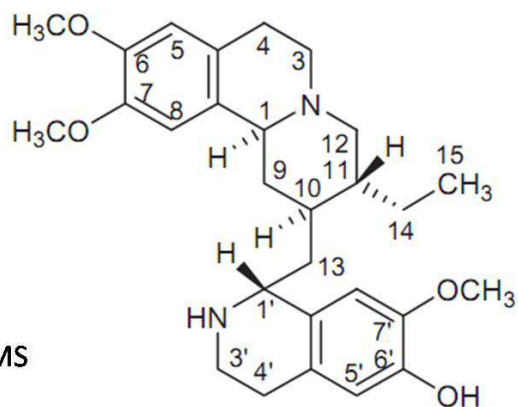
**Summenformel:**  $C_{29}H_{40}N_2O_4$   
**Molekulargewicht:** 480,64 g/mol  
**Identifizierung:** mittels NMR und MS



UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$ /nm 225, 283, 290 (sh)

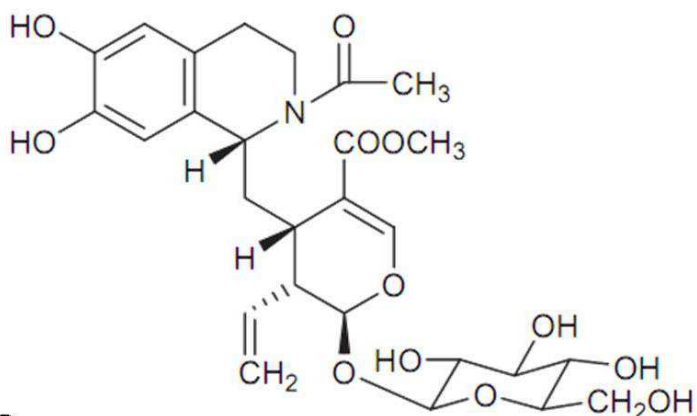
# Cephaelin

**Summenformel:**  $C_{28}H_{38}N_2O_4$   
**Molekulargewicht:** 466,61 g/mol  
**Identifizierung:** mittels NMR und MS



UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$ /nm 225, 283, 290 (sh)

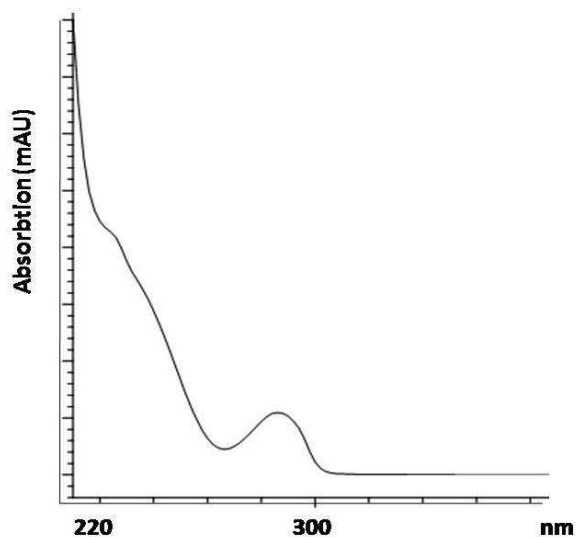
# Ipecosid



**Summenformel:** C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>12</sub>

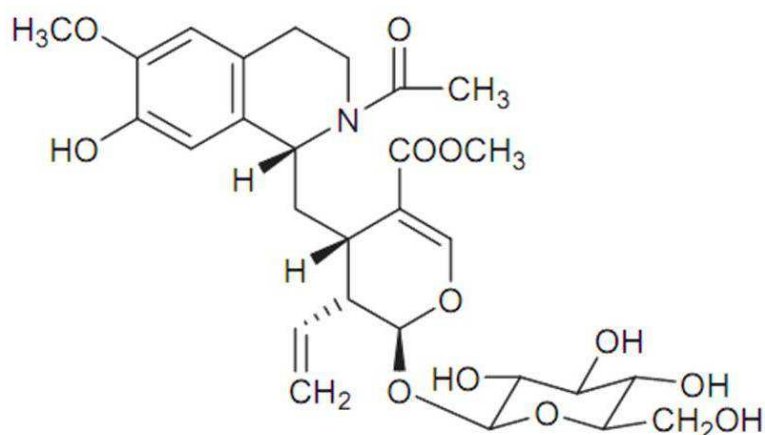
**Molekulargewicht:** 565,22 g/mol

**Identifizierung:** mittels NMR und MS



UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$ /nm 227, 287

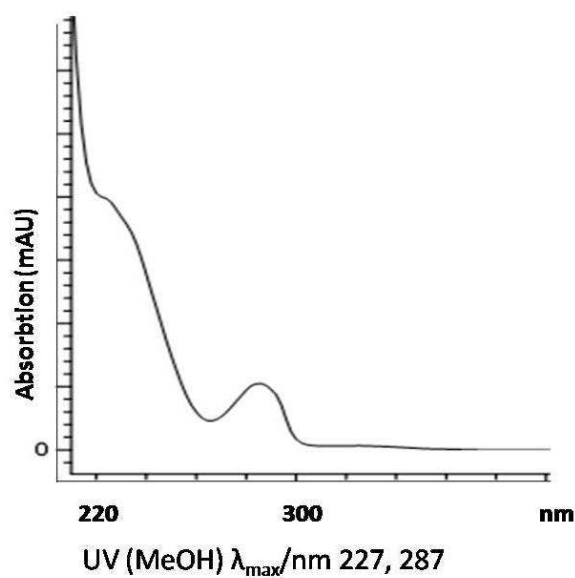
# 6-O-Methylipecosid



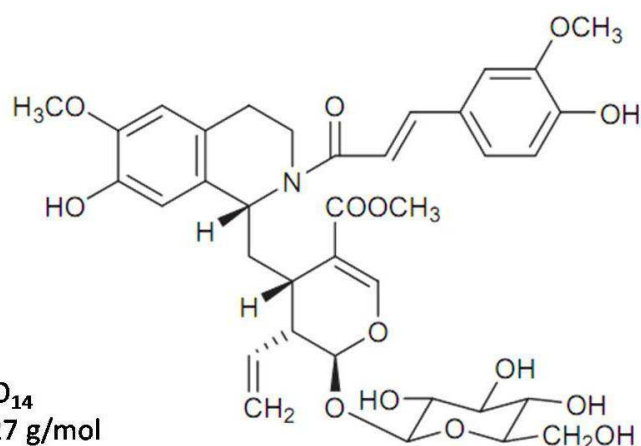
**Summenformel:**  $C_{28}H_{37}NO_{12}$

**Molekulargewicht:** 579,25 g/mol

**Identifizierung:** mittels NMR und MS



# 6-O-Methyl-trans-cephaelosid

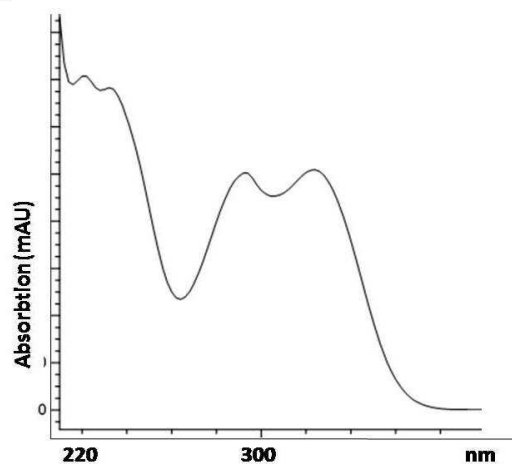


**Summenformel:**  $C_{36}H_{43}NO_{14}$

**Molekulargewicht:** 713,27 g/mol

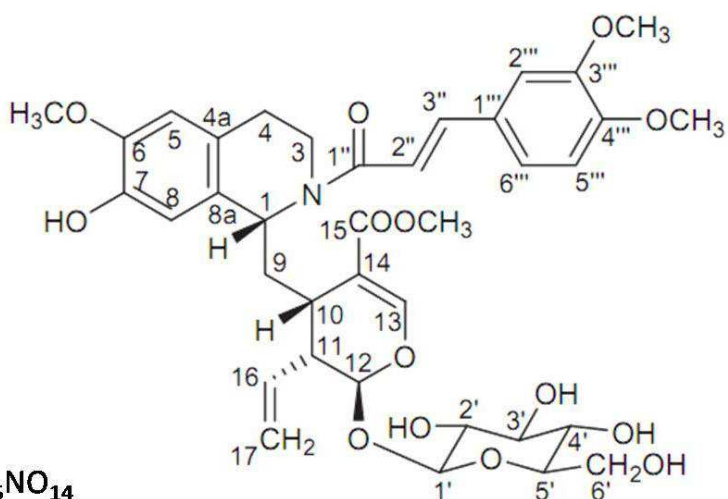
**Masse (ESI, pos mod):** 736,2 g/mol  $[M+Na]^+$

**Identifizierung:** mittels NMR und MS



UV (MeOH)  $\lambda_{max}$ /nm 221, 235, 296, 324

# Borucosid \*

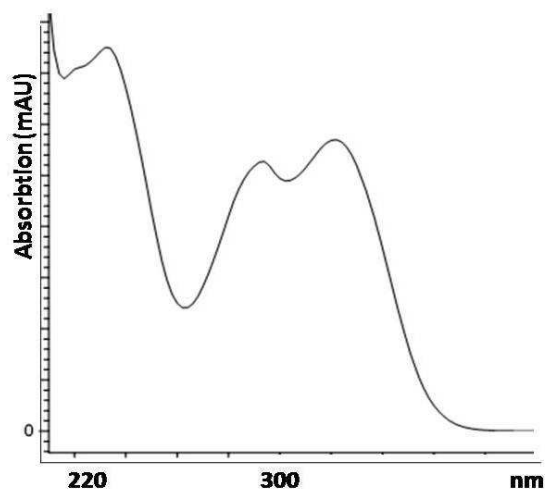


**Summenformel:** C<sub>37</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>14</sub>

**Molekulargewicht:** 727,75 g/mol

**Masse (ESI, pos mod):** 750,2 g/mol [M+Na]<sup>+</sup>

**Identifizierung:** mittels NMR und MS



UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$ /nm 221sh (4.43), 232 (4.48),  
293 (4.13), 322 (4.20)

\*BERNHARD et al., 2011

# Borucosid

<sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C-NMR Shifts und Werte der detektierbaren <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-Kopplungskonstanten

| Nr | <sup>1</sup> H [ppm] | Mult | J[Hz]       | <sup>13</sup> C [ppm] |
|----|----------------------|------|-------------|-----------------------|
| 1  | -                    |      |             | 169,23                |
| 2  | -                    |      |             | 168,99                |
| 3  | 7,4                  | s    |             | 153,01                |
| 4  | -                    |      |             | 152,26                |
| 5  | -                    |      |             | 150,8                 |
| 6  | -                    |      |             | 148,58                |
| 7  | -                    |      |             | 147,47                |
| 8  | 7,55                 | d    | 15,44       | 144,28                |
| 9  | 5,75                 |      |             | 135,92                |
| 10 | -                    |      |             | 131,62                |
| 11 | -                    |      |             | 129,84                |
| 12 | -                    |      |             | 124,4                 |
| 13 | 7,22                 | d    | 8,32        | 123,47                |
| 14 | 5,63 5,46            | d d  | 15,49 10,28 | 120,48                |
| 15 | 7,16                 | d    | 15,4        | 116,62                |
| 16 | 6,98                 |      |             | 116,5                 |
| 17 | 6,48                 | s    |             | 114,56                |
| 18 | 6,62                 | s    |             | 112,75                |
| 19 | 7,29                 | s    |             | 111,77                |
| 20 | -                    |      |             | 111,64                |
| 21 | 4,62                 | d    | 7,83        | 100,51                |
| 22 | 5,43                 | d    | 3           | 98,85                 |
| 23 | 3,28                 |      |             | 78,21                 |
| 24 | 3,28                 |      |             | 78,05                 |
| 25 | 3,11                 |      |             | 74,7                  |
| 26 | 3,11                 |      |             | 71,38                 |
| 27 | 3,87 3,67            |      |             | 62,64                 |
| 28 | 3,89                 | s    |             | 56,66                 |
| 29 | 3,86                 | s    |             | 56,45                 |
| 30 | 3,79                 | s    |             | 56,34                 |
| 31 | 3,66                 | s    |             | 51,65                 |
| 32 | 5,71                 |      |             | 50,9                  |
| 33 | 3,31                 |      |             | 45,03                 |
| 34 | 4,34 3,75            |      |             | 40,55                 |
| 35 | 2,59                 |      |             | 35,89                 |
| 36 | 2,91 2,79            |      |             | 29,99                 |
| 37 | 2,77                 |      |             | 27,3                  |



Herbarbeleg *C. affinis* HG2007086





**ACHENBACH, H., LOTTES, M., WAIBL, R., KARIKAS, G.A., CORREA, M.D., GUPTA, M.P. (1995).** Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. *Phytochemistry* 38: 1537-1545.

**AKINBOYE, E. & BAKARE, O. (2011).** Biological Activities of Emetine. *The Open Natural Products Journal* 4: 8-15.

**ALVES GARCIA, R.M., DE OLIVEIRA, L. O., ALVES MOREIRA, M. I., SILVA BARROS, W. (2005).** Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 233–243.

**AMADOR, T.A., VEROTTA, L., NUNES, D.S., ELISABETSKY, E. (2000).** Antinociceptive profile of Hodgkinsine. *Planta Medica* 66:770-772.

**ANDERSSON, L. (2002a).** Relationships and generic circumscriptions in the *Psychotria* complex (Rubiaceae/Psychotrieae). *Systematics and Geography of Plants* 72: 167-202.

**ANDERSSON, L. (2002b).** Re-establishment of *Carapichea* (Rubiaceae, Psychotrieae). *Kew Bulletin* 57: 363-374.

**APW** ANGIOSPERM PHYLOGENY website. Missouri Botanical Garden. (2010, 11. Dezember). <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>.

**AUBLET, J.B.C.F. (1775).** *Histoire des Plantes de la Guyane Francoise*. Didot jeune, London, Paris.

**BACKLUND, M.O. (2000).** Phylogenetic relationships within the Gentianales based on *ndhF* and *rcbL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae. *American Journal of Botany* 87: 1029-1043.

**BERGER, A., FASSHUBER, H., SCHINNERL, J., ROBIEN, W., BRECKER, L., VALANT-VETSCHERA, K. (2011).** Iridoids as chemical markers of false ipecac (*Ronabea emetica*), a previously confused medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology* 138: 756-761.

**BERGER, A. (in Vorbereitung)** *Vergleichende Phytochemische Untersuchungen ausgewählter Arten der Gattung Psychotria (Rubiaceae)*. Diplomarbeit der Universität Wien, Wien.

**BERNHARD, M., FASSHUBER, H., ROBIENE, W., BRECKER, L., GREGER, H. (2011).** Dopamine-iridoid alkaloids in *Carapichea affinis* (= *Psychotria borucana*) confirm close relationship to the vomiting root Ipecac. *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 232-235.

**BOTH, F.L., FARIAS, F.M., NICOLAGO, L.L, MISTURINI, J., HENRIQUES, A., ELISABETSKY, E. (2002a).** Avaliacao da atividade analgesica de extratos alcaloidicos de especies de *Psychotria*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 5: 41-45.

- BOTH, F.L., KERBER, V.A., HENRIQUES, A.T., ELISABETSKY, E. (2002b).** Analgesic Properties of Umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharmaceutical Botany* 40: 336-341.
- BREMER, B. (1996).** Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. *Opera Botanica* 7: 33-50.
- BREMER, B. & ERIKSSON, T. (2009).** Time tree of Rubiaceae: Phylogeny and dating the family, subfamilies and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170: 766-793.
- BREMER, B. & MANEN, J. (2000).** Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 225: 43-72.
- BURGER, W. & TAYLOR, C.M. (1993).** Family 202 Rubiaceae. In Burger W.: *Flora Costaricensis*. Fieldiana Botany 33, Field Museum of Natural History, Chicago.
- CHEONG, B., TAKEMURA, T., YOSHIMATSU, K., SANTO, F. (2011).** Molecular cloning of O-Methyl-Transferase from adventitious roots of *Carapichea ipecacuanha*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75: 107-113.
- DA SILVA, V., DE CARVALHO, M.G., ALVES, A.N. (2008).** Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). *Journal of Natural Medicines* 62: 356-357.
- DAVIS, A.P., BRIDSON, D.M., JARVIS, C., GOVAERTS, R. (2001).** The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 135: 35-42.
- DAVIS, A.P., GOVAERTS, R., BRIDSON, D.M., RUHSAM, M., MOAT, J., BRUMMITT, N.A. (2009).** A global assessment of distribution, diversity, endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96: 68–78.
- DE GARCIA, L.A., TOBON, C.F., CAMPO, E.M. (1997).** Citotoxicidad de los componentes de *Palicourea ovalis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 26: 55-57.
- DELPRETE, P. (2004).** Rubiaceae. In SMITH, N.: *Flowering Plants of the American tropics*. NY Botanical Garden Press, New York.
- DEL RAYO CAMACHO, M., PHILLIPSON, J.D., CROFT, S.L., YARDLEY, V., SOLIS, P.N., (2004).** In vitro Antiprotozoal and Cytotoxic Activities of some Alkaloids, Quinons, Flavonoids and Coumarins. *Planta Medica* 70: 70-72.
- DINDA, B., DEBASHIS, R.C., BIKAS, C.M. (2009).** Naturally Occurring Iridoids, Secoiridoids and their Bioactivity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57: 765-796.
- DOBLER, S.; PETSCHENKA, G.; PANKOKE, H. (2011).** Coping with toxic plant compounds--the insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides. *Phytochemistry* 72: 1593-1604.

**FASSHUBER, H. (2011).** *Strukturbestimmung sowie Untersuchung der enzymkatalysierten Hydrolyse von Naturstoffen mit Glycosidstruktur aus der Pflanzengattung Psychotria L.* Diplomarbeit der Universität Wien, Institut für Organische Chemie, Wien.

**HUBER, W. (2005).** *Tree diversity and biogeography of four one-hectare plots in the lowland rainforest of the Piedras Blancas National Park ("Regenwald der Österreicher"), Costa Rica.* Doktorarbeit Universität Wien, Wien.

**INBIO** Inbio-Park Costa Rica website. *Biodiversidad en Costa Rica.* (2011, 22. April ). <http://www.inbioparque.com/nosotros/biodiversidad-an-costa-rica.htm>.

**INOUE, H., TAKEDA, Y., NISHIMURA, H., KANOMI, A., OKUDA, T., PUFF, C. (1988).** Chemotaxonomic studies of Rubiaceae plants containing iridoid glycosides. *Phytochemistry* 27: 2591-2598.

**IPNI** *The International Plant Names Index* website – database of collaboration of The Royal Botanic Gardens Kew, The Harvard University Herbaria and the Australian National Herbarium. (2008, 1. März). <http://www.ipni.org>.

**ITOH, A., IKUTA, Y., BABA, Y., TANAHASHI, T., NAGAKURA, N. (1999).** Ipecac alkaloids from *Cephaelis acuminata*. *Phytochemistry* 52: 1169-1176.

**ITOH, A., IKUTA, Y., BABA, Y., TANAHASHI, T., NAGAKURA, N. (2002).** Tetrahydroisoquinoline-monoterpene glycosides from *Cephaelis acuminata*. *Phytochemistry* 59: 91-97.

**JANNIC, V., GUERITTE, F., LAPREVOTE, O., SERANI, L., MARTIN, M.T., SEVENET, T., POTIER, P. (1999).** Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciflora*. *Journal of Natural Products* 62: 838-843.

**KERBER, V., GREGIANINI, T.S., PARANHOS, J.T., SCHWAMBACH, J., FARIAS, F., FETT, J.P., FETT-NETO, A.G., ZUANAZZI, J.A., QUIRION, J.C., ELISABETSKY, E., HENRIQUES, A.T. (2001).** Brachycerine, a Novel Monoterpene Indole Alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *Journal of Natural Products* 64: 677-679.

**KERBER, V., PASSOS, C.S., VERLI, H., FETT-NETO, A.G., QUIRION, J.P., HENRIQUES, A.T. (2008).** Psychollatine, a glucosidic Monoterpene Indole Alkaloid from *Psychotria umbellata*. *Journal of Natural Products* 71: 697-700.

**LEAL, M., & ELISABETSKY, E. (1996).** Opioid-like activity of *Psychotria brachypoda*. *International Journal of Pharmacognosy* 34 : 267-272.

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

**MACBRIDE, JF. & DAHLGREN, B.E. (1936).** Flora of Peru, *Fieldiana Botany series vol.13, part 6, no.1.* Field Museum of Natural History, Chicago.

**MAGENDIE, F. & PELLETIER, M. (1817).** Recherches chimiques et physiologiques sur l'Ipecacuanha. *Journal de pharmacie et des sciences accessoires* 4: 145-164.

**McKENNA, D.J., TOWERS, G.H.N., ABBOTT, F.S. (1984).** Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and  $\beta$ -carboline constituents of Ayahausca. *Journal of Ethnopharmacology* 10: 195-223.

**MUHAMMAD, I., DUNBAR, D.C., KHAN, S.I., TEKWANI, B.L., BEDIR, E., TAKAMATSU, S., FERREIRA, D., WALKER, L.A. (2003).** Antiparasitic Alkaloids from *Psychotria klugii*. *Journal of Natural Products* 66: 962-967.

**NARINE, N. & MAXWELL, A.R. (2009).** Monoterpenoid Indole alkaloids from *Palicourea crocea*. *Phytochemistry Letters* 2: 34-36.

**NEPOKROEFF, M., BREMER, B., SYTSMA, K.J. (1999).** Reorganization of the Genus *Psychotria* and Tribe Psychotrieae (Rubiaceae) Inferred from ITS and rbcL Sequence Data. *Systematic Botany* 24: 5-27.

**NICHOLAS, A. & BAIJNATH, H. (1994).** A Consensus Classification for the Order Gentiales with Additional Details on the Suborder Apocynineae. *Botanical Review* 60: 440-482.

**O'CONNOR, S.E. & MARESH, J.J. (2006).** Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Products Reports* 23: 532-547.

**PAUL, J., MAXWELL, A.R., REYNOLDS, W.F. (2002).** Novel Bis (monoterpenoid) Indole Alkaloids from *Psychotria bahiensis*. *Journal of Natural Products* 66: 752-754.

**PLAGG, M. (in Vorbereitung)** *Chemotaxonomische Vorschläge zur Gliederung der Gattung Psychotria L.* . Diplomarbeit der Universität Wien, Wien.

**PORTO, D., HENRIQUES, A.T., FETT-NETO, A.G.(2009).** Bioactive Alkaloids from South American *Psychotria* and Related Species. *The Open Bioactive Compounds Journal* 2: 29-36.

**PUTTICK, G. B. & BOWERS, M.D. (1988).** Effect of qualitative and quantitative variation in allelochemicals on a generalist insect: Iridoid glycosides and the southern armyworm. *Journal of Chemical Ecology* 14 : 335-351.

**RAMAHEFARIZO, R., SEVENET, T., VOEGELEIN, F.G., KORDON, C. (1995).** Psycholeine, a natural Alkaloid extracted from *Psychotria oleoides*, acts as a weak antagonist of Somatostatine. *European Journal of Pharmacology* 285:19-23.

**RAZAFIMANDIMBISON, S., RYDIN, C., BREMER, B. ( 2008).** Evolution and trends in the *Psychotrieae alliance* (Rubiaceae)- A rarely reported evolutionary change of many-seeded carpels from one-seeded carpels. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 207-223.

**REGENWALD DER ÖSTERREICHER.** Verein Regenwald der Österreicher website. (2010, 17. September). <http://regenwald.at>.

**RIPPERGER, R. (1982).** Chimonanthine from *Palicourea dominguensis*. *Pharmazie* 37: 867.

**RIVIER, L., & LINDGREN, J. (1972).** Ayahausca, the South American hallucinogenic drink: Ethnobotanical and chemical investigations. *Economic Botany* 29: 101-129.

**ROBBRECHT, E. & MANEN, J. (2006).** The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, Angiosperms). Combined analysis (nDNA and cp DNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and subtree construction based on rbcL, rps16, trnL-trnF, and atpB-rbcL data. A new class. *Systematics and Geography of Plants* 76: 85-146.

**ROGERS, L. (1912).** The rapid cure of amoebic dysentery and hepatitis by hypodermic injections of soluble salts of emetine. *British Medical Journal* 1: 1424-1425.

**SAAD, H., EL-SHARKAWY, S.H., SHIER, W.T. (1995).** Biological activities of pyrrolidinoindoline alkaloids from *Calycodendron milnei*. *Planta Medica* 61: 313-316.

**SAMPAIO-SANTOS, M. & KAPLAN, M. (2001).** Biosynthesis and Significance of Iridoids in Chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12: 144-153.

**SIMÕES-PIRES, C. A., FARIAS, F.N., MARSTON, A., QUEIROZ, E.F., CHAVES, C.G., HENRIQUES, A.T., HOSTETTMANN, K. (2006).** Indole Monoterpenes with Antichemotactic Activity from *Psychotria myriantha*: Chemotaxonomic Significance. *Natural Product Communications* 1: 1101-1106.

**SOLIS, P.N., LANG 'AT, C., GUPTA, M.P., KIRBY, G.C., WARHURST, D.C., PHILLIPSON, J.D. (1995).** Bio-active compounds of *Psychotria camponutans*. *Planta Medica* 61: 62-65.

**SOLIS, P.N., RAVELO, A.G., PALENZUELA, A., MAHABIR, P.G., GONZALES, A., PHILLIPSON, D. (1997).** Quinoline Alkaloids from *Psychotria glomerulata*. *Phytochemistry* 44: 963-969.

**STAUNTON, J. (1972).** Biosynthesis. In J. SAXTON: *The Alkaloids-Volume 2* . The Chemical Society Burlington House, London.

**STEVEN, A. & OVERMAN, L. (2007).** Totalsynthese komplexer Cyclotryptaminalkaloide: stereokontrollierter Aufbau quartärer Kohlenstoffstereozentren. *Angewandte Chemie* 119: 5584-5605.

**STEYERMARK, J. (1975).** *Flora of Missouri*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

**STUART, K.L. & WOO-MING, R.B. (1974).** *Palicourea alkaloids*. Structure of palinine. *Tetrahedron Letters* 44: 3853-3856.

**SZABÒ, L.F. (2008).** Molecular evolutionary lines in the formation of indole alkaloids derived from secologanin. *ARKIVOC* (iii): 167-181.

**TAKAYAMA, H., MORI, I., KITAJIMA, M. AIMI, N., NORDIN, H.L.,(2004).** New Type of Trimeric and Pentameric Indole Alkaloids from *Psychotria rostrata*. *Organic Letters* 6: 2945-2948.

**TAYLOR, C.M. ( 1996).** Overview of the Psychotrieae (Rubiaceae) in the neotropics. *Opera Botanica Belgica* 7: 261-270.

**TAYLOR, C.M. (1997).** Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae, Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 224-262.

**TAYLOR, C.M. (2001).** Overview of the neotropichal genus *Notopleura* (Rubiaceae: Psychotrieae), with the Description of some new species. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 478-515.

**TAYLOR, C.M. (2001).** Rubiaceae. In STEVENS, W.: *Flora de Nicaragua* 3. Missouri Botanical Garden, Missouri.

**TAYLOR, C.M. (2004a).** Rubiacearum Americanarum Magna Hama Pars XVI. New Species, a New Subspecies, and an Overlooked Species of *Psychotria* subg. *Heteropsychotria* from Mexico, Central America, and Western South America. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature* 14: 493-508.

**TAYLOR, C.M. (2004b).** The Neotropical genus *Ronabea* (Rubiaceae, Lasiantheae). *Systematics and Geography of Plants* 74: 35-42.

**TAYLOR, C.M. (2005).** *Margaritopsis* (Rubiaceae, Psychotrieae) in the Neotropics . *Systematics and Geography of Plants* 75: 161-177.

**TAYLOR, C.M. (2008).** The neotropical Palicoureeae-Psychotrieae today, a significant part of the world Rubiaceae flora IV International Rubiaceae (Gentianales) Conference - Programme & Abstracts. *Scripta Botanica Belgica* 44: 68.

**THE PLANT LIST** *The Plant List database* website. Royal Botanic Gardens New York, Kew & Missouri Botanical Garden (2011, 22. August). <http://www.theplantlist.org>.

**THE WORLD FACTBOOK.** *Central Intelligence Agency database* website. CIA. (2011, 11. Juni). <http://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/cs.html>.

**TROPICOS.** *TROPICOS database* website. Missouri Botanical Garden. (2001, 19. Juli). <http://www.tropicos.org>.

**VALVERDE, J., TAMAYO, G., HESSE, M. (1999).**  $\beta$ -Carboline monoterpenoid glucosides from *Palicourea adusta*. *Phytochemistry* 52: 1485-1489.

**VAN DE SANTOS, L., FETT-NETO, A.G., KERBER, V.A., ELISABETSKY, E., QUIRION, J.C., HENRIQUES, A.T. (2001).** Indole momoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Biocemical Systematics and Ecology* 29: 1185-1187.

**VEROTTA, L., PILATI, T., TATO, M., ELISABETSKY, E., AMADOR, T.A., NUNES, D.S. (1998).** Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria colorata*. *Journal of Natural Products* 61: 392-396.

**VEROTTA, L., PETERLONGO, F., ELISABETSKY, E., AMADOR, T.A., NUNES, D.S. (1999).** High-performance liquid chromatography–diode array detection–tandem mass spectrometry analyses of the alkaloid extracts of Amazon *Psychotria* species. *Journal of Chromatography A* 841: 165-176.

**WEISSENHOFER, A. (2005).** *Structure and Vegetation Dynamics of four selected one-hectare forestplots in the lowland rainforests of the Piedras Blancas National Park ("Regenwald der Österreicher"), Costa Rica, with notes on the vegetation diversity of the Golfo Dulce region.* Doktorarbeit . Universität Wien, Wien.

**WIEGREBE, W., KRAMER, W.J., SHAMMA, M. (1984).** The Emetine Alkaloids. *Journal of Natural Products* 47: 397-408.

**WILL, S., & KIEHN, M. (2008).** Survey of Rubiaceae in the Golfo Dulce area, Costa Rica: new species, combinations and name changes since 2001. *Stapfia* 88: 109-118.

**ZENK, M.H., RUEFER, M., AMANN, M., DEUS-NEUMANN, B. (1985).** Benzylisoquinoline Biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes. *Journal of Natural Products* 48: 725-738.



## Danksagung

Mein Dank gilt

meinen Eltern, für die Unterstützung in finanzieller und persönlicher Hinsicht,

meinem Betreuer, Ao. Prof. Dr. Harald Greger, für die Bereitschaft zu diesem Thema und die geduldige Betreuung,

Mag. Johann Schinnerl, für die hilfsbereite Kooperation im Labor und die technische Unterstützung,

MA Michaela Plagg, für die gute Zusammenarbeit und die unzähligen Diskussionen,

dem Team von La Gamba, allen voran Mag. Dr. Anton Weißenhofer und Mag. Dr. Werner Huber, für die tatkräftige Unterstützung in La Gamba und auch in Wien,

dem Institut für Organische Chemie, für die Zusammenarbeit,

dem Umweltministerium von Costa Rica, insbesondere Dr. Guevara für die Genehmigung der Sammelreise und

dem Team der Chemodiversity Research Group, für die gute Zusammenarbeit.



## Curriculum vitae

Name: Martin Bernhard

geboren: 23.11.1976 in Bozen (Italien)

1982-1987 Grundschule J. W. v. Goethe in Bozen

1988-1990 Franziskanergymnasium in Bozen

1991-1993 Berufsfachschule für Holztechnik Dipl. Ing. Luis Zuegg, Meran

1994 Erwerb des Gesellenbriefs für Tischler

1993-2001 berufliche Tätigkeit als Tischler

2001-2002 Ausbildung an der Fachoberschule für Tourismus und Biotechnologie Marie Curie, Meran

2002-2003 Ausbildung am Sozialwissenschaftlichen Gymnasium C. v. Medici, Mals

2003 Maturadiplom am Sozialwissenschaftlichen Gymnasium, Mals

2003-2008 Studium der Biologie (437) an der Universität Wien

2008-heute Studium der Botanik (438) an der Universität Wien

## Wissenschaftliche Publikationen:

**BERNHARD, M., FASSHUBER, H., ROBIEN, W., BRECKER, L., GREGER, H. (2011)** Dopamine-iridoid alkaloids in *Carapichea affinis* (= *Psychotria borucana*) confirm close relationship to the vomiting root Ipecac. *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 232-235.



## Zusammenfassung

Die Gattung *Psychotria* L. (Rubiaceae) gehört mit rund 2.000 tropisch verbreiteten Arten zu den größten Gattungen des Pflanzenreichs. Molekularbiologische Daten begründeten eine Neugruppierung dieser Gattung und führten zur Wiedereinführung der Gattung *Carapichea* und zur Ausgliederung der Taxa *Ronabea*, *Margaritopsis* und *Notopleura*.

DC- sowie HPLC-UV-Vergleiche von methanolischen Rohextrakten aus 15 Vertretern des *Psychotria*-Komplexes aus Costa Rica zeigten eine klare Abgrenzung von *Carapichea affinis* (Standl.) Andersson (= *Psychotria borucana* (Ant.Molina) C.M. Taylor & W.C. Burger). Die weitere Auftrennung des Rohextrakts von *C. affinis* durch Säulenchromatographie und präparative Dünnschichtchromatographie führte zur Isolierung der dominanten Inhaltsstoffe. Die Struktur der nachgewiesenen Substanzen wurde am Institut für Organische Chemie mittels NMR und MS aufgeklärt. Im Gegensatz zu den innerhalb des *Psychotria*-Komplexes vorherrschenden Stoffklassen (Tryptamin-Iridoid-Alkaloide und Iridoid-Glykoside) konnten in *C. affinis* sechs verschiedene Dopamin-Iridoid-Alkaloide (Emetin-Alkaloide, Ipecac-Alkaloide) nachgewiesen werden. Neben den prominentesten Vertretern dieser Stoffklasse, Emetin und Cephaelin, konnten vier verwandte Glykoside identifiziert werden: die beiden bekannten N-Acetate Ipecosid und 6-*O*-Methylipecosid mit den korrespondierenden N-*O*-Methylkaffeat-Derivaten, mit Borucosid als neu beschriebener Substanz.

Somit konnte die kürzlich erfolgte Wiedereinführung der Gattung *Carapichea* chemotaxonomisch untermauert werden, da sich sowohl *C. affinis* als auch *C. ipecacuanha* durch die akkumulierten Dopamin-Iridoid-Alkaloide klar von den übrigen Vertretern der Gattung *Psychotria* L. unterscheiden.



## Abstract

The genus *Psychotria* L. (Rubiaceae) is one of the largest genera worldwide, comprising about 2000 species in the tropics. DNA-data suggested a new infrageneric grouping and led to a reinstallation of the genus *Carapichea* and to the separation of *Ronabea*, *Margaritopsis*, and *Notopleura*.

TLC- and HPLC-UV comparison of methanolic crude extracts from 15 different species of the *Psychotria complex*, collected in Costa Rica, showed a clear chemical segregation of *Carapichea affinis* (= *Psychotria borucana*). All major compounds were isolated and their structures identified by NMR and MS analysis. In contrast to the more widespread accumulation of iridoids and/or tryptamin-iridoid-alkaloids, the chemical profile was characterized by dopamin-iridoid alkaloids. Beside the well known compounds emetine and cephaeline, four related glycosides were isolated, characterized by various N-acylations. Two were identified as the known N-acetates ipecoside and 6-O-methylipecoside, whereas the two others represent corresponding N-O-methylcaffeate derivatives from which borucoside was described as a new compound. In addition to morphological characters and analyses of nucleotide sequence variation, the present chemical data supported a recent taxonomic rearrangement where *Psychotria borucana* has been grouped together with *Psychotria ipecacuanha* in a separate genus *Carapichea*.





# Dopamine-iridoid alkaloids in *Carapichea affinis* (= *Psychotria borucana*) confirm close relationship to the vomiting root Ipecac

Martin Bernhard<sup>a</sup>, Hannes Fasshuber<sup>b</sup>, Wolfgang Robien<sup>b</sup>, Lothar Brecker<sup>b</sup>, Harald Greger<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Chemodiversity Research Group, Faculty Center of Biodiversity, University of Vienna, Rennweg 14, A-1030 Wien, Austria

<sup>b</sup> Institute of Organic Chemistry, University of Vienna, Währingerstrasse 38, A-1090 Wien, Austria

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 28 December 2010

Accepted 26 March 2011

Available online 21 April 2011

### Keywords:

*Carapichea affinis*

*Psychotria borucana*

Rubiaceae

Dopamine-iridoid alkaloids

Cephaeline

Chemotaxonomy

## ABSTRACT

Broad-based HPLC-UV comparison of 57 methanolic crude extracts of the *Psychotria* complex (Rubiaceae), representing about 20 different species collected in Costa Rica, exhibited a clear chemical segregation of *Psychotria borucana*. In contrast to the more widespread tryptamine-iridoid alkaloids it deviated by an accumulation of dopamine-iridoid alkaloids. Similar to the South American vomiting root Ipecac, *Psychotria ipecacuanha* (= *Cephaelis ipecacuanha*), cephaeline and emetine were found together with four related glycosides characterized by various *N*-acylations. Two glycosides were identified as the known *N*-acetates ipecoside and 6-*O*-methylipecoside, whereas the two others represent corresponding *N*-*O*-methylcaffeate derivatives from which borucoside was described as a new compound. Structure elucidation of all compounds was carried out by NMR- and MS-analyses supported by CSEARCH-NMR-database system. In addition to morphological characters and analyses of nucleotide sequence variation the chemical profile of *P. borucana* supported a recent taxonomic rearrangement where it has been grouped together with *P. ipecacuanha* in a separate genus *Carapichea*.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Subject and source

*Psychotria* is the largest genus of the family Rubiaceae, comprising about 1600 mostly tropical species. Due to the lack of significant stable morphological characters and a comprehensive worldwide taxonomic treatment, satisfying infrageneric and/or generic delimitations are still missing (Taylor, 1996; Nepokroeff et al., 1999). Cladistic analyses based on DNA sequence data strongly suggest a taxonomic splitting and rearrangement of *Psychotria* also incorporating species of other genera (Nepokroeff et al., 1999). Important contributions to a more natural grouping can also be expected from phytochemical data (Lopes et al., 2004). In this case a comprehensive overview about the chemical diversity will also contribute to a better understanding of the many ethnobotanical and pharmaceutical applications of the genus as well as of the ecological role of characteristic compounds.

## 2. Previous work

Previous phytochemical studies on *Psychotria* species led to the isolation and identification of iridoids, tryptamine-iridoid alkaloids, and alkaloids of polyindoline type. Their different distribution supported a recent taxonomic grouping in which species of the subgenus *Heteropsychotria* were mainly characterized by tryptamine-iridoid alkaloids, whereas those of the

\* Corresponding author. Tel.: +43 1 4277 54072; fax: +43 1 4277 9541.

E-mail address: [harald.greger@univie.ac.at](mailto:harald.greger@univie.ac.at) (H. Greger).

subgenus *Psychotria* deviated by polyindoline alkaloids (Lopes et al., 2004). By contrast, dopamine-iridoid alkaloids, also classified as tetrahydroisoquinoline-monoterpene alkaloids (Fig. 1), were isolated so far only from *P. klugii* Standl. (Muhammad et al., 2003) and the well-known South American vomiting root *P. ipecacuanha* (Brot.) Stokes (= *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.) (Lee, 2008), published either as *Cephaelis ipecacuanha* (Itoh et al., 1991; Nagakura et al., 1993) or *Cephaelis acuminata* Karsten (Itoh et al., 1999, 2002). Based on a cladistic analysis of nucleotide sequence variation in the *rps16* intron (cpDNA) *P. borucana* (A.R. Molina) C.M. Taylor & W. Burger (= *Cephaelis borucana* A. R. Molina) was shown to form a strongly supported monophyletic group together with *P. ligularis* var. *carapichea* (Poir.) Steyerf. (= *Cephaelis guianensis* (Aubl.) Standl.) and *P. ipecacuanha* (Brot.) Stokes (= *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.). Since all three species also share a number of morphological characters they were recently treated taxonomically as the separate genus *Carapichea* Aubl. (Andersson, 2002). A literature search showed that only Ipecac, *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson, has previously been subjected to chemical analysis (Itoh et al., 1991, 1999; 2002; Nagakura et al., 1993). These results prompted us to isolate and identify the characteristic compounds of *P. borucana*, now classified as *Carapichea affinis* (Standl.) L. Andersson (Andersson, 2002).

### 3. Present study

*C. affinis* was collected in the “Rainforest of the Austrians” near Golfito, SW-Costa Rica, in July 2008. A voucher specimen (HG 207084) was deposited at the Herbarium of the Institute of Botany, University of Vienna (WU). 20 g air-dried roots were extracted with MeOH at room temperature for 5 days, filtered and concentrated to afford 1.2 g of crude extract. After

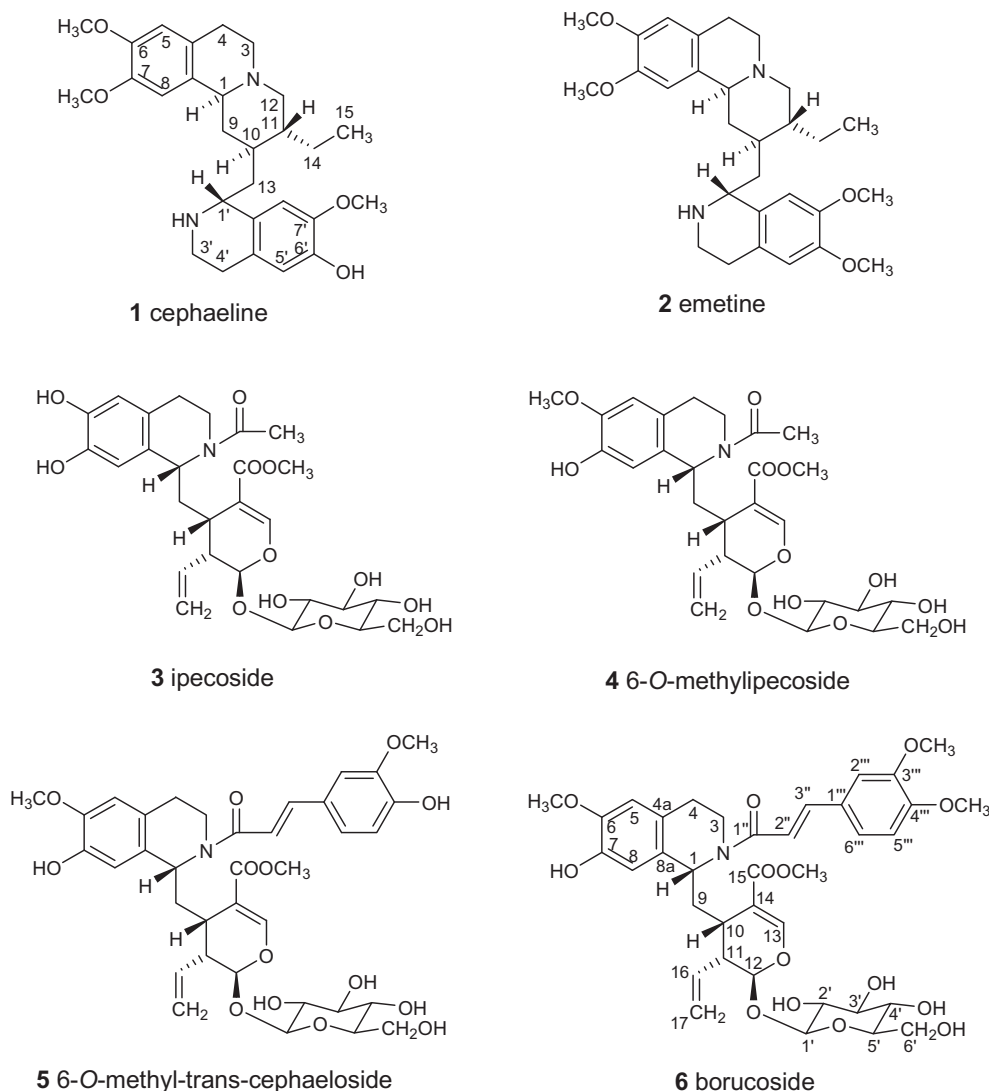


Fig. 1. Structures of compounds 1–6 isolated from the roots of *C. affinis* (= *P. borucana*).

partitioning between  $\text{CHCl}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}$  the aqueous layer was used for HPLC–UV comparison and then roughly separated by CC on a silica gel column (Merck silica gel 60, 0.2–0.5) with  $\text{CHCl}_3$ –MeOH (85:15) leading to 18 fractions. The alkaloid containing fractions 11–13, monitored by TLC sprayed with Dragendorff's reagent, were pooled together (40 mg) and separated by preparative TLC using  $\text{CHCl}_3$ –MeOH (80:20) to afford 3.6 mg **3**, 4.5 mg **4**, 3.5 mg **5**, and 5 mg **6**. The combined column fractions 14–18 were further separated by RP-MPLC using  $\text{CHCl}_3$  with increasing amounts of MeOH to yield contaminated **1** and **2**, which were purified by preparative TLC ( $\text{CHCl}_3$ –MeOH 90:10) to afford 21 mg **1** and 4.4 mg **2**. HPLC comparison was performed on Agilent 1100 with UV diode array detection at 230 nm, using a Hypersil BDS-C18  $250 \times 4.6$  mm,  $5 \mu\text{m}$  column, with a mobile phase gradient from MeOH 40% to 100% in 0.01 mol/l ammonium acetate in  $\text{H}_2\text{O}$ , flow rate 1 ml/min.

NMR-spectra were recorded on a Bruker DRX-400 AVANCE spectrometer at 400.13 MHz ( $^1\text{H}$ ) or 100.62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) at 298.1 K  $\pm$  0.1 K using Topspin 2.1 software. For 1D spectra 32k data points were recorded and Fourier transformed to spectra with a range of 7200 Hz ( $^1\text{H}$ ) and 30,000 Hz ( $^{13}\text{C}$ ). 2D spectra were measured by 128 experiments with 1024 data points each. Linear forward prediction, sinusoidal multiplication and Fourier transformation led to 2D spectra with a range of 7200 Hz and 30,000 Hz for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , respectively.  $\text{CH}_3\text{OH}$  was used as internal standard for  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.340) and  $\text{CD}_3\text{OD}$  for  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$  49.00) spectra. Mass Spectra were recorded on a 900S (Finnigan MAT) by direct infusion electrospray ionization in positive mode. High resolution mass spectra were performed with the same equipment at a resolution of 10,000. Combined CSEARCH and SPECINFO databases running under the CSEARCH-program were used for spectral similarity searches and prediction of  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (Bremser et al., 1981; Schütz et al., 1997; Robien, 2009).

Apart from the well-known aglyca cephaeline (**1**) and emetine (**2**) the chemical profile of *C. affinis* is characterized by four related glycosides with various *N*-acylations (**3**–**6**) (Fig. 1). Compounds **3** and **4** were identified as the known *N*-acetates ipecoside (**3**) and 6-*O*-methylipicoside (**4**) (Itoh et al., 1991). In contrast 6-*O*-methyl-transcephaeloside (**5**) (Nagakura et al., 1993) and **6** represent corresponding methylated caffeate derivatives. The substance **6**, which carries three methoxy and one hydroxy group, was shown to be an as yet undescribed compound. Its NMR spectrum is similar to compounds **3**–**5** indicating the characteristic tetrahydroisoquinoline skeleton as well as all structural features derived from a condensation with secologanin (Itoh et al., 1991; Nagakura et al., 1993). Typical chemical shifts and  $^3J_{\text{C-H}}$  couplings as well as line broadening of proton signals, caused by hindered nitrogen inversion, show the nitrogen to be part of an amide function. However, no acetyl residue, typical for the ipecosides **3** and **4**, was detected. Instead, a trans-caffeoyl moiety, like in compound **5**, was identified to form the tertiary amide. In compound **6** three oxygen bound methyl groups were detected. One is connected to the hydroxy group at position 6 of the tetrahydroisoquinoline nucleus, the two others are bound to the hydroxy groups at positions 3''' and 4''' in the caffeoyl moiety. This methylation pattern has been determined by  $^3J_{\text{C-H}}$  couplings between the methyl protons and the quaternary carbon atoms in the aromatic rings, which were determined in an HMBC spectrum. The new derivative was designated as borucoside (**6**) (Fig. 1).

Borucoside (**6**): yellow oil; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ : 221sh (4.43), 232 (4.48), 293 (4.13), 322 (4.20).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$  400 MHz)  $\delta$  7.52 (1H, d, 15.5 Hz, H-3''), 7.37 (1H, d, 1.1 Hz, H-13), 7.26 (1H, d, 1.5 Hz, H-2''), 7.19 (1H, dd, 6.7 & 1.5 Hz, H-6''), 7.10 (1H, d, 15.5 Hz, H-2''), 6.95 (1H, d, 6.7 Hz, H-5''), 6.45 (1H, s, H-8), 6.59 (1H, s, H-5), 5.72 (1H, m, H-16), 5.68 (1H, m, H-1), 5.60 (1H, dd, 17.8 & 1.4 Hz, H-17a), 5.42 (1H, dd, 11.4 & 1.4 Hz, H-17b), 5.40 (1H, d, 2.9 Hz, H-12), 4.59 (1H, d, 8.0 Hz, H-1'), 4.31 (1H, dd, 13.6 & 5.3 Hz, H-3a), 3.86 (3H, s, C-3'''-O-CH<sub>3</sub>), 3.84 (1H, m, H-6'a), 3.83 (3H, s, C-6-O-CH<sub>3</sub>), 3.72 (1H, m, H-3b), 3.64 (1H, m, H-6'b), 3.76 (3H, s, C-4'''-O-CH<sub>3</sub>), 3.63 (3H, s, COO-CH<sub>3</sub>), 3.28 (1H, m, H-11), 3.27 (1H, m, H-5'), 3.25 (1H, m, H-3'), 3.24 (1H, m, H-4'), 3.08 (1H, m, H-2'), 2.87 (1H, m, H-4b), 2.76 (1H, m, br, H-4a), 2.74 (1H, m, br, H-10), 2.56 (1H, m, br, H-9a), 1.54 (1H, m, br, H-9b);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  169.2 (C<sub>q</sub>, C-1''), 169.0 (C<sub>q</sub>, C-15), 153.0 (CH, C-13), 152.3 (C<sub>q</sub>, C-4'''), 150.8 (C<sub>q</sub>, C-3'''), 148.6 (C<sub>q</sub>, C-6), 147.5 (C<sub>q</sub>, C-7), 144.3 (CH, C-3''), 135.9 (CH, C-16), 131.6 (C<sub>q</sub>, C-8a), 129.8 (C<sub>q</sub>, C-1'''), 124.4 (C<sub>q</sub>, C-4a), 123.5 (CH, C-2'''), 120.5 (CH<sub>2</sub>, C-17), 116.6 (CH, C-6''), 114.7 (CH, C-8), 116.5 (CH, C-2''), 112.6 (CH, C-5), 111.8 (CH, C-5''), 111.6 (C<sub>q</sub>, C-14), 100.5 (CH, C-1'), 98.8 (CH, C-12), 78.2 (CH, C-3'), 78.0 (CH, C-5'), 74.7 (CH, C-2'), 71.4 (CH, C-4'), 62.6 (CH<sub>2</sub>, C-6'), 56.7 (CH<sub>3</sub>, C-3'''-O-CH<sub>3</sub>), 56.4 (CH<sub>3</sub>, C-6-O-CH<sub>3</sub>), 56.3 (CH<sub>3</sub>, C-4'''-O-CH<sub>3</sub>), 51.6 (CH<sub>3</sub>, COO-CH<sub>3</sub>), 50.9 (CH, C-1), 45.0 (CH, C-11), 40.5 (CH<sub>2</sub>, C-3), 35.9 (CH<sub>2</sub>, C-9), 30.0 (CH<sub>2</sub>, C-4), 27.3 (CH, C-10); ESI MS (pos. ion mode)  $m/z$  728.2 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 750.2 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>; HR ESI MS  $m/z$  750.2762 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> (calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{NaNO}_{14}$  750.2738).

#### 4. Chemotaxonomic significance

As already pointed out previously, in *Psychotria* characteristic UV spectra serve as indicators for the presence of tryptamine-iridoid alkaloids containing an indole chromophore (Lopes et al., 2004). In our broad-based HPLC–UV comparison of species of the *Psychotria* complex, collected in the 'Rainforest of the Austrians' in southwest Costa Rica, the methanolic root extract of *C. affinis* clearly deviates by different UV spectra. In accordance with morphological characters and DNA data (Nepokroeff et al., 1999; Andersson, 2002) the chemical profile also fits in perfectly with the major compounds of the vomiting root, *C. ipecacuanha*, consisting of dopamine-iridoid alkaloids (Fig. 1).

The biogenetic trend towards *N*-acylated derivatives deserves special chemotaxonomic attention. Whereas various *N*-acetates were isolated from *C. ipecacuanha* (Nagakura et al., 1993; Itoh et al., 1991, 2002) and *P. klugii* (Muhammad et al., 2003), *N*-*O*-methylcaffeate derivatives were only detected so far in the two *Carapichea* species. Surprisingly, dopamine derived ipecac alkaloids were also found in the stem bark and seeds of the well-known Indian medicinal plant 'Ankol', *Alangium lamarckii* Thwaites, of the family Cornaceae (Alangiaceae). However, in spite of the formation of cephaeline (**1**) and emetine (**2**) (Budzikiewicz et al., 1964), and a series of glycosides closely related to ipecoside, no derivatives with *N*-acylation have been detected. Instead, the *N*-atom was shown to be always part of a lactam ring typical for the alangisides (Itoh et al.,

1995, 1996). Regarding the clear chemical divergence of *P. klugii* from other *Psychotria* species by dominating dopamine-iridoid alkaloids (Muhammad et al., 2003), suggesting close affinities to the genus *Carapichea*, it would be rewarding to reinvestigate its taxonomic position by morphological analyses and DNA sequence data.

## Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Roland Albert of the Dept. of Chemical Ecology and Ecosystem Research, University of Vienna, for supporting our work in the Field Station La Gamba in Costa Rica and Dr. Anton Weissenhofer of the Faculty Center of Biodiversity, University of Vienna for his advice of collecting and identifying *Psychotria* species.

## References

- Andersson, L., 2002. Kew Bull. 57, 363.  
Bremser, W., Wagner, H., Franke, B., 1981. Org. Magn. Reson. 15, 178.  
Budzikiewicz, H., Pakrashi, S.C., Vorbrueggen, H., 1964. Tetrahedron 20, 399.  
Itoh, A., Tanahashi, T., Nagakura, N., 1991. Phytochemistry 30, 3117.  
Itoh, A., Tanahashi, T., Nagakura, N., 1995. J. Nat. Prod. 58, 1228.  
Itoh, A., Tanahashi, T., Nagakura, N., 1996. Phytochemistry 41, 651.  
Itoh, A., Ikuta, Y., Baba, Y., Tanahashi, T., Nagakura, N., 1999. Phytochemistry 52, 1169.  
Itoh, A., Baba, Y., Tanahashi, T., Nagakura, N., 2002. Phytochemistry 59, 91.  
Lee, M.R., 2008. J. R. Coll. Physicians Edinb 38, 355.  
Lopes, S., Von Poser, G.L., Kerber, V.A., Farias, F.M., Konrath, E.L., Moreno, P., Sobral, M.E., Zuanazzi, J.A.S., Henriques, A.T., 2004. Biochem. Syst. Ecol. 32, 1187.  
Muhammad, I., Dunbar, D.C., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Bedir, E., Takamatsu, S., Ferreira, D., Walker, L.A., 2003. J. Nat. Prod. 66, 962.  
Nagakura, N., Itoh, A., Tanahashi, T., 1993. Phytochemistry 32, 761.  
Nepokroeff, M., Bremer, B., Sytsma, K., 1999. J. Syst. Bot. 24, 5.  
Robien, W., 2009. Trends Anal. Chem. 28, 914.  
Schütz, V., Purtuc, V., Felsing, S., Robien, W., 1997. Fresenius' J. Anal. Chem. 359, 33.  
Taylor, C.M., 1996. Opera Bot. Belg. 7, 261.