

Synthese und pharmakologische
Testung von
Protoberberin-Alkaloiden und
Derivaten

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Aline Horling

geb. am 24. Februar 1982 in Luckenwalde

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter Imming
2. Prof. Dr. Bodo Dobner
3. Prof. Dr. Franz Bracher

verteidigt am 17. August 2017

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
2.	Biosynthese und Synthese der Protoberberine.....	8
2.1	Biosynthese der Benzylisochinolin-Alkaloide	8
2.2.	Partialsynthesen	13
2.2.1.	Partialsynthese aus Berberin	13
2.2.2	Partialsynthese aus Tetrahydropalmatin.....	14
2.2.3	Syntheseversuche zur Herstellung von Scoulerin und anderen hydroxylierten Derivaten des Tetrahydropalmatins	16
2.2.3.1	Demethylierung von Tetrahydropalmatin mit Bromwasserstoffsäure	16
2.2.3.2	Demethylierung von Tetrahydropalmatin mit Tribromboran.....	17
2.2.3.3	Demethylierung von Tetrahydropalmatin mit AlCl ₃ -NaI.....	20
2.2.3.4	Demethylierung von Tetrahydropalmatin mit Natriumbenzylselenolat.....	20
2.3	Totalsynthese von Protoberberinen	21
2.3.1	Literaturbekanntes	21
2.3.2	Der synthetische Weg zum Protoberberin.....	23
2.3.3	Synthese der Phenylacetamide	23
2.3.4	Mit dem Bischler-Napieralski-Ringschluss zum Tetrahydroisochinolin.....	26
2.3.5	Fördernde und hemmende Einflussfaktoren der Bischler-Napieralski- Reaktion	30
2.3.6	Die Mannich-Reaktion	32
2.3.7	Die Arylbromierung – Schlüsselreaktion zur Synthese 9,10-substituierter Protoberberine ?	36
2.3.8	Der Weg über ein Isochromanon zum Protoberberin.....	38
2.3.8.1	8-Hydroxy-7-methoxyisochroman-3-on als Startverbindung des Isochromanonweges	38
2.3.8.2	7-Methoxyisochroman-3-on als Startverbindung des Isochromanonweges...	40
2.4	Synthese von flexibleren Grundgerüsten.....	44
2.4.1	Synthese von Phenethyltetrahydroisochinolininen	44
2.4.2	Synthese von Dibenzazecinen	45
2.5	Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse, Ausblick	47
3.	Biologische Testung.....	54
3.1	Agar-Diffusionstest	54
3.1.1	Prinzip des Testsystems	54

3.1.2	Literaturbekanntes zur antimikrobiellen Aktivität von Protoberberinen	54
3.1.3	Testsubstanzen	55
3.1.4	Testergebnisse	55
3.2	Testung auf Hemmung der Biosynthesen:.....	62
	Ergosterol in Hefen und Cholesterol in humanen Zellen	62
3.2.1	Screening auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese in Hefen	62
3.2.1.1	Grundlagen	62
3.2.1.2	Prinzip des Screenings.....	63
3.2.1.3	Testsubstanzen und Durchführung des Screenings	64
3.2.1.4	Testergebnisse	64
3.2.1.5	Diskussion der antimikrobiellen Aktivität: Ergebnisse aus Agar-Diffusionstest und Screening auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese.....	65
3.2.2	Screening auf Hemmung der pflanzlichen SMT	70
3.2.3	Screening auf Inhibition der Cholesterolbiosynthese in humanen Zellen und Quantifizierung der Hemmkonzentrationen.....	71
3.2.3.1	Grundlagen	71
3.2.3.2	Prinzip des Screenings.....	72
3.2.3.3	Quantifizierung der Hemmkonzentration vielversprechender Inhibitoren.....	73
3.2.3.4	Experimentelle Durchführung	73
3.2.3.5	Testergebnisse	74
3.2.3.6	Diskussion der Ergebnisse.....	76
3.3	MTT-Test.....	78
3.3.1	Grundlagen	78
3.3.2	Literaturbekanntes zur zytotoxischen Aktivität von Berberin und Derivaten....	78
3.3.3	Testsubstanzen und Kontrolllösungen	79
3.3.4	MTT-Assay	79
3.3.5	Testergebnisse	80
3.3.6	Diskussion der Ergebnisse	82
3.4	Protoberberine als Referenzsubstanzen für Untersuchungen an Cytochrom P450 Oxidasen	83
3.4.1	Das CYP-System.....	83
3.4.2	Wirkung der Protoberberine auf CYP-Systeme	84
3.4.3	Prinzip und experimentelle Durchführung des Testsystems	85

3.4.4	Testergebnisse	86
3.4.5	Diskussion der Ergebnisse	87
3.5	in vivo Untersuchung der Blut-Hirnschrankengängigkeit.....	90
3.5.1	Das Gehirn und seine Schutzbarriere	90
3.5.2	Transportsysteme an der Blut-Hirn-Schranke.....	91
3.5.3	Untersuchung der Hirngängigkeit ausgewählter Alkaloide	92
3.5.4	Applikation und Probenahme	94
3.5.5	Bewertung der Hirngängigkeit	94
3.5.6	Testergebnisse	95
3.5.7	Diskussion der Ergebnisse	96
4.	Zusammenfassung und Ausblick	98
5.	Summary	102
6.	Abkürzungen.....	104
7.	Literaturverzeichnis	106
8.	Abbildungsverzeichnis.....	120
9.	Tabellenverzeichnis	122
10.	Anhang	123
10.1	Synthesen.....	123
10.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	123
10.1.2	Geräte	125
10.1.3	Monographien	127
10.2	Biologische Testung	186
10.2.1	Agar-Diffusionstest	186
10.2.1.1	Nährmedien und Mikroorganismen	186
10.2.2	MTT-Test	187
10.2.2.1	Zelllinie	187
10.2.2.2	Kultivierung der Zellen.....	187
10.2.2.3	Aussäen der Zellen.....	187
10.2.2.4	MTT-Reagenz	187
10.2.3	Screening an Cytochrom P450 Oxidasen.....	188
10.2.3.1	Material und Methoden.....	188
10.2.3.2	IC ₅₀ -Kurven.....	189
10.2.3.3	Detaillierte Darstellung der Ergebnisse	191
10.2.4	Untersuchung der Blut-Hirnschrankengängigkeit.....	191

10.2.4.1	Aufarbeitung der CFS-, Plasma- und Gehirnproben.....	191
10.2.4.2	LC-MS/MS-Analyse	191
10.2.4.3	Graphische Darstellung der Ergebnisse	192
10.2.5	Screening auf Inhibition der Cholesterolsynthese in humanen Zellen.....	195
10.2.6	Screening auf Inhibition der Ergosterolsynthese in Hefen – Probenvorbereitung zur GC-MS-Analyse.....	198
10.3	Reinheitsbestimmung der Substanzen mittels HPLC	199
	Danksagung.....	200
	Liste der Veröffentlichungen	202
	Lebenslauf	203
	Eidesstattliche Erklärung.....	205

1. Einleitung und Zielsetzung

In dem folgenden Kapitel werden die Rolle der Naturstoffe in der Suche neuer Arzneistoffe sowie die Beweggründe, die zur Bearbeitung des vorliegenden Themas führten, erläutert.

Spielen Naturstoffe heute noch eine Rolle in der Arzneimittelwirkstofffindung und –entwicklung? Einst hatten (traditionelle) Naturprodukte große Bedeutung in der Arzneistoffsuche. Bereits im frühen 19. Jahrhundert wird von den ersten bioaktiven Naturstoffen berichtet: Strychnin, Morphin, Atropin, Colchicin.

Nach der erfolgreichen Isolierung von Naturstoffen aus ihrer Ursprungsquelle – Pflanzen, Pilze, marine Mikroorganismen – wurde 1826 der erste kommerziell erhältliche Naturstoff von E. Merck, Morphin, auf den Arzneimittelmarkt eingeführt. Schon bald darauf folgte Aspirin, ein partialsynthetisches Derivat der Salicylsäure (Bayer, 1899).

Penicillin, dessen antibiotische Wirksamkeit 1928 von Alexander Fleming entdeckt wurde, war der Vorreiter einer langen Reihe von für die Arzneistoffentwicklung bedeutungsvoller Naturstoffe. Klinische Studien in den frühen 1940iger Jahren und die Kommerzialisierung des synthetischen Penicillins revolutionierten den Weg der Naturstoffe in die Pharmaforschung.

Im Bereich Antibiotika folgten dem Penicillin Streptomycin, Chloramphenicol, Cephalosporin, Erythromycin und noch einige andere. Alle genannten werden auch heute noch in der antiinfektiven Therapie verwendet. Die Entwicklung und der Einsatz mechanismus-basierter Bioassays brachten die Naturstoffe noch weiter voran [Butler, 2004]. Der β -Lactamase-Hemmer Clavulansäure aus *Streptomyces clavuligerus* [Brown et al., 1976, Howarth et al., 1976] sowie der HMG-CoA-Reductase-Hemmer Mevastatin aus *Penicillium citrinum* [bezeichnet als ML-236b in Endo et al., 1976] waren zwei der ersten Wirkstoffe, die in den 1970iger Jahren durch diese Screeningmethoden identifiziert wurden.

Newman und Cragg analysierten in einem Review den Anteil der Naturstoffe und von Naturstoffen abgeleiteten Substanzen an der Markteinführung von Arzneistoffen zwischen 1981 und 2006 [Newman and Cragg, 2007]. Die folgende Darstellung vermittelt einen Überblick über die Gesamtheit der zwischen Januar 1981 und Juni 2006 in den Weltmarkt eingeführten Substanzen, unterschieden nach ihrem Ursprung (insgesamt 1010 Substanzen).

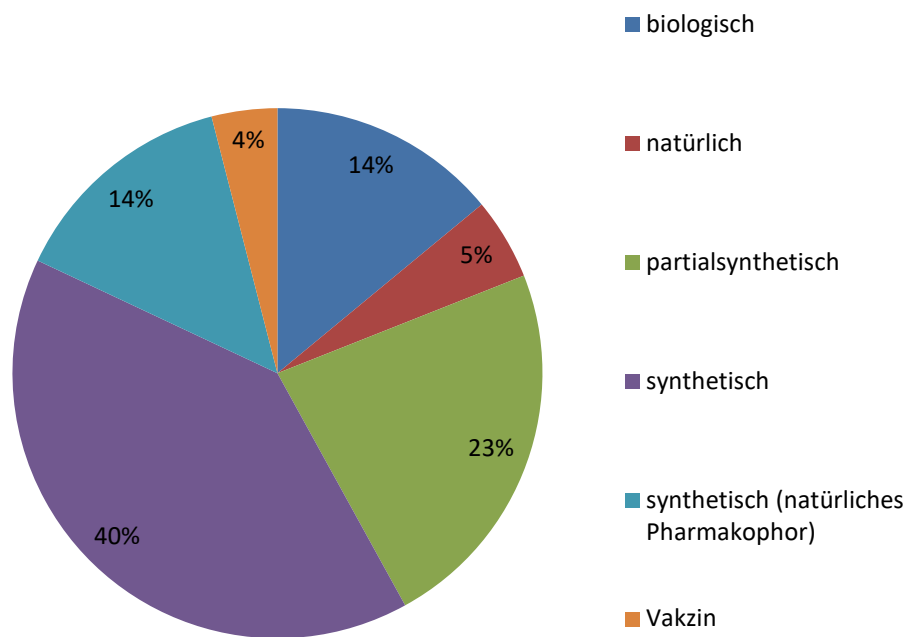


Abbildung 1: Gesamtheit der zwischen 1981 und 2006 eingeführten Wirkstoffe unterschieden nach Ursprung, abgewandelt nach [Newman and Cragg, 2007]

Hierbei wird deutlich, dass die Naturstoffe sowie durch Partialsynthese erhaltene Derivate noch immer von großer Bedeutung für die Entwicklung von neuen Pharmaka sind und eine Alternative zur Totalsynthese neuer Verbindungen darstellen. Die Kategorie „biologisch“ umfasst große Peptide oder Proteine (> 45 Aminosäuren am NH₂-Ende), die entweder aus einem Organismus oder einer Zelllinie isoliert oder durch biotechnologische Methoden hergestellt wurden. „Natürliche“ Produkte sind kleine Moleküle, die von Organismen gebildet werden, um biologische Funktionen zu erfüllen. Des Weiteren ist der Anteil synthetischer Substanzen, die nach dem Vorbild Naturstoff entwickelt wurden, mit 14 % beachtlich.

Laut Analyse Newmans und Craggs besitzen die zwischen 1981 und 2006 eingeführten Naturstoffe und deren partialsynthetischen Derivate vorwiegend antikanzerogene und antibakterielle Eigenschaften, die totalsynthetischen Substanzen, deren Pharmakophor von einem Naturstoff abgeleitet wurde, antivirale. Durch die Etablierung des High-Throughput-Screenings können in kürzester Zeit viele verschiedene Substanzgruppen synthetischen Ursprungs auf Aktivität an verschiedenen Targets getestet werden. Aus diesem Grund werden die synthetischen Wirkstoffe, markteingeführt zwischen 1981 und 2006, für verschiedenste Indikationen verwendet. Hier gibt es keine Spezifizierung auf einzelne Indikationen innerhalb

der Gruppe [Newman and Cragg, 2007]. Seit den 1940iger Jahren spielen Naturstoffe und partialsynthetische Derivate eine dominante Rolle in der Krebstherapie. Dabei beträgt ihr Anteil der bis Juni 2006 auf dem Markt der Anticancertherapeutika eingeführten Wirksubstanzen 42 % gegenüber 35 % der totalsynthetischen Wirkstoffe [Newman and Cragg, 2007].

Mit dem 31. Dezember 2003 wurden 15 Naturstoffe und von ihnen abgewandelte Substanzen in klinischen Phase III – Studien gezählt [Butler, 2004]. Davon schafften es bis heute neun Kandidaten zur Zulassung. Unter ihnen befindet sich das Sphingosin-1-phosphat Analogon Fingolimod, welches 2011 als Immunsuppressivum die europäische Zulassung erlangte (Gilenya®). Fingolimod stellt eine synthetische Nachbildung des natürlichen Wirkstoffes Myriocin dar und zeichnet sich durch eine bessere Verträglichkeit aus. Myriocin ist eine atypische Aminosäure und stammt aus dem Pilz *Isaria sinclairii* (Abb. 2).

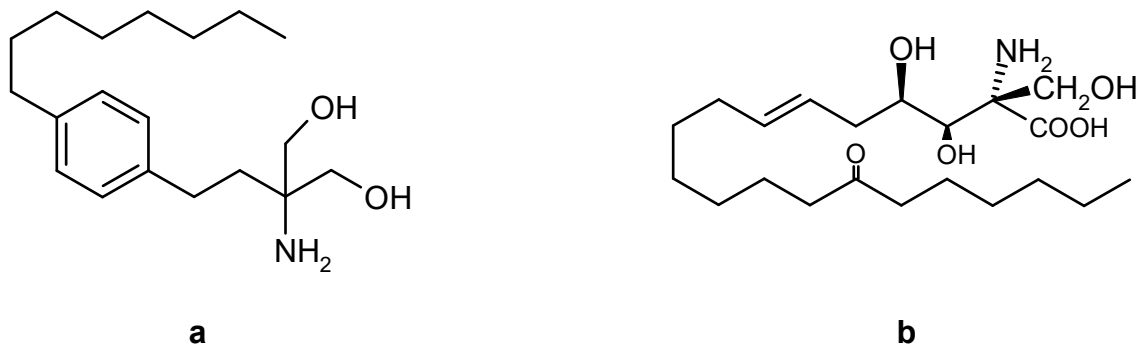


Abbildung 2: Fingolimod (a) und Myriocin (b)

Als potente und vielversprechende Quellen für Naturstoffe erwiesen sich marine Organismen, insbesondere Invertebraten wie Schwämme, Tunikaten, Bryozoen oder Meeresschnecken [Faulkner, 2002; Proksch et al., 2002]. Im Jahre 2006 kommt erstmals ein Giftstoff aus der marinen Kegelschnecke *Conus magus* als Arzneimittel auf dem europäischen Markt: Ziconotid (Prialt®), ein synthetisches Analogon des ω -Conopeptids, eingesetzt zur Bekämpfung starker chronischer Schmerzen [Becker et al., 2006; Cragg et al., 2014].

Stickstoffhaltige organische natürlich vorkommende Verbindungen wie die Alkaloide dienen bereits mehrfach als Vorlage für die Entwicklung neuer Arzneistoffe. Mit PM00101 (Zalypsis®) befindet sich ein synthetisches Tetrahydroisochinolinalkaloid, strukturell ähnlich zu vielen natürlichen marinen Verbindungen, in der klinischen Phase II zur Behandlung des multiplen Myeloms [Ocio et al., 2016; Petek et al., 2014].

Berberin – ein Alkaloid vom Protoberberin-Typ - ist ein weitverbreiteter Naturstoff, der in Pflanzen der Familien *Ranunculaceae*, *Papaveraceae* und *Fumariaceae* vorkommt [Breitmaier, 2008].

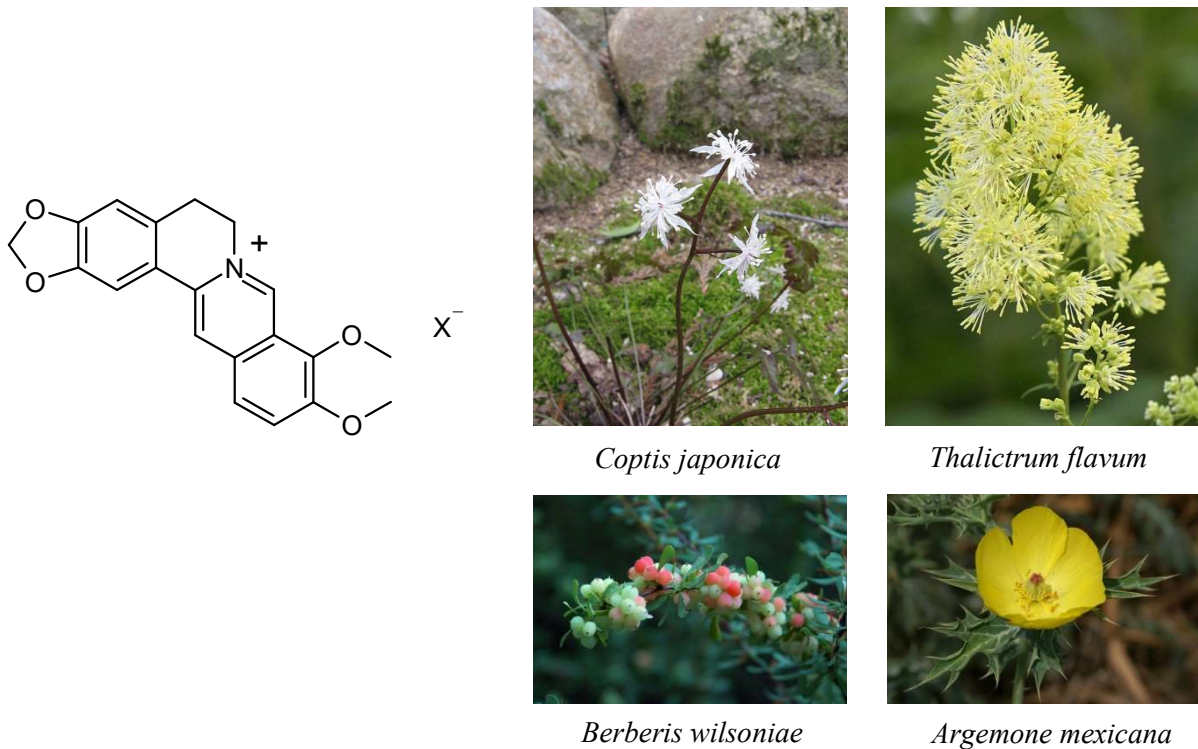


Abbildung 3: Berberin, ein Protoberberinium-Salz, und Pflanzenbeispiele seines Vorkommens

In Abbildung 3 ist die Konstitutionsformel von Berberin gezeigt. Es kommt häufig als Pyridinium-Hydroxid in der Natur vor. Manche Alkaloide, so auch Berberin, werden entsprechend ihrem Wirkprofil vor allem in fernöstlichen Gebieten in der traditionellen Medizin verwendet. Berberin und seine Salze, insbesondere Berberinsulfat und -phosphat, werden als intestinales Antiseptikum in oraler Form angewendet. Berberin besitzt antibakterielle Wirkung und inhibiert das Wachstum von Pilzen und Würmern. Daher wird es besonders oft bei Krankheiten wie bakteriellem Durchfall, Darmparasiten und Infektionen der Bindehaut verwendet. Pharmakologische Studien bestätigen für Berberin antitumorale [Kettmann et al., 2004], antiretrovirale [Gudima et al., 1994], antifungale [Volleková et al., 2003], kardioprotektive [Zheng et al., 2003], immunregulative [Kim et al., 2003], antiplasmodische [Tran et al., 2003], antiinflammatorische [Kupeli et al., 2002], antioxidative [Rockova et al., 2004] und analgetische [Yesilada und Kupeli, 2002] Wirkungen. Vor einiger Zeit wurde von der Inhibition der hepatischen HMG-CoA-Reduktase in

hyperhomocysteinämischen Ratten mit Reduktion des Cholesterolspiegels in der Leber berichtet [Wu et al., 2011].

Berberin und einige synthetische Derivate zeigen sich sogar antimykobakteriell wirksam, wobei halogenierte 13-benzylsubstituierte Verbindungen eine zwei- bis vierfach stärkere Aktivität aufweisen als die Leitstruktur selbst [Mahapatra et al., 2014].

Berberin weist auf Grund seiner quartären Azadienstruktur eine hohe Hydrophilie auf, die in einer geringen Permeabilität durch biologische Membranen und eingeschränkter Verteilung der Substanz *in vivo* resultiert. Eine Vielzahl von Untersuchungen bestätigen die geringe absolute Bioverfügbarkeit von Berberin [Chen et al., 2011; Hua et al., 2007; Yu et al., 2000]. Berberins log *P* Wert wurde mit -1.5 bestimmt [Battu et al., 2010]. Hingegen wird von einer schnellen Überwindung der Biomembranen durch Tetrahydroprotoberberine wie Tetrahydropalmatin, charakterisiert durch ein tertiäres anstelle eines quartären Grundgerüsts, berichtet [Hong et al., 2006 und 2008].

Bereits in früheren Arbeiten unseres Arbeitskreises standen Protoberberin-Alkaloide im Fokus [Meyer, 2008]. Dabei wurden im Labor synthetisierte Protoberberine sowie Verbindungen aus einer historischen Substanzsammlung Johannes Georg Gadamers (1867-1928) einem Dopamin-Rezeptor-Screening unterzogen. Zu diesem Zeitpunkt befand sich das vollsynthetische Tetrahydroprotoberberin, 12-Chlorscoulerin mit seinen vielversprechenden Eigenschaften als partieller Dopamin-Rezeptor-Agonist/Antagonist, in der klinischen Phase II zur Therapie der Schizophrenie und stellte den Ausgangspunkt für unsere Forschung auf dem Gebiet der Protoberberin-Alkaloide dar [Li et al., 2006]. Der Wirkstoffkandidat konnte sich nicht in den klinischen Studien durchsetzen.

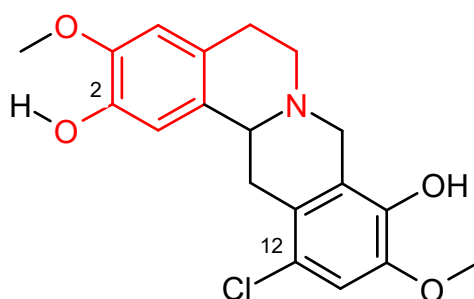


Abbildung 4: 12-Chlorscoulerin mit integrierter Dopaminstruktur (rot)

Protoberberin-Alkaloide besitzen ein tetracyclisches Ringsystem, in dem sich ein substituiertes Phenethylamin verbirgt. Auch Dopamin enthält dieses Strukturelement, genauer gesagt ist Dopamin ein zweifach hydroxyliertes Phenethylamin. 12-Chlorscoulerin weist eine

Dopaminstruktur auf, in der eine Hydroxylgruppe durch eine Methoxygruppe ersetzt ist (Abb. 4).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an die bereits durch frühere Arbeiten erlangten Ergebnisse auf dem Gebiet der Protoberberine anzuknüpfen. Dabei stand die Synthese neuartiger Protoberberine im Vordergrund.

Im folgendem sind die Kernpunkte der Arbeit aufgeführt:

1. Synthese von Tetrahydroprotoberberinen mit einem Substituenten in Position 2

Achim Meyer aus unserem Arbeitskreis erlangte im Rahmen seiner Promotion durch die Testung natürlicher Protoberberine sowie partialsynthetischer und synthetischer Derivate an Dopaminrezeptoren wichtige Struktur-Wirkungsbeziehungen. Dabei kristallisierte sich eine Affinität der am A-Aromaten mindestens monosubstituierten Derivate zum D₁-Rezeptor heraus [Meyer, 2008]. Seine Substanzsammlung enthielt keine Tetrahydroprotoberberine mit nur einem Substituenten in Position 2. Die Datenlage zur Synthese solcher Derivate ist schmal. Schon 1985 erkannten Meise und Mika, dass Zyklisierungen von Hydroxyamiden durch die Bischler-Napieralski-Reaktion nur unter definierten Bedingungen gelingen [Meise et al., 1985].

Hier galt es einen Weg zur Bildung von 2-substituierten Tetrahydroprotoberberinen zu finden und zu optimieren.

2. Synthese von Tetrahydroprotoberberinen mit Substituenten in 9,10-Stellung

Die Mehrzahl der natürlich vorkommenden Tetrahydroprotoberberine weist das sogenannte „natürliche“ Substitutionsmuster auf, d.h. sie tragen Substituenten in den Positionen 9 und 10. Die übrigen liegen in der 10, 11-substituierten Form vor, der „Pseudo“-Form.

In dem von Achim Meyer durchgeführten pharmakologischen Screening von Protoberberin-Alkaloiden an Dopaminrezeptoren zeigten die natürlichen Verbindungen mit 9,10-Substitution aus der Substanzsammlung Johannes Georg Gadamers eine höhere Affinität gegenüber dem D₁-Rezeptor als Derivate mit 10,11-Substitution [Meyer, 2008].

Viele synthetisch zugängliche Tetrahydroprotoberberine weisen Substituenten in den Positionen 10 und 11 auf. Die Wege zum tetrazyklischen Grundgerüst mit Substituenten in 9,10-Position sind tückisch. Die Schlüsse der Ringe B und C gelingen nur durch das Vorhandensein aktivierender Gruppierungen.

Hier sollten die synthetischen Arbeiten zur Aufklärung der notwendigen Syntheseschritte und -wege zum tetrazyklischen Grundgerüst der Tetrahydroprotoberberine beitragen.

3. Biologische Evaluierung der synthetisierten Substanzen an verschiedenen Testsystemen

Wie bereits beschrieben, sind die Wirkungen der Tetrahydroprotoberberine (zu) vielfältig. Keine ist ausgeprägt genug, um von pharmazeutischem Nutzen zu sein. Durch die Anwendung konvergenter Synthesen soll eine Bibliothek von Substanzen entstehen, die verschiedene Testsysteme durchlaufen soll, um eine pharmazeutisch relevante Verbindung mit spezifischer Wirkung zu identifizieren. Testsysteme sind der Agar-Diffusionstest zur Untersuchung möglicher antibakterieller und antimykotischer Wirkungen sowie Screening-Assays auf eine Inhibition der Cholesterin- und Ergosterolsynthese. Weiterhin werden begleitend ein standardisierter unspezifischer cytotoxischer Screening-Assay (MTT-Test), ein Screening an Cytochrom P450 Oxidasen und ein Testsystem zur Untersuchung der Blut-Hirnschrankengängigkeit durchgeführt.

Die Literaturrecherche ergab, dass Naturstoffe, davon abgeleitete Verbindungen sowie synthetische Verbindungen mit natürlichem Pharmakophor eine bedeutende Rolle in der Pharmaforschung und -entwicklung spielten und noch immer spielen. Vorteilhaft ist das gezielte Screening von Substanzen mit bereits empirisch ermittelten Wirkungen. Die „blinde“ Suche nach neuen Stoffen wird vermieden. Außerdem dienen Naturstoffe als Vorbild für die voll- oder partialsynthetische Herstellung von Verbindungen im Großmaßstab, um sie dem High-Throughput-Screening zuzuführen. Aufgrund dessen und der genannten pharmakologischen Wirkungen stellen Protoberberine durchaus eine hoffnungsvolle Struktur für ein anwendungsfähiges Pharmakon dar und sind deshalb Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2. Biosynthese und Synthese der Protoberberine

Im folgenden Kapitel werden die Alkaloidbiosynthese sowie die Partial- und Totalsynthesen der für diese Arbeit wichtigen Berberinderivate beschrieben.

Eines der Ziele und Herausforderungen der vorliegenden Arbeit war die Synthese von Tetrahydroprotoberberinen nach dem Vorbild natürlich vorkommender Protoberberine, d.h. Verbindungen, die Substituenten in den Positionen 9 und 10 tragen. Partial- und Vollsynthesen führen zu den gewünschten Alkaloiden. Die einfachste Variante ist die Partialsynthese solcher Verbindungen ausgehend von kommerziell erhältlichen Protoberberin-Alkaloidderivaten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Berberinchlorid und Tetrahydropalmatin als Ausgangsverbindungen herangezogen. In den folgenden Unterkapiteln und Abschnitten werden zum einen die partialsynthetische Herstellung von Tetrahydroprotoberberinen mit natürlichem Substitutionsmuster aus Berberinchlorid und Tetrahydropalmatin und zum anderen die Möglichkeiten und Grenzen der Vollsynthese dieser Protoberberine vorgestellt. Allen voran geht die Biosynthese der Benzylochinolin-Alkaloide, die als Ideengeber für die Synthese von Protoberberinen fungiert.

2.1 Biosynthese der Benzylochinolin-Alkaloide

Pflanzen produzieren etwa 12000 verschiedene Alkaloide, die anhand ihres Kohlenstoffgrundgerüsts diversen Gruppen zugeordnet werden können [Ziegler und Facchini, 2008]. Alkaloide übernehmen in vielen Pflanzen eine defensive Rolle gegenüber Herbivoren und Pathogenen. Aufgrund ihrer ausgeprägten biologischen Aktivität werden einige der 12000 Alkaloide als Pharmazeutika, Stimulanzien, Narkotika und Gifte verwendet [Ziegler und Facchini, 2008].

Die Benzylochinolin-Alkaloide repräsentieren ungefähr 2500 aufgeklärte Strukturen und bieten starke pharmazeutische Anwendungsmöglichkeiten. Einige der prominentesten Vertreter sind das narkotisch analgetische Morphin, das antitussive Codein, das muskelrelaxierende Papaverin und die antimikrobiell wirksamen Substanzen Sanguinarin und Berberin. In Abbildung 5 sind die genannten Verbindungen strukturell wiedergegeben.

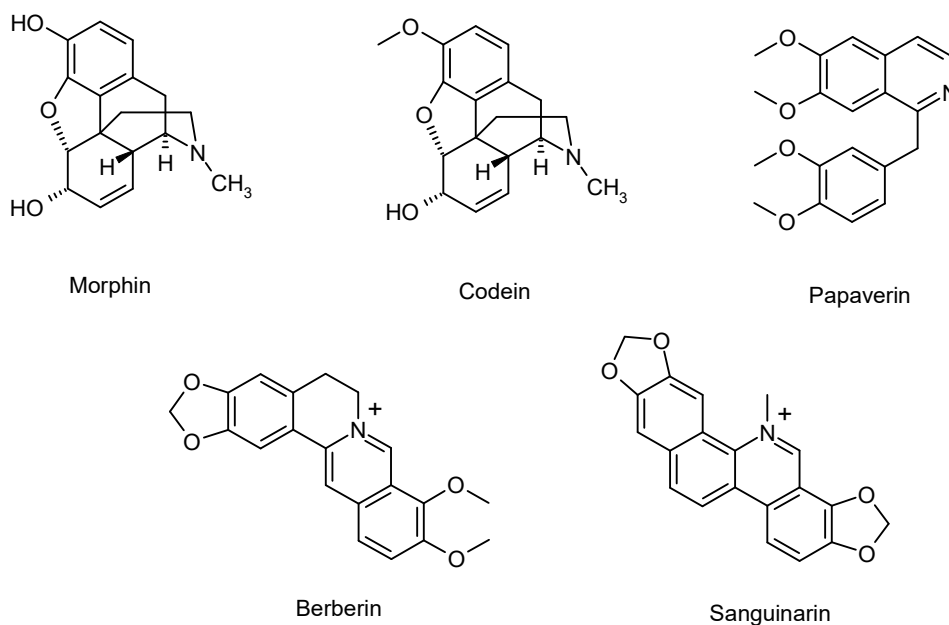


Abbildung 5: Auswahl einiger Benzylisochinolin-Alkaloide

Durch die seit Ende der 40er Jahre mögliche Anwendung der Isotopenmarkierung etablierte sich die Hypothese eines 1-Benzyltetrahydroisochinolins als gemeinsame Vorstufe der Morphin-, Protopin- und Protoberberinbiosynthese [Battersby *et al.*, 1963].

Die Entwicklung der Reinigung und Charakterisierung von Enzymen der Alkaloidbiosynthese unter Verwendung von Pflanzenzellkulturen Anfang der 1970er Jahre [Zenk *et al.*, 1977 und 1991] führte ab Ende der 1970er Jahre bis Anfang der 1990er Jahre zur nahezu vollständigen Aufklärung der Biosynthesen der Morphine und Protoberberine auf enzymatischer Ebene [Kutchan, 1998]. Vor einigen Jahren erst wurden in *Papaver somniferum* zwei Non-Häm-Dioxygenasen, Thebain 6-O-Demethylase und Codein O-Demethylase, die einzigen bekannten 2-Oxoglutarat/Fe (II)-abhängigen Dioxygenasen, die O-Demethylierungen in der Morphinbiosynthese katalysieren, identifiziert [Hagel & Facchini, 2010]. Wenig später konnte das Gen für Dihydrobenzophenanthridin-oxidase (DBOX), das für die Aromatisierung von Dihydrosanguinarin verantwortliche Enzym, aus *Papaver somniferum* isoliert werden [Hagel *et al.*, 2012]. Die an der Bildung von Noscopin, einem Phthalidisochinolinalkaloid in *Papaver somniferum*, beteiligten Enzyme Canadinsynthase (CAS) [Dang und Facchini, 2014a], N-Methylcanadin-1-hydroxylase (CYPY82Y1) [Dang und Facchini, 2014b] und Noscopinsynthase (NOS) [Chen und Facchini, 2014] wurden kürzlich isoliert und charakterisiert. Es wird davon ausgegangen, dass die in *Papaver somniferum* identifizierten Enzyme, Thebain 6-O-Demethylase und Codein O-Demethylase, auch maßgeblich an der

Regulierung der Protopinalkaloidbiosynthese durch oxidative Dealkylierungen von Methlendioxybrücken und Methoxygruppen beteiligt sind [Farrow und Facchini, 2013].

Kürzlich wurden 11 neuartige miRNAs (microRNA) in *Papaver somniferum* identifiziert und ihre Beteiligung in der Regulierung der Benzylochinolinalkaloidbiosynthese nachgewiesen [Boke et al., 2015].

Am Beginn der Benzylochinolin-Biosynthese steht die Decarboxylierung von Tyrosin zu Tyramin oder von Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) zu Dopamin, gefolgt von der Kondensation zweier Tyrosinderivate. Dabei fungieren die Tyrosindecarboxylase als Katalysator und Dopamin als Precursor für das Isochinolin-Gerüst. 4-Hydroxyphenylacetaldehyd, aus der Deaminierung von Tyramin gebildet, dient als Benzylbaustein. Die Kondensation von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd, eine Pictet-Spengler-Reaktion, zu dem ersten Intermediat (S)-Norcoclaurin wird durch das Enzym Norcoclaurinsynthase katalysiert [Rüffer und Zenk, 1987]. Im Jahre 1991 veröffentlichten Dittrich und Kutchan die Nukleotidsequenz des Berberinbrückenenzym [Dittrich und Kutchan, 1991]. Damit gelang es erstmalig, cDNA des Isochinolinalkaloidstoffwechsels zu isolieren. In den folgenden Jahren konnten weitere cDNAs der Biosynthese isoliert werden. Mittlerweile ist der Weg vom (S)-Norcoclaurin bis zum (S)-Retikulin, dem zentralen Intermediat für verschiedene Benzylochinolin-Alkaloide, vollständig auf cDNA-Ebene aufgeklärt. Die Umwandlung von (S)-Norcoclaurin zu (S)-Retikulin umfasst eine O-Methylierung in Position 6, eine N-Methylierung, eine 3'-Hydroxylierung durch eine NADPH-abhängige Monooxygenase (CYP80B3) sowie eine 4'-O-Methylierung [Huang und Kutchan, 2000]. Dabei werden die Methylierungen von S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen katalysiert [Morishige et al., 2000]. Durch diese Modifikationen entsteht mit (S)-Retikulin ein Intermediat für die oxidative Phenolkupplung zu einem Morphinandion bzw. des oxidativen Ringschlusses zum (S)-Scoulerin.

Das oben erwähnte Berberinbrückenenzym (BBE) setzt das trizyklische (S)-Retikulin zum tetrazyklischen (S)-Scoulerin um und leitet dieses in die Protoberberinbiosynthese [Dittrich und Kutchan, 1991]. Für die Modifikation der Protoberberine sind weitere Enzyme notwendig, die ebenso wie das BBE auf DNA-Ebene identifiziert wurden. Hierbei sind die S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase (9OMT) [Morishige et al., 2002] sowie methyldioxybrückenbildende NADPH-abhängige Monooxygenasen (CYP719) zu nennen [Ikezawa et al., 2003 und 2007]. Auf diesem Weg entsteht aus (S)-Scoulerin (S)-Canadin, auch als (S)-Tetrahydroberberin bezeichnet. (S)-Canadin wird darauffolgend durch die (S)-Tetrahydroberberinoxidase (STOX) zu Berberin oxidiert. Die Gene aller an der

Umwandlung von (S)-Norcoclaurin zu Berberin beteiligten Biosyntheseenzyme wurden identifiziert. Zuletzt wurde von der Isolierung der für die STOX codierenden Gene aus Mexikanischem Stachelmohn (*Argemone mexicana*) und Wilsons Berberitze (*Berberis wilsoniae*) berichtet [Gesell et al., 2011]. Die Biosynthese der Protoberberin-Alkaloide ausgehend vom L-Tyrosin ist in Abbildung 6 graphisch wiedergegeben.

Für die synthetische Darstellung des Isochinolin-Gerüsts bietet die Kondensation zweier Tyrosinderivate zum Tetrahydroisochinolin, der initiale Schritt der Biosynthese von Benzylisochinolin, einen idealen Ansatzpunkt. Diese in der Natur durch Enzyme katalysierte Reaktion kann im Syntheselabor durch die Bildung eines Phenethylacetamids aus leicht zugänglichen Derivaten der Phenyllessigsäure und Phenethylaminen mit anschließender Zyklisierung und kombinierter Hydrierung nachgeahmt werden. Hierbei dienen das Phenyllessigsäurederivat als Benzylbaustein und die Aminkomponenten als Präkursoren für das Isochinolin-Gerüst. Für die Einführung der Methyleneinheit zur Bildung des Protoberberingerüsts, welche in der Natur durch das BBE katalysiert wird, muss auf die Mannich-Reaktion zurückgegriffen werden.

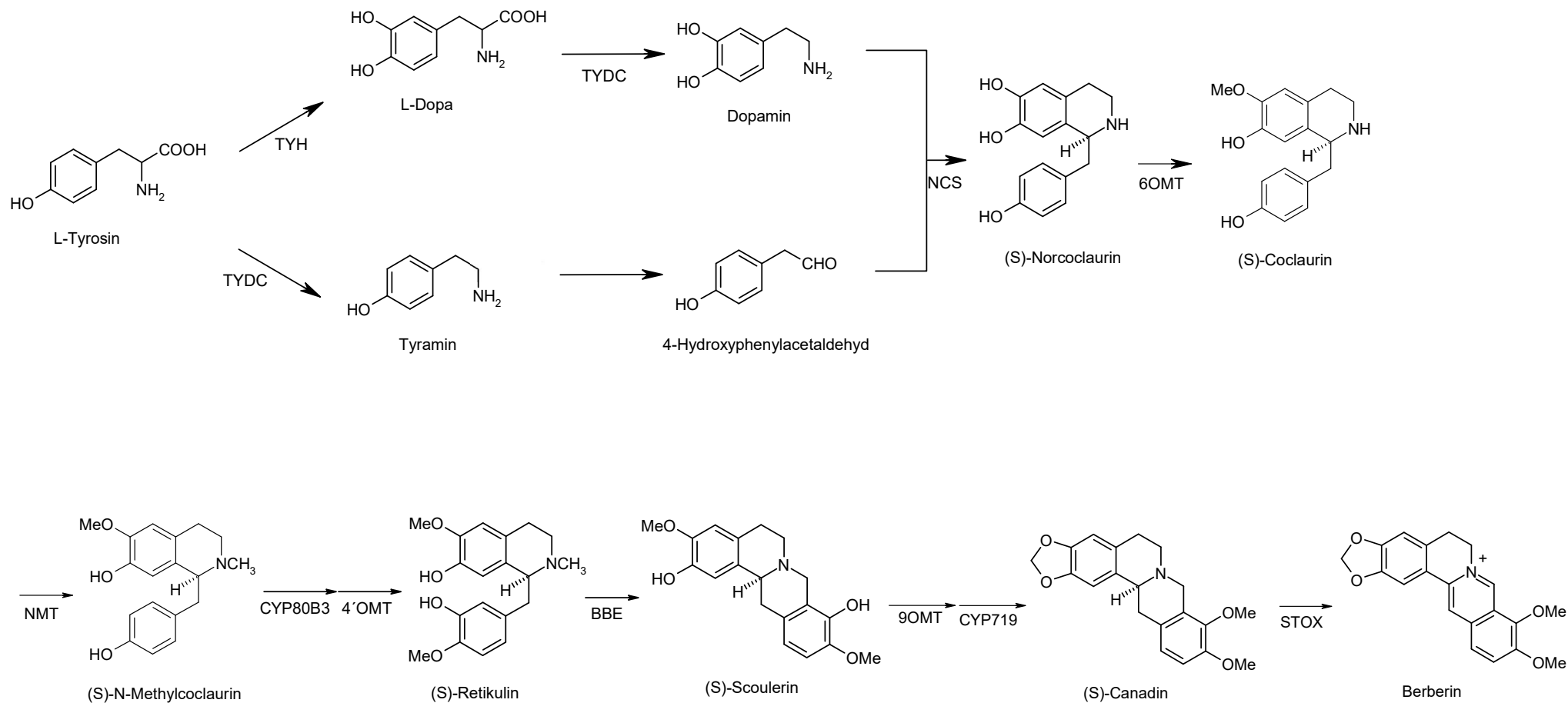


Abbildung 6: Biosynthese der Protoberberin-Alkaloide ausgehend vom L-Tyrosin; Erläuterungen siehe Text, TYH: Tyrosinhydroxylase, TYDC: Tyrosin/Dopa-Decarboxylase, NCS: Norcoclaurinsynthase, 6OMT: Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase, NMT: N-Methyltransferase, CYP80B3: N-Methylcoclaurin-3'-hydroxylase, 4'OMT: 3'-Hydroxy-N-methyl-coclaurin-4'-O-methyltransferase, BBE: Berberinbrückenenzym, 9OMT: Scoulerin 9-O-Methyltransferase, CYP719A1: Canadinsynthase, STOX: (S)-Tetrahydroberberinoxidase; modifiziert nach [Ziegler und Facchini, 2008, Facchini, 2001]

2.2. Partialsynthesen

2.2.1. Partialsynthese aus Berberin

Ausgehend von Berberinchlorid ist, wie in Abbildung 7 dargestellt, eine Vielzahl von Protoberberin-Alkaloidderivaten synthetisch zugänglich. Für diese Arbeit konnte durch eine Hydrierung mit Natriumborhydrid in Methanol aus Berberinchlorid Canadin erhalten werden. Die Umwandlung von Berberin zum Berberrubin konnte durch eine von Frerichs erstmals 1910 angewandte Reaktion erreicht werden [Frerichs, 1910]. Dabei wird das Berberinchlorid bei 200 °C mit Harnstoff zusammenschmolzen. Bei dieser Temperatur wird vermutlich das durch Abspaltung von Ammoniak entstehende Harnstoffderivat Biuret gebildet. Der genaue Mechanismus der Reaktion ist nicht bekannt. Durch eine anschließende Hydrierung des Berberrubinchlorids mit Natriumborhydrid in Methanol wird Nandinin erhalten.

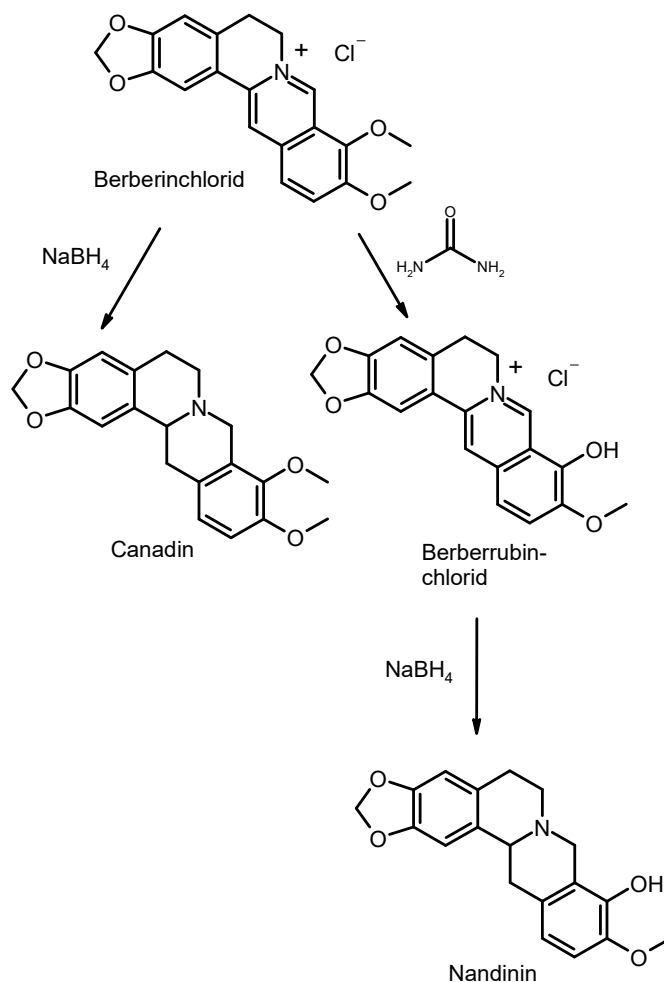


Abbildung 7: Partialsynthese von Berberrubinchlorid, Canadin und Nandinin; Erläuterungen siehe Text

2.2.2 Partialsynthese aus Tetrahydropalmatin

Ebenso wie aus Berberin sind aus Tetrahydropalmatin durch synthetische Abwandlung Derivate für die im Rahmen dieser Arbeit vorgesehenen Testungen herstellbar. Tetrahydropalmatin ist ein Tetrahydroprotoberberin, besitzt also ein tertiäres anstelle eines quartären Grundgerüsts.

Die Struktur des Tetrahydropalmatins sowie die Strukturen der durch Partialsynthese zugänglichen Zielverbindungen sind in Abbildung 8 dargestellt.

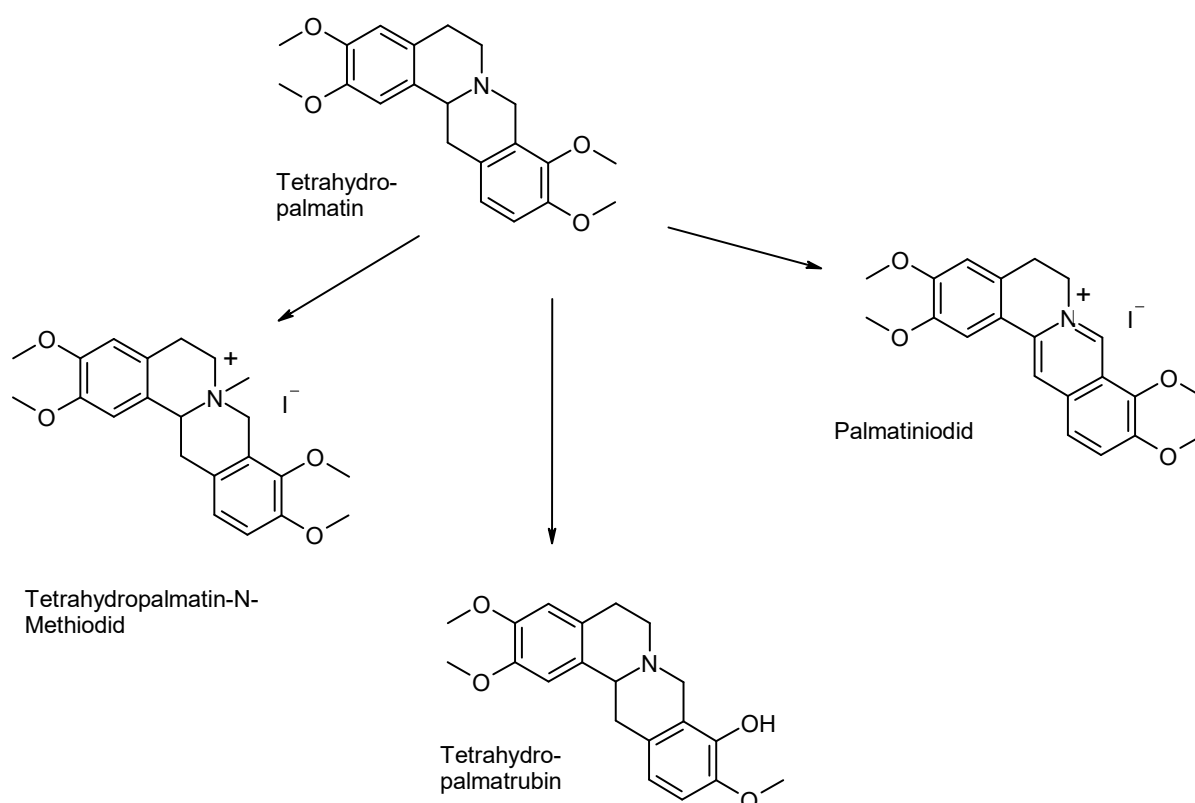


Abbildung 8: Partialsynthese von Palmatinioidid, Tetrahydropalmatrubin und Tetrahydropalmatin-N-Methiodid; Erläuterungen zur Durchführung der Synthese im Text

Palmatinioidid kann in einem einfachen oxidativen Schritt mit Iod in Ethanol erhalten werden [Holland *et al.*, 1979]. Dabei kommt es allerdings in einer Nebenreaktion zu einer elektrophilen Substitution durch Iod am Aromaten D, der durch die vorhandenen Methoxysubstituenten gegenüber dem eher schwachen Elektrophil aktiviert ist. Die nicht ablaufende elektrophile Substitution durch Iod an die freien Positionen des Aromaten A wird vermutlich durch Ring B und die Methoxysubstituenten sterisch gehindert. In folgender Abbildung 9 ist die Reaktion von Tetrahydropalmatin mit Iod zum Palmatinioidid und iodiertem Nebenprodukt dargestellt.

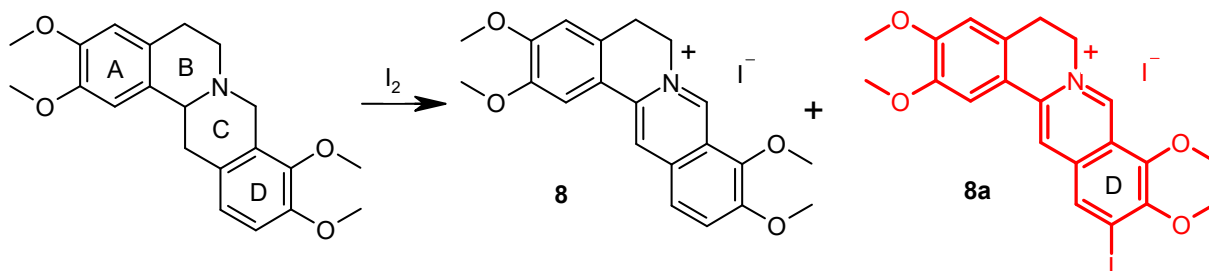


Abbildung 9: Synthese von Palmatinioid **8**, Entstehung des Nebenproduktes **8a**

Wird keine Trennung beider Produkte durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel vorgenommen, werden beide Produkte der nachfolgenden selektiven Demethylierung [Frerichs, 1910] an Position 9 und der anschließenden Hydrierung ausgesetzt (Abb. 10). Dabei entstehen die Zielverbindung Tetrahydropalmatrubin und das iodierter Tetrahydropalmatrubin als Nebenprodukt, welches ebenfalls der biologischen Testung im Rahmen dieser Arbeit unterzogen wurde.

Das Tetrahydropalmatin-N-Methiodid wird durch eine N-Methylierung von Tetrahydropalmatin mit Methyliodid in Aceton erhalten.

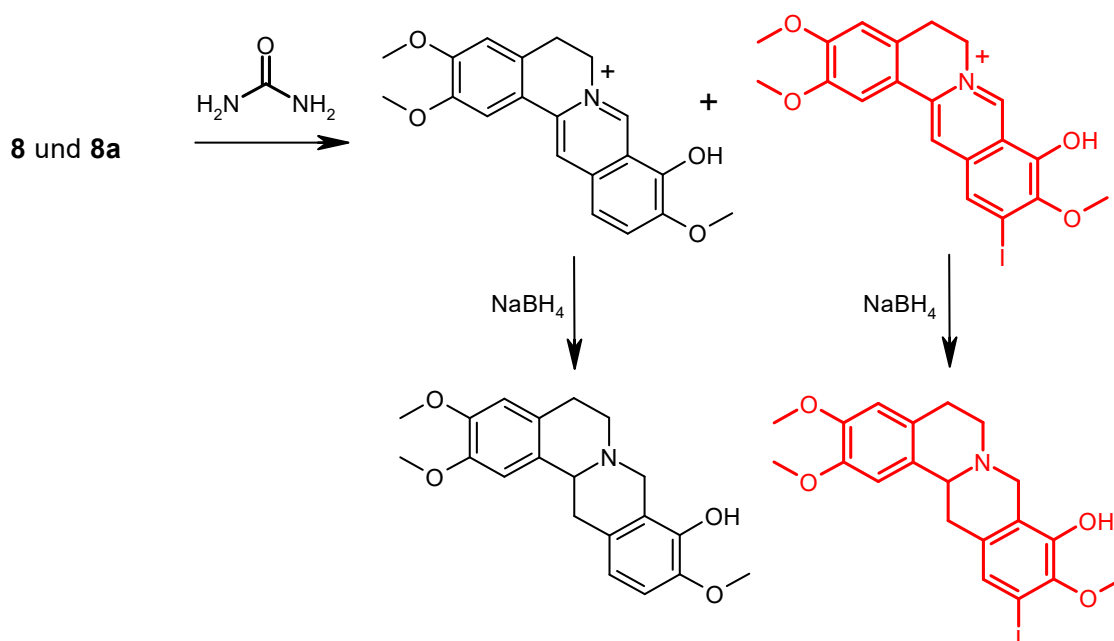


Abbildung 10: Darstellung von Tetrahydropalmatrubin und 11-Iod-Tetrahydropalmatrubin durch selektive Demethylierung und anschließender Hydrierung

2.2.3 Syntheseveruche zur Herstellung von Scoulerin und anderen hydroxylierten Derivaten des Tetrahydropalmatins

Scoulerin als natürliches Vorbild des vielversprechenden Dopamin D1-Agonisten/D2-Antagonisten Chlorscoulerin weist im Vergleich zu Tetrahydropalmatrubin zwei Hydroxygruppen auf: in den Positionen 2 und 9 (Abb. 11).

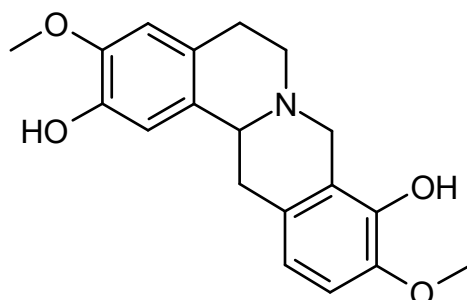


Abbildung 11: Scoulerin

Die Partialsynthese dieser Verbindung aus Tetrahydropalmatin wurde im Rahmen dieser Arbeit auf vier Wegen versucht. Knackpunkt der Synthese ist die selektive Demethylierung des Ausgangsstoffes.

2.2.3.1 Demethylierung von Tetrahydropalmatin mit Bromwasserstoffsäure

Dreistündiges Erhitzen des Tetrahydropalmatins in 48 %iger wässriger HBr-Lösung unter Lichtausschluss und im Argonstrom sowie anschließende Umkristallisation des entstehenden Feststoffes aus Ethanol führten lediglich zu einem vollständig demethylierten Tetrahydroprotoberberin. Diese Methode der Etherspaltung erwies sich als zu drastisch und unselektiv. Tetrahydroxyberbin-Hydrobromid (**26**) wurde isoliert und die biologische Wirksamkeit in verschiedenen Testsystemen untersucht.

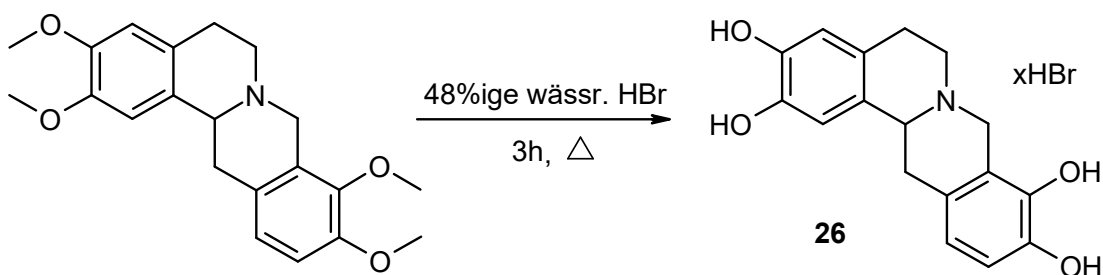


Abbildung 12: Darstellung von Tetrahydroxyberbin-Hydrobromid (**26**) aus Tetrahydropalmatin

2.2.3.2 Demethylierung von Tetrahydropalmatin mit Tribromboran

Ma et al. verwendeten Tribromboran zur selektiven Etherspaltung von Isochinolinalkaloiden [Ma et al., 2008]. Tribromboran ist eine Lewisäure. In folgender Abbildung ist die Reaktionsfolge der Demethylierung mit BBr_3 dargestellt.

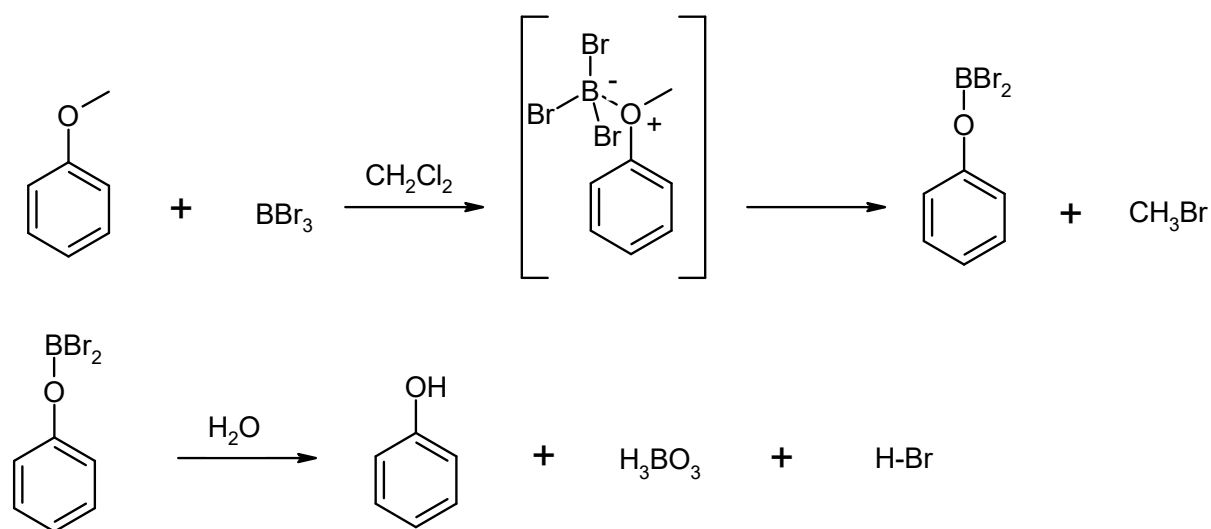


Abbildung 13: Etherspaltung mit Tribromboran

Beim ersten Syntheseversuch rührten wir 1.0 g Tetrahydropalmatin in 25 mL trockenem Methylenchlorid. Es wurden 5 molare Äquivalente Tribromboran hinzugefügt und die Reaktionsmischung bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ für eine Stunde gerührt. Dabei zeigte sich nach Zugabe von BBr_3 ein zäher, schlecht zu rührender Niederschlag. Nach einer Stunde wurde mit 150 mL Methylenchlorid verdünnt und die organische Phase mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Dabei bildete sich erneut eine schwerlösliche Masse. Mittels Dünnschichtchromatographie (Eluent: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5 %) konnten vier Substanzen in der organischen Phase detektiert werden. Nach Auftragen der Vergleichssubstanzen Tetrahydropalmatin (Rf-Wert: 0.76) und Scoulerin (Rf-Wert: 0.48) konnten zwei Spots diesen Verbindungen zugeordnet werden. THP gibt nach Bedampfen der DC-Platte mit Iod einen gelben Spot, die anderen Verbindungen einen gelblich braunen. Im ESI-MS konnten die Massen 355 für THP, 327 für Scoulerin sowie 341 und 313 identifiziert werden. Bei einer einfachen Demethylierung von Tetrahydropalmatin wird eine Verbindung der Masse 341, bei der Spaltung von drei Ethergruppen eine Verbindung der Masse 313 erhalten. Somit konnten die beiden zusätzlichen Flecken auf der DC-Platte diesen Substanzen zugeordnet werden. Die Substanz mit einer Hydroxygruppe und drei Methoxygruppen (Rf-Wert: 0.55) wird weniger

stark auf der Kieselgel-DC-Platte zurückgehalten als Scoulerin, jedoch stärker als THP. Die stärkste Retention von allen Verbindungen erfährt das dreifach hydroxylierte Protoberberin (Rf-Wert: 0.19).

Insgesamt war die Ausbeute der Synthese aufgrund der Bildung des zähen Niederschlages nach Zugabe von BBr_3 bzw. gesättigter NaHCO_3 -Lösung und der unvollständigen Umsetzung des Eduktes eher unbefriedigend. Nach einer Verlängerung der Reaktionszeit um 30 Minuten wurden alle Methoxygruppen gespalten. Wurde das Reaktionsgemisch in eine eiskalte Lösung von NaHCO_3 gegossen oder stattdessen eine wässrige Lösung von Natriumfluorid eingesetzt, bildete sich weniger schwerlöslicher Niederschlag. Dieser wurde abgefrittet und versucht zu lösen (H_2O , CH_2Cl_2 , MeOH). Im Wasser löste sich nur wenig, in Methanol war die Löslichkeit am höchsten, jedoch befand sich in dieser Phase nicht das gewünschte Produkt. In der Methylenchloridphase waren gemäß DC und ESI-MS alle Verbindungen enthalten – vom Ausgangsstoff THP über Scoulerin bis hin zur vollständig demethylierten Verbindung.

Eine Trennung der entstandenen Produkte durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel war schwierig. Ein grundlegendes Problem war die Löslichkeit der Verbindungen. Nur unter Zusatz polarer Lösungsmittel wie Methanol oder Dimethylsulfoxid konnte dieser in Lösung gebracht werden. Eine hinreichende Trennung und Reinigung aller Produkte konnte nicht erzielt werden. Es konnte von Scoulerin und einer einfach demethylierten Verbindung – das EI-MS lässt auf eine OH-Gruppe am A-Aromaten schließen, nur sehr wenig gewonnen werden (Abb. 14a und b). Durch die Abspaltung der Methylgruppe an C-2 entsteht aus Tetrahydropalmin Tetrahydrocolumbamin, durch die Demethylierung an C-3 Corypalmin. Die Schwerlöslichkeit der Feststoffe spricht für das Vorliegen von Hydrobromiden. Das EI-Massenspektrum von Scoulerin entspricht den in der Literatur veröffentlichten analytischen Daten [Chen *et al.*, 1968]. Die BBr_3 -Methode führte ebenfalls nicht zum gewünschten Ziel.

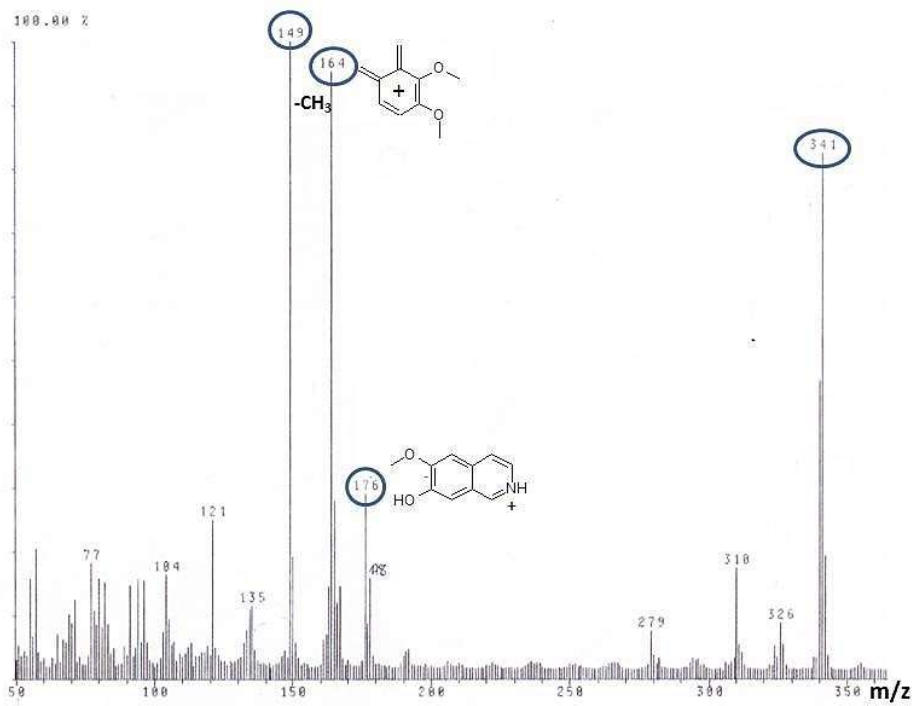


Abbildung 14a: EI-Massenspektrum: einfach demethyliertes Berbin (Tetrahydrocolumbamin/Corypalmin)

100 %

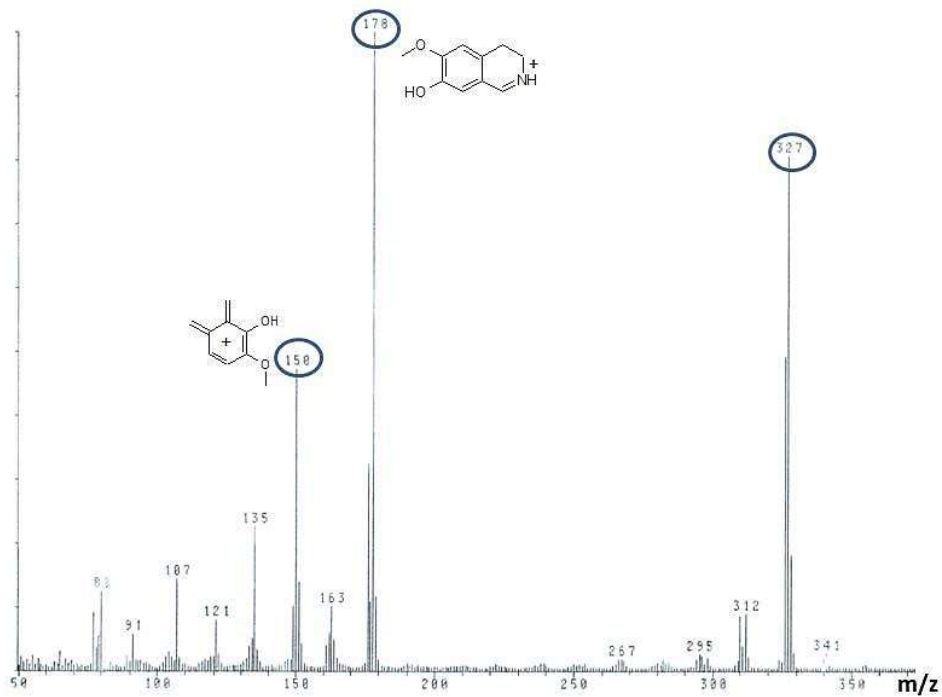


Abbildung 14b: EI-Massenspektrum: Scoulerin

2.2.3.3 Demethylierung von Tetrahydropalmatin mit $\text{AlCl}_3\text{-NaI}$

Eine schonende Methode der Demethylierung wurde von Asghari und Ghiaci entwickelt [Asghari et al., 2003]. Dabei wird die zu demethylierende Substanz mit je 2 Äquivalenten AlCl_3 und NaI im Mörser verrieben und anschließend für 8 Stunden im Trockenschrank auf 70-80 °C erwärmt. Nach Zugabe von wässriger Natriumthiosulfat-Lösung (5 %) zum Reaktionsgemisch wird mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Auch bei dieser Methode gelang keine selektive Demethylierung des Tetrahydropalmatins. Zudem konnte auch hier keine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung erreicht werden. Die Verlängerung der Reaktionszeit und/oder die Erhöhung der Konzentration des Spaltungsreagenz' $\text{AlCl}_3\text{-NaI}$ führten nicht zum Erfolg, vielmehr entstand dadurch das Tetrahydroxyberbin als alleiniges Produkt neben dem nicht umgesetzten Edukt.

2.2.3.4 Demethylierung von Tetrahydropalmatin mit Natriumbenzylselenolat

In einer Publikation von Ahmad et al. wird die regioselektive O-Demethylierung von Aporphinalkaloiden vorgestellt [Ahmad et al., 1977]. Hierbei wird das für die Gesundheit nicht ganz ungefährliche Dibenzyldiselenid verwendet. Daraus wird in situ durch einen Überschuss NaBH_4 in trockenem DMF und in Argonatmosphäre das eigentliche Reagenz – Natriumbenzylselenolat – hergestellt (Abb. 15). Zu dem Reaktionsgemisch wird das Alkaloid, gelöst in DMF, hinzugegeben. Es wird 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung und Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand in 5 %iger Schwefelsäure aufgenommen und mit Toluol ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird auf pH 8-9 gebracht und mit Chloroform extrahiert.

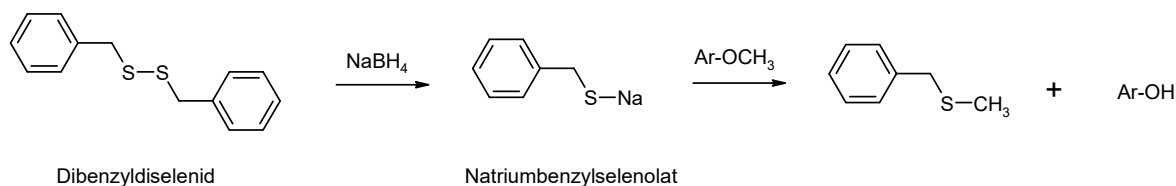


Abbildung 15: O-Demethylierung von Alkaloiden durch Natriumbenzylselenolat nach in situ Herstellung aus Dibenzyldiselenid

Auch bei dieser Methode konnte das Edukt nicht vollständig umgesetzt werden. Nach der chromatographischen Reinigung an Kieselgel konnten aufgrund der schlechten Auftrennung nur geringe Mengen der einfach demethylierten Substanz und Scoulerin fraktioniert werden. Tetrahydroxyberbin als ein Endprodukt wurde nicht identifiziert.

Diese Methode der Etherspaltung erwies sich am geeignetsten von allen vorgestellten Varianten in Bezug auf das Synthesergebnis: weniger Nebenprodukte und vor allem in organischen Lösungsmitteln gut lösliche Verbindungen. Die Bedingungen der Reinigung der Substanzen an Kieselgel gilt es zu optimieren, um ausreichende Substanzmengen beider Verbindungen zu erhalten. Allerdings wurde dieser Weg von uns nicht weiterverfolgt, zumal das Reagenz Natriumbenzylselenolat aufgrund seiner Giftigkeit und seines beständigen, überaus hartnäckigen stechenden Geruchs diese Methode der Demethylierung von THP unpraktikabel macht.

2.3 Totalsynthese von Protoberberinen

2.3.1 Literaturbekanntes

Wie unter 2.1. beschrieben zählen die Protoberberine zu den Benzylisochinolin-Alkaloiden. Daher ist es nicht erstaunlich, dass die Mehrheit der synthetischen Ansätze der Protoberberin-Alkaloide auf den Grundsynthesen der Isochinoline basieren. Drei Zugangswege sind vor allem zu nennen: Die Pomeranz-Fritsch-Reaktion, das Pictet-Spengler-Verfahren sowie die Bischler-Napieralski-Reaktion.

Bei der Pomeranz-Fritsch-Reaktion wird ein aromatischer Aldehyd mit einem Aminoacetal zu einem Iminoacetal kondensiert, welches anschließend unter Säurekatalyse zum Isochinolin zyklisiert. [Pomeranz, 1893, Fritsch, 1893]. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 16 dargestellt.

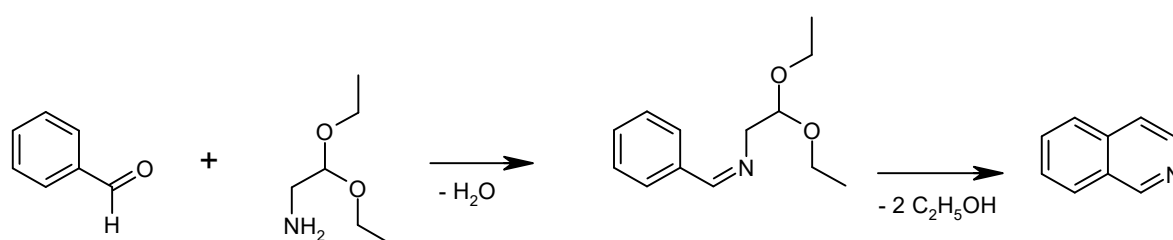


Abbildung 16: Darstellung von Isochinolinen durch die Pomeranz-Fritsch-Reaktion; Erläuterungen im Text

Die Pictet-Spengler-Reaktion als weitere Synthesemöglichkeit für Isochinoline liefert aus 2-Phenylethylaminen und Aldehyden in Gegenwart von Säuren 1,2,3,4-Tetrahydroisochinoline (Abb. 17) [Pictet, Spengler, 1911]. Imine (Schiffsche Basen) treten dabei als Zwischenstufe auf. Bei dem zweiten Reaktionsschritt handelt es sich um eine intramolekulare Variante der Mannich-Reaktion.

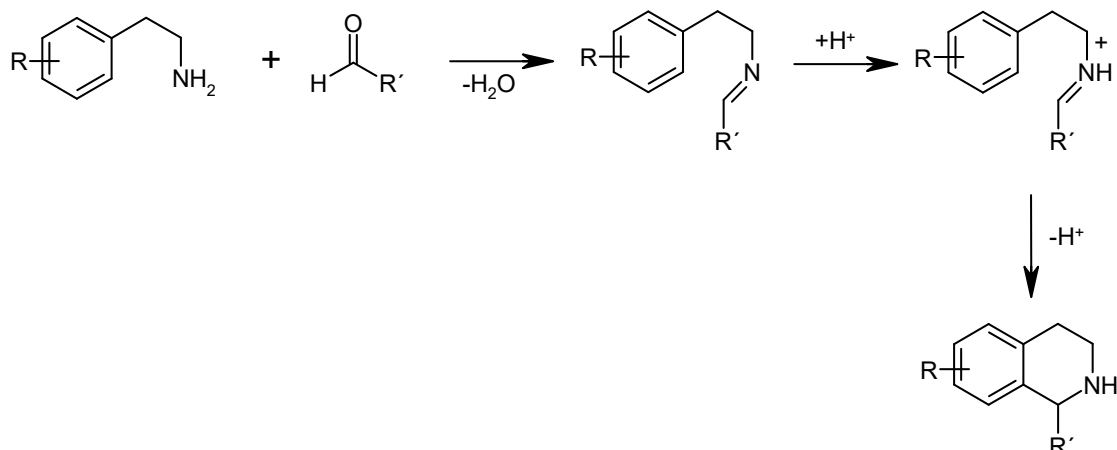


Abbildung 17: Darstellung von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolinen durch die Pictet-Spengler-Reaktion

In der Literatur spielt die Bischler-Napieralski-Reaktion die wichtigste Rolle zur Vollsynthese von Protoberberinen [Bischler, Napieralski, 1893]. Diese 1893 beschriebene Reaktion beruht auf einer unter Wasserabspaltung ablaufenden Zyklisierung von 2-Phenylethylacetamiden zu 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolinen unter Einsatz von Kondensationsmitteln wie Phosphorylchlorid oder Phosphorpentoxid (Abb.18).

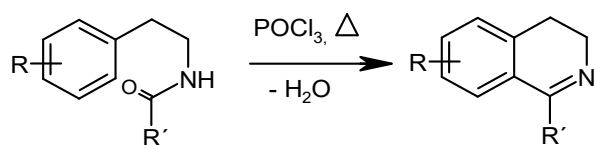


Abbildung 18: Darstellung von 3,4-Dihydroisochinolinen durch die Bischler-Napieralski-Reaktion

Wahrscheinlich reagiert ein intermediär gebildetes Nitrilium-Ion mit dem Aromaten im Sinne einer elektrophilen aromatischen Substitution und leitet somit den Ringschluss ein [Fodor et al., 1972].

Aufgrund geringer und vor allem wechselnder Ausbeuten kam es zu zahlreichen Modifikationen der Reaktion, die Whaley in einem Übersichtsartikel zusammenfasste [Whaley, 1951]. Durch Kombination der Reaktion mit einer nachfolgenden Hydrierung werden Tetrahydroisochinoline erhalten. Dieser Fakt sowie die leichte Zugänglichkeit der Edukte, Phenethylamine und Phenylethylsäurederivate, führten zu meiner Entscheidung, die Bischler-Napieralski-Reaktion für die Darstellung von Protoberberin-Alkaloiden im Rahmen dieser Arbeit zu verwenden.

2.3.2 Der synthetische Weg zum Protoberberin

Die Synthese von Protoberberinen beginnt üblicherweise mit der Kopplung eines Phenylethylaminderivats mit einem Phenylethylamin zum Phenethylacetamid. An die darauffolgende Zyklisierung mit kombinierter Hydrierung zum Tetrahydroisochinolin schließt sich die Mannich-Reaktion an, die die fehlende Methyleneinheit zur Vervollständigung des Protoberberingerüsts einführt. Abbildung 19 zeigt die Reaktionsfolge. Details einzelner Syntheseschritte sind im Anhang (10.1.3) aufgeführt.

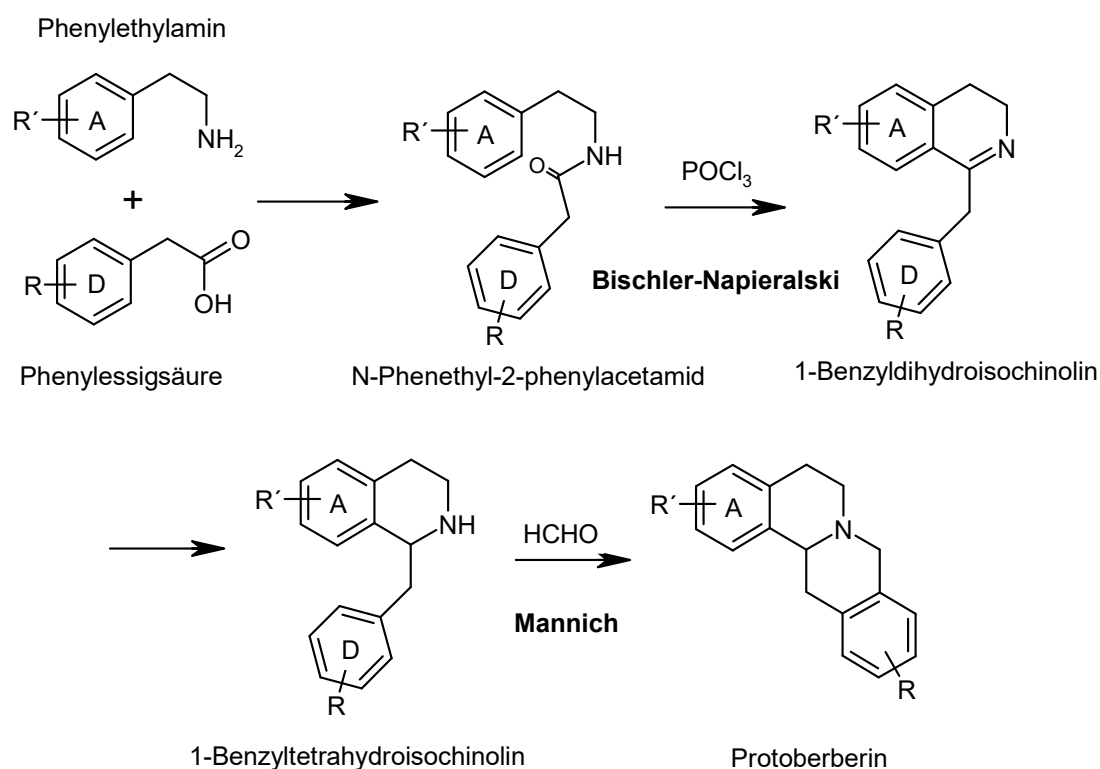
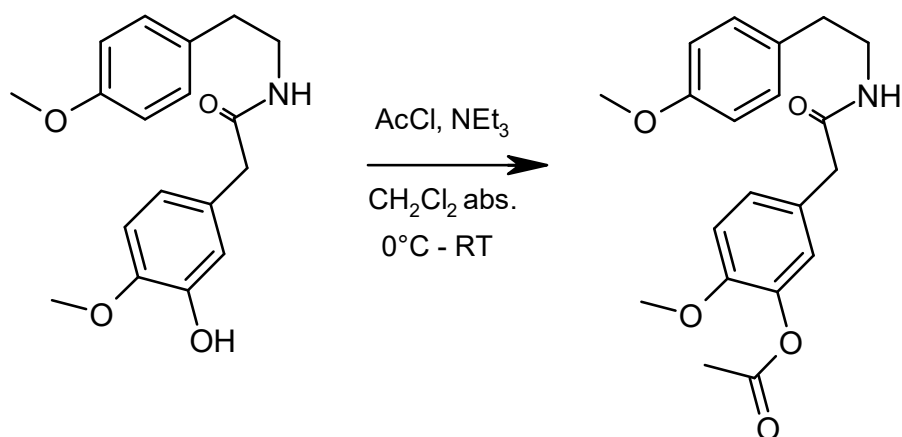


Abbildung 19: Reaktionsfolge der Protoberberin-Synthese

2.3.3 Synthese der Phenylacetamide

Die Bildung des Phenylacetamids gelingt ohne vorherige Aktivierung der Säurekomponente unter Anwendung von hohen Temperaturen und unter Ausschluss von Sauerstoff [Teitel und Bossi, 1968]. Dazu werden das Phenylethylaminderivat und 1.1 molare Äquivalente Phenethylamin in Xylol 14 bis 16 Stunden lang am Rückfluss unter Argonatmosphäre gekocht. Das Amid wird nach Abdestillieren des Lösungsmittels aus Ethylacetat und Heptan umkristallisiert. Ölige Produkte werden durch eine Chromatographie an Kieselgel gereinigt. Da bekannt ist, dass Phosphorylchlorid direkt mit freien Hydroxylgruppen reagiert und somit Phosphorsäureester als Nebenprodukte entstehen, ist es notwendig, für den anschließenden Ringschluss vorhandene Phenolgruppen zu schützen. Dies geschieht, wie in Abbildung 20

gezeigt, durch Umsetzung des Phenylacetamids mit 1.05 molaren Äquivalenten Acetylchlorid in trockenem Dichlormethan unter Zusatz von 1.1 molaren Äquivalenten Triethylamin bei 0 °C bzw. Raumtemperatur.



2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-
N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid

2-(3-Acetoxy-4-methoxyphenyl)-
N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid

Abbildung 20: Einführen einer Schutzgruppe in das Phenylacetamid; Erläuterungen im Text

Die Verknüpfung eines Phenylessigsäurederivates mit dem entsprechenden Phenylethylamin zum Phenylacetamid, ohne vorherige Aktivierung der Säurekomponente, liefert üblicherweise Ausbeuten zwischen 70 und 96 %. Diese Ausbeute wurde bei der Kopplung von Dopamin-Hydrochlorid und Homoveratrumsäure zu *N*-[2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl](3,4-dimethoxyphenyl)acetamid nicht erreicht. Hierbei wurde lediglich eine Ausbeute von 15 % erzielt. Auch unter Verwendung von 4-*N,N*-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) und [*N*-(3-Dimethylamino-propyl)-*N*-ethylcarbodiimid] (EDC) als Kondensationsmittel konnte keine Erhöhung der Ausbeute erreicht werden. Auch die Bildung von *N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl]-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-acetamid gelang nicht durch die einfache Kopplung von Tyramin und Homoisovanillinsäure unter Anwendung von hohen Temperaturen in Argonatmosphäre. Hierbei wurde die Bildung des Amids sowohl durch die schlechte Löslichkeit Tyramins in Toluol als auch die Eigenschaft des Tyramins mit der Carbonsäure ein Ester zu bilden beeinflusst. Änderungen von Reaktionsbedingungen wie der Austausch des Lösungsmittels (Dimethylformamid, Ethanol) und eine veränderte Reaktionstemperatur verhalfen nicht zur Herstellung des gewünschten Produktes. Eine zuvor durchgeführte Acetylierung zur Protektion der Hydroxylgruppe des Tyramins sollte die Carbonsäureesterbildung unterbinden. Dennoch

gelang die Synthese des Amids nicht. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass bei dieser Reaktion eine Aktivierung der Ausgangsstoffe für die Kopplung unumgänglich ist. Versuche, das Amid unter Verwendung von EDC/DMAP oder HBTU (*N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphat) zu erhalten, misslangen.

Schließlich konnte *N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl]-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-acetamid unter Einsatz von (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) und Hünig-Base (Diisopropylethylamin, DIPEA) synthetisiert werden. Zugrunde gelegt wurde die Arbeit von Kim und Patel [*Kim und Patel, 1994*], die BOP ((Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat) zur Synthese von Estern mit säure- und baselabilen Schutzgruppen unter milden Bedingungen verwendeten. Das Kupplungsreagenz PyBOP dient der Aktivierung von Homoisoanillinsäure und generiert das sehr reaktive Phosphonium-Intermediat **A** (Abb. 21). Diese Verbindung lagert sich zu dem weniger reaktiven Benzotriazolylester **B** um. Aufgrund der Nucleophilie des Amins kann dieses mit beiden Verbindungen, **A** und **B**, zum Amid reagieren. Alkohole dagegen sind weniger nucleophil und reagieren ausschließlich mit Verbindung **A** zum Ester. Tyramin und Homoisoanillinsäure könnten als Phenole unter Esterbildung mit **A** reagieren. Eine Publikation von Le Bras et. al [*Le Bras et al., 2007*] beschreibt die erfolgreiche Kopplung von Coumarin und Aminophenol mit Hilfe von PyBOP und Hünig-Base. Hier gelang die Isolierung von 74 % des Amids durch gleichzeitiges Vorlegen der Ausgangsstoffe und PyBOP und anschließendem Hinzufügen von Diisopropylethylamin. Die primäre aliphatische Aminfunktion des Tyramins ist basisch und könnte bei der Reaktion die Aufgabe des Diisopropylethylamins als Hilfsbase zur Bindung von Protonen übernehmen und protoniert nicht mehr für die Amidbildung zur Verfügung stehen. Um das zu unterbinden und vorrangig das Carbonsäureamid zu bilden, haben wir zuerst Tyramin und Homoisoanillinsäure in DMF gerührt und anschließend PyBOP beinahe zeitgleich mit DIPEA hinzugefügt. Nun erst bilden sich die Intermediate **A** und **B**, welche beide mit dem Amin zum Amid reagieren können. Nach zweifacher Reinigung mit Hilfe der Säulenchromatographie konnten tatsächlich 70 % des Amids isoliert werden.

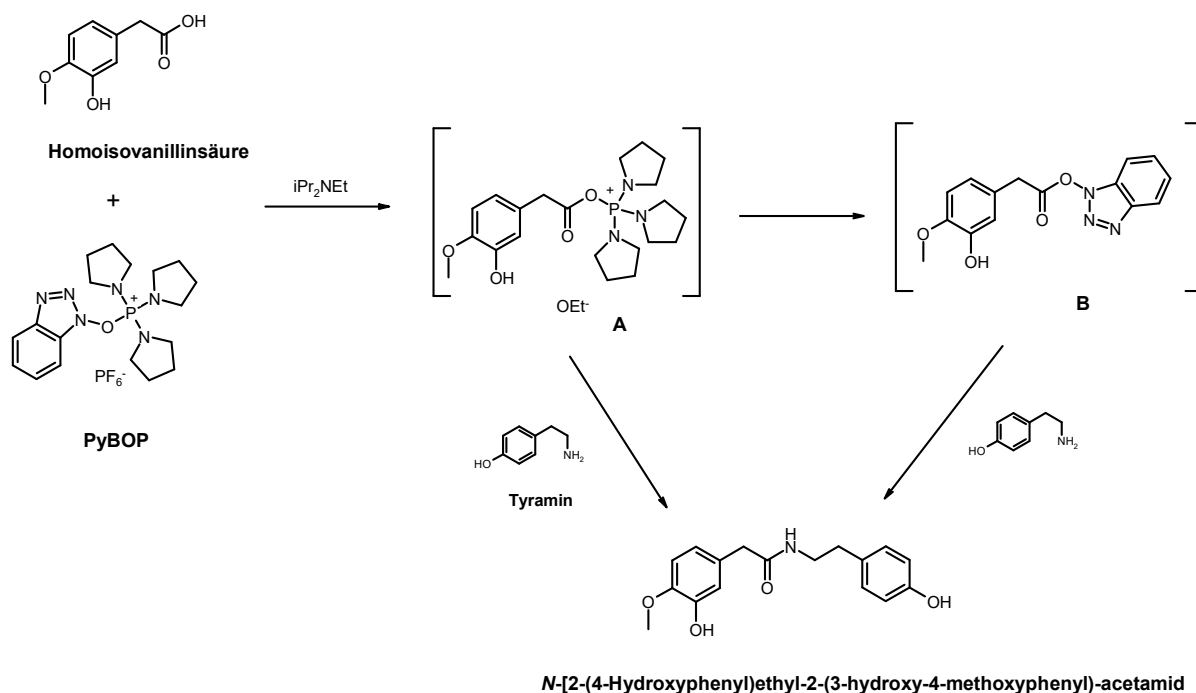


Abbildung 21: Kupplung von Homoisoavanillinsäure und Tyramin unter Verwendung von PyBOP/DIPEA; Erläuterungen im Text

2.3.4 Mit dem Bischler-Napieralski-Ringschluss zum Tetrahydroisochinolin

Das Phenylacetamid wurde, gelöst oder suspendiert in Toluol, mit 10 molaren Äquivalenten frisch destilliertem Phosphorylchlorid unter Argonatmosphäre versetzt. Die Bischler-Napieralski-Reaktion wird durch die Aktivierung der Amidfunktion mit Phosphorylchlorid eingeleitet. Dieses Gemisch wurde fünf bis sechs Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung unter Vakuum destilliert, bis ein dickes Öl verbleibt [*modifiziert nach Grote et al., 2008*]. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und unter Eiskühlung portionsweise mit Natriumborhydrid über eine Stunde versetzt. Danach wurde eine Stunde zum Rückfluss erhitzt, um gegebenenfalls eine zuvor eingeführte Schutzgruppe der Phenolfunktion abzuspalten. Andernfalls wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Wie schon Meise und Mika feststellten, ist für das Gelingen des Ringschlusses nach Bischler-Napieralski ein bestimmtes Substitutionsmuster am Aromaten A notwendig [*Meise et al., 1985*]. In der hier vorgelegten Arbeit wurde bestätigt, dass für den Ringschluss eine aktivierende Gruppierung - z.B. eine Methoxygruppe - in Paraposition zur Ringschlussstelle vorhanden sein muss (Abb. 22). Modifikationen wie die Verlängerung der Reaktionszeit führten nicht zum gewünschten Ringschluss.

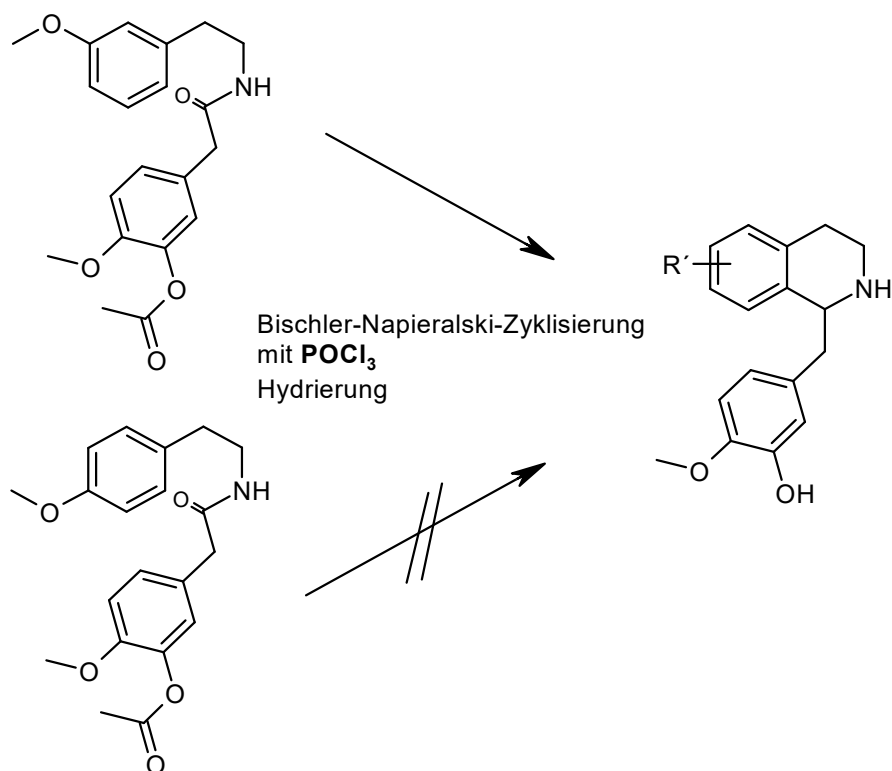


Abbildung 22: Synthese von Tetrahydroisochinolinen durch Bischler-Napieralski-Reaktion

Allerdings konnte bei Zusatz eines weiteren Kondensationsmittels, in diesem Fall Phosphorpentoxid, ein Ringschluss auch bei Verbindungen mit nicht aktiviertem A-Aromaten erzielt werden, jedoch in sehr niedrigen Ausbeuten (5 %), was eine Abwandlung der Aufarbeitung notwendig machte.

In dieser Variante suspendierten wir das *N*-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]-phenylacetamid (Beispiel) in Toluol und setzten unter Argonatmosphäre 6 molare Äquivalente POCl_3 zu. Nach der Erwärmung des Reaktionsgemisches zum Rückfluss wurden portionsweise 10 molare Äquivalente Phosphorpentoxid hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von fünf bis sechs Stunden wurde der gesamte Kolbeninhalt auf Eis gegossen, um überschüssiges Kondensationsmittel zu zerstören. Nach Alkalisieren der Mischung mit 20 %iger Natronlauge wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Die Hydrierung erfolgte wie oben beschrieben.

Eine alleinige Verwendung von Phosphorpentoxid als Kondensationsmittel für den Ringschluss erwies sich als nicht ausreichend.

Das Zwischenprodukt 1-Benzyl-dihydroisochinolin (Abb. 19) wurde sofort, wie beschrieben, der Hydrierung mit NaBH_4 unterworfen. Es ist eine instabile Verbindung. Erste Synthesen zur Bildung von Tetrahydroisochinolin unter zeitlicher Trennung von Bischler-Napieralski-Reaktion und Hydrierung zeigten dies. Schon während der Aufarbeitung des 1-Benzyl-dihydroisochinolins konnte per Dünnschichtchromatographie ein Nebenprodukt, welches im Laufe der Aufarbeitung zum Hauptprodukt wurde, nachgewiesen werden. Erstmals darauf aufmerksam wurden wir bei der Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisoquinolin (Abb. 23).

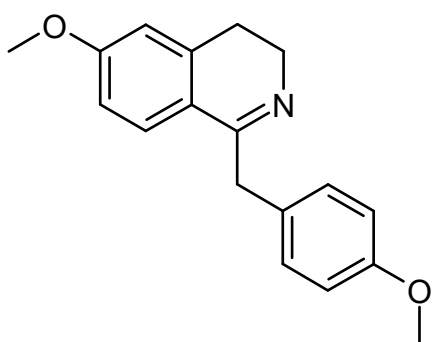


Abbildung 23: 1-(4-Methoxybenzyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisochinolin

Nach sofortiger Aufarbeitung und Trennung beider Substanzen mittels Säulenchromatographie sowie direkt anschließender NMR-Untersuchung zeigte sich, dass sich die Substanzen nur um ein Signal im NMR-Spektrum unterschieden. 1-(4-Methoxybenzyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisoquinolin enthält im Gegensatz zum unbekanntem Nebenprodukt ein singuläres Signal für zwei Wasserstoffatome der Benzylgruppe bei 3.96 ppm. Im Massenspektrum (FTMS) der unbekanntem Verbindung konnte ein Molekülpeak $M+1$ von 296 detektiert werden. Somit unterscheiden sich die Molekülmassen beider Substanzen um 14 g/mol. Nach weitergehender Untersuchung der unbekanntem Verbindung mittels ^{13}C -NMR und Elementaranalyse konnte die Verbindung als 1-(4-Methoxybenzoyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisochinolin identifiziert werden (Abb. 24).

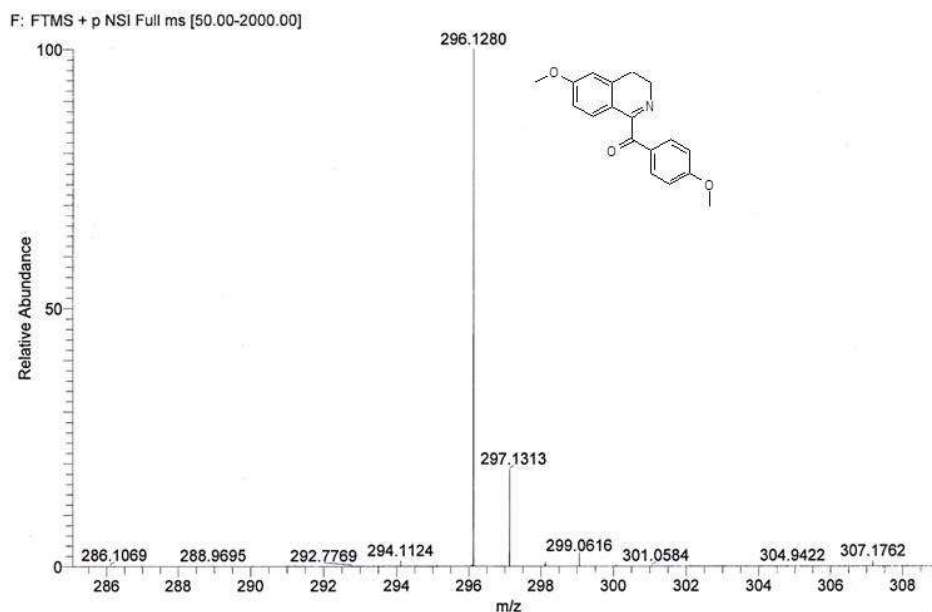


Abbildung 24: Massenspektrum von 1-(4-Methoxybenzoyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisochinolin

Die vollständigen Daten zur Analytik befinden sich im Anhang (10.1.3).

Bermejo et al. berichteten 2002 von der Entdeckung neuartiger antitumoral wirkender Isochinoline, die störend auf die G1-Phase des Zellzyklus wirken [Bermejo et al., 2002]. Am stärksten zytotoxisch zeigten sich dabei 1-Benzoyl-3,4-dihydroisochinoline. Aus diesem Grund unterwarfen wir das beim Ringschluss von *N*-[2-(3-Methoxyphenyl)ethyl](4-methoxyphenyl)acetamid entstandene 1-(4-Methoxybenzoyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisochinolin ebenfalls der später durchgeführten Testung auf zytotoxischen Aktivität der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen (Unterkapitel 3.3).

Die Bildung carbonylgruppenhaltiger Kondensationsprodukte bei der Bischler-Napieralski-Reaktion wurde bereits 1924 von Buck, Haworth und Perkin beobachtet [Buck et al., 1924]. Sie stellten eine leichte Oxidierbarkeit der Methylengruppe bei substituierten 1-Benzyl-3,4-dihydroisochinolin durch Stehen in alkoholischer, etherischer oder benzolischer Lösung an der Luft fest. Martin und Jefford begründen diese Reaktion mit einer lichtabhängigen Photooxidation einiger substituiertes 1-Benzyl-3,4-dihydroisochinoline [Martin and Jefford, 1982].

2.3.5 Fördernde und hemmende Einflussfaktoren der Bischler-Napieralski-Reaktion

Eine erfolgreiche Zyklisierung von 2-Phenylethylacetamiden zu 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolinen nach Bischler-Napieralski ist von einigen Faktoren abhängig.

Als erste Voraussetzung gilt das Vorhandensein aktivierender Substituenten an dem Aromaten, an dem ein Ringschluss stattfinden soll (Abb. 22). Wird dies außer Acht gelassen, kein zusätzliches Kondensationsmittel neben POCl_3 eingesetzt und das instabile Produkt der Bischler-Napieralski-Reaktion unverzüglich der Hydrierung mit NaBH_4 zugeführt, entsteht ein Diphenethylamin als Reaktionsprodukt. Folgende Abbildung verdeutlicht die Reaktion anhand eines Beispiels (Abb. 25). Kuehne und Shannon wiesen bereits in einer Publikation im Jahre 1976 auf die Möglichkeit der Reduktion von Amiden mit Hilfe von POCl_3 und NaBH_4 hin [Kuehne und Shannon, 1976].

fehlende Aktivierung

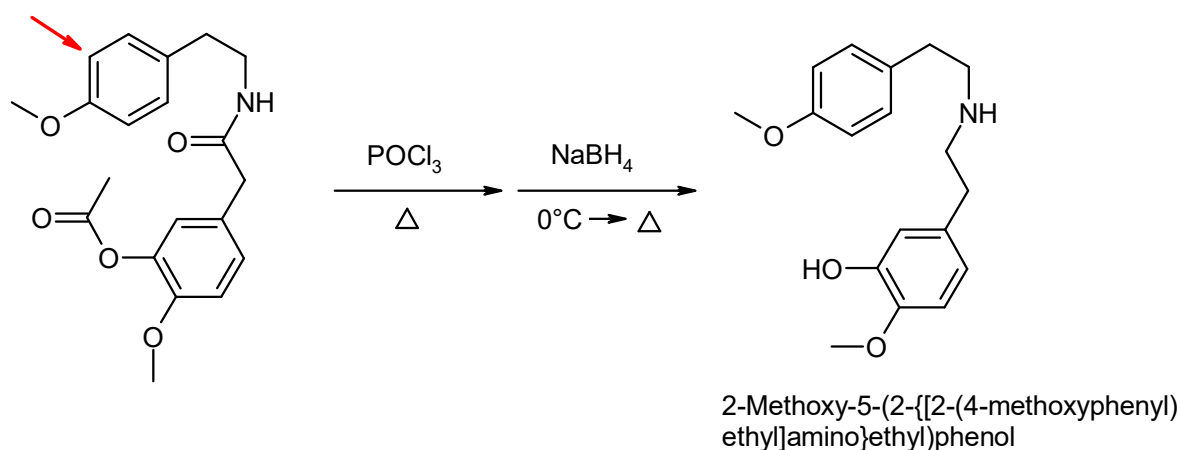


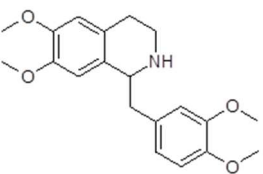
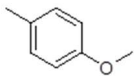

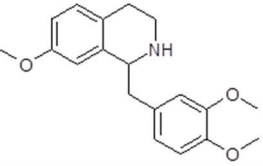
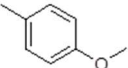

Abbildung 25: Bildung eines Diphenethylamins unter Bischler-Napieralski-Reaktionsbedingungen

Des Weiteren ist bei der Umsetzung arylsubstituierter Phenylacetamide zur Vermeidung carbonylgruppenhaltiger Kondensationsprodukte durch Oxidation des entstehenden Dihydroisochinolins unbedingt unter Sauerstoffausschluss zu arbeiten (siehe Abschnitt 2.3.4). Eine sofortige Hydrierung des Rohproduktes, idealerweise ebenfalls in Argonatmosphäre durchgeführt, minimiert die Gefahr der Oxidation der Verbindung und trägt somit zur Erhöhung der Ausbeute des Tetrahydroisochinolins bei.

Zusätzlich zeigte sich, dass nicht nur Art und Position der Substituenten am A-Aromaten entscheidend für den positiven Verlauf des Ringschlusses sind, sondern auch die Substituenten am D-Aromaten einen Einfluss auf die Ausbeute der Reaktion ausüben. Je mehr Substituenten mit negativem induktiven Effekt (-I-Effekt) an diesem Aromaten vorhanden sind, desto

geringer die Ausbeute des Reaktionsproduktes. Dies trifft allerdings nur auf Verbindungen mit deaktiviertem A-Aromaten zu. Synthetische Versuche zeigten, dass elektronenziehende Substituenten am Aromaten D den Ablauf der Bischler-Napieralski-Reaktion bei Vorhandensein eines aktivierten A-Aromaten nicht beeinflussen. Die folgende Tabelle 1 gibt die Ergebnisse synthetischer Versuche bezüglich des Ringschlusses nach Bischler-Napieralski wider.

Tabelle 1: Einfluss von Arylsubstituenten auf die Ausbeute der Synthese von Tetrahydroisochinolininen durch Bischler-Napieralski-Zyklisierung und Hydrierung; roh: Gesamtausbeute gravimetrisch bestimmt, ohne Reinigung des Produktes, isoliert: nach Reinigung (Säulenchromatographie)

	Verbindung	Ausbeute
aktivierter Aromat A		78 % (isoliert)
		77 % (isoliert)
		80 % (isoliert)
deaktivierter Aromat A		12 % (roh) 5 % (isoliert)
		25 % (roh) 12 % (isoliert)
		62 % (roh) 30 % (isoliert)

2.3.6 Die Mannich-Reaktion

Bei der Mannich-Reaktion wird das Tetrahydroisochinolin mit Formaldehyd in salzsaurer methanolischer Lösung umgesetzt (Abb. 26).

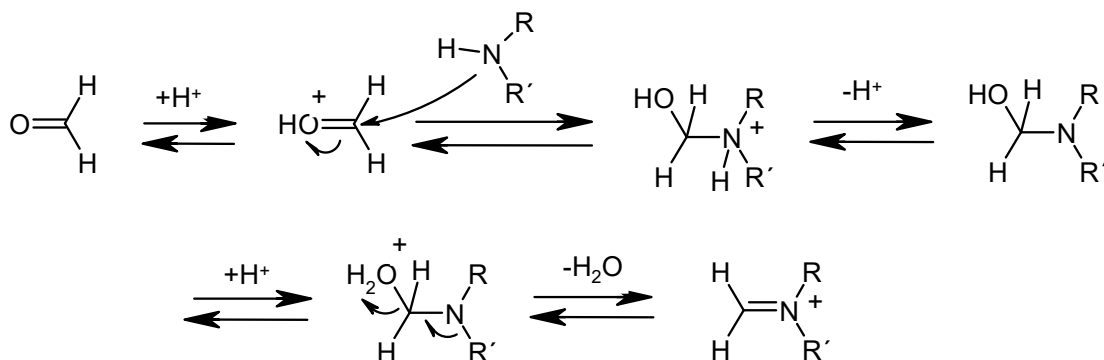


Abbildung 26: Bildung des Carbenium-Iminium-Ions während der Mannich-Reaktion

Einschränkend bei der Mannich-Reaktion ist das Erfordernis von aktivierenden Substituenten am Ring D, d.h. am Phenylelessigsäurederivat. Ringschlüsse mit unsubstituierten Derivaten gelingen nicht. Das Vorhandensein von +M- oder +I-Substituenten ist essentiell. Befinden sich aktivierende Methoxygruppen am D-Ring des Tetrahydroisochinolins, wie in Abbildung 27 gezeigt, entsteht ausschließlich das Pseudoprotoberberin mit den Methoxygruppen in 10,11-Substitution. Die Methoxygruppen, welche zu den Substituenten der 1. Ordnung gehören, dirigieren den zweiten Substituenten in o- und p-Stellung, wobei gewöhnlich die p-Position überwiegt [Beyer, Walter, 1998]. In diesem konkreten Fall konnte nur das Pseudoprotoberberin isoliert werden.

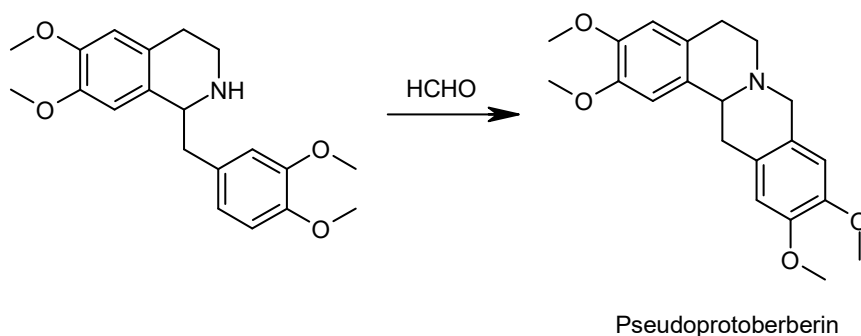


Abbildung 27: Bildung eines Pseudoprotoberberins durch die Mannich-Reaktion

Die Arbeitsgruppe um Kametani untersuchte die Bildung von Nandinin und Canadin via Mannich-Reaktion bei verschiedenen pH-Werten genauer [Kametani et al., 1971]. Canadin besitzt zwei Methoxygruppen in 9,10-Substitution. Sie erhielten bei dem Versuch, das

entsprechende Tetrahydroisochinolin zu Canadin umzusetzen, nur das Pseudoprotoberberin. Nandinin hingegen besitzt in 9-Position eine OH-Gruppe. Bei Reaktionen im Sauren und Neutralen konnte Kametani sowohl das Pseudo- als auch das Protoberberin isolieren, wobei das Protoberberin, d.h. Nandinin im pH-Bereich 1 bis 2 überwog. Im Neutralen dagegen dominierte das Pseudoprotoberberin und bei einem pH-Wert von 7.8 wurde nur noch das Pseudoprotoberberin in geringer Ausbeute erhalten. Bei ähnlichen Untersuchungen ausgehend vom 1-(3-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin im Rahmen dieser Arbeit wurden bei Reaktionen im Sauren und Neutralen in etwa gleiche Mengen beide Protoberberine detektiert. Da die Aminogruppe unter diesen Reaktionsbedingungen protoniert vorliegt, erscheint folgender Ansatz zu Erklärung der Reaktion denkbar: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Formaldehyd und dem Phenol lenken die Substitution in die o-Position. Dieser mögliche Mechanismus ist in Abbildung 28 gezeigt.

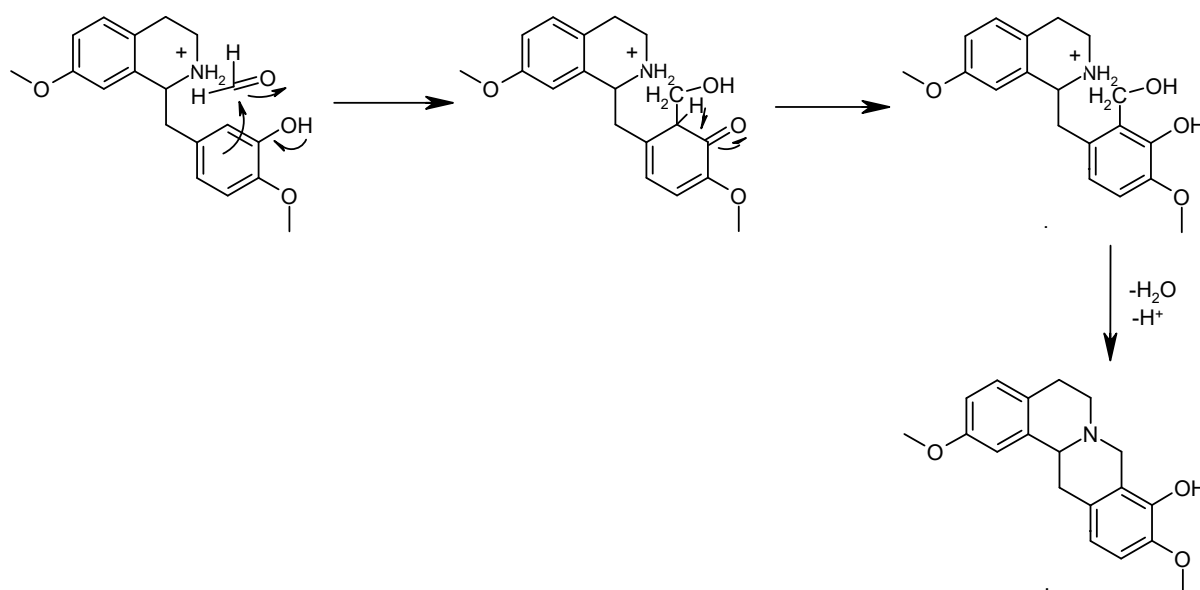


Abbildung 28: vorgeschlagener Mechanismus der Bildung von hydroxylierten Protoberberinen via Mannich-Reaktion

Das Entstehen beider Produkte konnte in der Substanzcharakterisierung mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie bewiesen werden. Typisch für Protoberberine ist das Signal für 8-H, ausgeprägt als Dublett mit einer chemischen Verschiebung von ca. 4.2 ppm im ^1H -NMR-Spektrum. Bei Pseudoprotoberberinen erscheint das Dublett mit einer chemischen Verschiebung von 3.9 ppm. Hervorragend eignet sich die EI-Massenspektrometrie für die Identifizierung und Unterscheidung der Protoberberin-Alkaloide. Diese Alkaloide spalten sich in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion in folgende Fragmente:

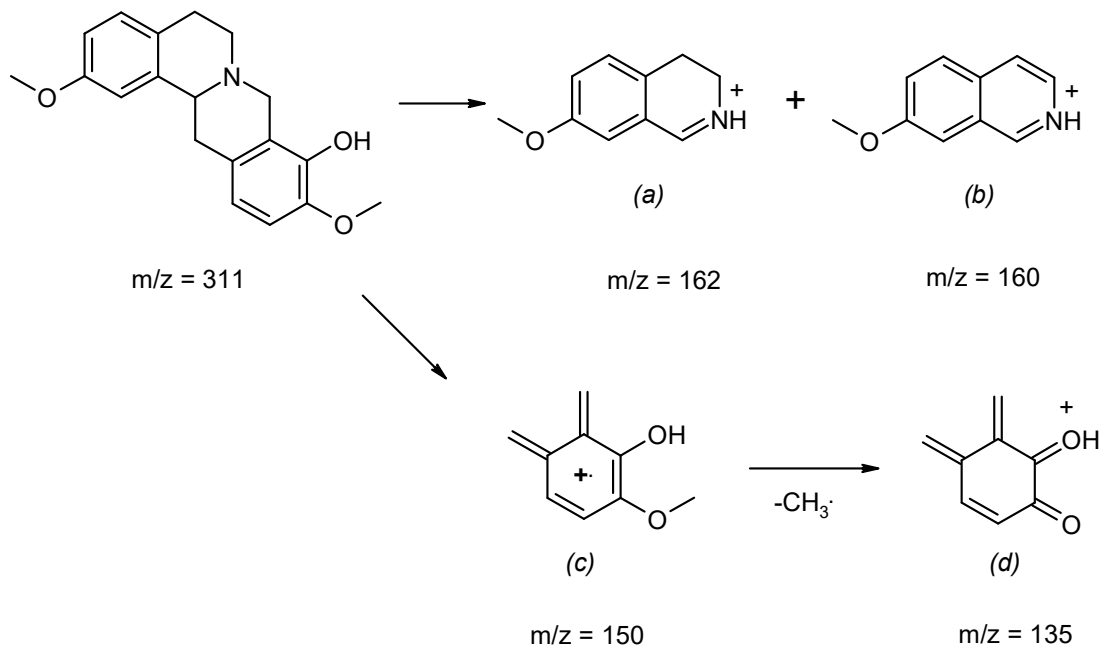


Abbildung 29: Hauptfragmente aus 2,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin

Im Falle eines 10,11-Substitutionsmusters tritt das Fragment (c) mit einer annähernd vergleichbaren Intensität wie der Basispeak, Fragment (a), auf. Bei 9,10-substituierten hydroxylierten Protoberberin-Alkaloiden dagegen ist der Peak des Fragments (c) in seiner Intensität um etwa 50 % vermindert [Chen et al., 1968].

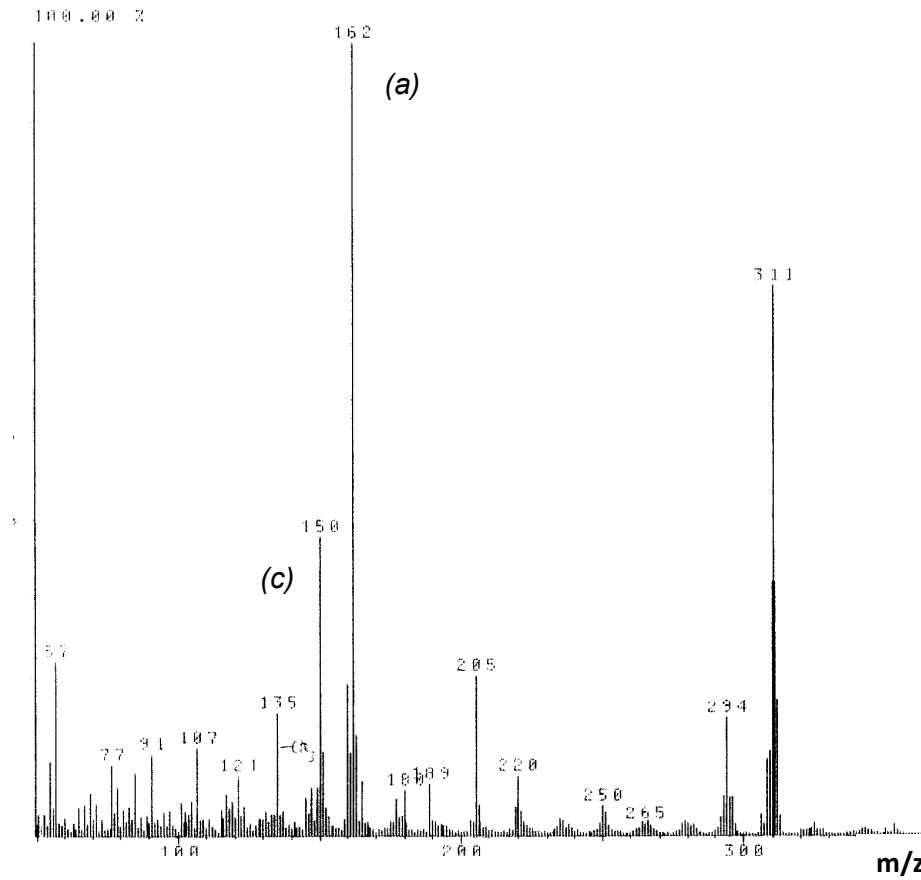
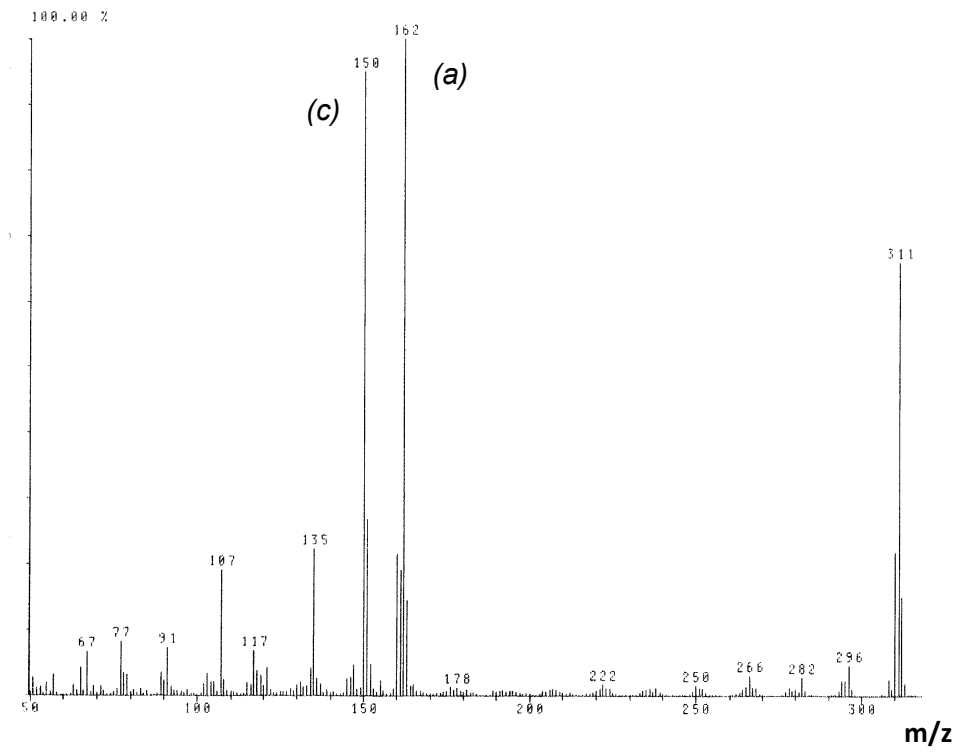


Abbildung 30: EI-Massenspektren, oben: 2,10-Dimethoxy-11-hydroxyberbin, unten: 2,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin

2.3.7 Die Arylbromierung – Schlüsselreaktion zur Synthese 9,10-substituierter Protoberberine ?

Mit Hilfe einer Bromierung des D-Aromaten ist es möglich, den zukünftigen Ring C der Protoberberine auch ohne das Vorhandensein den Ringschluss aktivierender Substituenten zu schließen bzw. nicht erwünschte Ringschlussstellen am Aromaten zu blockieren.

Choi und Chi beschrieben die Anwendung von Bromsubstituenten als Schutzgruppen bei Reaktionen von Aromaten [Choi et al., 2001]. Brom als Substituent 1. Ordnung wirkt nicht allzu stark desaktivierend auf die elektrophile Einführung weiterer Substituenten und erscheint daher hier geeignet.

Gerade im Hinblick auf die Synthese 9-Hydroxy-10-methoxy-substituierter Protoberberinderivate ist der von Choi et al. vorgeschlagene Einsatz von Bromsubstituenten als Schutzgruppen, hier für die Blockade unerwünschter Ringschlussstellen, interessant.

Eine Bromierung des Aromaten gelingt leicht (Abb. 31).

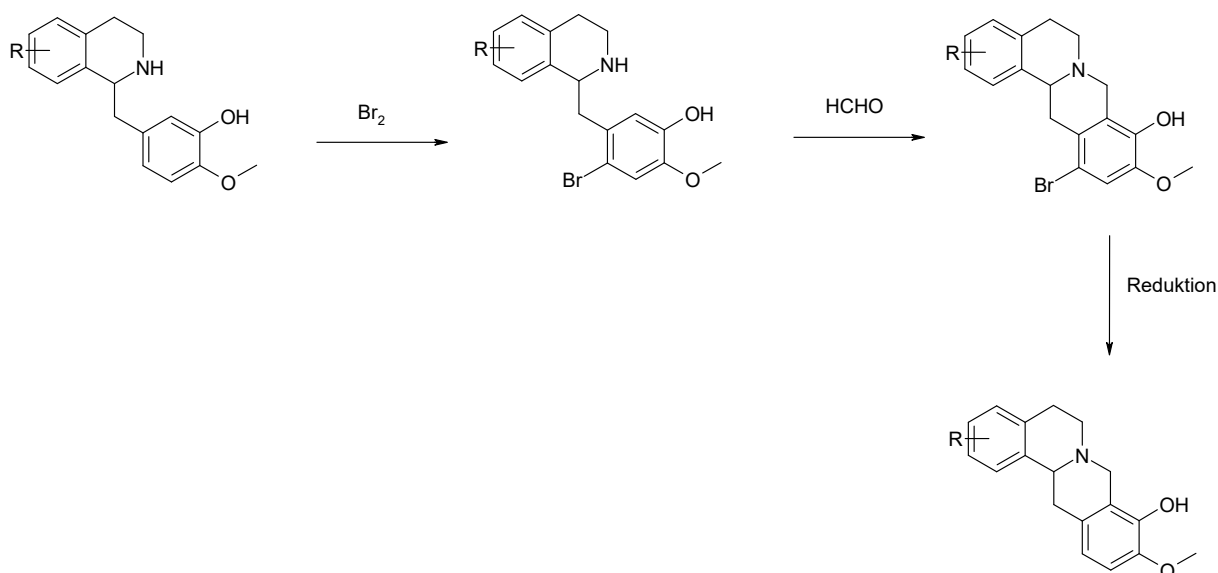


Abbildung 31: Bromierung eines Tetrahydroisochinolins; Erläuterungen im Text

Bromphenole sind alkalisensitiv. Aus diesem Grund wird nicht das Phenyllessigsäurederivat vor der Amidbildung bromiert, sondern erst das Intermediat Tetrahydroisochinolin, um die Gesamtausbeute der Synthese so hoch wie möglich zu halten. Die Hydroxylgruppe dirigiert den Zweitsubstituenten vorwiegend in *o*- und *p*-Stellung. Die Debromierung kann mit LiAlH₄ erfolgen [Nagata et al., 1975]. Diese Form der Protodebromierung ist ziemlich radikal und kann in der Entstehung zahlreicher unerwünschter Nebenprodukte resultieren. Choi et al. beschreiben in ihrer Arbeit die Möglichkeit der selektiven Protodebromierung in Gegenwart eines „Bromfängers“ wie Natriumsulfit [Choi et al., 2001]. Reaktives Agens ist hierbei HBr.

Diese Reaktion stellt die Rückreaktion der elektrophilen Aromatenbromierung dar (Abb. 32).

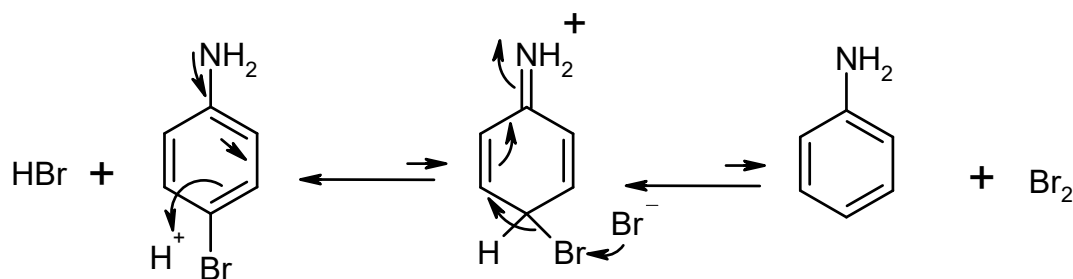


Abbildung 32: Darstellung der selektiven Protodebromierung [Choi et al., 2001]

Die Reversibilität der Bromierung wurde nur an reaktiven Aromaten beobachtet. D.h. Brom wird selektiv in *o*- oder *p*-Stellung zu den Substituenten, die die Basizität des Aromatenkerns erhöhen, abgespalten [Choi et al., 2001, Effenberger et al., 1970]. Weiterhin wurde erkannt, dass Brom bevorzugt vor anderen reduzierbaren Gruppen (-Cl, -NO₂) abgespalten wird [Choi et al., 2001]. Gerade für die Synthese von Protoberberinen, die Substituenten tragen, die gute Abgangsgruppen darstellen, ist die selektive Debromierung äußerst vorteilhaft.

Ein Syntheserversuch zur Arylbromierung mit anschließender Mannich-Reaktion zur Bestätigung der Bildung eines für Protoberberine typischen Substitutionsmusters am D-Aromaten wurde durchgeführt. Ausgehend von Verbindung **4a** konnte nach dreistündiger Reaktionszeit die Masse einer arylbromierten Verbindung (**134**) im Massenspektrum nachgewiesen werden. Allerdings erfolgte die Umsetzung nicht vollständig – auch das Edukt blieb nachweisbar. Aufgrund des geringen Ansatzes wurde das Gemisch direkt der Mannich-Reaktion zugeführt. Dabei entstanden zwei Verbindungen. Eine anschließende Trennung der Verbindungen mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform als Eluent mit NMR-spektroskopischer Untersuchung der Fraktionen bestätigte die erwartete Bildung von 7-Methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-6-ol, Verbindung **5a**, und die Entstehung des gewünschten Produktes 5-Bromo-7-methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-8-ol **135**. Somit konnte der Ringschluss in ortho-Stellung zur OH-Gruppe durch Blockade der Para-Stellung durch einen zuvor eingeführten Bromsubstituenten bestätigt werden (Abb. 33). Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte die Arylbromierung nicht weiterverfolgt werden. Sie stellt jedoch einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die gezielte Synthese 9,10-substituierter Protoberberine in weitergehenden Arbeiten dar.

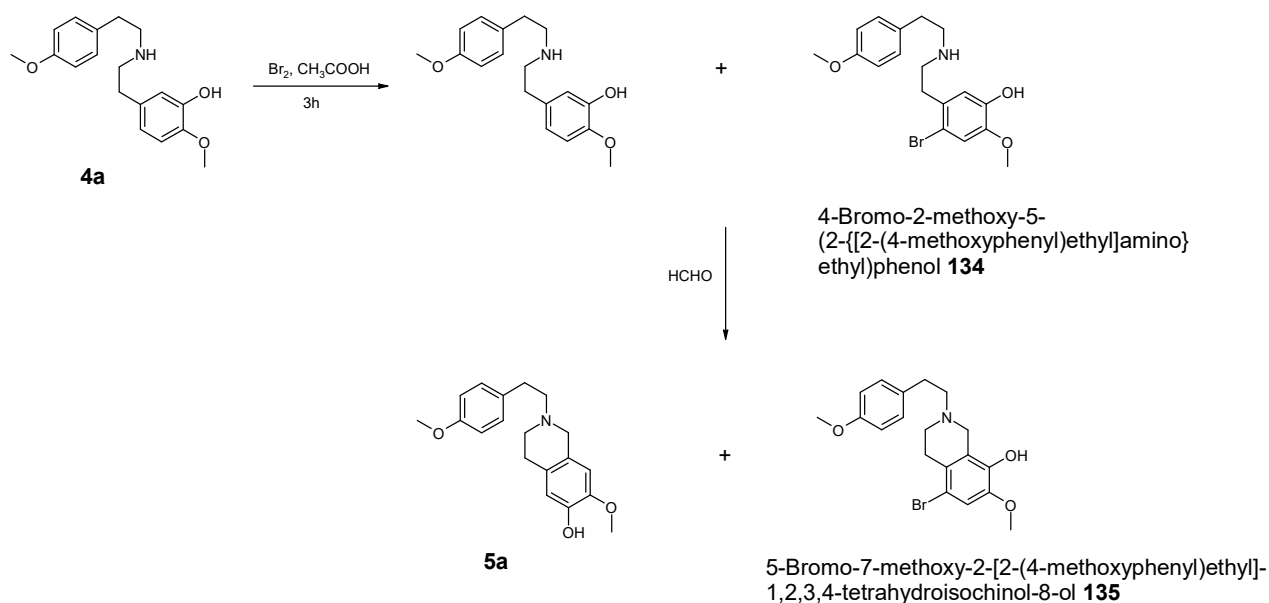


Abbildung 33: Bromierung von 2-Methoxy-5-(2-{{2-(4-methoxyphenyl)ethyl}amino}ethyl)phenol **4a**

2.3.8 Der Weg über ein Isochromanon zum Protoberberin

Parallel zu der Standardreaktionsfolge in der Synthese von Protoberberinen wurde versucht, über Isochromanone statt über die Phenylacetamide zu Protoberberinen zu gelangen. Vorteile dieses Weges sind die Vermeidung der Mannich-Reaktion und infolgedessen die ausschließliche Bildung von Protoberberinen mit natürlichem Substitutionsmuster. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Isochromanone zur Synthese von 9,10-substituierten Protoberberinen herangezogen: das kommerziell erhältliche Isochroman-3-on, 8-Hydroxy-7-methoxyisochroman-3-on sowie 7-Methoxyisochroman-3-on. Für die beiden letzteren galt es zunächst einen praktikablen Syntheseweg zu finden.

2.3.8.1 8-Hydroxy-7-methoxyisochroman-3-on als Startverbindung des Isochromanonweges

In Abbildung 34 ist die Reaktionsfolge zur Synthese der Zielverbindungen ausgehend von 8-Hydroxy-7-methoxyisochroman-3-on dargestellt.

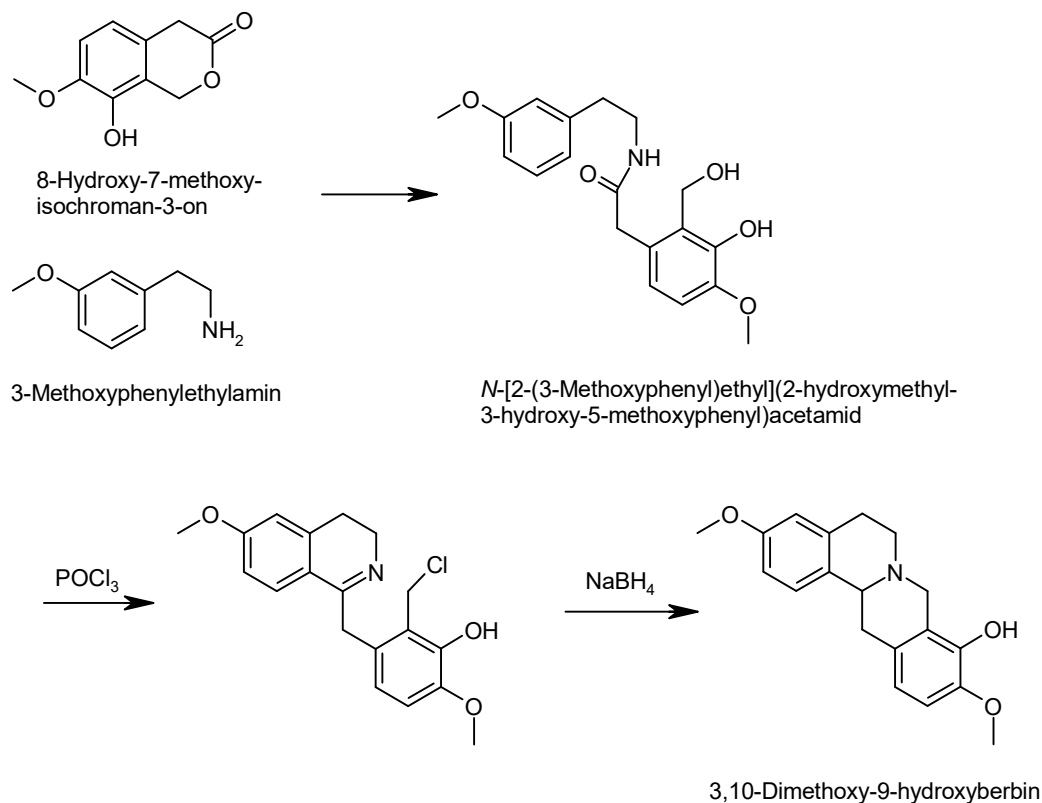


Abbildung 34: Reaktionsabfolge im Isochromanonweg zum Protoberberin

Für die Herstellung von 8-Hydroxy-7-methoxyisochroman-3-on wurde nach einer Vorschrift von Ahmad gearbeitet [Ahmad et al., 1982]. Diese beinhaltet die Verwendung von Phenylboronsäure für die Umsetzung von Homoisovanillinsäure mit Paraformaldehyd zum entsprechenden Isochromanon [Nagata et al. 1975]. Phenylboronsäure aktiviert bei Vorhandensein einer OH-Gruppe die Position 2 stärker als Position 6 (siehe Abbildung 35) und ermöglicht somit die Bildung des Isochromanon-3-ons mit substituierter OH-Gruppe in Position 8, die notwendig ist, um später das Protoberberin mit natürlichem Substitutionsmuster zu erhalten. Ohne Aktivierung mit Phenylboronsäure entstünde bei dem Umsatz von Homoisovanillinsäure mit Formalin in Form einer Mannich-Reaktion ein disubstituiertes Isochromanon-3-on mit 6,7-Stellung der Substituenten.

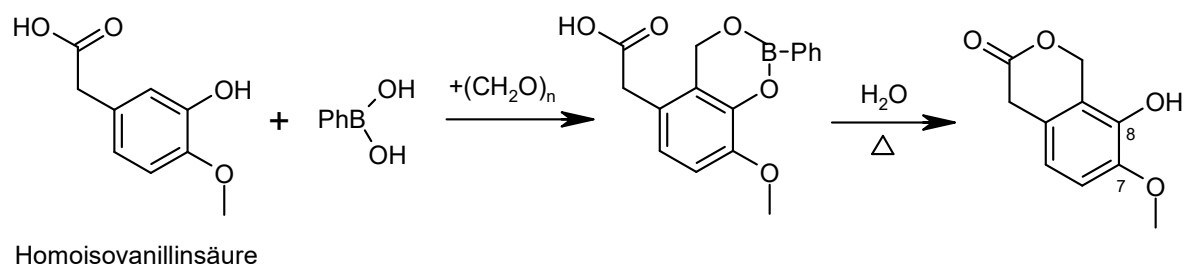


Abbildung 35: Bildung des Isochromanons aus Homoisovanillinsäure; Erläuterungen im Text

Bei der Bildung des Amids durch Kondensation des Isochromanons mit 3-Methoxyphenylethylamin entstand neben dem Amid ein Lactam, das nach einer chromatographischen Trennung in höheren Ausbeuten gewonnen werden konnte (Abb. 36). Dieses wurde im nächsten Schritt weiter umgesetzt. Da es nicht gelang, die OH-Gruppe am Isochromanon zu verestern, um sie somit für die Bischler-Napieralski-Reaktion zu schützen, wurde versucht, die Verbindung ungeschützt weiter umzusetzen. Erwartungsgemäß misslang der Ringschluss nach Bischler-Napieralski unter den unter 2.3.4 angegebenen Reaktionsbedingungen. Der Versuch, die Hydroxylgruppe des Lactams zu acetylieren, zeigte teilweise Erfolg. Das Gemisch wurde mit 2 molaren Äquivalenten POCl_3 umgesetzt. Bei diesem Ansatz konnten nach zweifacher chromatographischer Reinigung 26 % von 3,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin isoliert werden. Die Verbindung wurde hinsichtlich einer biologischen Wirksamkeit in verschiedenen Testsystemen untersucht.

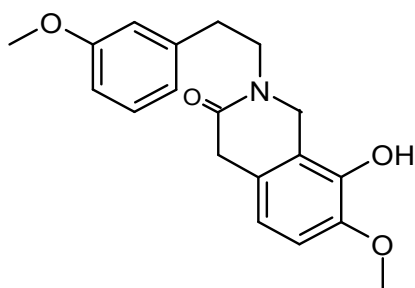


Abbildung 36: Ein Isochinolin-3-on-Derivat als Nebenprodukt

2.3.8.2 *7-Methoxyisochroman-3-on als Startverbindung des Isochromanonweges*

Ausgehend vom Anisaldehyd kann in einer dreistufigen Synthese 7-Methoxyisochroman-3-on (**103**) hergestellt werden (Abb. 37).

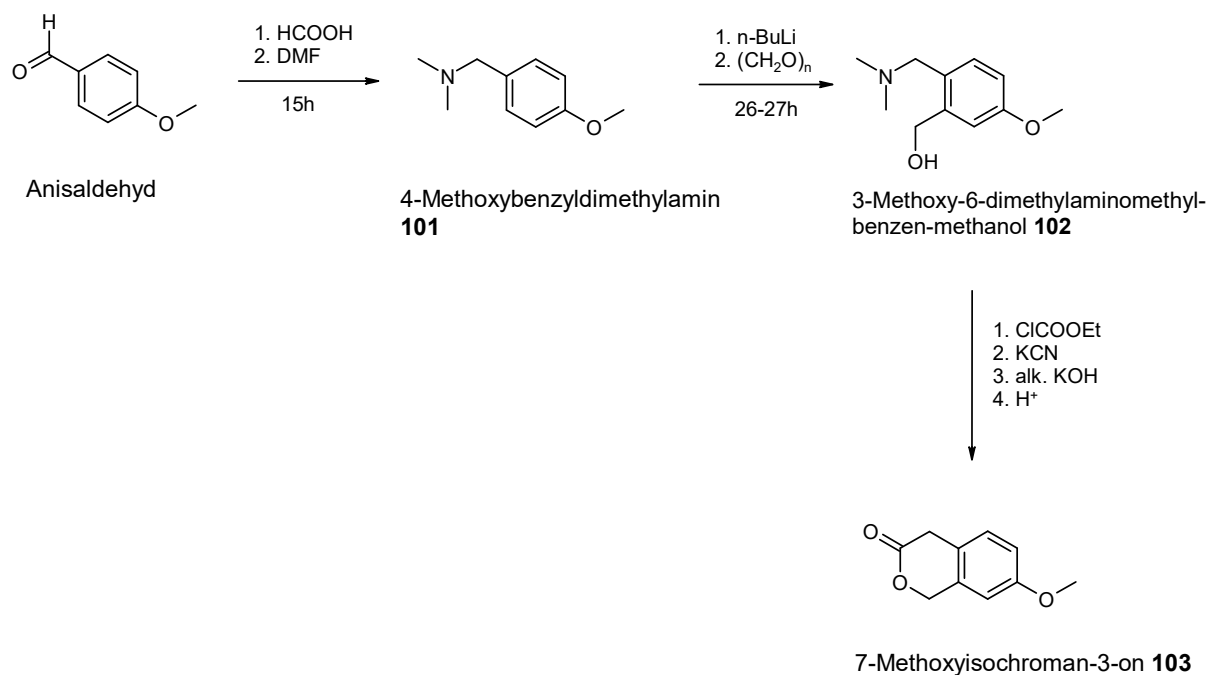


Abbildung 37: Synthese von 7-Methoxyisochroman-3-on; Erläuterungen im Text

Die Synthese von 4-Methoxybenzyl-dimethylamin (**101**) aus Anisaldehyd durch die Leuckart-Wallach-Reaktion wurde bereits 1946 beschrieben [Elliott, 1946]. Anisaldehyd, 4 molare Äquivalente Dimethylformamid sowie 85 %ige Ameisensäure wurden für 15 Stunden bei 180-190 °C gerührt. Eine Trennung des Produktes vom nicht umgesetzten Edukt durch fraktionierte Destillation gelang nicht vollständig. Zur Umgehung dieses Reinigungsschrittes, wurde der nach Eindampfen der organischen Phase verbleibende Rückstand in 1 M HCl gelöst und mit Toluol der nicht umgesetzte Anisaldehyd ausgeschüttelt. Daraufhin wurde der pH-Wert der wässrigen Phase mit 40 %iger KOH-Lösung auf über 9 angehoben und die Lösung dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Letztendlich konnten nach Einrotieren der organischen Phase und Trocknung über MgSO₄ 32 % 4-Methoxybenzyl-dimethylamin (**101**) gewonnen werden.

Zur Herstellung von 3-Methoxy-6-dimethylaminomethylbenzen-methanol (**102**) wurde nach einer Arbeitsvorschrift von Mali et al. verfahren (Abb. 37) [Mali et al., 1986]. Nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches verblieb ein öliger Rückstand, der bei niedrigem Druck destilliert wurde. 3-Methoxy-6-dimethylaminomethylbenzen-methanol (**102**) destilliert bei 1 bar bei 58-65°C [Mali et al., 1986] und konnte in einer Ausbeute von 95 % isoliert werden. Im letzten Schritt zur Synthese des 7-Methoxyisochroman-3-ons wurden 3-Methoxy-6-dimethylaminomethylbenzen-methanol (**102**) und Natriumhydrogencarbonat in Benzol gerührt und Chlorameisensäureethylester, ebenfalls gelöst in Benzol, hinzugefügt [Mali et al., 1986]. Abweichend von der Arbeitsvorschrift nach Mali et al., wurden Reaktionszeiten und die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches modifiziert. Im Anschluss wird das Rohprodukt mittels

Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (9:1) gereinigt. Durch die Verlängerung der Reaktionszeiten, die Modifikation des Fließmittels in der Säulenchromatographie im letzten Schritt sowie die Veränderung der Aufarbeitung des ersten Schrittes gelang es uns reproduzierbar die in der Literatur angegebene Ausbeute der Synthese von 7-Methoxyisochroman-3-on zu erreichen. Infolge der deutlich höheren Ausbeute von 3-Methoxy-6-dimethylaminomethylbenzen-methanol (95 % gegenüber 58 % in der Literatur angegeben), jedoch geringeren Ausbeute von 4-Methoxybenzyltrimethylamin (32 % gegenüber 56 % in der Literatur) und vergleichbaren Ausbeute von 7-Methoxyisochroman-3-on (36 % gegenüber 39 % in der Literatur) ergab sich eine reproduzierbare Gesamtausbeute von 54 % (Lit. 51 %).

7-Methoxyisochroman-3-on diente als Edukt für die Synthese von 2,10-Dimethoxyberbin (Tab. 2). Auch hier entstanden bei der Kondensation des Isochromanons und der Phenylethylaminokomponente sowohl das Lactam, 7-Methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,4-dihydroisochinolin-3-on, als auch das methylhydroxylierte Phenylacetamid (Abb. 38).

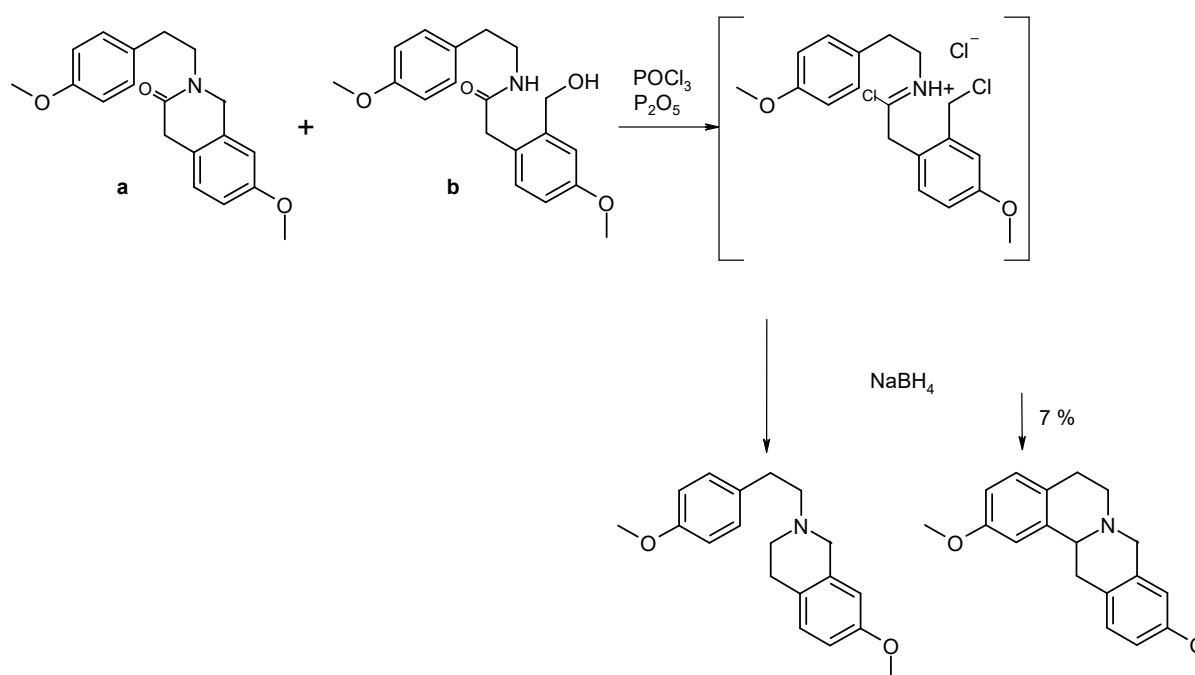


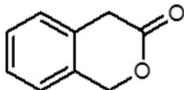
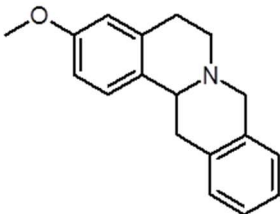
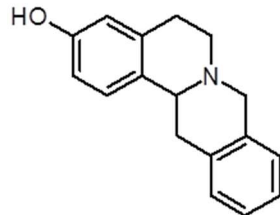
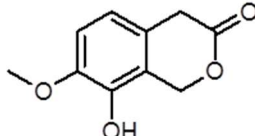
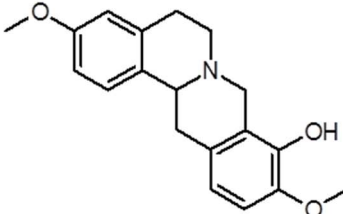
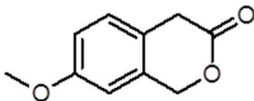
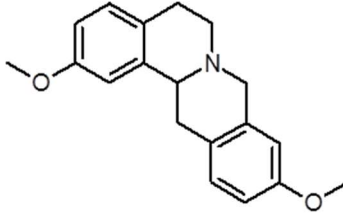
Abbildung 38: Umsetzung eines Gemisches aus Lactam **a** und Phenylacetamid **b** unter Bischler-Napieralski-Bedingungen; Erläuterungen im Text

Für den nachfolgenden Ringschluss nach Bischler-Napieralski mit $\text{POCl}_3/\text{P}_2\text{O}_5$ ist das Vorhandensein der freien Hydroxy-Gruppe an der Methylseitenkette von **b** ungünstig. Aufgrund des deaktivierten A-Aromaten ist der Schluss des zukünftigen B-Ringes von vornherein nur bedingt möglich. Aufgrund der meta-Stellung der Methoxygruppe zur

Ringschlussstelle wird der elektrophile Angriff erschwert und der Chlorierung der OH-Gruppe und anschließender Alkylierung des Stickstoffs der Vorzug gegeben [Meise et al., 1985]. Die Reaktion nach Bischler-Napieralski, um den Ring B zu schließen, findet nun nicht mehr statt (Abb. 38). Es wurde ein Gemisch aus a und b eingesetzt. So konnten 7 % 2,10-Dimethoxyberbin isoliert werden.

Nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit aus Isochromanonen hergestellten Verbindungen.

Tabelle 2: Übersicht der aus Isochromanonen synthetisierten Protoberberine

Edukt	Zielverbindung
	
	<p style="text-align: center;">3-Methoxyberbin 27</p> 
Isochroman-3-on	3-Hydroxyberbin 28
	
8-Hydroxy-7-methoxyisochroman-3-on	3,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin 141
	
7-Methoxyisochroman-3-on	2,10-Dimethoxyberbin 136

2.4 Synthese von flexibleren Grundgerüsten

2.4.1 Synthese von Phenethyltetrahydroisochinolinen

Werden Produkte der Bischler-Napieralski-Reaktion aus nichtaktivierten Ausgangsstoffen (Abb. 25) der Mannich-Reaktion unterworfen, entstehen substituierte Phenethyltetrahydroisochinoline mit einem flexiblen Grundgerüst. Diese Verbindungen haben im Vergleich zum Tetrahydroprotoberberin durch die Öffnung des Ringes B ihre Rigidität verloren.

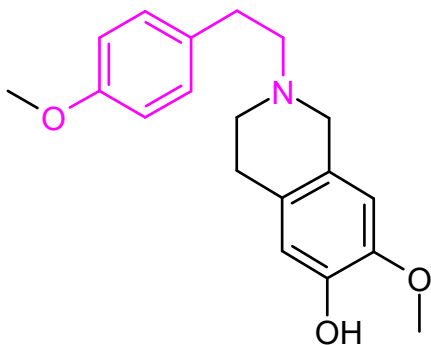


Abbildung 39: 7-Methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-6-ol mit Dopaminstrukturelement (magenta)

Auch Phenethyltetrahydroisochinoline enthalten eine Dopaminstruktur und können daher, genau wie Tetrahydroprotoberberine, von pharmazeutischer Relevanz sein (Abb. 39). Eben aus diesem Grund richteten wir unser Augenmerk auf die gezielte Synthese von Phenethyltetrahydroisochinolinen. Die Synthese der Phenethyltetrahydroisochinoline ist der der Protoberberine ähnlich.

Folgende Schritte sind notwendig:

1. Die Bildung eines Phenylacetamids durch Kopplung eines Phenylethylamins (2.3.3)
2. gegebenenfalls eine Acetylierung freier Hydroxylgruppen (2.3.3)
3. Reduktion des Phenylacetamids mit $\text{POCl}_3/\text{NaBH}_4$ [Kuehne et al., 1977]
4. Schließen des Ringes C mit der Mannich-Reaktion (2.3.6)

Um die Syntheseschritte zu reduzieren und die mögliche Bildung von Phosphorsäureestern zu verhindern, ersetzen wir die Reduktion des Amids mit $\text{POCl}_3/\text{NaBH}_4$ durch eine Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid. Somit wurde das Einführen von Schutzgruppen bei Vorhandensein freier Hydroxylgruppen vor der Reduktion des Amids überflüssig. Die Synthese von Phenethyltetrahydroisochinolinderivaten konnte damit auf drei Schritte begrenzt werden.

Für die Reduktion mit LiAlH_4 wurde das entsprechende Amid entweder in trockenem Tetrahydrofuran oder tert. Butylmethylether gelöst, in Argonatmosphäre gerührt und währenddessen auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Die 2.5- bis 5-fache molare Menge LiAlH_4 wurde in einer Portion zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Nach Entfernen des Eisbades wurde 14 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneutem Kühlen der Reaktionsmischung auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ wurde dem Gemisch solange Wasser zugefügt, bis kein Wasserstoff mehr entwich. Der separierte Feststoff wurde fünfmal mit einem Lösungsmittelgemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 9:1 extrahiert. Die flüssige Phase wurde ebenso behandelt. Nach Vereinigung der Phasen wurde die organische Phase mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der verbleibende ölige Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ 97:3) gereinigt.

Die exakten Reaktionsbedingungen sowie der Ablauf der Reduktion der Phenylacetamide mit LiAlH_4 sind dem Anhang dieser Arbeit zu entnehmen (10.1.3).

2.4.2 Synthese von Dibenzazecinen

Dibenzazecine sind zehngliedrige Ringe mit einem Stickstoffatom und zwei annellierten Phenylringen. Aufgrund der fehlenden C-N-Brücke zeichnen sie sich, wie Phenethyltetrahydroisochinoline, durch ein flexibles Grundgerüst aus. Sie sind weniger starr als ihre strukturellen Verwandten, die Protoberberine. Die Phenylringe können verschieden am Zehnring annulliert vorliegen. Abhängig von ihrer Position werden mehrere Subtypen der Dibenzazecine unterschieden. In Abbildung 40 ist ein Dibenz[d,h]azecin gezeigt.

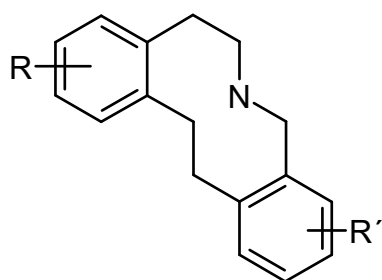


Abbildung 40: Dibenz[d,h]azecin

Die Struktur dieses Subtyps ist dem Grundgerüst der Tetrahydroprotoberberine am ähnlichsten. Dibenz[d,h]azecine können daher bei der Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen für

Tetrahydroprotoberberine herangezogen werden und klären, ob die Rigidität der Protoberberine ihre biologische Wirkung beeinflusst.

Zur Synthese eines Dibenz[d,h]azecins wurde das kommerziell erhältliche Tetrahydropalmin als Ausgangsverbindung herangezogen. Dieses wurde mit Methyljodid quarternisiert und anschließend der Reduktion nach Birch unterworfen [Birch, 1950]. Die Birch-Reduktion von 2,3,9,10-Tetramethoxy-7-methyl-5,6,13,13a-tetrahydro-8H-dibenzo[a,g]chinolizin-N-Methiodid gab 31 % Ausbeute an 2,3-Dimethoxy-7-methyl-9,10-dimethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[d,h]azecin **25**. Daneben entstand 6,7-Dimethoxy-2-methyl-1-(6-methyl-4,5-dimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **25a**. Davon wurden 36 % in reiner Form gewonnen.

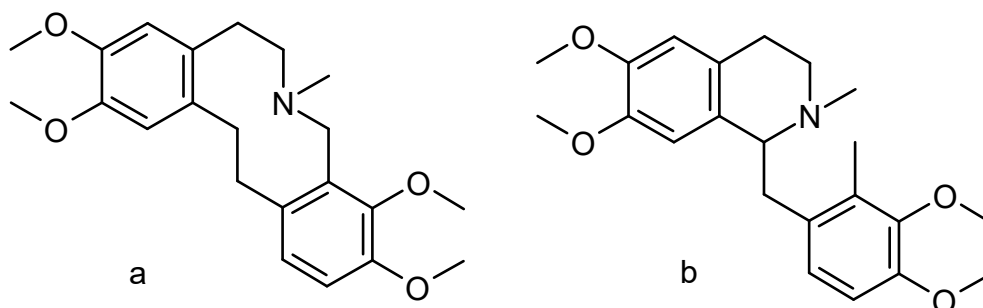


Abbildung 41: a 2,3-Dimethoxy-7-methyl-9,10-dimethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[d,h]azecin **25**;
b 6,7-Dimethoxy-2-methyl-1-(6-methyl-4,5-dimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **25a**

Der Erfolg der Synthese wird entscheidend durch die Reaktionsdauer beeinflusst. Längere Reaktionszeiten führen zur Zunahme von höher hydrierten Produkten, die die säulenchromatographische Reinigung des gewünschten Produktes erschweren. Die hier verwendete Reaktionszeit von 10 Minuten ist der beste Kompromiss zwischen höchstmöglicher Umsetzung des Eduktes und minimaler Bildung von Nebenprodukten.

Die Spaltung der C-N-Bindung zur Bildung eines Azecins nach Demethylierung von 2,3,9,10-Tetramethoxy-7-methyl-5,6,13,13a-tetrahydro-8H-dibenzo[a,g]chinolizin-N-Methiodid gelang nicht.

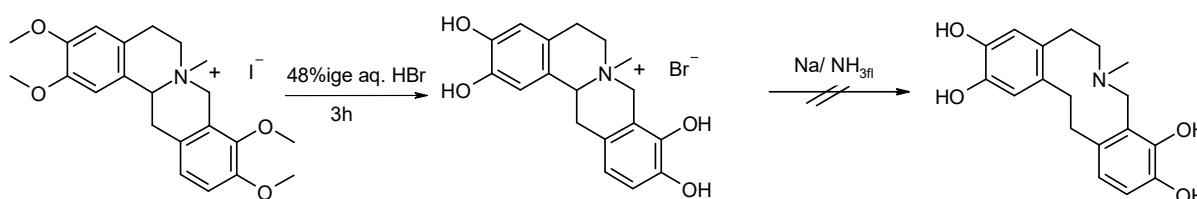


Abbildung 42: Syntheserversuch zur Spaltung der C-N-Brücke von 2,3,9,10-Tetrahydroxy-7-methyl-5,6,13,13a-tetrahydro-8H-dibenzo[a,g]chinolizin N-Methbromid unter Reaktionsbedingungen nach Birch

Eine weitere Möglichkeit zur Quarternisierung von Tetrahydropalmitin bietet sich durch die Verwendung von *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBS) [Craig *et al.*, 1970]. Hierbei entsteht ein tertiäres Amin-N-oxid **66**, das anschließend der Reduktion unter Birchbedingungen unterworfen werden kann [Yardley, 1973]. Jedoch konnte hier nur eine Ausbeute von 10 % des 2,3,9,10-Tetramethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[*d,h*]azecins **67** erreicht werden.

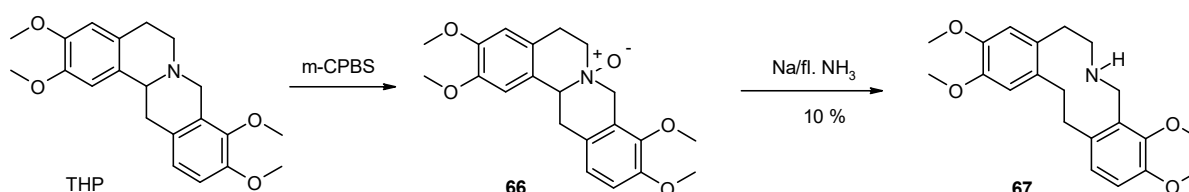


Abbildung 43: Synthese von 2,3,9,10-Tetramethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[*d,h*]azecin **67**

2.5 Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse, Ausblick

Durch Partialsynthese ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Protoberberinium-Salz Berberinchlorid und dem Protoberberin Tetrahydropalmitin gelang es im Rahmen dieser Arbeit, recht unkompliziert elf Alkaloidderivate (ohne Dibenzazecine) herzustellen. Dagegen stellte sich die Synthese von Scoulerin und seinen Derivaten auf partialsynthetischem Weg aus Tetrahydropalmitin, d.h. Tetrahydroprotoberberine mit ein oder mehreren Hydroxy- neben Methoxysubstituenten, als schwierig heraus. Kern des Problems ist die selektive Demethylierung von Tetrahydropalmitin. Alle unternommenen Versuche, Methoxygruppen selektiv zu entfernen, erwiesen sich entweder als unpraktikabel oder resultierten in sehr mageren Ausbeuten. Einzig Tetrahydropalmitrubin (Abschnitt 2.2.2) konnte recht unkompliziert in zwei Schritten aus Tetrahydropalmitin synthetisiert werden.

Die Totalsynthese der Protoberberine gelang zum größten Teil auf klassischem Wege: Kondensation von Phenylelessigsäurederivat und Phenylethylamin zum Phenylacetamid, Ringschluss nach Bischler-Napieralski mit anschließender Hydrierung zum Tetrahydroisochinolin, Mannich-Reaktion zur Vervollständigung des Protoberberingerüsts.

Die Kopplung vom Amin und Säure zum Amid verlangte in Abhängigkeit vom gewünschten Produkt Modifikationen. So war der Einsatz von den Kupplungsreagenzien PyBOP und Hünig-Base (Diisopropylethylamin) bei der Synthese von *N*-[2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl]-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-acetamid aus Tyramin und Homoisovanillinsäure notwendig.

Die Bischler-Napieralski-Reaktion gehört zu den prominentesten Methoden zur Bildung des Isochinolingerüsts in der Totalsynthese von Protoberberin-Alkaloide. Diese Reaktion führt zur

Synthese von 3,4-Dihydroisochinolininen aus β -Ethylamiden elektronenreicher Arenen unter Verwendung von Kondensationsmitteln wie POCl_3 und P_2O_5 . Der Erfolg der Zyklisierung nach Bischler-Napieralski in der Alkaloidsynthese ist vor allem vom Substitutionsmuster des Phenylethylacetamids abhängig. Die Fachliteratur bietet zahlreiche Veröffentlichungen zu Alternativen bzw. Modifikationen der Bischler-Napieralski-Reaktion. Diese umfassen vor allem neue Ansätze zu den Reaktionsbedingungen, die bei der Zyklisierung nach Bischler-Napieralski besonders harsch sind. Zu erwähnen sind Reagenzien wie POCl_3 in 1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphat [Judeh et al., 2002], Oxalylchlorid - FeCl_3 [Larsen et al., 1991], Trifluormethansulfonsäureanhydrid/2-Chlorpyridin [Movassaghi et al., 2008], Triphenylphosphit/ Br_2 [Vaccari et al., 2008] und die mikrowellenunterstützte Bischler-Napieralski-Reaktion [Awuah et al., 2010], wobei hier lediglich die Reaktionszeit minimiert wurde. 1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphat ist eine farblose, viskose, hydrophobe ionische Flüssigkeit, welche als umweltfreundliches Agens und Ersatz für flüchtige organische Lösungsmittel eingesetzt wird. Durch dessen Verwendung kann die aufwendige chromatographische Reinigung des Produktes eingespart bzw. vereinfacht werden, da hier nicht die üblicherweise dunkelgefärbten teilweise gummiartigen Syntheseprodukte entstehen [Judeh et al., 2002]. Die größten Nachteile dieser Variante sind der äußerst intensive Kostenaufwand und das für uns entscheidende Ausschlusskriterium: Die Synthese von in Position 7 substituierten 3,4-Dihydroisochinolininen aus deaktivierten *N*-(2-Phenylethyl)phenylacetamiden gelingt nicht. Dieser Aspekt ist beinahe allen Publikationen gemein. Vaccari jedoch gelang es mit seiner Methode, mit Bromotriphenoxyphosphoniumbromid bei $-60\text{ }^\circ\text{C}$ in Methylenchlorid, zwei 3,4-Dihydroisochinoline aus deaktivierten β -Phenylethylamiden herzustellen. Dabei wurden Ausbeuten von 26 bzw. 27 % erzielt [Vaccari et al., 2008]. Allerdings setzte er *N*-(2-Phenylethyl)acetamide ein, damit entfällt der den Ringschluss deaktivierende Effekt der substituierten Phenylacetamide, der im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde (Abschnitt 2.3.5 Tabelle 1). Wir konnten mit unserer Methode, Umsatz von deaktivierten *N*-(2-Phenylethyl)phenylacetamiden (ohne Substituent am Phenylacetamid) mit POCl_3 in Kombination mit P_2O_5 und anschließender Reduktion mit NaBH_4 , Tetrahydroisochinoline mit einer Ausbeute von 30 % isolieren und erzielten damit vergleichbare Ergebnisse wie Vaccari. Eine durchaus interessante Alternative zur Bischler-Napieralski-Zyklisierung bieten Movassaghi et al. Hierbei wird Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf_2O) in Anwesenheit von 2-Chlorpyridin in Methylenchlorid bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ für eine milde Cyclodehydrierung verwendet [Movassaghi et al., 2008]. Die intramolekulare Zyklisierung ist in der folgenden Abbildung

anhand eines Beispiels dargestellt. Nach elektrophiler Aktivierung des Amids erfolgt die intramolekulare nucleophile Zyklisierung mit anschließender Deprotonierung.

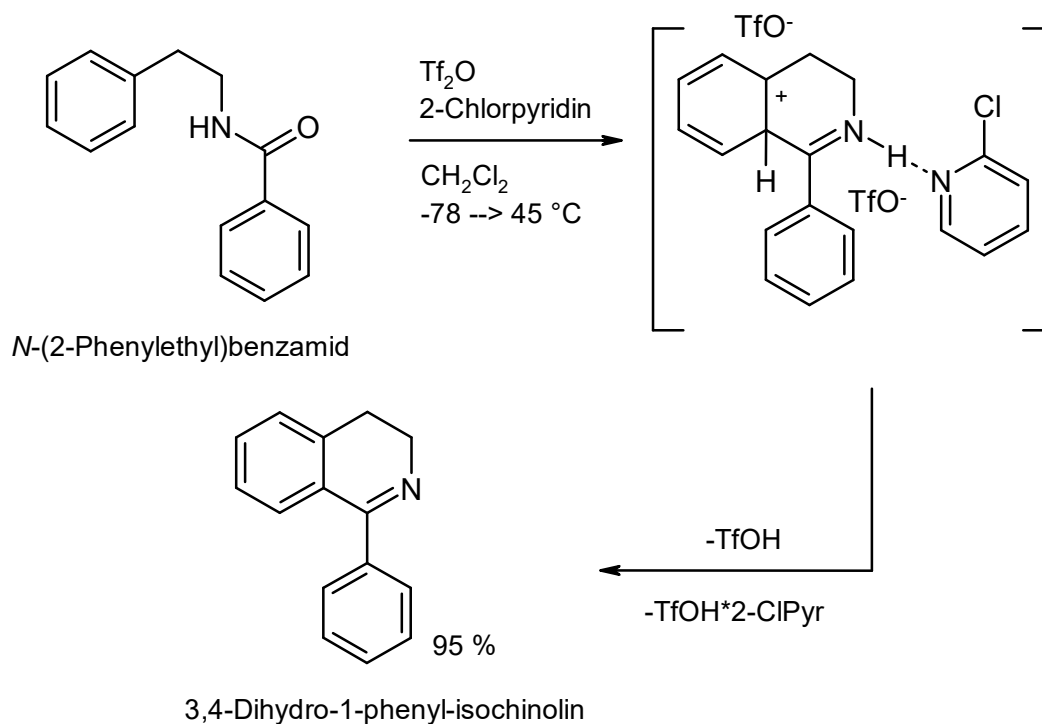


Abbildung 44: Synthese von 3,4-Dihydro-1-phenyl-isochinolin [modifiziert nach *Movassaghi et al., 2008*]

Im direkten Vergleich der Reaktionsbedingungen wurden unter Verwendung von $\text{Tf}_2\text{O}/2\text{-Chlorpyridin}$ 95 % von 3,4-Dihydro-1-phenyl-isochinolin, mit POCl_3 23 % des Produktes isoliert [Movassaghi et al., 2008]. Bei deaktivierten halogenierten *N*-Phenethylamiden gelang die Zyklisierung unter den genannten Bedingungen nur unter Zusatz der Bestrahlung mit Mikrowellen. Auch bei dieser beschriebenen Methode wurden keine Phenylacetamide eingesetzt, deren Substituenten den Ringschluss beeinflussen können. Damit entfällt auch wie bei Vaccari die Entstehung carbonylhaltiger Nebenprodukte durch leichte Oxidierbarkeit der Methylengruppe bei substituierten 1-Benzyl-3,4-dihydroisochinolin (Abschnitt 2.3.4) bei der Aufarbeitung, was wiederum die Gesamtausbeute der Synthese beeinträchtigen kann.

Dennoch sind die erzielten Ausbeuten bei der Umsetzung von deaktivierten *N*-(2-Phenylethyl)acetamiden bzw. unsubstituierten *N*-(2-Phenylethyl)benzamid (Abb. 44) nach Movassaghi bemerkenswert und machen diese Methode für die Bildung des Isochinolingerüsts in der Protoberberinsynthese attraktiv und sollten in weiterführenden Arbeiten Beachtung finden.

Ebenso wie die Bischler-Napieralski-Reaktion ist auch der Erfolg der Mannich-Reaktion, die die fehlende Methyleneneinheit zur Vervollständigung des Protoberberingerüsts einführt, von aktivierenden Substituenten am Aromaten abhängig. Befindet sich eine Hydroxygruppe in unmittelbarer Nachbarschaft zur Ringschlussstelle, kann nach Reaktion im Säuren und aufwendiger chromatographischer Reinigung das Protoberberin mit 9,10-Substitution gewonnen werden. Befindet sich kein Substituent oder andere als OH-Gruppen am Aromaten, werden nur Verbindungen mit 10,11-Substitutionsmuster, die sogenannten Pseudoprotoberberine, erhalten. Ist man bei der Totalsynthese der Tetrahydroprotoberberine auf die Mannich-Reaktion angewiesen und liegen keine hydroxylierten Verbindungen vor, kann das natürliche Substitutionsmuster durch vorherige Einführung von Brom zur Blockade unerwünschter Ringschlussstellen erhalten werden (Abschnitt 2.3.7).

Eine Alternative zum beschriebenen klassischen Syntheseweg bietet der Einsatz von Isochroman-3-onen anstelle der Phenylethylamin-Komponente. Die Abfolge der Reaktionen bleibt identisch, die Mannich-Reaktion entfällt. Vorteil dieses Systems ist der Erhalt des 9,10-Substitutionsmusters, falls die entsprechenden Isochroman-3-one kommerziell oder synthetisch zugänglich sind. Nachteilig ist auch hier die Notwendigkeit von aktivierenden Substituenten am Phenylethylamin für die Zyklisierung zum Dihydroisochinolin. Weiterhin kommt erschwerend hinzu, dass durch Aufbrechen der Lactonstruktur des Isochroman-3-ones bei der Phenylacetamidbildung eine freie Hydroxygruppe an der Methylseitenkette des Amids entsteht (Abb. 34). Dies führt insbesondere bei Zyklisierungsreaktionen deaktivierter Verbindungen bevorzugt zu Chlorierung dieser OH-Gruppe mit anschließender Alkylierung des Stickstoffs anstelle des Ringschlusses zum Dihydroisochinolin [Meise *et al.*, 1985]. Hier muss ein weiterer Syntheseschritt zum Schutz der freien OH-Gruppe eingeschoben werden, um diese Reaktion zu verhindern. Hier bietet sich beispielsweise Chlorameisensäureethylester als Schutzgruppe an (Abb. 45) [Schlüter, 1987].

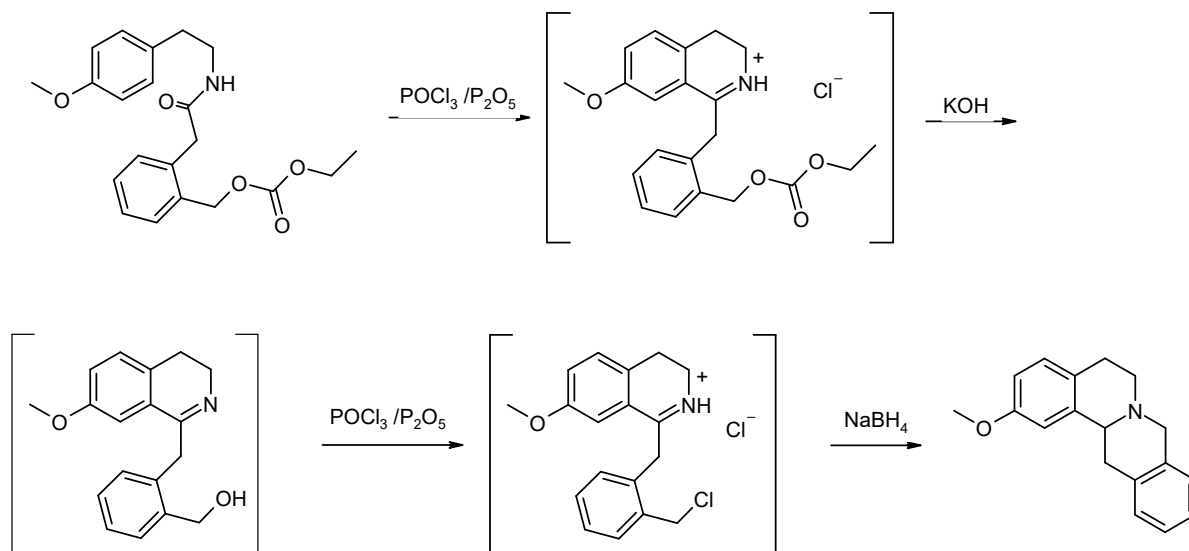


Abbildung 45: Zwischenstufen der Zyklisierung von deaktivierten Phenylacetamiden nach vorangegangenem Schutz der Methylhydroxygruppierung durch Chlorameisensäureethylester [modifiziert nach Mohr, 2005]

Insgesamt konnten wir über den Isochromanonweg zwei Tetrahydroprotoberberine mit natürlichem Substitutionsmuster gewinnen, eines sogar mit der gewünschten Substitution in Position 2 (Tab. 2).

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten und vorgestellten Ergebnisse zur Totalsynthese von Tetrahydroprotoberberinen lassen sich am Beispiel 9-Hydroxy-10-methoxysubstituierter Protoberberine in einer Übersicht, einem Entscheidungsbaum, zusammenfassen (Abb. 46). Abhängig vom gewünschten Produkt (mit Substitution in Position 2 oder 3) und von der Verfügbarkeit der Ausgangsverbindungen bietet diese Übersicht entsprechende Kurzanleitungen zur jeweiligen Synthese.

Synthese von 9-Hydroxy-10-methoxy-substituierten Protoberberinen

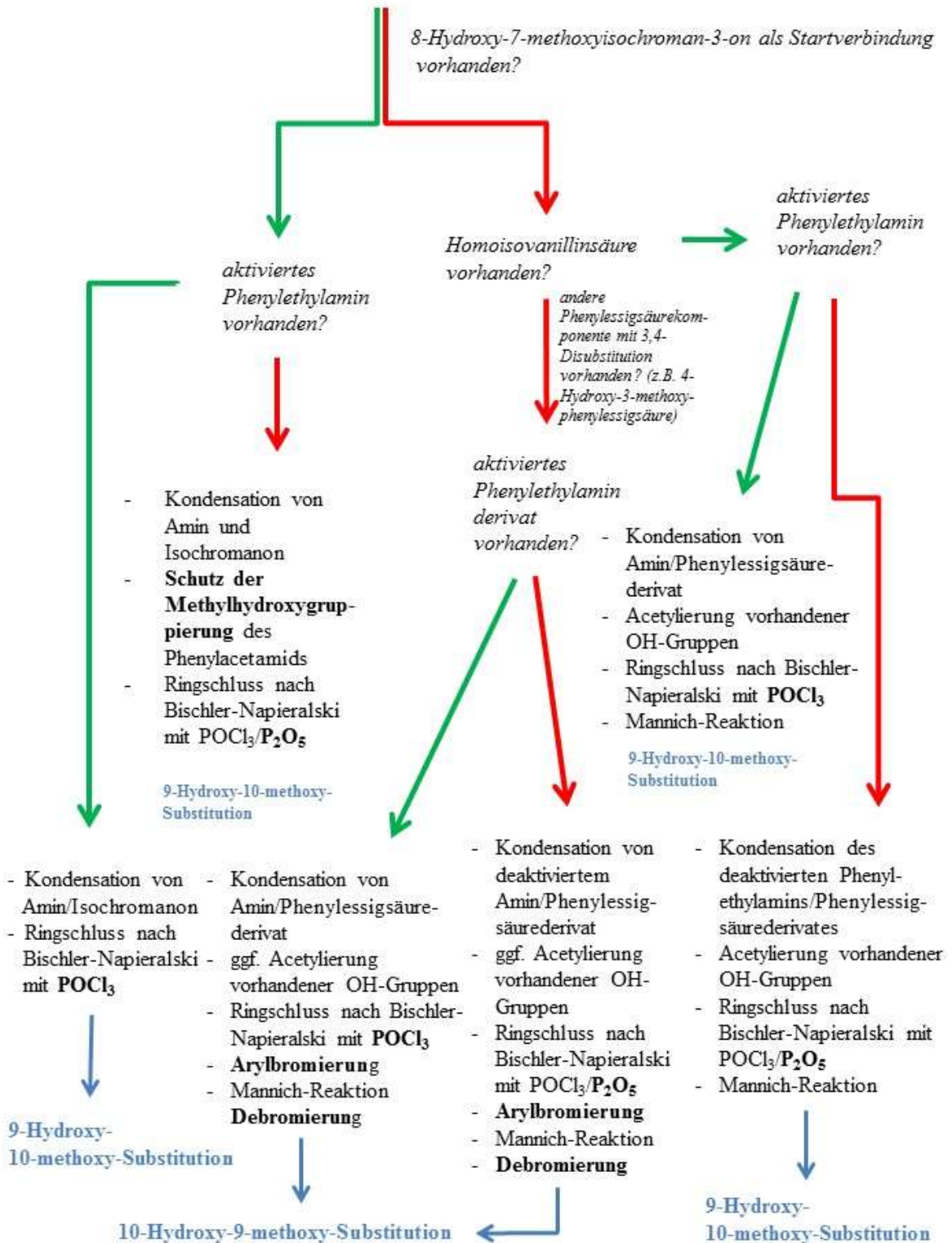


Abbildung 46: Entscheidungsbaum mit Kurzanweisungen zur Synthese von Tetrahydroprotoberberinen; Farbcodierung: grün = Verbindung verfügbar, rot = Verbindung nicht verfügbar

Verbindungen, die sich durch ein flexibles Grundgerüst von den rigiden Tetrahydroprotoberberinen unterscheiden, konnten im Rahmen dieser Arbeit partialsynthetisch durch Dibenzazecine und vollsynthetisch durch Phenethyltetrahydroisochinoline dargestellt werden.

Die Synthese von Dibenzazecinen gelingt leicht aus den entsprechenden Tetrahydroprotoberberinen. Nach erfolgter Quarternisierung mit Methyljodid oder *m*-Chlorperbenzoesäure wird die C-N-Bindung unter Birch-Bedingungen gespalten, um ein zehngliedriges und damit flexibles Grundgerüst zu erhalten. Das Prinzip und der Ablauf der Synthese sind unkompliziert, das Einstellen erfolgversprechender Reaktionsbedingungen dagegen knifflig. Für jedes Produkt müssen die besten Bedingungen (Reaktionszeit) empirisch ermittelt werden, um die Ausbeute zu optimieren und gleichzeitig zur Erleichterung der Reinigung die Nebenprodukte zu minimieren. Zwei Verbindungen wurde nach dieser Methode synthetisiert (2.4.2).

Die beschriebene Synthese der Tetrahydroprotoberberine (Unterkapitel 2.3) kann auf die Darstellung von Phenethyltetrahydroisochinolinen übertragen werden. Da bei diesen Verbindungen der Ring B der Protoberberine fehlt, entfällt hier glücklicherweise der Ringschluss nach Bischler-Napieralski. So ist jegliches Substitutionsmuster am Aromaten A möglich. Stattdessen erfolgt nach Bildung der Phenylacetamide die Reduktion zum Diphenethylamin. Das Amid lässt sich entweder durch Einsatz von $\text{POCl}_3/\text{NaBH}_4$ [Kuehne *et al.*, 1977] oder LiAlH_4 reduzieren. Der entscheidende Vorteil der Reduktion mit LiAlH_4 liegt darin, dass vorhandene Hydroxygruppen, die mit POCl_3 reagieren, diese Reaktion nicht stören. Die sich anschließende Reaktion nach Mannich zur Einführung der Methyleneinheit für die Ringbildung wird ebenso von aktivierenden Substituenten am Aromaten wie bei der Totalsynthese der Tetrahydroprotoberberine beeinflusst.

Insgesamt konnten zwölf Phenethyltetrahydroisochinoline synthetisiert werden (2.4.1).

3. Biologische Testung

In dem folgenden Kapitel werden die biologischen Testungen hinsichtlich Theorie, Durchführung und Ergebnisse vorgestellt.

3.1 Agar-Diffusionstest

3.1.1 Prinzip des Testsystems

In der vorliegenden Arbeit wird der Agar-Diffusionstest als mikrobiologisches Testverfahren verwendet. Dabei werden Agarplatten mit Mikroorganismen in fein suspendierter Form beimpft. Nach Bebrütung der Platten entsteht ein Bewuchs, der sich als Trübung des Agar bemerkbar macht. Das Wachstum der Mikroorganismen kann durch Aufbringen von wachstumsfördernden oder wachstumshemmenden Testsubstanzen auf den Agar modifiziert werden.

Der Agar-Diffusionstest dient lediglich dem grundsätzlichen Erkennen einer antimikrobiellen Aktivität. Quantitative Aussagen sind aus den gemessenen Hemmhofdurchmessern nur bedingt ableitbar.

3.1.2 Literaturbekanntes zur antimikrobiellen Aktivität von Protoberberinen

Das gesundheitsbewusstere Denken und Leben der Menschen fördert zunehmend die Stellung der Medizin pflanzlichen Ursprungs. Folglich steigt die Zahl der Untersuchungen bereits volksmedizinisch eingesetzter Pflanzen hinsichtlich Inhaltsstoffe und Wirkung stetig. So zeigte ein methanolischer Extrakt der *Coptis japonica*-Wurzel, welche im östlichen Asien das Dasein einer traditionellen Arzneipflanze genießt und daher Anwendung in der Volksmedizin findet, eine Hemmung des Wachstums von acht humanen intestinalen Bakterien, darunter *Bifidobacterium longum* und *Clostridium perfringens*. Die biologisch aktiven Inhaltsstoffe dieses Extraktes wurden als Berberinchlorid, Coptisinchlorid und Palmatinioidid charakterisiert [Chae et al., 1999]. Auch andere Forschungsgruppen befassten sich mit diesem Thema. So schreiben Iwasa et al. Berberin und Palmatin eine schwache Wirkung gegen *Candida albicans* und *Escherichia coli* (MIC > 1000 µg/mL) und eine moderate gegen *Staphylococcus aureus* (MIC = 250 µg/mL) zu [Iwasa et al., 1996]. Die Wirkung gegen Dermatophyten und *Candida*-Spezies wurde von Volleková et al. beschrieben.

Berberin und Palmatin, isoliert aus *Mahonia aquifolium*, zeigten sich gegen die Testkeime im Vergleich mit den Azolen Fluconazol und Bifonazol jedoch zehnmal schwächer. Dagegen

konnte das Berberinderivat Jatrorrhizin mit Azolen vergleichbaren MIC-Werten von 62.5 bis 125 $\mu\text{g/mL}$ überzeugen [Volleková *et al.*, 2003].

Auch in Testsystemen auf Wirkung gegen Erreger der Leishmaniose [Vennerstrom *et al.*, 1990] und der Malaria [Iwasa *et al.*, 1999] konnten mit Berberin und Derivaten positive Ergebnisse erzielt werden.

Größtenteils sind die publizierten antimikrobiellen Wirkungen der Tetrahydroprotoberberine schwächer ausgeprägt als die der quartären Protoberberinium-Salze [Iwasa *et al.*, 1996, Cheng *et al.*, 2014]. Die planare Molekülstruktur mit hoher Aromatisierung (Berberin, Palmatin) wird für die stärkere Wirkung verantwortlich gemacht. Ebenso zeigen positiv geladene Moleküle wie N-Methyl-Tetrahydroprotoberberine einen antimikrobiellen Effekt [Iwasa *et al.*, 1996, Cheng *et al.*, 2014]. Dennoch konnten auch für Tetrahydroprotoberberine wie Stylopin, Corydalin, Canadin [Abbasoglu *et al.*, 1991] sowie dem seltenen 8-Oxoprotoberberin-Derivat mit Monosubstitution am Ring A, Pendulamin A [Faizi *et al.*, 2003], beachtliche antibakterielle Wirkungen nachgewiesen werden. Antimykotische Effekte wurden nicht aufgezeigt.

3.1.3 Testsubstanzen

Die zu testenden Verbindungen werden je nach Löslichkeit in Dichlormethan oder Dimethylsulfoxid gelöst und 1 %ige Stammlösungen hergestellt. Jeweils 5 μL dieser Stammlösungen werden auf Rundfilter (disc) mit einem Durchmesser von sechs Millimeter der Firma Macherey-Nagel aufgetragen. Somit ist jedes Filterpapier mit 50 μg Substanz beladen. Als Referenzen werden das antimykotisch wirkende Clotrimazol und das antibakteriell wirkende Tetracyclinhydrochlorid eingesetzt. Von beiden Verbindungen, gelöst in Methanol, werden 2.5 μL (25 $\mu\text{g}/\text{disc}$) auf Rundfilter aufgetragen. Als Blindwert werden Rundfilter mit 5 μL reinem DMSO bzw. Dichlormethan präpariert.

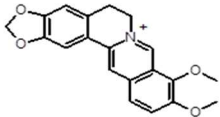
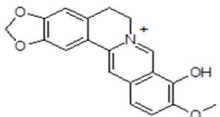
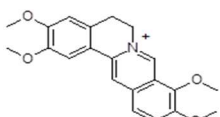
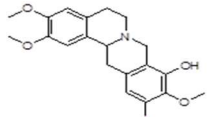
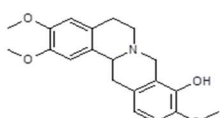
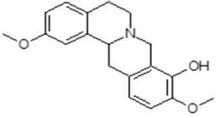
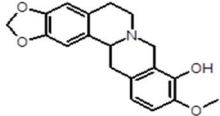
3.1.4 Testergebnisse

Der Agar-Diffusionstest wird mit 50 μg Testsubstanz pro Rundfilter (3.1.3) durchgeführt. Bei einer aufgetragenen Substanzmenge von 50 $\mu\text{g}/\text{disc}$ konnte bei den Protoberberinium-Salzen Berberinchlorid **21** und Palmatiniiodid **8** und den Tetrahydroprotoberberinen **12**, **10**, **74a**, **65**, **27** und **28** sowie einigen Phenethyltetrahydroisochinolininen eine antimikrobielle Hemmung beobachtet werden. Das gram-positive Bakterium *Streptococcus entericus* zeigte sich gegenüber **21** und **8** empfindlich mit einer Wachstumshemmung von 12 mm (Berberin) und 8 mm (Palmatin) sowie gegenüber den Verbindungen **65** (9 mm Wachstumshemmung), **27** und **28** (beide 7 mm Wachstumshemmung). Des Weiteren wirkten Berberinchlorid mit einem

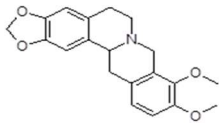
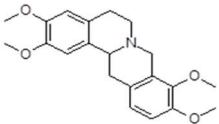
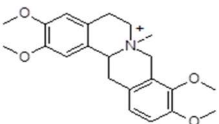
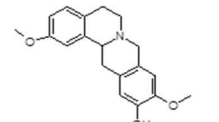
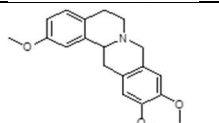
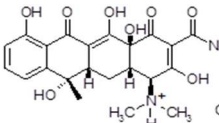
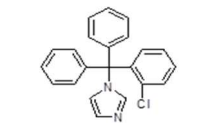
Wachstumshemmhof von 15 mm und Verbindung **65** mit einer totalen Wachstumshemmung von 13 mm gegen *Candida glabrata*. Die Protoberberine **12**, **10**, **74a**, **65** sowie die Phenethyltetrahydroisochinoline **5a**, **5e**, **5f** und **5j** verursachten die Hemmung des Wachstums von *Hyphopichia burtonii*. Dabei wurden Hemmhöfe von 8 (für Verbindung **10**), 9 (für Verbindung **5j**) und 11 mm (für die Verbindungen **12** und **74a**) gemessen. Diese Testverbindungen bewirkten eine Wachstumshemmung, wohingegen **65** und die Phenethyltetrahydroisochinoline ein totales Absterben des Modellkeims hervorriefen. Den stärksten Effekt zeigte Verbindung **5a** mit einer totalen Wachstumshemmung von 20 mm. Die Ergebnisse des Agar-Diffusionstests sind in den Tabellen 3 und 4 zusammenfassend aufgeführt. Nur Phenethyltetrahydroisochinoline zeigten eine Wirkung gegenüber *Yarrowia lipolytica*. Die Verbindungen **5b**, **5c** und **5j** hemmten etwa gleichstark das Wachstum dieses Keimes (WH 9-11 mm).

Bei Erhöhung der Substanzauftragsmenge von 50 auf 200 µg zeigte sich ein positiver Effekt bei den Verbindungen **1**, **74a** und **7** bezüglich der Hemmung des Wachstums des *Aspergillus brasiliensis* (8-13 mm). Dabei konnte eine totale Hemmung des Wachstums, d.h. ein Absterben des Pilzes beobachtet werden (s. Tabelle 3). Alle positiv getesteten Verbindungen unterlagen in ihrer Wirkung auf die Modellkeime den Referenzen Tetracyclin-Hydrochlorid und Clotrimazol.

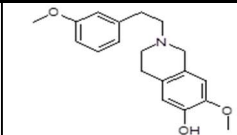
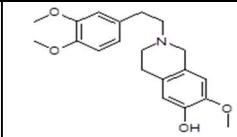
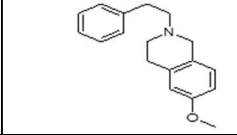
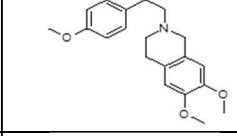
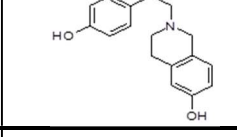
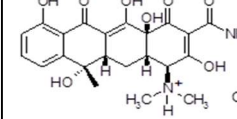
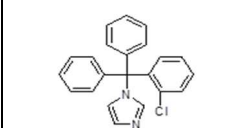
Tabelle 3: Testergebnisse des Agar-Diffusionstests, hier: Protoberberin-Alkaloide; Bezifferung der Substanzen gemäß Anhang (10.1.3); k. T.: keine Testung, WH: Wachstumshemmung, TH: totale Wachstumshemmung

Substanz	Gramnegative Bakterien		Grampositive Bakterien		Hefen		Schimmelpilze	Dermatophyten
	E. coli	P. antimicrobia	S. equorum	St. entericus	Y. lipolytica	C. glabrata	A. brasiliensis	H. burtonii
21 	-	-	-	WH 12	-	WH 15	-	-
1 	-	-	-	-	-	-	TH 8 (200 µg)	-
8 	-	-	-	WH 8	-	-	-	-
12 	-	-	-	-	-	-	-	WH 11
10 	-	-	-	-	-	-	-	WH 8
74a 	-	-	-	-	-	-	TH 13 (200 µg)	WH 11
7 	-	-	-	-	-	-	TH 9 (200 µg)	-

Fortsetzung Tabelle 3

Substanz		Gramnegative Bakterien		Grampositive Bakterien		Hefen		Schimmelpilze	Dermatophyten
		E. coli	P. antimicrobia	S. equorum	St. entericus	Y. lipolytica	C. glabrata	A. brasiliensis	H. burtonii
2		-	-	-	-	-	-	-	-
22		-	-	-	-	-	-	-	-
24		-	-	-	-	-	-	-	-
74		-	-	-	-	-	-	-	-
41		-	-	-	-	-	-	-	-
Tetra-cyclin-HCl		TH 27	TH 13	TH 32	TH 35	k.T.	k.T.	k.T.	k.T.
Clotri-mazol		k.T.	k.T.	k.T.	k.T.	TH 18 WH 25	TH 20	TH 14 WH 20	TH 30

Fortsetzung Tabelle 4

Substanz	Gramnegative Bakterien		Grampositive Bakterien		Hefen		Schimmelpilze	Dermatophyten
	E. coli	P. antimicrobia	S. equorum	St. entericus	Y. lipolytica	C. glabrata	A. brasiliensis	H. burtonii
5h 	-	-	-	-	-	-	-	-
5i 	-	-	-	-	-	-	-	-
5j 	-	-	-	-	WH 9	-	-	WH 9
5k 	-	-	-	-	-	-	-	-
6 	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetra-cyclin-HCl 	TH 27	TH 13	TH 32	TH 35	k.T.	k.T.	k.T.	k.T.
Clotri-mazol 	k.T.	k.T.	k.T.	k.T.	TH 18 WH 25	TH 20	TH 14 WH 20	TH 30

3.2 Testung auf Hemmung der Biosynthesen:

Ergosterol in Hefen und Cholesterol in humanen Zellen

Eine Auswahl synthetisierter Tetrahydroprotoberberinderivate sowie der „Prototyp“ der Phenethyltetrahydroisochinoline **5a** wurden auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese in Hefen sowie der Cholesterolbildung in menschlichen Zellen getestet. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf eine antimykotische Wirkung der Protoberberinium-Salze. Es wird die Hemmung des Enzyms Sterol-24-methyltransferase (24-SMT) im Biosyntheseweg von Ergosterol diskutiert (3.2.1.1). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Ergosterol und Cholesterol wurden die Verbindungen auch hinsichtlich einer Wirksamkeit auf die Cholesterolbiosynthese untersucht. Für antimykotisch wirkende Verbindungen soll somit ein Einfluß auf die Biosynthese von Cholesterol ausgeschlossen werden. Im Screeningassay auf Hemmung der Cholesterolbiosynthese zeigte sich das Phenethyltetrahydroisochinolin **5a** besonders potent, sodass weitere Derivate dieser Testung zugeführt und die Hemmkonzentrationen der vielversprechendsten Verbindungen ermittelt wurden. Im folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit werden diese Ergebnisse vorgestellt.

Durchgeführt wurden die Screeningassays von Christoph Müller aus dem Arbeitskreis um Prof. Dr. F. Bracher, LMU München.

3.2.1 Screening auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese in Hefen

3.2.1.1 Grundlagen

1999 berichteten Park et al. von der antimykotischen Wirkung von Berberin und Palmatin gegenüber verschiedenen *Candida*-Spezies, wobei Palmatin mit einem MIC > 500 µg/mL nur etwa die Hälfte der Wirkung von Berberin zeigte [Park et al., 1999]. Park et al. nennen als mögliche Wirkursache eine Hemmung des Enzyms Sterol-24-methyltransferase (24-SMT). Die meisten Sterole in Pflanzen und Pilzen sind am C-24 alkylsubstituiert, im Unterschied zum in nahezu allen tierischen Organismen dominierenden Cholesterol. Die Methyl- und Ethylsubstituenten an C-24 sind die einzigen Kohlenstoffbausteine des Sterols, die sich nicht vom Acetat-Mevalonat-Weg ableiten [Nes und McKean, 1977]. In Pilzen wird die für die Biosynthese von Ergosterol notwendige Alkylgruppe am C-24 durch eine Transmethylierung von S-Adenosylmethionin (SAM) eingeführt. Schlüsselenzym ist hierbei 24-SMT. Lanosterol, dem ersten Sterol im Biosyntheseweg zum Ergosterol, fehlt diese Methyleinheit noch. Abbildung 47 stellt die Strukturunterschiede dar.

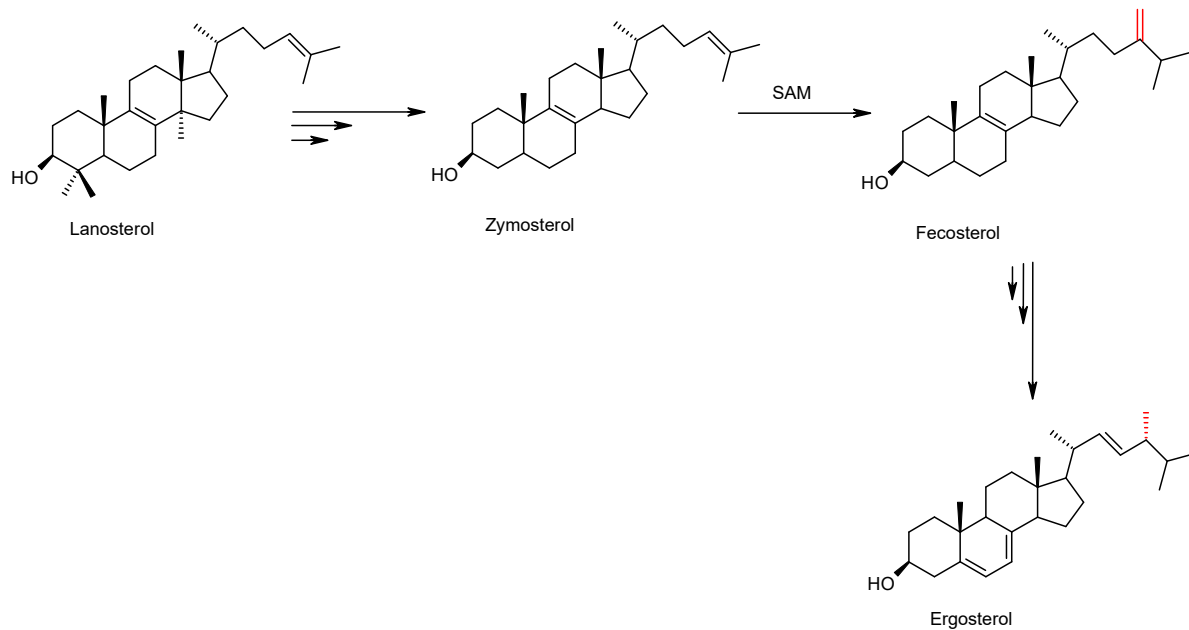


Abbildung 47: Der Weg von Lanosterol zu Ergosterol, verkürzte Darstellung, nach [Nes, 2000]

Wie aus der Abbildung 47 zu entnehmen ist, sind Substrate von 24-SMT tetrazyklisch. Das Grundgerüst der Protoberberinium-Salze ist ebenfalls tetrazyklisch, allerdings mit einem vierten Sechs- anstelle eines Fünfringes.

Das Fehlen von Ergosterol in der Pilzzelle vermindert die Fluidität, Permeabilität und die Funktionalität der fungalen Zellmembran, die durch die Hemmung von Enzymen verursachte Akkumulation von Intermediaten ist toxisch für die Pilzzelle.

3.2.1.2 Prinzip des Screenings

Das Prinzip dieses Testsystems, entwickelt von Müller [Müller, 2002], beruht auf der Inkubation eines Testorganismus mit subletalen Mengen an Wirkstoff. Findet eine Inhibition der Ergosterolbiosynthese im Post-Squalen-Weg statt, verändert sich das typische Sterolmuster des Pilzes in Abhängigkeit von dem gehemmten Zielenzym des Wirkstoffs [Renard et al., 2009]. Nach Extraktion der Sterolfraction durch Festphasenextraktion (SPE), können diese Veränderungen gegenüber dem normalen Sterolmuster chromatographisch mittels GC/MS dargestellt und interpretiert werden.

Als Testkeim wird, neben *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae*, die nicht-pathogene Hefe *Yarrowia lipolytica* eingesetzt. *Yarrowia lipolytica* eignet sich besonders als Testkeim. Zum einen kann die Hefe innerhalb eines kurzen Inkubationszeitraumes (72 Stunden) ausreichend Biomasse erzeugen, zum anderen stimmt ihr Verhalten überwiegend mit dem von

phyto- und humanpathogenen Pilzen überein. Somit sind die im Screening-Assay erzeugten Ergebnisse zumindest qualitativ übertragbar.

3.2.1.3 Testsubstanzen und Durchführung des Screenings

Die in den Tabellen 3 und 4 (Abschnitt 3.1.4) dargestellten Verbindungen, Tetracyclin ausgenommen, wurden getestet.

Als Testkeime wurden die Hefen *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* sowie *Yarrowia lipolytica* verwendet. Alle Testkeime wurden vom DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen.

Als erstes wurden die jeweiligen minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) der Substanzen gegen die Testkeime gemäß DIN 58940-84 ermittelt [DIN 58940-84, 2002]. Für die Stammlösungen wurden die Testsubstanzen in absolutem Ethanol gelöst und auf Konzentrationen von 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 und 0.1 mg/mL verdünnt. Clotrimazol wurde als Positivkontrolle, Ethanol als Blindwert verwendet. Jeweils 10 µL der Verdünnungen wurden in eine 24-well-Platte, welche 1990 µL einer Suspension aus Medium und 5.0×10^5 CFU/mL (colony forming units) des Testkeimes enthielt, überführt. CFU wurde bestimmt durch Verwendung eines Mc Farland Standards mit einer Absorption von 0.5 bei 570 nm (Hitachi, Mannheim, Deutschland). Die Absorption des Standards entspricht 5×10^6 CFU/mL [DIN 58940-84, 2002]. Schlussendlich betragen die Konzentrationen der Verdünnungen 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, und 0.5 µg Testsubstanz pro mL Ethanol. Der Assay wurde zweifach durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 48 ± 2 Stunden bei 28 °C wurden die MICs visuell bestimmt. Anschließend wurde der Inhalt geeigneter Wells (ausreichend Biomasse) mit zugesetzten Inhibitorkonzentrationen von 10 und 20 µg/mL der Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion und gaschromatographischen Bestimmung des Sterolmusters zugeführt. Als interner Standard wurde Cholestan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; 10 µg/mL in TBME) verwendet. Details der Probenvorbereitung zur GC-MS-Analyse sind im Anhang beschrieben (10.2.6).

3.2.1.4 Testergebnisse

Die Positivkontrolle Clotrimazol zeigte ein MIC unter 1 µg/mL, bei den Testsubstanzen hingegen war bis zu einer Konzentration von 20 µg/mL keine Hemmung zu verzeichnen. Da die Hemmung einzelner Enzyme der Ergosterolbiosynthese nicht zwangsläufig zum Zelltod führt, wurde anschließend die mögliche Wirkung der Substanzen auf einzelne Schritte der Ergosterolbiosynthese untersucht. Dabei zeigten nur zwei Verbindungen eine signifikante Änderung des Sterolmusters in *Y. lipolytica*: **65** und **74a**. Bei den übrigen Testsubstanzen

konnte durch die GC-MS-Analyse kein abweichendes Sterolmuster detektiert werden. Die Inkubation von *Y. lipolytica* mit **65** und **74a** verursachte eine Akkumulation von 24(28)-Dehydroergosterol. Daraus ist zu schließen, dass an einer Stelle des Post-Squalen-Weges die Ergosterolbiosynthese unterbrochen wird. Aufgrund des akkumulierten Dehydroergosterol wurde die Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase als blockiertes Enzym identifiziert.

3.2.1.5 *Diskussion der antimikrobiellen Aktivität: Ergebnisse aus Agar-Diffusionstest und Screening auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese*

Agar-Diffusionstest

Bei der biologischen Prüfung auf antimikrobielle Aktivität im Agar-Diffusionstest zeigten 16 von 31 Testverbindungen Wirksamkeit gegen einen oder mehrere der Modellkeime. Im Vergleich zu den mitgeführten Referenzen, Clotrimazol und Tetracyclin-Hydrochlorid, waren die Wirkungen der Verbindungen allerdings eher gering ausgeprägt. Der Agar-Diffusionstest gibt nur einen Hinweis auf eine antimikrobielle Aktivität der Testverbindungen. Quantitative Aussagen sind aus den erzeugten Hemmhofdurchmessern nicht ableitbar. Die ermittelten und in der Literatur veröffentlichten MIC-Werte gegenüber verschiedenen Bakterien- und Pilzspezies von Berberin und Palmatin sowie Tetrahydroprotoberberinen betragen meist > 250-1000 $\mu\text{g/mL}$ [Iwasa et al., 1996, Volleková et al., 2003], d.h. es sind relativ große Mengen der Substanzen nötig, um mit Standardantibiotika vergleichbare Effekte zu erzielen. Die antimikrobielle Wirkung der Protoberberinium-Salze Berberinchlorid **21**, Palmatiniodid **8** und Berberrubinchlorid **1** ist vermutlich auf die quartäre Ammoniumfunktion zurückzuführen, die mit verschiedenen zellulären Zellstrukturen interagieren kann, z.B. DNA und Zellmembranen.

Der Modellkeim *Aspergillus brasiliensis* wurde von drei Verbindungen in seinem Wachstum total gehemmt: Berberrubinchlorid **1**, 2,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin **74a** und Nandinin **7**. Alle drei Tetrazyklen tragen ein gemeinsames Strukturmerkmal: eine 9-Hydroxy-10-methoxy-Substitution als typisches Merkmal der natürlich vorkommenden Protoberberine.

Das Wachstum der eingesetzten Hefe *Yarrowia lipolytica* wurde ebenfalls von drei der getesteten Verbindungen beeinträchtigt. Gemeinsames Strukturmerkmal hier: alle sind trizyklisch aufgebaut und besitzen in Position 6 entweder eine Methoxy- oder eine Methylendioxy-Gruppierung (Verbindungen **5b**, **5c** und **5j**).

Der Modellkeim *Candida glabrata* wurde von zwei Substanzen beeinflusst, Berberinchlorid **21** und 2,11-Dimethoxyberbin **65**. Beide weisen keine auffälligen gemeinsamen Strukturmerkmale auf.

Der im Screening eingesetzte Dermatophyt *Hyphopichia burtonii* wurde von den meisten Testverbindungen in seinem Wachstum gehemmt. Dabei riefen die Substanzen **12**, **10** und **74a** eine Wachstumshemmung, gekennzeichnet durch Hemmhöfe bis zu 11 mm, hervor. Allen Substanzen gemein ist die Substitution einer Methoxygruppe in den Positionen 3 und 10 sowie das Tragen einer Hydroxygruppe in Position 9. Folglich weisen auch diese Hemmstoffe das natürliche Substitutionsmuster der Protoberberine auf. Das Tetrahydroprotoberberin **65** sowie die Phenethyltetrahydroisochinoline **5a**, **5e** und **5f** führten zu einer totalen Hemmung des Wachstums von *Hyphopichia burtonii*. Dabei wurden Hemmhöfe von bis zu 20 mm erzeugt. Im Vergleich dazu, Clotrimazol verursacht schwächer konzentriert Hemmhöfe von 30 mm Durchmesser bei diesem Modellkeim.

Auch in den Studien von Iwasa et al. sowie Abbasoglu et al. zeigten Verbindungen mit Methoxy- oder Methylendioxysubstitution stärker ausgeprägte antimikrobielle Effekte als anders substituierte Verbindungen, wobei Abbasoglu keine antimykotischen Wirkungen für diese Substanzen verzeichnen konnte [Iwasa et al., 1996, Abbasoglu et al., 1991]. In unserer Untersuchung zeigten Verbindungen, die zusätzlich zur Methoxy- bzw. Methylendioxygruppierung eine Hydroxygruppe tragen, antimykotische Wirkung. Dabei muss eine 9-Hydroxy-10-methoxy-Substitution vorliegen. Pseudoprotoberberine mit 11-Hydroxy-10-methoxy-Substitution erzeugten keine Hemmhöfe.

In den von uns durchgeführten Untersuchungen konnten die aus der Literatur bekannten antimykotischen Wirkungen von Berberin und Palmatin nur für Berberin, nicht für Palmatin gegen *Candida glabrata* beobachtet werden.

Bei den Phenethyltetrahydroisochinolinolen nahmen die Verbindungen **5a**, **5e** und **5f** eindeutig negativen Einfluss auf das Wachstum von *Hyphopichia burtonii*. Allen drei Verbindungen haben die Substitution in Position 4' am Phenylethylelement sowie die 6-Hydroxy-7-methoxy-substitution des Tetrahydroisochinolins gemeinsam. Der Tausch der Positionen von OH und OCH₃ resultierte in keiner Wirksamkeit gegenüber *Hyphopichia burtonii* (Vergleich **5a** und **5d**).

Mögliche Ursache für eine Hemmung der Ergosterolbiosynthese ist die Blockade des Enzyms Sterol-24-methyltransferase (24-SMT) [Park et al., 1999], verantwortlich für die Übertragung einer Methyleinheit von SAM auf Zymosterol (Abb. 48).

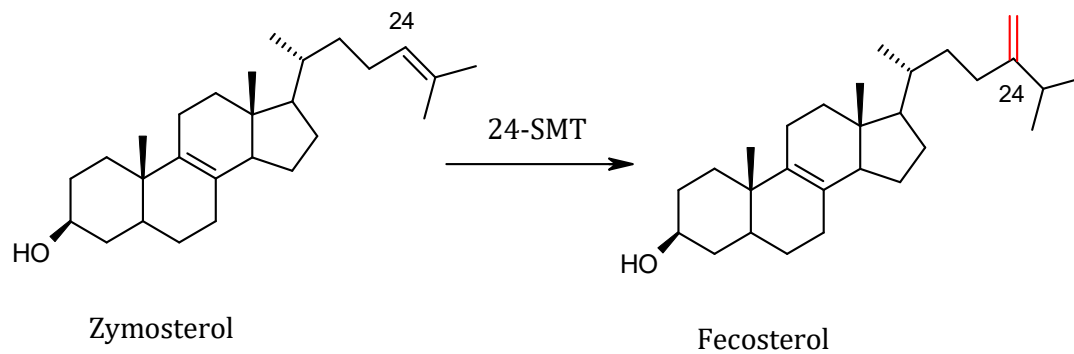


Abbildung 48: Zymosterol als Substrat von 24-SMT in Hefen, Einführung einer Methyleinheit

Screening auf Hemmung der Ergosterolbiosynthese

Zur weiteren Untersuchung möglicher antimykotischer Eigenschaften von Protoberberinen und Phenethyltetrahydroisochinolinen wurde ein Screening auf Hemmung der Ergosterolbiosynthese in Hefen durchgeführt (Abschnitt 3.2.1). Merkmal der von Müller entwickelten Screeningmethode ist die Limitierung der Untersuchung auf den Post-Squalen-Weg der Biosynthese von Ergosterol [Müller, 2002]. Eine Hemmung der Enzyme des Prä-Squalen-Weges ist mit dieser Methode nicht detektierbar. Dabei entstünden zu polare Substanzen wie beispielsweise Phosphate und CoA-aktivierte Substanzen, die äußerst schwer durch die Sterolextraktionsmethode erfassbar wären.

Für das Screening auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese wurde die Hefe *Yarrowia lipolytica* als geeignetster Testkeim identifiziert. Ihr Verhalten deckt sich zum größten Teil mit dem von phyto- und humanpathogenen Pilzen. Folglich können die im Screening erzeugten Ergebnisse zumindest qualitativ übertragen werden. Allerdings bildet *Y. lipolytica*, in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen, 24(28)-Dehydroergosterol und Ergosterol in unterschiedlichen Mengen, was zu Fehlinterpretationen bezüglich einer Enzymhemmung von Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase führen kann.

Nach Inkubation von *Y. lipolytica* mit **65** und **74a** akkumulierte das Sterol 24(28)-Dehydroergosterol. Wie bereits erwähnt, ist *Y. lipolytica* selbst in der Lage dieses Sterol zu bilden. Da in den Blindproben Dehydroergosterol nicht detektiert wurde, wird von einer tatsächlichen Hemmung des Enzyms Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase ausgegangen. Nicht ganz auszuschließen ist jedoch, dass das Verhältnis Ergosterol zu 24(28)-Dehydroergosterol auch in verschiedenen Blindproben variieren könnte.

Den Verbindungen der Klasse der Phenethyltetrahydroisochinoline, die im Agar-Diffusionstest vorrangig das Wachstum der Hefe *Yarrowia lipolytica* hemmten, konnten im Screening auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese keine Wirkung nachgewiesen werden. Allerdings ist

anhand der Ergebnisse eine Wirksamkeit im Bereich des Prä-Squalen-Weges der Ergosterolbiosynthese nicht auszuschließen.

Leider konnte in dem Screeningassay die Inhibition der 24-SMT durch die Protoberberine nicht bestätigt werden. 24-SMT fehlt dem tierischen Organismus. Dieser Aspekt macht potenzielle und selektive Inhibitoren dieses Targets in Hinblick auf eine pharmazeutische Anwendung als Antimykotikum und die Reduktion von Nebenwirkungen äußerst attraktiv. Bekannte Hemmer der 24-SMT (Abb. 49) erweisen sich als für den menschlichen Organismus zu toxisch für eine pharmazeutische Verwendung [Guo et al., 1997].

Betrachtet man die Testergebnisse der vorliegenden Arbeit (Tabellen 3 und 4), so wird deutlich, dass Derivate mit Hydroxysubstitution im Agar-Diffusionstest einen größeren Hemmeffekt auf das Wachstum des Dermatophyten *Hyphopichia burtonii* und des Schimmelpilzes *Aspergillus brasiliensis* ausüben als andere Verbindungen. Bei den Protoberberinen führten nur die getesteten Verbindungen mit einer 9-Hydroxy-10-methoxy-Substitution zu einer Wachstumshemmung, teilweise sogar totalen Wachstumshemmung von *Aspergillus brasiliensis* und *Hyphopichia burtonii*. Phenethyltetrahydroisochinoline mit Substitutionen in den Positionen 4' (Cl, F oder OCH₃) sowie 6 (OH) und 7 (OCH₃) erzeugten eine totale Wachstumshemmung des Modellkeimes *Hyphopichia burtonii*, im Ausmaß ähnlich der Referenz Clotrimazol.

Für eine antimykotische Wirkung der Verbindungen könnte die Hydroxygruppe am D-Aromaten verantwortlich gemacht werden. Die Verbindungen könnten damit als Substrate für die Enzymkaskade der Ergosterolbiosynthese im Post-Squalen-Weg fungieren. Alle Intermediate der Ergosterolbiosynthese enthalten eine Hydroxygruppe am äußeren Ring. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe um Volleková, die für Jatrorrhizin, welches sich durch eine OH-Gruppe an Position 3 anstelle einer Methoxygruppe vom Palmatin unterscheidet, eine weitaus höhere inhibitorische Aktivität gegen Dermatophyten und einigen *Candida*-Spezies fanden als für Berberin und Palmatin [Volleková et al., 2003]. Es ist anzunehmen, dass die enzyminhibierende Potenz der Verbindungen mit der Anwesenheit von polaren Gruppen, die als Wasserstoffbrückendonatoren fungieren, gekoppelt ist. Ob sich diese Eigenschaft steigern lässt, beispielsweise durch Einführung einer weiteren OH-Gruppe, setzt weitere Synthesen und Testungen voraus.

Zugegebenermaßen fällt die antimykotische Aktivität der Verbindung **65** aus dem Rahmen der gezogenen Struktur-Wirkungsbeziehungen. Diese Verbindung zeigte gegenüber den Modellkeimen *Hyphopichia burtonii* und *Candida glabrata* eine deutliche Aktivität bis hin zur

totalen Wachstumshemmung. Auch nach dem Screening auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese kann eine antimykotische Wirkung in *Y. lipolytica* nicht ausgeschlossen werden. Dieses Tetrahydroprotoberberin trägt an den Positionen 2 und 10 jeweils eine Methoxygruppe und enthält keinerlei Hydroxysubstitution.

Bekannte Inhibitoren der 24-SMT hemmen auch das Enzym Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase. In der Literatur bekannte Inhibitoren der 24-SMT und der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase sind die synthetischen Verbindungen 25-Aza-24,25-dihydrozymosterol, 24-Methyl-24-thiacholesterol und (20,21)(24,25)-bis-Methylencholestanol (Abb. 49).

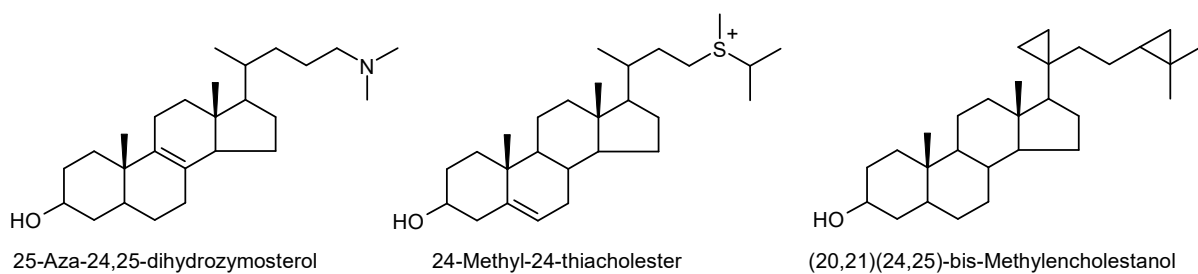


Abbildung 49: Inhibitoren der 24-SMT und Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Bei der Synthese dieser Verbindungen wurde das Prinzip der Mimikry angewendet. In der Biosynthese von Ergosterol werden an C-24 und C-25 carbokationische Zwischenstufen postuliert. Die genannten Verbindungen stellen Imitate dieser Zwischenstufen dar und weisen höhere Bindungsaffinitäten zum Enzym auf [Guo et al., 1997; Nes, 2000]. Die Wirkung der Verbindung (20,21)(24,25)-bis-Methylencholestanol ist nicht so einfach erklärbar und es kann nur darüber spekuliert werden, da hier die Möglichkeit zur Ausbildung einer positiven Ladung nicht gegeben ist. Daneben ist ein fungizider Naturstoff, isoliert aus *Geotrichum flavo-brunneum*-Kulturen, als deutlicher Inhibitor der 24-SMT bekannt [Parks und Rodriguez, 1983]. Allerdings hemmt dieser Naturstoff auch nicht selektiv. Daneben werden auch die Enzyme Sterol- Δ^{14} -Reduktase und Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase blockiert. Vertreter dieser Klasse sind sehr seltene natürlich vorkommende Azasteroide, die in ihrem Grundgerüst wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Verbindungen ein Stickstoff enthalten. Unsere Testverbindungen tragen zwar keine lange (stickstoffhaltige) Seitenkette am Grundgerüst, sind jedoch durch den im tetrazyklischen Grundgerüst enthaltenen Stickstoff, genau wie die genannten bekannten 24-SMT- und $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Hemmer in der Lage, positive Ladungen

auszubilden und somit kationische Imitate der Zwischenstufen der Ergosterolbiosynthese darzustellen.

3.2.2 Screening auf Hemmung der pflanzlichen SMT

Aufgrund der ermittelten möglichen Inhibition der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase in der Ergosterolbiosynthese in *Y. lipolytica* und der in der Literatur postulierten ähnlichen Wirkmechanismen von Inhibitoren der 24-SMT und Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase wurden auf Anfrage Prof. Dr. H. Schallers vom Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) der Universität Strasbourg die Substanzen **65** und **74a** für eine Untersuchung auf Hemmung der pflanzlichen 24-SMT in *Arabidopsis thaliana* nach Strasbourg gesendet. *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) fungiert in der genetischen Forschung als wichtiger Modellorganismus aus der Gattung der Schaumkressen. Die Testverbindungen wurden den Pflanzen in Konzentrationen von 2 mg/L zugesetzt. Die Keimung und das Wachstum der Pflanzen wurden etwa einen Monat lang beobachtet. Daran schloss sich eine gaschromatographische Analyse des Sterolmusters. Wie in der folgenden Abbildung deutlich wird, konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstum von *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss der Substanzen **65** und **74a** im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 50). Die Testverbindungen hatten keinen Effekt auf das Sterolmuster.

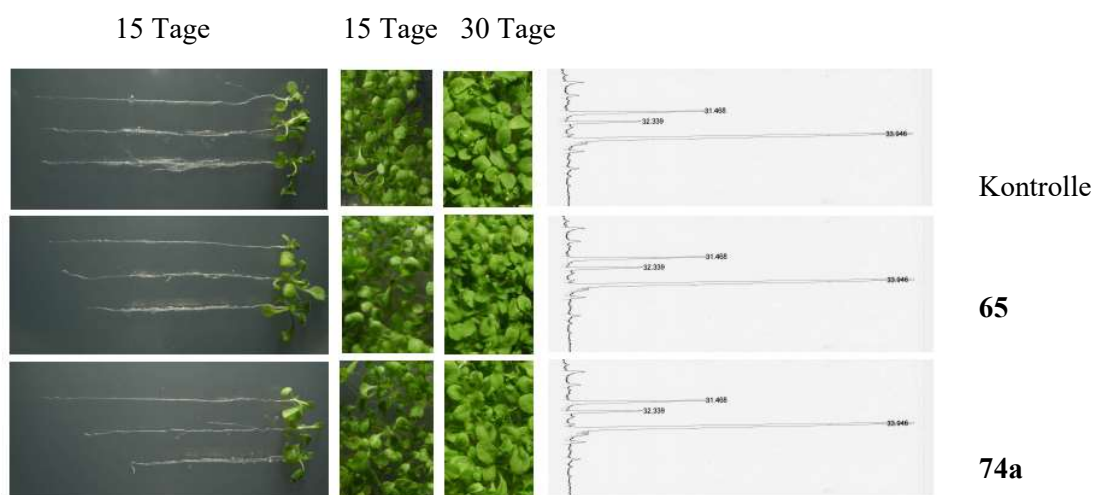


Abbildung 50: Keimung von *Arabidopsis thaliana* nach 15 und 30 Tagen

3.2.3 Screening auf Inhibition der Cholesterolsynthese in humanen Zellen und Quantifizierung der Hemmkonzentrationen

3.2.3.1 Grundlagen

Cholesterin, ein lebenswichtiges Sterin und Bestandteil der Zellmembran, fungiert als Vorstufe für Steroidhormone und Gallensäuren. Besonders während der embryonalen Entwicklung wird Cholesterin eine Schlüsselrolle zugeschrieben. So wird eine seltene, aber bekannte, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLO-Syndrom), mit einem Defekt der Cholesterolsynthese in Zusammenhang gebracht [Waterham et al., 2000]. Diese Erkrankung wurde 1964 erstmals von den Genetikern David Smith, Luc Lemli und John Opitz beschrieben [Smith et al., 1964]. Die Inzidenz für das SLO-Syndrom liegt in Europa und den USA bei 1:60000 Geburten. Durch die Arbeiten von Irons und Tint wurde bekannt, dass Kinder, die an dem SLO-Syndrom leiden, nicht fähig sind, Cholesterin zu bilden. Im Jahr 1993 erkannten Irons und Tint, dass am SLO-Syndrom Leidende erniedrigte Cholesterin- sowie erhöhte 7-Dehydrocholesterin (7-DHC)-Spiegel aufwiesen [Irons et al., 1993, Tint et al., 1994]. Diese Erkenntnis führte zur Identifizierung der biochemischen Ursache des Smith-Lemli-Opitz-Syndroms: ein enzymatischer Defekt der 7-Dehydrocholesterinreduktase (7-DHCR), dem Enzym, das die Reduktion von 7-Dehydrocholesterin (Cholesta-5,7-dien-3 β -ol) zu Cholesterin (Cholesta-5-en-3 β -ol) im letzten Schritt der Cholesterolsynthese katalysiert (Abb. 51) [Irons et al., 1993, Tint et al., 1994]. Cholesterin ist eine lebensnotwendige Substanz, die zu 80 % selbst vom Körper synthetisiert wird. Nur etwa 20 % werden über die Nahrung aufgenommen. Bereits ab der 8. Schwangerschaftswoche können Feten eigenes Cholesterin bilden. Ab diesem Zeitpunkt werden sie nicht mehr mit Cholesterin durch die Mutter versorgt. Die Organbildung findet in der 4. bis 12. Schwangerschaftswoche statt, wofür Cholesterin unbedingt benötigt wird. Der Mangel an Cholesterin führt bei an SLO-Syndrom leidenden Kindern häufig zu Organfehlbildungen wie Mikrozephalie und Retrognathie und geht mit geistiger Zurückgebliebenheit einher.

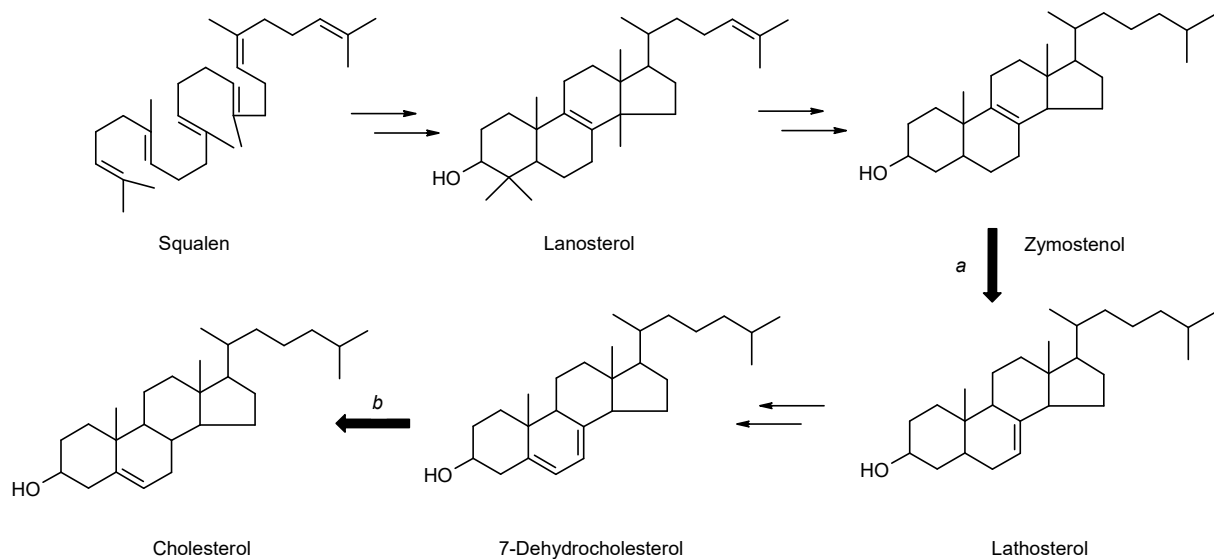


Abbildung 51: Post-Squalen-Weg der Cholesterolsynthese; *a* katalysiert durch $\Delta 8,7$ -Isomerase, *b* katalysiert durch 7-Dehydrocholesterolreduktase (7-DHCR)

Die Erkenntnis, dass eine Störung in der Cholesterolsynthese ursächlich für das SLO-Syndrom ist, ermöglichte die Diagnosesicherstellung mit einem Labortest. Eine Behandlung der Erkrankung ist möglich, eine Heilung dagegen bisher nicht.

Seit bekannt wurde, dass Berberin durch Hemmung der hepatischen HMG-CoA-Reduktase in Ratten den Cholesterolspiegel senken kann, wurde die Testung unserer Berberin- und Tetrahydroberberinderivate hinsichtlich einer Beeinflussung der Cholesterolsynthese ein interessanter Aspekt der aktuellen Arbeit [Wu et al., 2011].

3.2.3.2 Prinzip des Screenings

Basierend auf einer Inkubation von humanen HL-60-Zellen mit den Testsubstanzen, anschließender Zellyse, gefolgt von Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion und Analyse des entstandenen Sterolmusters, wird der Effekt von Testsubstanzen auf die Cholesterolsynthese in einem *in vitro* Zelltest untersucht [Giera et al., 2007]. Um ein bestimmtes gehemmtes Enzym des Post-Squalen-Pfades benennen zu können, werden die per GC-MS identifizierten Sterole mit dem Sterolmuster, hervorgerufen durch Inkubation der Zellen mit bekannten Cholesterolsyntheseinhibitoren, verglichen.

3.2.3.3 Quantifizierung der Hemmkonzentration vielversprechender Inhibitoren

Für die Erlangung quantitativer Ergebnisse schließt sich dem Screening ein Ganzzell-Assay (humane *HL-60*-Zellen) an, der die Bestimmung des Ausmaßes einer Inhibition auf die Gesamtcholesterolsynthese erlaubt [Giera et al., 2007]. Isolierte Enzyme der Cholesterolsynthese werden hierbei vermieden. Daher können im Ganzzell-Assay nur selektive Inhibitoren eingesetzt werden, um von der Hemmung der Gesamtcholesterolsynthese auf das Ausmaß der Hemmung des jeweiligen Enzyms zu schließen.

Cholesterin ist allzeit in Zellen vorhanden. Um neu gebildetes Cholesterin von diesem Matrixcholesterin zu unterscheiden, wird die Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz in Anwesenheit von $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Acetat durchgeführt. In der Folge wird dieser Baustein in neu synthetisiertem Cholesterin eingebaut, sodass eine Unterscheidung möglich ist. Anschließend kann die Menge ^{13}C -markiertem Cholesterin gaschromatographisch-massenselektiv bestimmt werden. Die IC_{50} -Werte korrelieren mit der prozentualen Hemmung der Gesamtcholesterolsynthese. Zur Testung werden sechs geeignete Konzentrationen der vielversprechendsten Kandidaten eingesetzt (3fach).

3.2.3.4 Experimentelle Durchführung

Alle Testverbindungen aus dem Screening auf Inhibition der Ergosterolsynthese wurden für das Screening auf Inhibition der Cholesterolsynthese in humanen Zellen eingesetzt (Tabellen 3 und 4).

990 μL einer Suspension von 1×10^6 humanen *HL-60*-Zellen in einem speziellen *HL-60*-Zellmedium ("Medium für HL 60 Zellen, lipidfreies Medium"; PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) wurde in 24-well-Platten mit je 10 μL des potenziellen Inhibitors in den Konzentrationen 50 μM und 1 μM für 24 Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO_2 -Konzentration). Als Blindwert wurde Ethanol verwendet. AY 9944 und BM 15.766 (beide von Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland bezogen), bekannte Inhibitoren des Post-Squalen-Pfades der Cholesterolsynthese, wurden als Referenzen für die Inhibition des Enzyms 7-Dehydrocholesterolreduktase verwendet. Die Suspensionen wurden nach Zusatz des internen Standards Cholestan (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) der Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion und gaschromatographischen Bestimmung des Sterolmusters zugeführt. Zymostenol, eingesetzt als Referenzsubstanz, wurde aus Cholesta-8,14-dien-3 β -ol synthetisiert [Giera et al., 2007], 7-Dehydrocholesterin von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)

bezogen. Die Durchführung der Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion zur Vorbereitung der Proben für die GC-MS-Analyse ist im Detail im Anhang beschrieben (10.2.5).

Für die Bestimmung der Hemmkonzentrationen wurden jeweils sechs Konzentrationen der potentesten Verbindungen hergestellt. Die Substanzen wurden anhand einer semiquantitativen Analyse des akkumulierten 7-Dehydrocholesterolpeaks ausgewählt. In diesem Fall waren das die für die Hemmung der 7-Dehydrocholesterolreduktase bekannten Verbindungen AY 9944 und BM 15.766 sowie **5f**, **5h** und **5i**. Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurden alle Konzentrationsstufen sowie der Blindwert dreifach getestet. Die Inkubation der Zellen mit der jeweiligen Substanz erfolgte wie beim qualitativen Screening, wobei 10 µL sterile Natrium-¹³C-Acetat-Lösung (6.25 mg/mL) 10 µL der Zellsuspension ersetzen. Nach der Zelllyse wurden 3 x 25 µL jeden Zelllysates dem Bradford-Assay zur Proteinbestimmung zugeführt [Bradford, 1976; Giera et al., 2007]. Anschließend erfolgten Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion und die gaschromatographische Analyse des Sterolmusters mit massenspektrometrischer Detektion (10.2.5 und 10.2.6). Der Assay wurde zweifach durchgeführt.

Die gesamtheitliche Inhibition der Cholesterolsynthese in Prozent wurde durch folgende Gleichung (1) berechnet.

$$\%Inhibition = \left[1 - \left(\frac{A_S \times A_{ISC} \times PC_C}{A_C \times A_{ISS} \times PC_S} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

A_S Fläche der Probe (¹³C-markiertes Cholesterol); A_{ISC} Fläche des internen Standards (Cholestan); PC_C Proteingehalt der Kontrolle; A_C Fläche der Kontrolle (¹³C-markiertes Cholesterol); A_{ISS} Fläche des internen Standards in der Probe (Cholestan); PC_S Proteingehalt der Probe

Die prozentuale Hemmung relativ zu unbehandelten Kontrollproben (0% Hemmung) wurde durch Verwendung von Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Inc, San Diego, USA) gegen die logarithmische Inhibitorkonzentration aufgetragen.

3.2.3.5 Testergebnisse

Die Inkubation mit den Verbindungen **5a**, **28** und **5e** resultierte in einer Akkumulation von 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) bei einer geringen eingesetzten Konzentration. Bei höheren Konzentrationen hingegen akkumulierte neben 7-DHC auch das Sterol Zymostenol. Das lässt auf eine Inhibition der Enzyme Δ⁸,7-Isomerase (Markersterol Zymostenol) sowie 7-Dehydrocholesterolreduktase (Markersterol 7-Dehydrocholesterol) schließen. Verbindung **60** hemmt beide genannten Enzyme – konzentrationsunabhängig. Die Verbindungen **41**, **5b**, **5c**,

5j und **5k** dagegen führten zur alleinigen Anhäufung von Zymostenol, was auf eine selektive Inhibition des Enzyms $\Delta 8,7$ -Isomerase deutet. Die Verbindungen **5d**, Jatrorrhizinioidid, Berberinchlorid **21** und **74a** beeinflussen die Cholesterolsynthese in keiner Weise.

Nach Inkubation der humanen *HL-60*-Zellen mit den Verbindungen **5f** – **i**, **6** und Palmatinioidid **8** zeigte sich ein Sterolmuster, charakteristisch für die selektive Inhibition der 7-Dehydrocholesterolreduktase. Die Substanzen Palmatinioidid **8**, **5g** und **6** führten allerdings nur bei Einsatz höherer Konzentrationen zur Akkumulation von 7-Dehydrocholesterol, wohingegen **5f**, **5h** und **5i** bereits in sehr niedrigen Konzentrationen einen Effekt zeigten.

Die Screeningergebnisse der bekannten Inhibitoren der 7-DHCR, AY 9944 und BM 15.766, decken sich mit den Literaturdaten: AY 9944 inhibierte die Enzyme $\Delta 8,7$ -Isomerase und 7-Dehydrocholesterolreduktase [Paik et al., 1986, Gaoua et al., 1999, Shefer et al., 1998, Moebius et al., 1998], BM 15.766 hemmte 7-DHCR selektiv [Aufenanger et al. 1986, Fernández et al., 2005]. Die Phenethyltetrahydroisochinoline **5f**, **5h** und **5i** zeigten die gleiche Effekte auf *HL-60*-Zellen wie BM 15.766, führten jedoch zu einer stärkeren Akkumulation von 7-DHC bei gleicher Konzentration.

Die inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50} -Werte) für die Phenethyltetrahydroisochinoline **5f**, **5h** und **5i** sowie BM 15.766 wurden bestimmt. Durch den Einbau von markierten $2-^{13}C$ -Acetat-Einheiten in neu synthetisiertem Cholesterol, konnte dieses selektiv durch GC-MS bestimmt und vom Matrixcholesterol unterschieden werden [Giera et al., 2007]. Die auf diese Weise bestimmten IC_{50} -Werte korrespondieren mit der prozentualen Hemmung der Cholesterolsynthese im Ganzzell-Assay.

Die Ergebnisse der IC_{50} -Bestimmung für die genannten Verbindungen sind zusammenfassend in Tabelle 5 dargestellt. Verbindung **5f** zeigte eine ausgesprochen hohe inhibitorische Aktivität.

Tabelle 5: ermittelte IC_{50} -Werte der Hemmung der Gesamtcholesterolsynthese aus der Bestimmung des Einbaus von ^{13}C in neu synthetisiertes Cholesterol; Konfidenzintervall 95 %, R^2 Bestimmtheitsmaß

Substanz	relative Molekülmasse	IC_{50} [nM]	Konfidenzintervall [nM]	R^2
BM 15.766 (Sulfat)	483.0	500	430-570	0.975
5f	317.8	2.3	2.0-2.6	0.979
5h	313.4	120	95-150	0.908
5i	343.4	7300	6100-8700	0.958

3.2.3.6 *Diskussion der Ergebnisse*

Es sind drei Inhibitoren der 7-DHCR bekannt: AY 9944, BM 15.766 und YM 9429. Die beiden zuerst genannten wurden beim Screening der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen auf Inhibition der Cholesterolsynthese als Referenzsubstanzen mitgeführt. YM 9429 wurde nur in wenigen Studien untersucht und zeigte sich weniger potent in der Hemmung von 7-DHCR als AY 9944 und BM 15.766 [Honda et al., 1996].

AY 9944 wird in der Literatur als ein unselektiver Inhibitor der Cholesterolsynthese beschrieben [Gaoua et al, 1999, Shefer et al., 1998]. Dies bestätigte sich auch in unserem Screening mit der Hemmung zweier Enzyme, $\Delta 8,7$ -Isomerase und 7-Dehydrocholesterolreduktase, durch AY 9944. Durch diese Inhibition kommt es zur Akkumulation weiterer Sterole, hier hauptsächlich Zymostenol (Cholesta-8-en-3 β -ol), was zur Verzerrung der simulierten Situation im SLOS führt.

Der Inhibitor BM 15.766 ist als selektiver Inhibitor von 7-DHCR bekannt, jedoch weniger potent als AY 9944 [Aufenanger et al. 1986, Fernández et al., 2005]. BM 15.766 zeigte sich *in vitro* weniger toxisch als AY 9944 [Pill et al., 1985]. Folglich ist derzeit kein geeigneter 7-DHCR-Inhibitor für die Untersuchung der pathobiochemischen Vorgänge im SLOS verfügbar. In Abbildung 52 sind die Strukturen der bekannten Inhibitoren von 7-DHCR neben unserer potentesten Verbindung **5f** dargestellt.

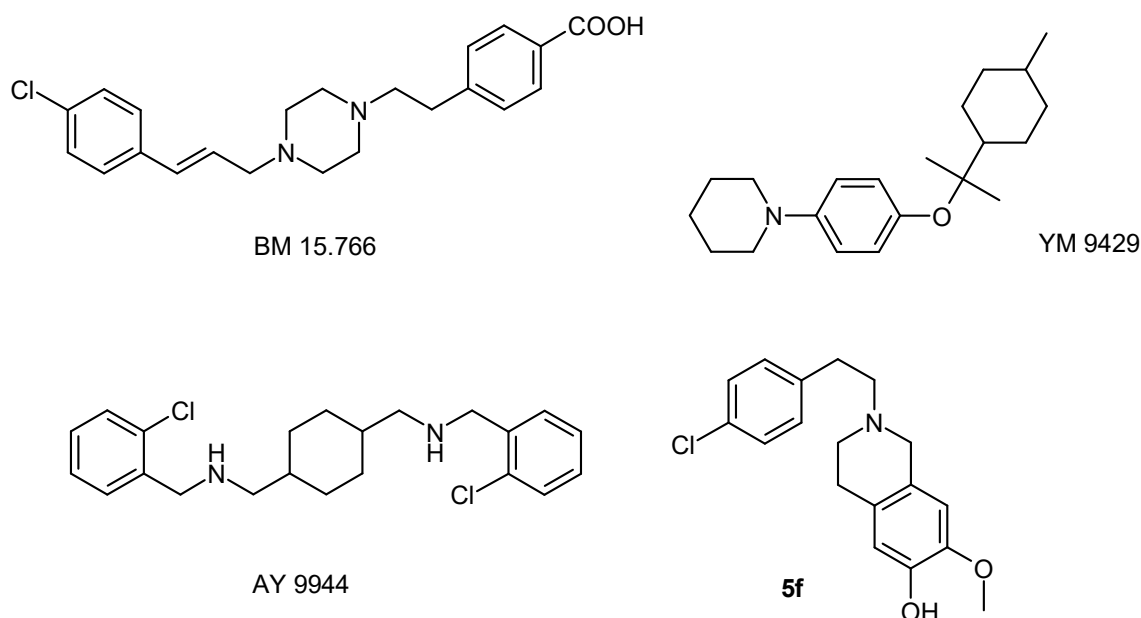


Abbildung 52: Strukturen der bekannten Inhibitoren der 7-Dehydrocholesterolreduktase und der potente und selektive Inhibitor **5f**

Alle in Abbildung 52 dargestellten Verbindungen sind Ammoniumion-enthaltene kationische Substanzen. Neben BM 15.766 waren im qualitativen Screening auf eine Hemmung der Cholesterolsynthese sechs Verbindungen selektiv wirksam gegen 7-DHCR.

Drei Verbindungen (Palmatiniodid **8**, **5g** und **6**) führten nur bei hohen eingesetzten Konzentrationen zu einer Akkumulation von 7-Dehydrocholesterol. Die Substanzen **5f**, **5h** und **5i** und die Referenzsubstanz BM 15.766 inhibierten 7-DHCR bereits in sehr niedriger Konzentration. Dabei zeigten die drei Phenethyltetrahydroisochinoline die gleichen Effekte auf *HL-60*-Zellen wie BM 15.766, führten jedoch zu einer stärkeren Akkumulation von 7-DHC bei gleicher Konzentration. Die *in vitro* für eine 50%ige Hemmung der 7-DHCR notwendige Konzentration der Verbindung **5f** ist deutlich niedriger als die für BM 15.766 (Tab. 5). Verbindung **5f** zeigt sich 200mal potenter als BM 15.766 in der Hemmung der Cholesterolsynthese in einem Ganzzell-Assay unter gleichen Bedingungen.

Aufgrund der geringen Anzahl getesteter Verbindungen können Struktur-Wirkungsbeziehungen nur vage formuliert und getroffen werden. Alle Inhibitoren der 7-DHCR vom Phenethyltetrahydroisochinolin-Typ (**5a**, **5f-i**, **6**) tragen eine Hydroxygruppe an C-6 des Tetrahydroisochinolingrundgerüsts. Zusätzlich ist bei diesen Verbindungen, ausgenommen Substanz **6**, eine Methoxygruppe in Position 7 substituiert. Die Phenethyltetrahydroisochinoline (**5b**, **5c**, **5j**, **5k**), die im Assay eine selektive Hemmung des Enzyms $\Delta 8,7$ -Isomerase bewirkten, zeigen dieses Substitutionsmuster nicht. Phenethyltetrahydroisochinolinderivate, die keine Hydroxygruppe an C-6 und Methoxygruppe an C-7 tragen, hatten keine inhibitorische Wirkung auf 7-DHCR. Eine Hydroxylierung in Position 7 und das Einführen einer Methoxygruppe in Position 6 führte zum Verlust der Wirkung auf die Cholesterolsynthese (**5d**). Sowohl das Tetrahydroprotoberberin **74a** als auch die Protoberberinium-Salze Berberinchlorid **21** und Jatrorrhiziniiodid tragen keine Hydroxygruppe am Aromaten D an der entsprechenden Position. Sie zeigten keine Wirkung auf die Cholesterolsynthese. Das lässt den Schluss zu, dass für eine Hemmung des Enzyms 7-Dehydrocholesterolreduktase eine 6-Hydroxygruppe am Phenethyltetrahydroisochinolingrundgerüst und eine 11-Hydroxylierung am Grundgerüst der Protoberberine erforderlich sind (Ausnahmen: Verbindungen **28** und **8**). Die bekannten Inhibitoren der 7-DHCR, BM 15.766 und AY 9944, tragen ebenso wie **5f** an einem der Phenylringe einen elektronenziehenden Substituenten (Abb. 52). Die Verbindung **5h** enthält keine solche funktionelle Gruppe, zeigte aber eine höhere Aktivität gegenüber 7-DHCR als BM 15.766 (Tab. 5). Das Substitutionsmuster des zum Piperidinring annellierten Phenylringes scheint daher für die Aktivität wichtiger zu sein als das Muster am anderen Aromaten.

Abschließend kann gesagt werden, dass es in einem Ganzzell-Assay gelungen ist, drei neue selektive Inhibitoren des Enzyms 7-Dehydrocholesterolreduktase, ein Schlüsselenzym im Erkrankungsbild des autosomal rezessiv vererbaren Smith-Lemli-Opitz-Syndroms, zu identifizieren. Die Verbindung **5f** zeigte dabei eine 200fach höhere Aktivität gegenüber 7-DHCR als der bekannte selektive Inhibitor BM 15.766. Die mittleren inhibitorischen Konzentrationen wurden aus der Hemmung der Gesamtcholesterolsynthese ermittelt.

Da 7-DHCR das letzte Enzym der Cholesterolsynthese darstellt, spiegeln die IC_{50} -Werte die selektive Hemmung dieses Enzyms wider. Diese Annahme wird durch zwei Feststellungen unterstrichen:

1. der Einsatz höherer Substanzkonzentrationen (50 μ M) führte zu keiner Akkumulation anderer Steroide,
2. nichtselektive Inhibitoren (**5a**, **5e**) konnten mit der angewandten Methode identifiziert werden.

Aufgrund des kleinen Substanzpools sind Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen nur eingeschränkt möglich.

3.3 MTT-Test

3.3.1 Grundlagen

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität wurden die Testsubstanzen einem Standard-MTT-Test nach Mosmann unterzogen [Mosmann, 1983].

3.3.2 Literaturbekanntes zur zytotoxischen Aktivität von Berberin und Derivaten

Schon seit jeher werden traditionelle chinesische Pflanzendrogen in der Krebsbehandlung eingesetzt. In den letzten Jahren werden die wirksamen Inhaltsstoffe zunehmend systematisch und wissenschaftlich bezüglich ihres antineoplastischen Potenzials bewertet. Berberin durchlief Screenings und zeigte Antitumoraktivität. Kuo et al. beschrieben für Berberin und Palmatin die Fähigkeit, DNA-Komplexe zu bilden. Diese Eigenschaft war bei Berberin stärker ausgeprägt und führte zur Apoptose von humanen Leukämiezellen *HL-60*, dem Zelltyp, der auch in der vorliegenden Arbeit für die Zytotoxizitätstestung verwendet wurde [Kuo et al., 1995]. Als molekulares Target von Berberin und einigen seiner Derivate wie Coralyn wurde die DNA-Topoisomerase I identifiziert [Gatto et al., 1996, Pilch et al., 1997, Kettmann et al., 2004].

Die Forschungsgruppe um Orfila berichtete, dass Berberin eine breite antineoplastische Wirkung ohne Differenzierung von tumoralen und normalen humanen Zellen besitzt [Orfila et

al., 2000]. Die Ergebnisse von Orfilas in-vitro-Testungen konnten aber bei in-vivo Testungen im Ratten- und Mausmodell nicht bestätigt werden. Der NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) von Berberinchlorid war in beiden Studien 60 bis 100mal höher als die pharmakologische Dosis (bezogen auf die Anwendung als Arzneimittel in China und Indien) [Jahnke *et al.*, 2006].

8-Oxyberberin zeigte sich signifikant zytotoxisch gegenüber fünf Tumorzelllinie mit ED₅₀ von 1.07 bis 2.96 µg/mL [Min *et al.*, 2006]. Bereits in früheren Studien erwiesen sich 8-Oxoderivate zytostatisch gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien [Weimar *et al.*, 1991]. Auch für 8- oder 13-hexylsubstituierte Derivate von Berberin ließen sich zytotoxische Eigenschaften gegenüber humanen Tumorzelllinien nachweisen [Iwasa *et al.*, 2011].

Über zytotoxische Eigenschaften der Tetrahydroprotoberberine ist weniger bekannt. Für das Tetrahydroprotoberberin Canadin, welches sich einzig durch die Sättigung des Ringes C von Berberin unterscheidet, wurde bisher keine zytotoxische Aktivität beschrieben [Correché *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2010]. Kim *et al.* bestätigte jedoch moderate zytotoxische Effekte anderer Tetrahydroprotoberberine wie Nandinin, Corydalin, Isocorybulbin und Tetrahydropalmatin [Kim *et al.*, 2010].

3.3.3 Testsubstanzen und Kontrolllösungen

Für alle Substanzen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mM in reinem DMSO hergestellt. Für ein erstes Screening wurde davon jeweils 1 µL in 99 µL Zellsuspension eingesetzt, sodass sich eine Endkonzentration von 100 µM ergab. Bei positivem Ergebnis wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 50, 25, 12.5, 6.25 und 3.125 µM für die jeweilige Verbindung hergestellt. Jede Konzentration wurde in dreifacher Bestimmung vermessen. Als Positivkontrolle für ein erstes Screening diente eine 1 %ige Triton-X-100-Stammlösung in DMSO. Dabei handelt es sich um ein nichtionisches Detergenz, welches zur Lyse der Zellmembran und somit zum Zelltod führt. Das reine Lösungsmittel, DMSO, wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Als Referenzinhibitor für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurde Cisplatin verwendet.

3.3.4 MTT-Assay

Im Screening zur Identifizierung einer möglichen zytotoxischen Wirkung auf die verwendeten Zellen der humanen Leukämie Zelllinie *HL-60* wurden die im Rahmen dieser Arbeit ersten synthetisierten Protoberberine sowie die kommerziell erhältlichen Verbindungen

Tetrahydropalmin und Berberinchlorid eingesetzt. Von allen anderen synthetisierten Verbindungen wurde sofort, ohne Vorscreening, der IC_{50} bestimmt.

In jedes Well einer 96er Well-Testplatte wurden 99 μ L der Zellsuspension einer Zelldichte von 9×10^5 Zellen pro Milliliter pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden je 1 μ L Testlösung, reines DMSO oder Triton-X-100-Stammlösung auf die ausgesäten Zellen gegeben. Nach erneuter 24stündiger Inkubation bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 -Konzentration wurden 10 μ L MTT-Reagenz pro Well zugesetzt. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurde das gebildete Formazan durch Zugabe von 190 μ L reinem DMSO gelöst. Nach einstündiger Inkubation auf dem Schüttler erfolgte die Auslesung der Platte bei einer Testwellenlänge von $\lambda = 570$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 630$ nm) in einem ELISA-Reader (MRX II Microplate Reader, Dynex Technologies, USA). Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes wurde der Mittelwert der Absorptionen für die mit reinem DMSO behandelten Zellen als 100 % gesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism Version 4.0 für Windows (Graph Pad Software, San Diego, Californien, USA).

3.3.5 Testergebnisse

Im Screening zur Identifizierung einer möglichen zytotoxischen Wirkung auf die verwendeten Zellen der humanen Leukämie Zelllinie *HL-60* ergaben sich die in der folgenden Abbildung dargestellten Ergebnisse.

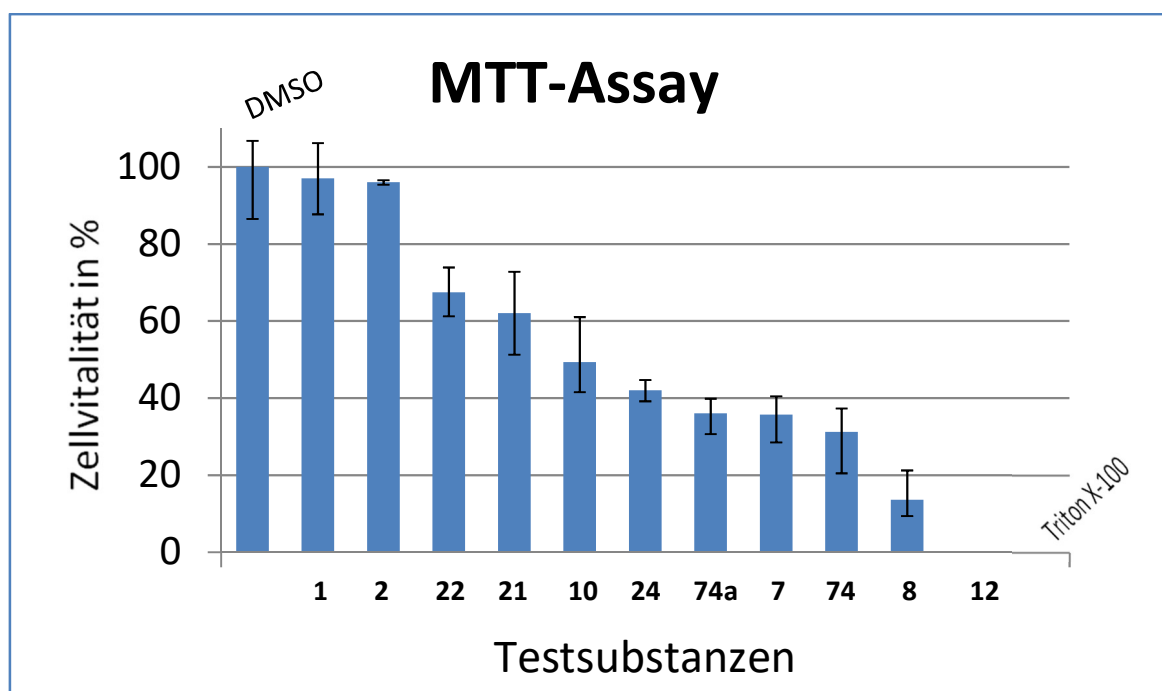


Abbildung 53: Ergebnisse aus dem Vorscreening auf Zytotoxizität, Nummerierung der Testsubstanzen übernommen aus Tabelle 3

Verbindung **12** sticht hervor, die im Vorscreening den gleichen zytotoxischen Effekt auf die Zellen zeigte wie die Positivkontrolle Triton X-100, die zu 100 % zum Tod der Zellen aufgrund von Lyse der Zellmembran führt (Abb. 53). Zu beachten ist jedoch, dass im Vorscreening die Verbindungen in der hohen Konzentration von 100 μM verwendet wurden.

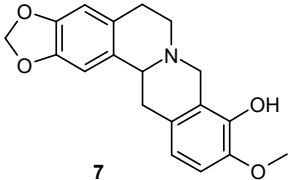
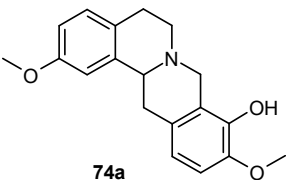
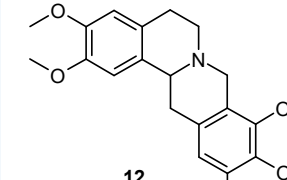
Somit ist es nicht möglich hieraus nach schwacher, mäßiger oder starker Schädigung der Zellen zu differenzieren. Die mit 100 μM Berberinchlorid **21** behandelten Zellen wiesen, entgegen den Erwartungen, zu 62 % eine Zellvitalität auf. Nach der Literaturrecherche (3.3.2) wurde ein gewisser zytotoxischer Effekt erwartet. Außerdem lässt die Struktur der Substanz als quartäres Ammoniumsalz eine Zelltoxizität vermuten.

Um die toxische Wirkung der Substanzen auf die *HL-60*-Zellen zu differenzieren, wurden IC_{50} -Bestimmungen mit dem gesamten Pool der im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen sowie Berberinchlorid und Tetrahydropalmatin durchgeführt. Mit Ausnahme von Verbindung **12** wurden alle Substanzen mit der hohen Anfangskonzentration von 400 μM eingesetzt, um für die Berechnung des IC_{50} möglichst eine vollständige sigmoide Zellviabilitäts-Konzentrations-Kurve zu erhalten.

Mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism Version 4.0 auswertbare sigmoide Kurvenverläufe konnten für drei der getesteten Substanzen erhalten werden. Bei allen anderen Testverbindungen ergaben sich entweder lineare Verläufe oder zu flache sigmoide Kurven, sodass eine IC_{50} -Berechnung nicht möglich war.

In der folgenden Tabelle 6 sind die berechneten mittleren inhibitorischen Konzentrationen für die Substanzen **7**, Nandinin, **74a**, 2,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin und **12**, 11-Iod-Tetrahydropalmatrubin aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht der mittleren inhibitorischen Konzentrationen der Testverbindungen auf *HL-60*-Zellen

Testverbindung			
IC_{50} in μM	67	54	24

Im Vergleich mit dem zugelassenen Zytostatikum Cisplatin, welches das Wachstum von Zellen durch eine Hemmung der DNA-Replikation stört und somit zum Erliegen des Zellstoffwechsels

und zur Apoptose führt, besitzen die in Tabelle 6 aufgeführten Alkaloide eine geringe bis keine Zytotoxizität. Für Cisplatin wurde ein IC_{50} von 5 μ M ermittelt.

3.3.6 Diskussion der Ergebnisse

Die Zytotoxizität der Substanzen, die in der vorliegenden Arbeit allerdings nur an den Zellen der humanen Leukämiezelllinie *HL-60* getestet wurde, ist auf der Basis dieser Daten als gering einzustufen. Jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien, um das zytotoxische Potenzial einer Substanz umfassend zu beurteilen.

Beim Vorscreening ergab sich für Berberinchlorid **21**, getestet in einer Konzentration von 100 μ M, eine zytotoxische Aktivität gegenüber den *HL-60*-Zellen von 38 %. Dieses Ergebnis ist mit dem von Kuo et al. vergleichbar, die die Berberin-induzierte Apoptose von humanen Leukämiezellen *HL-60* untersuchten und 84 % Zellviabilität bei Behandlung der Zellen mit 25 μ g/mL Berberinchlorid (entspricht 67 μ M) nach 24 h (Zeitraumen für die Testung der vorliegenden Arbeit: 28 h) fanden [Kuo et al., 1995].

Die beiden anderen Protoberberinium-Salze Berberrubinchlorid **1** und Palmatin **8** zeigten in unserem Testsystem sehr unterschiedliche Effekte. Berberrubinchlorid führte zu kaum einer Veränderung der Zellen. Nach der Inkubationszeit überlebten mehr als 96 % der Zellen. Palmatin hingegen führte bei einer Konzentration von 100 μ M zu 86 % zum Zelltod. Kuo et al. detektierten zwar bei einer Behandlung der *HL-60*-Zellen mit 25 μ g/mL Palmatin Komplexe der Substanz mit der DNA, konnten jedoch keine Apoptose der Zellen nachweisen [Kuo et al., 1995]. Allerdings testete Kuo Palmatinchlorid, in dieser Arbeit kam Palmatiniodid zum Einsatz. Wir erwarteten ein vergleichbares Verhalten der drei Protoberberinium-Salze aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten (quartäre Grundstruktur). Anscheinend ist dieses Strukturelement für die Antitumorwirkung verschiedener Protoberberine nicht zwingend notwendig. Nach Literaturangaben erwies sich bei einer Testung in den 1980er Jahren auf Wirkung gegen S-180-Ascitestumorzellen Berberin als wirkungslos, dagegen Berberrubin als äußerst potent [Hoshi et al., 1976].

Alle von uns getesteten 9-hydroxy-substituierten Tetrahydroprotoberberine bewirkten im Vorscreening bei einer Konzentration von 100 μ M eine Verringerung der Zellvitalität. Die zytotoxische Aktivität reichte von 51 % für Tetrahydropalmatrubin **10** über 64 % für Nandinin **7** und 2,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin **74a** bis 100 % von 11-Iod-Tetrahydropalmatrubin **12**, wobei die Wirkung der zuletzt genannten Verbindung dem am D-Aromaten substituierten Iod zugeschrieben wird. Auch Verbindung **74**, ein Pseudotetrahydroprotoberberin mit 10-Methoxy-11-hydroxy-Substitution zeigte sich gegenüber *HL-60*-Zellen toxisch (69 %). Der genaue

Mechanismus, der zu einem Absterben der Zellen oder einer Störung des Zellzyklus führt, ist nicht bewiesen. In der Literatur wird zu den bereits erwähnten Möglichkeiten der DNA-Komplexierung und der Topoisomerase I als Target, die Interkalation in die DNA diskutiert. Zu einem Einschub in die DNA sind Substanzen fähig, die sich durch polyzyklische, aromatische und planare Grundstrukturen auszeichnen. Zu den prominenten Vertretern der DNA-Interkalatoren zählen Ethidiumbromid und Doxorubicin. Möglicherweise verstärken polare Gruppen wie die Hydroxygruppe der Tetrahydroprotoberberine die Interkalation in die DNA über Wasserstoffbrückenbindungen. Jedoch ist es nicht möglich, aus den Daten unserer Testung und aus der Literatur einen allgemeinen Wirkmechanismus abzuleiten. Die Wirkungen der Protoberberine auf unterschiedliche Zelllinien sind zu verschieden.

3.4 Protoberberine als Referenzsubstanzen für Untersuchungen an Cytochrom P450 Oxidasen

3.4.1 Das CYP-System

Oxidationen, Reduktionen, Hydrolysen und Eliminationen zählen zu den Phase-I-Reaktionen der Biotransformation von Xenobiotika und Arzneistoffen. Die bedeutendsten Enzyme für die Metabolisierung von Arzneistoffen sind die Enzyme der Cytochrom P450-Familie. Diese Enzyme katalysieren beispielsweise N-Oxidationen, Epoxydierungen und Hydroxylierungen von Aromaten zur Hydrophilisierung und dadurch besseren renalen oder biliären Elimination von Xenobiotika und Arzneistoffen. Die für den Arzneistoffmetabolismus wichtigsten CYP-Enzyme sind in Abbildung 54 dargestellt.

Die Gruppe der Cytochrom P450 abhängigen Enzyme unterteilt sich in verschiedene Familien und Subfamilien. Mitglieder einer Familie weisen zu mindestens 40 % eine identische Aminosäuresequenz auf, Vertreter einer Subfamilie zu mindestens 55 %. Familien werden mit einer Zahl, Subfamilien mit einem Buchstaben gekennzeichnet. So gehört CYP3A4 zur Familie 3 und Subfamilie A, wobei die Zahl 4 den genauen Vertreter der Subfamilie beschreibt. Die verschiedenen Enzyme unterscheiden sich in Substratspezifität, Enzymaktivität und Gewebeverteilung. Die größte Menge an CYP-Enzymen wurde in der Leber nachgewiesen, aber sie kommen auch in anderen Geweben wie Lunge und Gehirn vor.

Aufgrund der Bedeutung der humanen cytochromen P450 Enzyme für die Metabolisierung von Arzneistoffen und somit auch für die Wirkdauer eines Pharmakons, werden neue Arzneistoffkandidaten standardmäßig auf Interaktionen mit dieser Enzymgruppe untersucht.

Bei Verabreichung mehrerer Arzneistoffe in Kombination kann es durch das Konkurrieren der Pharmaka um die Stoffwechsellzyme zu Arzneistoffinteraktionen kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach ersten erfolgreichen Synthesen von Protoberberinderivaten vier Verbindungen dem Screening an Cytochrom P450 Oxidasen unterworfen, um Tendenzen für die Hemmung bestimmter CYP-Enzyme und Anhaltspunkte für Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erlangen.



Abbildung 54: Bedeutung der Cytochrome im Arzneistoffmetabolismus [modifiziert nach Rendic et al., 1997]

3.4.2 Wirkung der Protoberberine auf CYP-Systeme

Berberin als meist verbreitetes und untersuchtes Alkaloid aus der Gruppe der Isochinolin-Alkaloide vom Protoberberin-Typ zeigte in vielen Studien eine Hemmung von CYP-Enzymen. Guo und Mitarbeiter bestätigten in einer randomisierten 2-Phasen Crossover-Studie die Hemmung von CYP2D6, 2C9 und 3A4 nach wiederholter Gabe von 300 mg (t.i.d., p.o.) Berberin [Guo et al., 2012]. Im gleichen Jahr veröffentlichten Zhao et al. *in vitro* an den rekombinanten CYP1A2, 2D6 und 3A4 bestimmte inhibitorische Aktivitäten für Berberin, Neferin und Tetrahydropalmin [Zhao et al., 2012]. Von den untersuchten CYPs wurde 2D6 am stärksten gehemmt. Die beiden Pflanzeninhaltsstoffe, Berberin und Tetrahydropalmin, inhibierten das Enzym mit IC_{50} -Werten von $7.40 \pm 0.36 \mu\text{M}$ bzw. $3.04 \pm 0.26 \mu\text{M}$. Die zwei weiteren CYPs, CYP3A4, insbesondere CYP1A2, wurden hingegen deutlich weniger von allen drei Testsubstanzen gehemmt. Neferin zeigte die schwächste Aktivität gegenüber den CYP-Enzymen [Zhao et al., 2012].

Im Rahmen einer in unserem Arbeitskreis angefertigten Dissertationsschrift [Meyer, 2008] wurden bereits verschiedene natürlich in *Papaveraceae* vorkommende Isochinolin-Alkaloide neben synthetisch gewonnenen Isochinolin-Alkaloidderivaten auf eine Hemmung der Cytochrom P450 abhängigen Enzyme untersucht [Salminen et al., 2011]. Auch hier erwiesen

sich die Protoberberin-Alkaloide einerseits als schwache bis moderate Inhibitoren der CYP1A2 und 2C19, andererseits als moderate bzw. potente Hemmstoffe der 3A4 und 2D6. Andere getestete CYP-Enzyme, 2A6, 2B6, 2C8 und 2C9, wurden dagegen kaum bis gar nicht beeinflusst. Zusätzlich konnten im Screening selektive Inhibitoren der CYP Isoform 3A4 identifiziert werden [Salminen et al., 2011]. Ein spezifischer CYP-Inhibitor, der nicht mit anderen Targets interagiert, besitzt ein großes Potential für die Anwendung als Co-Therapeutikum.

3.4.3 Prinzip und experimentelle Durchführung des Testsystems

Bei diesem Groscreening handelt es sich um ein fluorimetrischen High-Throughput Screeningassay, der die Bestimmung der kompetitiven Hemmung der Cytochrom P450 Oxidasen durch die Testsubstanzen ermöglicht. Diese Art des Screenings ist populär und weitverbreitet in der Untersuchung von Arzneistoffinteraktionen während der präklinischen Phase. Es handelt sich dabei um eine Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Methode unter Verwendung von reinen humanen rekombinanten Enzymen. Spezielle fluorogene Substrate (z.B. Coumarin für CYP 2A6) und deren im Laufe der CYP-Reaktion gebildeten Metaboliten (z.B. 7-Hydroxycoumarin) sind zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Testverbindung notwendig. Gemessen wird die Fluorenzintensität, die je nach Einfluss der Testsubstanz auf die Enzym-Substrat-Reaktion variieren kann.

Das Screening an humanen Cytochrom P450 Oxidasen erfolgte in Kooperation mit dem Arbeitskreis Professor Dr. Raunio der Fakultät für Gesundheitswissenschaften, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Kuopio, Finnland. Durchgeführt wurde die Testung von Kaisa Salminen.

Für das Screening wurden Lösungen der Testverbindungen unterschiedlicher Konzentration eingesetzt (0.1 bis 1000 μM) und die mögliche Inhibition von CYP-Enzymen zweifach bestimmt. Die Verbindungen **28** und **26** wurden in Wasser, Verbindung **60** in Dimethylsulfoxid (DMSO) und **25** in Acetonitril (ACN) gelöst. Die Verbindungen **60** und **25** wurden mit Wasser bis zu einer Endkonzentration von 1.3 % DMSO und 2 % ACN verdünnt.

Zum Screening wurden folgende Cytochrom P 450 Oxidasen eingesetzt: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4.

Details der Durchführung, Material und Methoden sind im Anhang (10.2.3) aufgeführt.

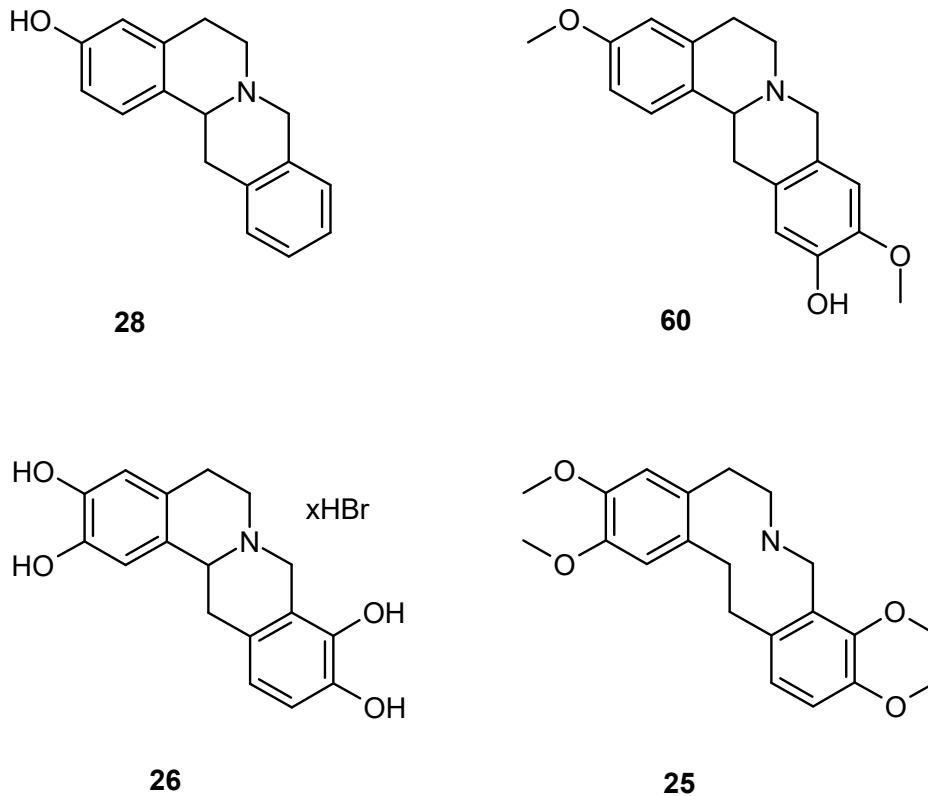


Abbildung 55: Im CYP-Screening eingesetzte Testverbindungen

3.4.4 Testergebnisse

Das Ausmaß der Inhibition eines CYP-Enzyms wurde klassifiziert als potent ($IC_{50} < 1 \mu M$), moderat ($1 \mu M < IC_{50} < 10 \mu M$), schwach ($IC_{50} > 10 \mu M$) und Non-Inhibitor ($IC_{50} > 100 \mu M$) [White, 2000].

Folgende in der Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse wurden erzielt.

Tabelle 7: Übersicht der Inhibition der CYP-Enzyme durch die Testverbindungen

Substanz	CYP Isoform						
	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A4
25	-	-	-	-	-	++	-
60	-	-	-	-	-	+++	-
28	+	-	-	-	+	+++	-
26	+	+	++	++	+	+	-

+++; $IC_{50} < 1 \mu M$; ++; $IC_{50} 1-10 \mu M$; +; $IC_{50} > 10 \mu M$; -, $IC_{50} > 100 \mu M$

Keine der getesteten Verbindungen zeigte Wirkung an CYP3A4, während alle Substanzen das Isoenzym 2D6 inhibierten. Die Verbindungen **60** und **25** hemmten nur dieses Isoenzym, **60** potent mit einem IC_{50} -Wert von $0.15 \mu M$, **25** moderat mit $1.3 \mu M$. Auch Verbindung **28** wies eine potente Hemmwirkung gegenüber 2D6 auf (IC_{50} von $0.62 \mu M$). Dagegen inhibierte es die

restlichen CYP-Enzyme nur gering oder nicht. Verbindung **26** zeigte keinerlei Selektivität gegenüber den verschiedenen CYP Isoformen. Es inhibierte alle Enzyme bis auf 3A4 schwach bis moderat. Die detaillierten Ergebnisse sind im Anhang unter 10.2.3 dargestellt.

3.4.5 Diskussion der Ergebnisse

Die exprimierte Menge an einzelnen CYP-Enzymen ist interindividuell sehr unterschiedlich. Gründe dafür sind zum einen die Enzyminduktion, zum anderen der genetische Polymorphismus. Viele Cytochrome werden erst durch Arzneistoffe stark induziert. Neben CYP1A2 und 2C zählt auch CYP2D6 zu den nicht konstitutiv exprimierten, d.h. durch Arzneistoffe induzierten Enzymen. Ein genetischer Polymorphismus kann ebenfalls unterschiedliche Enzymaktivitäten bewirken. Hierfür bekannte Cytochrome sind 2D6, 2C9, 2C19 und 2C1. 6 bis 7 % der Europäer sowie 1 % der Asiaten besitzen einen 2D6-Mangel, während 3-6 % der Europäer und 15-30 % der Asiaten einen Mangel von 2C19 aufweisen. Solche Polymorphismen beeinträchtigen die Geschwindigkeit der Metabolisierung verschiedener Arzneistoffe und beeinflussen Arzneimittelinteraktionen bei einer kombinierten Gabe mehrere Arzneistoffe.

Als typische CYP2D6 Substrate gelten lipophile Basen mit aromatischem Ring und einem Stickstoffatom, welches bei physiologischen pH-Wert protoniert werden kann [Wang *et al.*, 2009; Lewis, 2004]. Substrate sind beispielsweise Kardiaka wie der Betablocker Metoprolol oder das Antiarrhythmikum Propafenon und Psychopharmaka wie Amitriptylin als trizyklisches Antidepressivum und Perazin als Neuroleptikum. Die beiden Ipecacuanha-Alkaloide Cephaelin und Emetin erwiesen sich als potente Inhibitoren von CYP2D6 (Abb. 56) [Asano *et al.*, 2001].

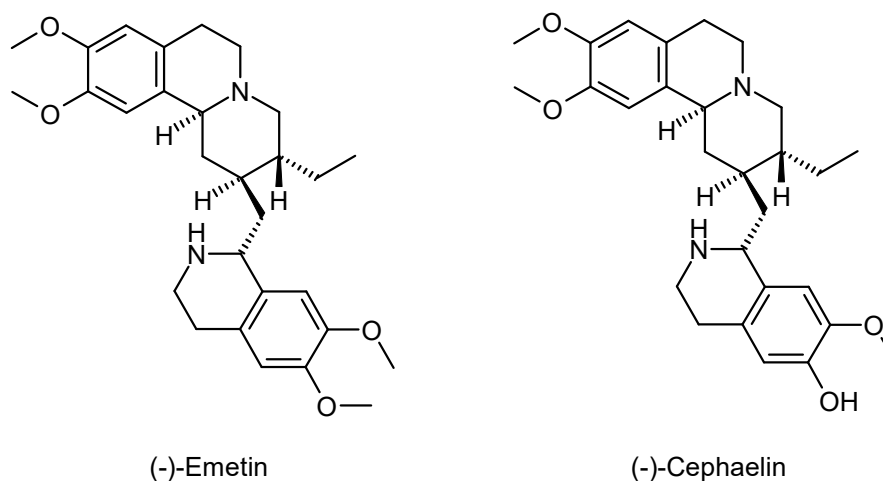


Abbildung 56: Emetin und Cephaelin, Isochinolin-Alkaloide mit dem Grundskelett des Benzo[*a*]hexahydrochinolizins

Die Tetrahydroprotoberberine Scoulerin, 2,3,10,11-Tetramethoxyberbin, 8-Ethyl-2,3,10,11-Tetramethoxyberbin und 2,3-Dimethoxyberbin-Hydrochlorid zeigten bei nur schwacher Interaktion mit anderen CYP-Isoformen eine potente Wirkung gegenüber CYP2D6 [Salminen et al., 2011]. *In vivo* wurde der Nachweis für die hauptsächliche Beteiligung von CYP2D6 an der Biotransformation Berberins in der Leber von Mäusen und Menschen erbracht [Guo et al., 2011]. Alle vier im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Verbindungen erfüllen die Strukturkriterien eines typischen CYP2D6-Substrates und hemmen dementsprechend dieses Isoenzym moderat bis potent (Tab. 7).

Hiroshi et al. postulierten die Notwendigkeit einer Methylendioxygruppierung am Dibenzocyclooctadiengerüst für einen inhibitorischen Effekt einer Verbindung auf CYP3A4, wobei lipophile voluminöse Substituenten an Position 6 diese Wirkung verstärken [Hiroshi et al., 2004]. Tatsächlich zeigten die meisten der im Rahmen der Dissertation von Achim Meyer getesteten methylendioxy-tragenden Protoberberine eine moderate bis potente Hemmwirkung gegenüber CYP3A4 [Salminen et al., 2011; Meyer, 2008]. Keine unserer vier Testverbindungen inhibierte die Isoform 3A4 – allen Substanzen fehlt das Strukturmerkmal der Methylendioxygruppe. Röntgenkristallstrukturanalysen von 3A4 zeigten, dass durch die Bindungstasche sowohl kleine als auch große Substrate aufgenommen werden können, teilweise sogar mehrere Ligandmoleküle [Yano et al., 2004]. Auch die in Abb. 56 gezeigten Isochinolin-Alkaloide Emetin und Cephaelin hemmen das Isoenzym 3A4 kompetitiv [Asano et al., 2001]. In ihrem Grundskelett findet sich die Protoberberinstruktur wieder. Somit ist es nicht verwunderlich, dass auch die meisten getesteten Protoberberine hemmend auf 3A4 wirken [Salminen et al., 2011]. Allerdings zeigte keine der vier hier vorliegenden Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, eine Wirkung auf dieses Isoenzym. Grund für eine möglicherweise nicht detektierbare Wirkung könnte die störende Hintergrundfluoreszenz bei den Verbindungen **60**, **26** und **28** sein.

Bisher wurden noch keine Wechselwirkungen zwischen Alkaloiden und CYP2B6 beschrieben. Im Allgemeinen ist noch wenig über strukturelle Merkmale des Isoenzym und seine Liganden bekannt. Bekannte Substrate sind Efavirenz, Tamoxifen, Methadon, Amlodipin [Walsky et al., 2006; Jang et al., 2014], als potente Inhibitoren erwiesen sich die Thrombozytenaggregationshemmer Ticlopidin and Clopidogrel [Walsky et al., 2006]. Nur Verbindung **26** zeigte in unserer Testreihe eine schwache Inhibition von CYP2B6 (Tab. 7).

CYP2C8 hat eine ähnlich große Bindungstasche wie CYP3A4, d.h. es kann ebenfalls sehr große Liganden aufnehmen. Die Arzneistoffe Praziquantel und Quinapril, Inhibitoren von 2C8 [Walsky et al., 2005], enthalten Isochinolinstrukturelemente, was eine Interaktion von

Protoberberinen mit 2C8 vermuten lässt. Auch hier zeigte jedoch lediglich **26** eine moderate Hemmwirkung (Tab. 7). Im Rahmen der Dissertation Achim Meyers zeigten die Protoberberine keine bis schwache Hemmwirkungen gegenüber CYP2C8 [Meyer, 2008].

An CYP1A2 zeigen einige Naturstoffe Aktivität: das Diterpenoid-Alkaloid Aconitin [Wang et al., 2006], Protopin [Paul et al., 2003] und Rutaecarpin [Don et al., 2003]. Alle drei sind stickstoffhaltige Alkaloide, wobei die beiden zu letzt genannten große strukturelle Ähnlichkeit mit den Protoberberin-Alkaloiden aufweisen. 1A2 ist fähig sowohl neutrale als auch basische Moleküle aufzunehmen, die meisten Substrate besitzen eine planare aromatische Struktur [Smith et al., 1997]. Gegen 1A2 zeigten die ausschließlich Hydroxylgruppen tragenden Verbindungen, **26** und **28**, eine Hemmwirkung, wenngleich nur schwach (Tab. 7).

Typische Substrate der CYP2C9 sind Phenytoin, Ibuprofen, (S)-Warfarin und Δ^1 -Tetrahydrocannabinol. Die meisten Substrate haben einen sauren Charakter und liegen bei physiologischem pH-Wert ionisiert vor. Alle Substrate sind chemisch sehr unterschiedlich, dennoch besitzen sie Gemeinsamkeiten: entweder weisen sie anionische Regionen auf oder können als Wasserstoffbrückendonatoren agieren [Smith et al., 1997]. Obwohl sie der gleichen Unterfamilie angehören spricht CYP2C9 auf chemisch diverse Substrate an: schwach basische wie Diazepam, stark basische wie Imipramin oder saure wie (R)-Warfarin.

CYP2C9 wird von Verbindung **26** moderat, 2C9 schwach gehemmt. Verbindung **28** zeigte eine schwache Hemmwirkung gegen 2C9. Die Bindungstasche von 2C9 ist vorwiegend hydrophil ausgeprägt [Wang et al., 2007a und b], was die Aufnahme der hydroxylierten Verbindungen Tetrahydroxyberberin-Hydrobromid (**26**) und 3-Hydroxyberberin (**28**) begünstigen kann.

Aufgrund der geringen Anzahl eingesetzter Testverbindungen können keine Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen können lediglich in Verbindung mit bereits veröffentlichten Daten zur Beeinflussung des CYP-Systems durch Protoberberine Anhaltspunkte gewonnen werden. Ein Screening weiterer Substanzen ist erforderlich. Vor allem wecken die Non-Inhibitor-Eigenschaften gegenüber CYP3A4 und die selektive Aktivität gegenüber CYP2D6 (mit Ausnahme Verbindung **26**) der Protoberberine das Interesse für weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Entwicklung von Arzneistoffkandidaten.

3.5 *in vivo* Untersuchung der Blut-Hirnschrankengängigkeit

3.5.1 Das Gehirn und seine Schutzbarriere

Damit das Gehirn höherer Wirbeltiere funktionieren kann, ist die Aufrechterhaltung der inneren Homöostase essentiell. Dazu muss eine konstante und intensive Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet werden. Mit einem Gewicht von nur 1300 g, was einem Anteil von 2 % des Gesamtkörpergewichtes entspricht, setzt das Gehirn 20 % der Gesamtenergie des Stoffwechsels um. Dies entspricht einem Bedarf von etwa 75 mg Glucose und 50 mL Sauerstoff pro Minute. Bei einer vollständigen Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr, tritt bereits nach 8 bis 10 Sekunden Ohnmacht ein. Nach wenigen Minuten hat dies ernste, oft irreparable Schädigungen des Zentralnervensystems zur Folge [Wolf et al., 1996]. Zum Schutz des neuronalen Gewebes zeigt das cerebrale Gefäßsystem höherer Wirbeltiere zahlreiche strukturelle und funktionelle Besonderheiten. Eine veränderte Ionenkonzentration, insbesondere die der Kaliumionen, hätte drastische Folgen auf das Membranpotential der Nervenzellen. Lipidlösliche, körperfremde Substanzen (lipophile Xenobiotika) können zu irreversiblen Schädigungen von nicht zur Regeneration befähigten Neuronen und das umgebende Bindegewebe führen [Wolf et al., 1996]. Deshalb muss der Stoffaustausch zwischen Blutplasma und Gehirn selektiv erfolgen. Im Jahr 1885 machte Paul Ehrlich erste Entdeckungen zu einer Barriere zwischen Blutkreislauf und Zentralnervensystem und trug damit wesentlich zur späteren Erforschung der Blut-Hirn-Schranke, die den unkontrollierten Übertritt der im Blut zirkulierenden Substanzen in das Hirngewebe beschränkt, bei [Ehrlich, 1885]. Die Blut-Hirn-Schranke ist eine auf der Innenseite der Blutgefäße im Gehirn liegende Endothelschicht, die durch so genannte *tight junctions* den interzellulären Übertritt polarer Verbindungen verhindert.

Für die Entwicklung neuer Pharmaka ist das Ausmaß, in welchem eine Substanz die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, von pharmakologischer Bedeutung. Das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke spielt sowohl für im Zentralnervensystemwirkende Neuropharmaka als auch für in der Peripherie wirkende Pharmaka eine wesentliche Rolle. Zur Messung und Darstellung der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke wurden verschiedene Methoden entwickelt. Klassische Verfahren verwenden Modellorganismen *in vivo*. Aber auch Zellkulturen (*in vitro*) und Computersimulationen (*in silico*) werden für die Untersuchung genutzt [Bickel, 2005]. *In vivo*-Verfahren repräsentieren optimal physiologischen Bedingungen. Aufgrund dessen sind diese Ergebnisse gut auf den Menschen übertragbar.

Wie einleitend beschrieben, zeigt Berberin aufgrund seiner quartären Azadienstruktur eine hohe Hydrophilie, die die Permeabilität durch biologische Membranen stark einschränkt.

Protoberberine mit gesättigten Grundstrukturen wie Tetrahydropalmatin hingegen überwinden biologische Membranen äußerst schnell [Hong et al., 2006 und 2008]. Für (-)-Stepholidin, ein Tetrahydroprotoberberin, isoliert aus *Stephania intermedia* LO und ein äußerst potenter Dopamin D₁-Rezeptoragonist bei gleichzeitiger antagonistischer Wirkung am D₂-Rezeptor, wurde ein B/P (Verhältnis der Konzentration im Gehirn und im Plasma) von 0.7 ermittelt. Von P-Glykoprotein und MDR-Protein bleibt es weitgehend unbeeinflusst [Sun et al., 2009].

3.5.2 Transportsysteme an der Blut-Hirn-Schranke

Für die Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des Gehirnes, muss ein konstanter Austausch von Nährstoffen und Sauerstoff zwischen Blut und Gehirngewebe stattfinden.

Eine Möglichkeit die Lipid-Doppelmembran der Endothelzellen zu durchdringen, ist die passive Diffusion (Permeation) lipophiler Substanzen wie Vitamine. Für in Blut gelöste Gase, z.B. Sauerstoff oder Kohlendioxid, sowie Wasser stellt die Blut-Hirn-Schranke kein Permeationshindernis dar. Weiterhin ermöglichen *tight junctions* und wasserführende Kanäle, Aquaporine, den Transport kleinerer polarer Substanzen (Harnstoff, Glycerin). Allerdings ist diese Transportform vernachlässigbar.

Ein weiteres wichtiges Transportsystem ist der Carrier-vermittelte Transport. Die Nährstoffversorgung des Gehirns mit Glucose und Aminosäuren erfolgt über dieses System. Glucose nutzt dabei den GLUT-1-Transporter, für Aminosäuren sind fünf Transportsysteme bekannt: das L-System für große, neutrale und aromatische Aminosäuren, das A-System für kleine, neutrale Aminosäuren sowie Glycin und GABA und drei Transportsysteme für basische, saure und kationische Aminosäuren [Lattera et al., 1992, Wolf et al., 1996].

Sehr große Moleküle wie Proteine und Molekülkomplexe wie Lipoproteine gelangen über keine der bisher genannten Transportsysteme in das Gehirn. Diese Verbindungen werden über Endocytose in cerebrale Kapillarendothelzellen aufgenommen und vesikulär durch die Zellen hindurch transportiert (Transzytose). Dabei wird zwischen rezeptorvermittelte und adsorptionsvermittelte Transzytose unterschieden [Abbott und Romero, 1996]. Das Cholesterin-transportierende Lipoprotein LDL, das Eisen-transportierende Protein Transferrin und Insulin binden hochspezifisch an luminale Membran-Rezeptoren, die nach Bildung intrazellulärer Transportvesikel in der Zelle mit Lysosomen verschmelzen oder über Transzytose durch die Zelle befördert werden und mit der abluminalen Membran verschmelzen. Dabei wird das gebundene Molekül freigesetzt [de Vries et al., 1993; Abbott und Romero, 1996; Friden, 1996].

Hingegen nutzt kationisiertes Albumin [Raub und Audus, 1990; Triguero et al., 1990; Thöle, 2000] die adsorptionsvermittelte Transzytose, bei der es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiv-geladenen Proteinen und der durch kohlenhydratreiche Glycoproteine negativ geladenen Zelloberfläche kommt.

Abbildung 57 fasst die beschriebenen Transportsysteme graphisch zusammen.

Es gibt noch zahlreiche weitere am Stofftransport durch die BHS beteiligte Transportproteine im cerebralen Kapillarendothel. Dazu zählen Transporter für Monocarbonsäuren (MCT-1 und MCT-2), Amin-Transporter für Cholin [Takakura et al., 1991; Audus et al., 1992; Cornford und Hyman, 1999] und Carrier für den Neurotransmitter Serotonin [Bradbury, 1993; Brust et al., 1995].

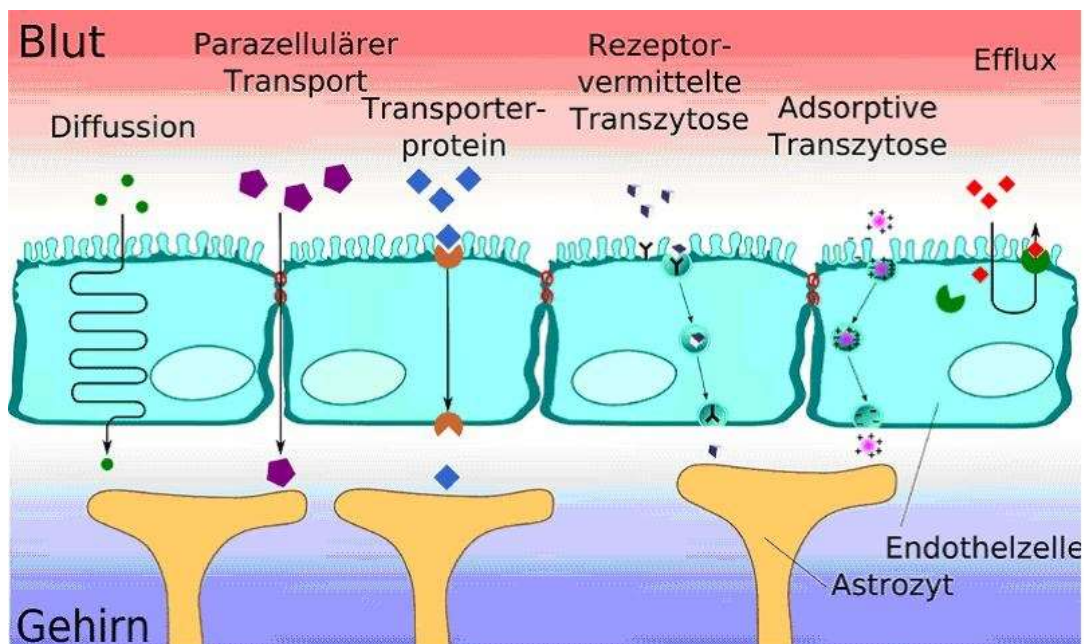
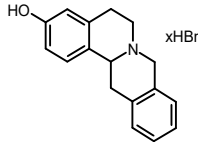
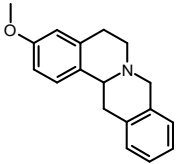
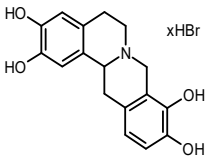
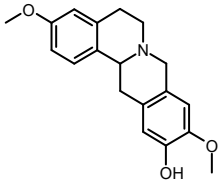
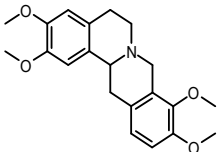
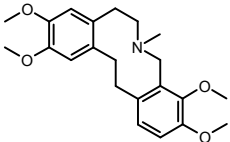


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke [Urheber: Armin Kübelbeck]

3.5.3 Untersuchung der Hirngängigkeit ausgewählter Alkaloide

Fünf synthetisierte Verbindungen und ein Naturstoff wurden repräsentativ für die Alkaloide *in vivo* auf ihre Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, untersucht und die Hirngängigkeit bewertet. Die Untersuchung erfolgte in Kooperation mit Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG und wurde von Patrizia Vöhringer durchgeführt. Die Testsubstanzen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 8: Alkaloide zur Untersuchung der Hirngängigkeit

	Testsubstanz	Molekulargewicht [g*mol ⁻¹]
28		332.24
27		265.36
26		380.23
60		311.38
22		355.44
25		371.48

Die ersten fünf in der Tabelle 8 aufgeführten Verbindungen wurden ausgewählt, weil sie unterschiedliche Varianten der Substitution von Tetrahydroprotoberberinen präsentieren. Tetrahydropalmatin **22** als natürlich in den Pflanzenfamilien *Ranunculaceae*, *Papaveraceae*, *Berberaceae* und *Rutaceae* vorkommendes Alkaloid wird bereits seit langer Zeit mit beachtlicher Wirkung in der Volksmedizin eingesetzt. 2,3,9,10-Tetrahydroxyberbin-Hydrobromid **26** ist ein durch Demethylierung synthetisiertes Derivat von Tetrahydropalmatin. Das Vorhandensein von Hydroxygruppen anstelle Methoxygruppen lässt eine verminderte Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, vermuten. Das Ausmaß des Einflusses der

polaren Substituenten sollte in der im Folgenden beschriebenen Untersuchung geprüft werden. Weiterhin wurden die Verbindungen 3-Hydroxyberbin **28** und 3-Methoxyberbin **27** als Tetrahydroprotoberberine mit nur einem Substituenten in der Position 2 untersucht. Beide Substanzen unterscheiden sich in der Polarität. 3,10-Dimethoxy-11-hydroxyberbin (**60**) trägt verschiedene Substituenten. Zudem weist die Substanz eine für Pseudoprotoberberine typische Anordnung der Substituenten auf. Verbindung **25** wurde durch die Spaltung der benzyllischen C-N-Bindung aus Tetrahydropalmitin hergestellt. 2,3-Dimethoxy-7-methyl-9,10-dimethoxy-5,6,7,8,13,14-hexyhydrodibenzo[d,h]azecin **25** enthält den für Dibenzoazecine typischen zehngliedrigen Ring, der der Verbindung eine höhere Flexibilität gegenüber den starren Tetrahydroprotoberberinen verleiht.

3.5.4 Applikation und Probenahme

Die Untersuchung wurde an männlichen Wistar Ratten (RjHan:WI, Janvier, Le Genest St Isle, Frankreich) durchgeführt (Gewicht: 240g-360g).

Die Alkaloide wurden in Mygliol (Neutralöl) gelöst und den Ratten jeweils in einer Dosierung von 3 mg/kg und einem Applikationsvolumen von 1 mL/kg intraperitoneal (i.p.) verabreicht (**28**: n=3, **27**: n=3, **60**: n=2, **25**: n=3, **22**: n=3). Nach 30 Minuten erfolgte das Anästhesieren der Tiere mit einer Mischung aus Ketamin (70 mg/kg, i.p.) und Xylazin (6 mg/kg, i.p.). Nach Einspannen des Kopfes in einen stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) wurden Proben von CSF (cerebrospinal fluid), Blut und Gehirn entnommen. Den Tieren wurde zuerst über eine Punktion der Cisterna magna CSF entnommen. Dem folgte die Entnahme von Blut durch eine Punktion des Herzens. Die Blutproben wurden dabei mit Hilfe von EDTA-haltigen S-Monovetten® (1.6 mg EDTA/mL Blut) (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gewonnen. Im Anschluss wurden die Ratten für drei Minuten transkardial mit Ringer-Lösung perfundiert um ein möglichst blutleeres Gehirn zu erhalten. Nach Dekapitation wurde den Tieren das Gehirn entnommen. Zur Gewinnung von Plasmaproben wurde das Blut 15 Minuten bei 4°C und 3200 x g zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Bis zur LC-MS/MS-Analyse wurden die CSF-, Plasma- und Gehirnproben bei -80°C gelagert.

3.5.5 Bewertung der Hirngängigkeit

Für die Beurteilung der Hirngängigkeit der Alkaloide, wurde das Verhältnis der Konzentration der jeweiligen Substanz in Gehirn und Plasma herangezogen (brain/plasma ratio = B/P).

$$B/P = \text{conc}_{\text{brain}}/\text{conc}_{\text{plasma}}$$

Die Bewertung richtete sich nach dem folgenden Rangsystem:

$$B/P > 0.3$$

$$B/P = 0.02 - 0.3$$

$$B/P < 0.02$$

3.5.6 Testergebnisse

Leider gelang es nicht, eine selektive LC-MS/MS-Methode für Verbindung **26** zu etablieren. Somit konnte für dieses Alkaloid keine Bewertung der Hirngängigkeit vorgenommen werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchung wiedergegeben (Tab. 9).

Tabelle 9: Testergebnisse zur Untersuchung der ZNS-Gängigkeit, Darstellung des B/P, grüne Farbhinterlegung = ideale ZNS-Gängigkeit

Substanz	B/P	ZNS-Gängigkeit
22	2.72	ideale ZNS-Gängigkeit
28	3.32	ideale ZNS-Gängigkeit
27	1.49	ideale ZNS-Gängigkeit
25	2.24	ideale ZNS-Gängigkeit
60	2.30	ideale ZNS-Gängigkeit

Für alle untersuchten und bewerteten Alkaloide wurde ein $B/P > 0.3$ ermittelt, d.h. alle Testverbindungen überqueren die Blut-Hirn-Schranke im idealen Maß.

Wider Erwarten zeigt, das brain/plasma ratio betrachtend, die hydroxylierte Verbindung **28** eine höhere ZNS-Gängigkeit als die methoxylierte Verbindung **27**. Verbindungen **60**, **22** und **25** zeigen keine Unterschiede in ihrer Eigenschaft die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Alle Verbindungen außer **27** sind im gleichen Ausmaß fähig in das Gehirngewebe zu gelangen. Für Verbindung **27** wurde die geringste Konzentration im Gehirngewebe gemessen ($B/P = 1.49$).

3.5.7 Diskussion der Ergebnisse

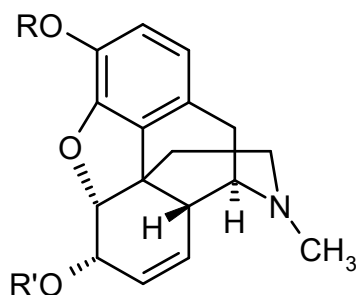
Nach Betrachtung der Transportmöglichkeiten für verschiedene Substanzen in das Gehirn, ist die Permeation als System für den Transport der getesteten Alkaloide am wahrscheinlichsten.

Alle Testverbindungen weisen ein für das passive Diffundieren notwendiges hydrophobes Kohlenstoffgrundgerüst auf – der Tetrazyklus bzw. das diannellierte zehngliedrige Ringsystem bei Verbindung **25**. Weiterhin wird das Diffusionsvermögen eines Moleküls durch die Endothelien der Blut-Hirn-Schranke durch seine Größe bestimmt. Moleküle mit einer molaren Masse bis $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ passieren die BHS per Diffusion. Die Testverbindungen besitzen ein Molekulargewicht von weniger als $400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Für alle Testsubstanzen wurde ein brain/plasma ratio größer 1.49 ermittelt. Substanzen, deren $B/P > 0.3$ beträgt, gelten als ideal ZNS-gängig.

Die chemische Struktur der Verbindung **28** lässt einen geringeren B/P erwarten als der der Substanz **27**. Beide Verbindungen unterscheiden sich um den Substituenten in Position 2. Die Hydroxylgruppe von **28** und das Vorliegen der Verbindung als Hydrobromid sollten den lipophilen Charakter der Verbindung mindern. Verbindung **28** zeigt von allen Substanzen unerwartet den höchsten B/P. Möglicherweise interagiert sie mit einem aktiven Transportmechanismus.

In der Literatur wurde der Übertritt der Benzylisochinolin-Alkaloide Morphin und Codein sowie dem chemischen Derivat Heroin beschrieben. Abbildung 58 stellt die strukturellen Unterschiede dieser drei Verbindungen dar. Morphin besitzt zwei charakteristische Hydroxylgruppen am Kohlenstoffgrundgerüst, wovon eine der OH-Gruppen im Codein methyliert vorliegt. Heroin wird synthetisch durch Diacetylierung von Morphin gewonnen.



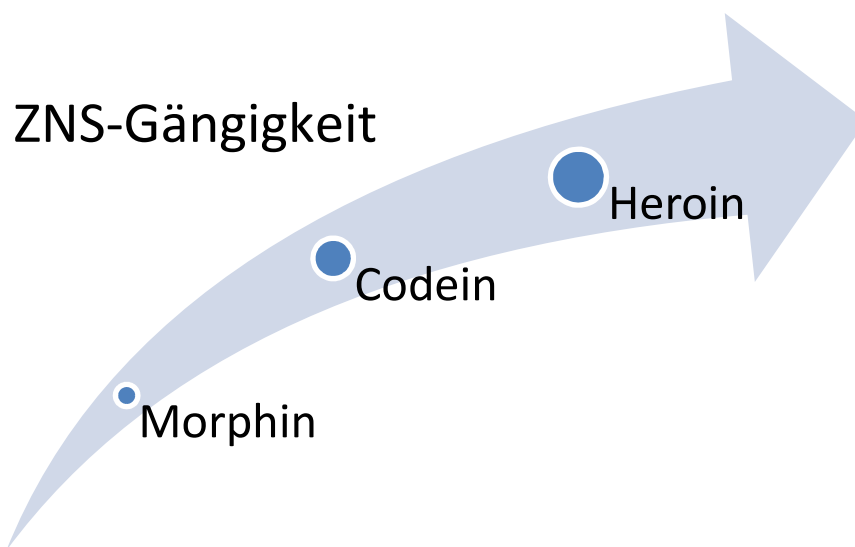
$R = R' = H$: (-)-Morphin

$R = OCH_3$ $R' = H$: (-)-Codein

$R = R' = COCH_3$: (-)-Heroin

Abbildung 58: allgemeine Struktur der Morphinan-Alkaloide

Das Ausmaß die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, steigt mit dem Austausch der Hydroxylgruppen vom Morphin über Codein zu Heroin - Heroin zeigt gegenüber Morphin eine etwa 25fach höhere Aufnahme im Gehirn [Habgood *et al.*, 2000; Oldendorf, 1974].



Aufgrund dieser in der Literatur beschriebenen Daten wurde eine geringe Hirngängigkeit unserer hydroxylierten Verbindungen vermutet.

Möglicherweise machen sich hydroxylierte Tetrahydroprotoberberine bestimmte Transportsysteme zu Nutze oder aber das sogenannte P-Glykoprotein, ein kanalbildendes Transmembranprotein mit intrazellulärer ATP-Bindungsstelle befördert einen Teil der bereits durch die Endothelzellmembran diffundierten unpolaren Substanzen aus dem Hirngewebe. Pan et al. sowie Chen et al. bestätigten in einer Reihe von *in vitro* und *in vivo* Tests die schlechte intestinale Verfügbarkeit von Berberin, verursacht durch P-Glykoprotein [Pan et al., 2002; Chen et al., 2011].

Schlussendlich kann gesagt werden, dass Tetrahydroprotoberberine mit ihrem lipophilen Grundskelett unabhängig von ihren Substituenten im großen Ausmaß fähig sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Aktive Mechanismen zur Passage der Blut-Hirn-Schranke durch Protoberberin-Alkaloide sind nicht bekannt.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Das folgende Kapitel fasst abschließend die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen und gibt einen Ausblick auf ergänzende und weiterführende Untersuchungen.

Berberin, ein Alkaloid vom Protoberberin-Typ und ein in der traditionellen chinesischen Volksmedizin verbreiteter Naturstoff, stellt aufgrund seiner vielfältigen pharmakologischen Wirkungen ein interessantes und vielversprechendes Target in der Wirkstoffforschung dar. Ausgehend von Berberin als Leitstruktur und basierend auf Ergebnissen vorangegangener Synthesestudien über Protoberberin-Alkaloide konnten im ersten Teil der vorliegenden Arbeit insgesamt 13 Alkaloidderivate partialsynthetisch, Ausgangspunkte waren Tetrahydropalmatin und Berberinchlorid, neun vollsynthetische Derivate sowie 12 Phenethyltetrahydroisochinoline hergestellt werden. Dabei gelang es, vier 2-substituierte Tetrahydroprotoberberine auf klassischem Wege zu synthetisieren: Kondensation von Phenylelessigsäurederivat und Phenylethylamin zum Phenylacetamid, Ringschluss nach Bischler-Napieralski mit anschließender Hydrierung zum Tetrahydroisochinolin, Mannich-Reaktion zur Vervollständigung des Protoberberingerüsts. Modifikationen zur Optimierung des Syntheseergebnisses waren notwendig und wurden bereits im Unterkapitel 2.5 ausführlich und zusammenfassend diskutiert. Über den Isochromanonweg konnten zwei Verbindungen, die das „natürliche“ Substitutionsmuster der Protoberberine aufweisen, Substituenten in 9,10-Position, eine Verbindung ist zusätzlich 2-substituiert, vollsynthetisch dargestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es den synthetischen Zugang zu Protoberberinen mit „natürlichem“ Substitutionsmuster sowie zu 2-substituierten Verbindungen zu etablieren und neuartige, bisher in der Literatur nicht beschriebene Protoberberine herzustellen.

In Kooperation mit den Arbeitskreisen um Prof. Dr. F. Bracher der Ludwig-Maximilians-Universität München, Prof. Dr. H. Raunio der Universität Kuopio und der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG konnte im zweiten Teil der Arbeit eine umfangreiche biologische Evaluierung der Substanzkollektion stattfinden. Angewendete Testsysteme waren der Agar-Diffusionstest zur Untersuchung möglicher antibakterieller und antimykotischer Wirkungen sowie Screening-Assays auf eine Inhibition der Cholesterol- und Ergosterolbiosynthese. Weiterhin wurden begleitend ein standardisierter unspezifischer cytotoxischer Screening-Assay (MTT-Test), ein Screening an Cytochrom P450 Oxidasen und ein Testsystem zur Untersuchung der Blut-Hirnschrankgängigkeit durchgeführt.

Im Agar-Diffusionstest zeigten sich 16 von 31 Testverbindungen wirksam gegen einen oder mehrere der Modellkeime. Jedoch im Vergleich zu den mitgeführten Referenzen, Clotrimazol und Tetracyclin-Hydrochlorid, waren die Wirkungen der Verbindungen eher als gering einzustufen. Der Agar-Diffusionstest gibt nur einen Hinweis auf eine antimikrobielle Aktivität der Testverbindungen. Quantitative Aussagen sind aus den erzeugten Hemmhofdurchmessern nicht ableitbar (Unterkapitel 3.1).

Im durchgeführten Screening auf eine Inhibition der Ergosterolbiosynthese verursachten zwei Verbindungen eine Veränderung des Sterolmusters in *Yarrowia lipolytica*, was auf eine Hemmung der Biosynthese von Ergosterol hinweist. Die Akkumulation von 24(28)-Dehydroergosterol lässt den Schluss zu, es handle sich bei den Verbindungen um spezifische $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Hemmer. Die Beobachtungen, dass *Yarrowia lipolytica* 24(28)-Dehydroergosterol und Ergosterol selbst in unterschiedlichen Mengen bilden kann, machen eine sichere Aussage zur Wirksamkeit der Verbindungen schwierig. Erneute Untersuchungen sind notwendig.

Die Zytotoxizität der Verbindungen wurde an den Zellen der humanen Leukämiezelllinie *HL-60* untersucht. Anhand der erhaltenen Daten ist die Zytotoxizität der Testsubstanzen als gering zu bewerten. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen an verschiedensten Zelllinien, um das zytotoxische Potenzial einer Substanz aussagekräftig zu beurteilen (Unterkapitel 3.3). Vier Protoberberinderivate wurden dem pharmakologischen Screening an Cytochrom P450 Oxidasen unterzogen. Alle Verbindungen zeigten eine schwache bis potente Wirkung gegen CYP2D6 und waren gegenüber CYP3A4 unwirksam. Ein Screening weiterer Verbindungen ist erforderlich. Besonders die Non-Inhibitor-Eigenschaften der getesteten Verbindungen gegenüber CYP3A4 sind in Hinblick auf Arzneistoffinteraktionen interessant (Unterkapitel 3.4).

Fünf Verbindungen wurden *in vivo* auf ihre Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, untersucht und anschließend die Hirngängigkeit bewertet. Dabei wurden Substanzen mit solchen Substitutionsmustern ausgewählt, die eine unterschiedliche Ausprägung der Hirngängigkeit erwarten ließen. Für alle untersuchten und bewerteten Alkaloide wurde ein $B/P > 0.3$ ermittelt, d.h. alle Testverbindungen überqueren die Blut-Hirn-Schranke im idealen Maß (Unterkapitel 3.5).

In einem *in vitro* Zelltest wurden die Testverbindungen auf die Fähigkeit, die Cholesterolsynthese in humanen *HL-60*-Zellen zu inhibieren, untersucht. Dabei ist es gelungen, drei neue selektive Inhibitoren des Enzyms 7-Dehydrocholesterolsynthase (7-DHCR), ein Schlüsselenzym im Krankheitsbild des autosomal rezessiv vererbten Smith-

Lemli-Opitz-Syndroms, zu identifizieren. Diese Inhibitoren gehören zur Substanzklasse der Phenethyltetrahydroisochinoline. Die Verbindung **5f** zeigte dabei eine 200fach höhere Aktivität gegenüber 7-DHCR als der bekannte selektive Inhibitor BM 15.766 (Abschnitt 3.2.3). Phenethyltetrahydroisochinoline sind synthetisch leicht zugängliche und stabile Verbindungen. Die Einfachheit der Strukturen überraschte im Screening auf Inhibition der Cholesterolsynthese mit unerwarteter und großer Wirkung gegenüber dem Enzym 7-Dehydrocholesterolreduktase. Aufgrund seiner selektiven Inhibition des Enzyms 7-Dehydrocholesterolreduktase stellt die Verbindung **5f** ein neues, wichtiges und sehr wirksames Werkzeug für die Erforschung der Pathogenese des Smith-Lemli-Opitz-Syndroms dar, eine seltene, aber bekannte vererbte Erkrankung, für welche es bislang keine Therapieoptionen gibt.

Seit den Diskussionen über einen Zusammenhang zwischen der Cholesterolkonzentration und Morbus Alzheimer sind weiterführende Untersuchungen zum Potenzial der Phenethyltetrahydroisochinoline auch in diesen Hinblick lohnenswert.

Exkurs: Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Cholesterolkonzentration und Morbus Alzheimer?

Seit den frühen 1990er Jahren wird eine Verbindung zwischen Cholesterolemie und der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer diskutiert. Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen lipidsenkenden Therapien und dem reduzierten Risiko an Alzheimer zu erkranken hin [Wolozin, 2004]. Alzheimer ist die häufigste Form der Demenz, die erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Alois Alzheimer beschrieben wurde. Etwa 5 % aller über 65-Jährigen und mehr als 35 % der über 80-Jährigen sind davon betroffen [Brookmeyer et al., 1998]. Individuen, die an Alzheimer erkranken, leiden unter Störungen des Gedächtnisses, des Denkvermögens und der emotionalen Kontrolle.

Neuropathologisch ist Morbus Alzheimer durch eine Ansammlung von β -Amyloidplaques im Gehirn charakterisiert. Das Vorläuferprotein, ein Transmembranprotein, Amyloid-Präkursor-Protein (APP), wird durch Sekretasen in kleinere Polypeptide gespalten. Wird APP durch eine α -Sekretase geschnitten, entsteht lösliches APP (sAPP). Wird APP von einer β - und anschließend von einer γ -Sekretase geschnitten, entstehen Beta-Amyloid-40 (A β 40) und Beta-Amyloid-42 (A β 42). A β 42 akkumuliert zu den charakteristischen Amyloidplaques, die zum Absterben von Neuronen führen [Mutschler et al., 2001].

Beobachtungen, dass erhöhte Cholesterolkonzentrationen im mittleren Lebensalter das Risiko für Alzheimer erhöhen und cholesterolsenkende Arzneistoffe, wie Statine, das Risiko senken, weckten das Interesse der Forscherwelt [Wolozin, 2004]. Pilotstudien suggerieren, dass Statine den Metabolismus von A β beeinflussen und somit insbesondere die Bildung von A β 42 verringern [Simons et al., 1998; Simons et al., 2002; Sjögren et al., 2003].

Im Mausmodell führte die Gabe des Cholesterolsyntheseinhibitors BM 15.766 zur reduzierten Ablagerung von Amyloidplaques im Gehirn [Refolo et al., 2001].

Statine und BM 15.766 beeinflussen auf unterschiedlichen Wegen die Cholesterolsynthese. So ist es wahrscheinlich, dass die Inhibition der in situ-Synthese von Cholesterol mit der reduzierten Produktion von A β und A β 42 korreliert. Mit der Gabe eines spezifischen Cholesterolsynthesehemmers wie unserer äußerst aktiven Verbindung **5f** könnte es möglich sein, durch die Verringerung des zellulären Cholesterolgehaltes die A β -Produktion zu reduzieren, ohne die Bildung anderer cholesterolabhängigen Stoffwechselprodukte zu beeinflussen. Hierfür sind weiterführende Studien bezüglich der Wirkung unserer selektiven Phenylethyltetrahydroisochinoline auf die Produktion von A β , im Vergleich mit dem deutlich schwächer wirkenden Cholesterolsynthesehemmer BM 15.766 (Tab. 5), notwendig und ein interessanter und wichtiger Aspekt zur weiteren biochemischen Charakterisierung von Phenyltetrahydroisochinolininen sowie zur Beurteilung ihres pharmazeutischen Potenzials. Darüberhinaus sind an den MTT-Test-anknüpfende (Unterkapitel 3.3) Untersuchungen zur zytotoxischen Aktivität der Verbindungen erforderlich.

5. Summary

Berberine, a quaternary ammonium salt from the protoberberine group of isoquinoline alkaloids, is found in plants of the families *Ranunculaceae*, *Papaveraceae* and *Fumariaceae*. Berberine offers diverse pharmacological effects. Therefore it is used in traditional Chinese folk medicine as antifungal, antibiotic and antiseptic agent.

The first part of the present thesis was focusing on the synthesis of novel protoberberine alkaloids. In the second part a biological evaluation of the synthesized compounds in different test systems was carried out to specify possible antibiotic and antimycotic or other effects.

Finally we succeeded in the synthesis of 13 partially synthetic, nine fully synthetic alkaloid derivatives and 12 phenethyltetrahydroisoquinolines. For the fully synthetic synthesis the classic route for the synthesis of tetrahydroprotoberberines and the isochromanone route were used to present 2-substituted tetrahydroprotoberberines and derivatives with natural 9,10-substitution pattern.

In cooperation with other working groups and institutions, Prof. Dr. F. Bracher, Ludwig-Maximilians-University Munich, Prof. Dr. H. Raunio, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, an extensive investigation of the substance collection could take place. Used test systems were the agar diffusion assay, screening assays for inhibition of the biosynthesis of cholesterol and ergosterol, for unspecific cytotoxicity the MTT assay on human *HL-60* cells, a screening on enzymes of the cytochrome P450 family and a test system for the investigation of the blood-brain barrier movement rate. In the agar diffusion assay, 16 of 31 tested compounds showed inhibitory activity against one or more of the model germs. However, compared to the reference substances their effect is poor. In the screening assay for inhibition of the biosynthesis of ergosterol in human *HL-60* cells two compounds showed an effect in *Yarrowia lipolytica*. Due to the own production of dehydroergosterol and ergosterol by *Yarrowia lipolytica* reliable statements about an antifungal effect cannot be taken. Further investigations are required.

For estimation of the cytotoxicity of the compounds the MTT assay on human *HL-60* cells were used. On the basis of data obtained the cytotoxicity of the test compounds is low. For a meaningful assessment of the cytotoxic potential of the compounds further assays on different cell lines are necessary.

Four protoberberine derivatives were tested on cytochrome P450 oxidases. All compounds had weak to strong activities against CYP2D6. None was effective against CYP3A4. Especially the

non-inhibitory-property against CYP3A4 is interesting regarding drug interaction and should be further investigated.

Five compounds were studied concerning their ability for passing the blood-brain barrier. For all alkaloids B/P > 0.3 was detected. That means all compounds are able to pass the blood-brain barrier ideally.

All compounds were tested in a whole-cell assay for inhibition of the cholesterol biosynthesis in human *HL-60* cells. It succeeded to identify three new selective inhibitors for the enzyme 7-dehydrocholesterolreductase (7-DHCR) which plays a key role in the autosomal recessive disease Smith-Lemli-Opitz syndrome. These inhibitors belong to the class of phenethyltetrahydroisoquinolines. The compound **5f** showed 200 times stronger inhibition of cholesterol biosynthesis than the established inhibitor BM 15.766 did under the same conditions. The phenethyltetrahydroisoquinolines are synthetically easy accessible and stable. Due to the simplicity of the structures the activity in inhibition of the cholesterol biosynthesis was unexpected and surprising. The compound **5f** with its selective inhibitory activity towards 7-DHCR will be an important and useful tool for studying molecular details of the pathogenesis of Smith-Lemli-Opitz syndrome, a disease with debilitating effects on patients for which presently there is no cure.

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AcCl	Acetylchlorid
BBE	berberine bridge enzyme, Berberinbrückenenzym
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BNR	Bischler-Napieralski-Reaktion
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
B/P	brain/plasma ratio
CYP	Cytochrom P450
d	Dublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett von Dublett (NMR)
DIPEA	Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMAP	4- <i>N,N</i> -(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dt	Dublett von Triplett (NMR)
EDC	[<i>N</i> -(3-Dimethylamino-propyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid]
EI	electron impact, Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
et al.	et alia (und andere)
eq.	Äquivalent
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration, mittlere Konzentration des Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition auftritt
J	Kopplungskonstante (NMR)
L-DOPA	Levodopa
Lit.	Literatur
m	Multiplett (NMR)
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie

MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OP	Oxidationsprodukt
ppm	parts per million
POCl ₃	Phosphorylchlorid
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett (NMR)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
SAM	S-Adenosylmethionin
SLOS	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom
24-SMT	Sterol-24- methyltransferase
SPE	solif phase extraction, Festphasenextraktion
t	Triplett (NMR)
Tab.	Tabelle
TBME	tert. Butylmethylether
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropalmitin
TSIM	<i>N</i> -Trimethylsilyl-imidazol
UV	Ultraviolett

7. Literaturverzeichnis

Abbasoglu A., Sener B., Günay Y., Temizer H. Antimicrobial activity of some isoquinoline alkaloids. *Arch. Pharm.* **324**, 379-380 (1991).

Abbott N. J., Romero, I. A. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol. Med. Today* **3**, 106-113 (1996).

Ahmad I. und Snieckus V. A convenient entry into the rhoeadan skeleton. Total synthesis of (\pm)-*cis*-alpinigenine. *Can. J. Chem.* **60**, 2678-2686 (1982).

Ahmad R., Saá, J. M., Cava M. P. Regioselective O-demethylation in the aporphine alkaloid series. *J. Org. Chem.* **42** (7), 1228-1230 (1977).

Asano T., Kushida H., Sadakane C., Ishihara K., Wakui Y., Yanagisawa T., Kimura M, Kamei H, Yoshida T. Metabolism of ipecac alkaloids cephaeline and emetine by human hepatic microsomal cytochrome P450s, and their inhibitory effects on P450 enzyme activities. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 678–682 (2001).

Asghari J., Ghiaci M. Dealkylation of alkyl and aryl ethers with $\text{AlCl}_3\text{-NaI}$ in the free solvent condition. *Solid State Phenomena* **90-91**, 3-6 (2003).

Audus K. L., Chikhale P. J., Miller D. W., Thompson S. E., Borchardt R. T. Brain uptake of drugs: The influence of chemical and biological factors. *Advances in Drug Research* **23**, 1-64 (1992).

Aufenanger J., Pill J., Schmidt F. H., Stegmeier K. The effects of BM 15.766, an inhibitor of 7-dehydrocholesterol Δ^7 -reductase, on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 911–916 (1986).

Autorenkollektiv. Organikum. 21. Auflage. Wiley-VCH Weinheim (2001).

Auwah E., Capretta A. Strategies and synthetic methods directed toward the preparation of libraries of substituted isoquinolines. *J. Org. Chem.* **75**, 5627-5634 (2010).

Barton D. H. R., Hesse R. H., Kirby G. W. Phenol Oxidation and Biosynthesis. 8. Investigations on Biosynthesis of Berberine and Protopine. *J. Chem. Soc.(C)* 6379 (1965).

Battersby A.R. The biosynthesis of alkaloids. *Proc. Chem. Soc. London* 189-200 (1963).

Battu S. K., Repka M. A., Maddineni S., Chittiboyina A. G., Avery M. A., Majumdar S. Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery. *AAPS PharmSciTech.* **11**, 1466-1475 (2010).

Becker C., Gensthaler B. M., Gräfe K. A. Schnecken gift gegen Schmerzen. *Pharmazeutische Zeitung online.* **36** (2006).

Bentley K. W. und Murray A. W. Rearrangement of Isoquinoline Alkaloid N-Oxides. *J. Chem. Soc.* 2497-2501 (1963).

Bermejo A., Andreu I., Suvire F., Léonce S., Caignard D. H., Renard P., Pierré A., Enziz R. D., Cortes D., Cabedo N. Syntheses and antitumor targeting G1 phase of the cell cycle of benzoyldihydroisoquinolines and related 1-substituted isoquinolines. *J. Med. Chem.* **45**, 5058-5068 (2002).

Bessi I., Bazzicalupi C., Richter C., Jonker H. R., Saxena K., Sissi C., Chioccioli M., Bianco S., Bilia A. R., Schwalbe H., Gratteri P. Spectroscopic, molecular modeling, and NMR-spectroscopic investigation of the binding mode of the natural alkaloids berberine and sanguinarine to human telomeric G-quadruplex DNA. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1109–1119 (2012).

Beyer H., Walter W. Lehrbuch der Organischen Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart Leipzig, 23. Auflage (1998).

Bickel U. How to measure drug transport across the blood-brain barrier. In: *NeuroRx* **2**, 15-26 (2005).

Birch A. J. Reduction by dissolving metals. Part VII. The reactivity of mesomeric anions in relation to the reduction of benzene rings. *J. Chem. Soc.* 1551-1555 (1950).

Bischler A. und Napieralski B. Zur Kenntnis einer neuen Isochinolinsynthese. *Ber.* **26**, 1903-1908 (1893).

Boke H., Ozhuner E., Turtas M., Parmaksiz I., Ozcan S., Unver T. Regulation of the alkaloid biosynthesis by miRNA in opium poppy. *Plant Biotech. J.* **13**, 409-420 (2015).

Bradbury M. W. B. The Blood-Brain Barrier. *Exp. Physiol.* **78**, 453-472 (1993).

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).

Breitmaier E., Alkaloide-Betäubungsmittel, Halluzinogene und andere Wirkstoffe, Leitstrukturen aus der Natur, Vieweg + Teubner GWV Fachverlage GmbH Wiesbaden, 3. Auflage (2008).

Brookmeyer R., Gray S., Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am. J. Public Health* **88**, 1337-1342 (1998).

Brown, A. G., Butterworth D., Cole M., Hanscomb G., Hood, J. D., Reading C., Rolinson G. N. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiotics* **29**, 668-669 (1976).

Brust P., Bergmann R., Johannsen B. Specific binding of [3H]imipramine indicates the presence of a specific serotonin transport system on endothelial cells of porcine brain. *Neuroscience Letters* **194**, 21-24 (1995).

Buck J. S., Haworth R. D., Perkin W. H. CCLXXXVIII.-Oxidation of substituted 1-benzyl-3,4-dihydroisoquinolines and a synthesis of papaveraldine. *J. Chem. Soc.* **125**, 2176 (1924).

Butler M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **67**, 2141-2153 (2004).

- Chae S-H., Jeong I-H., Choi D-H., Oh J-W., Ahn Y-J. Growth-Inhibiting Effects of *Coptis japonica* Root-Derived Isoquinoline Alkaloids on Human Intestinal Bacteria. *J. Agric. Food. Chem.* **47**, 934-938 (1999).
- Chen C.-Y. und MacLean D. B. Mass spectra and proton magnetic resonance spectra of some tetrahydroprotoberberine alkaloids. *Can. J. Chem.* **46**, 2501-2506 (1968).
- Chen W., Miao Y.-Q., Fan D.-J., Yang S.-S., Lin X., Meng L.-K., Tang X. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS PharmSciTech.* **12**, 705-711 (2011).
- Chen X., Facchini P. J. Short-chain dehydrogenase/reductase catalyzing the final step of noscapine biosynthesis is localized to laticifers in opium poppy. *Plant J.* **77**, 173-184 (2014).
- Cheng P., Wang B., Liu X., Liu W., Kang W., Zhou J., Zeng J. Facile synthesis of tetrahydroprotoberberine and protoberberine alkaloids from protopines and study of their antibacterial activities. *Nat. Prod. Res.* **28** (7), 413-419 (2014).
- Choi H. Y., Chi D. Y. A facile debromination reaction: Can bromide now use as a protective group in aromatic systems? *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 9202-9203 (2001).
- Cornford E. M., Hyman S. Blood-brain barrier permeability to small and large molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* **36**, 145-163(1999).
- Correché E. R., Andujar S. A., Kurdelas R. R., Gómez Lechó M. J., Freile M. L., Enriza R. D. Antioxidant and cytotoxic activities of canadine: Biological effects and structural aspects. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 3641-3651 (2008).
- Cragg G. M., Grothaus P. G., Newman D. J. New horizons for old drugs and drug leads. *J. Nat. Prod.* **77**, 703-723 (2014).
- Craig J. C., Purushothaman K. K. An improved preparation of tertiary amine N-oxides. *J. Org. Chem.* **35** (5), 1721-1722 (1970).
- Dang T. T. T., Facchini P. J. Cloning and characterization of canadine synthase involved in noscapine biosynthesis in opium poppy. *FEBS Lett.* **588**, 198-204 (2014a).
- Dang T. T. T., Facchini P. J. CYP82Y1 is *N*-methylcanadine-1-hydroxylase, a key noscapine biosynthetic enzyme in opium poppy. *J. Biol. Chem.* **289**, 2013-2026 (2014b).
- de Vries H. E., Kuiper J., de Boer A. G., van Berkel T. J. C., Breimer D. D. Characterization of the scavenger receptor on bovine cerebral endothelial cells in vitro. *J. Neurochem.* **61**, 1813-1821 (1993).
- Dittrich H. and Kutchan T.M. Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* **88**, 9969-9973 (1991).
- Don M.-J., Lewis D. F. V., Wang S.-Y., Tsai M.-W., Ueng Y.-F. Effect of structural modification on the inhibitory selectivity of Rutaecarpine derivatives on human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 2535-2538 (2003).

Effenberger F., Menzel P. Reversibilität der Bromierung von N-Alkylanilinen. *Angew. Chem.* **83**, 535-536 (1971).

Ehrlich P. in: Eine farbanalytische Studie: Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus, S. 69. Berlin: Hirschwaldt (1885).

Elliott W. H. Quaternary ammonium derivatives of substituted benzyldimethylamines, *Chem. Abstr.* **40**, 5032 (1946).

Endo A., Kuroda M., Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* **29**, 1346-1348 (1976).

Facchini P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **52**, 29-66 (2001).

Faizi S., Khan R. A., Azher S., Khan S. A., Tanseef S., Ahmad A. New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Planta Med.* **69**, 350-355 (2003).

Farrow S. C., Facchini P. J. Dioxygenases catalyze O-demethylation and O,O-demethylation with widespread roles in benzyloquinoline alkaloid metabolism in opium poppy. *J. Biol. Chem.* **288**, 28997-29012 (2013).

Fernández C., Martín M., Gómez Coronado D., Lasunción M. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J. Lipid Res.* **46**, 920-929 (2005).

Fodor G., Phillips B. A., Gal J. Mechanism of Bischler-Napieralski Reaction. *Angew. Chem-Intern. Ed.* **11**, 919-920 (1972).

Frerichs G. Beiträge zur Kenntnis des Berberins. Über Berberrubin. *Archiv der Pharmazie* **28**, 26-284 (1910).

Friden P. M. Utilization of an endogenous cellular transport system for the delivery of therapeutics across the blood-brain barrier. *J. Control. Release* **46**, 117-128 (1996).

Fritsch P. Synthesen in der Isocumarin- und Isochinolinreihe. *Ber.* **26**, 419-422 (1893).

Gaoua W., Chevy F., Roux C., Wolf C. Oxidized derivatives of 7-dehydrocholesterol induce growth retardation in cultured rat embryos: a model for antenatal growth retardation in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Lipid Res.* **40**, 456-463 (1999).

Gatto B., Sanders M. M., Yu C., Wu H-Y., Makhey D., LaVoie E., Lin LF. Identification of topoisomerase I as the cytotoxic target of the protoberberine alkaloid coralyn. *Cancer. Research* **56**, 2795-2800 (1996).

Gesell A., Díaz Chávez M. L., Kramell R., Piotrowski M., Macheroux P. and Kutchan T. M. Heterologous expression of two FADdependent oxidases with (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase activity from *Argemone mexicana* and *Berberis wilsoniae* in insect cells. *Planta* **233**, 1185-1197 (2011).

Giera M., Plössl F., Bracher F. Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway. *Steroids* **72**, 633–642 (2007).

Grewe R., Fischer H. Die Synthese von Homoisovanillinsäure und ihre Überführung in 6-Methoxy-isochinolin-Derivate. *Chem. Ber.* **96**, 1520-1528 (1963).

Grote C. W., Wang P. X., Moser F. W., Cantrell G. L. Preparation of 3,4-Dihydroisoquinolines from an acid and an amine. Mallinckrodt Inc. USA, WO 2008/073390 A2 (2008).

Gudima SO., Memelova LV., Borodulin VB., Pokholok DK., Mednikov BM., Tolkachev ON., Kochetkov SN. Kinetic analysis of interaction of human immunodeficiency virus reverse transcriptase with alkaloids. *Mol. Biol. (Mosk)* **28**, 1308-1314 (1994).

Guo D., Mangla A. T., Zhou W., Lopez M., Jia Z., Nichols S. D., Nes W. D. in R. Bittman: *Subcellular Biochemistry Volume 28: Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine*, S. 89, Plenum Press, New York (1997).

Guo Y., Li F., Ma X., Cheng X., Zhou H., Klaassen C. D. CYP2D plays a major role in berberine metabolism in liver of mice and humans. *Xenobiotica* **41**, 996-1005 (2011).

Guo Y., Chen Y., Tan Z-r., Klaassen C. D., Zhou H-h. Repeated administration of berberine inhibits cytochromes P450 in humans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **68**, 23-217 (2012).

Habgood M. D., Begley D. J., Abbott N. J. Determinants of passive drug entry into the central nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* **20**, 231–253 (2000).

Hagel J. M. und Facchini P. J. Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nature Chemical Biology* **6**, 273 - 275 (2010).

Hagel J. M., Beaudoin G. A. W., Fossati E., Ekins A., Martin V. J. J. and Facchini P.J. Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 42972–42983 (2012).

Hiroshi I, Yasuhiro T, Shigetoshi K, Akira H, Tadashi W. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitions in Cshisandra fruit extract. *Drug Metab. Dispos.* **32**(12), 1351-1358 (2004).

Holland H. L., Jeffs P. W., Capps T. M., MacLean D. B. The biosynthesis of Protoberberine and related isoquinoline alkaloids. *Can. J. Chem.* **57**, 1588-1597 (1979).

Honda A., Tint G. S., Shefer S., Batta A. K., Honda M., Salen G. Effect of Y 9429, a potent teratogen, on cholesterol biosynthesis in cultured cells and rat liver microsomes. *Steroids* **61**, 544-548 (1996).

Hong Z., Le J., Lin M., Fan G., Chai Y., Yin X., Wu Y. Comparative studies on pharmacokinetic fates of tetrahydropalmatine enantiomers in different chemical environments in rats. *Chirality* **20**, 119–124 (2008).

Hong Z., Fan G., Le J., Chai Y., Yin X., Wu Y. Brain pharmacokinetics and tissue distribution of tetrahydropalmatine enantiomers in rats after oral administration of the racemate. *Biopharm. Drug Dispos.* **27**, 111–117 (2006).

Horling A., Müller C., Barthel R., Bracher F., Imming P. A new class of selective and potent 7-dehydrocholesterol reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **55**, 7614–7622 (2012).

Hoshi A., Ikekawa T., Ikeda Y., Shirakawa S., Iigo M., Kuretani K., Fukuoku F. Antitumor activity of Berberrubine derivatives. *Gann.* **67**, 321-325 (1976).

Howarth T. T., Brown A. G., King T. J. Clavulanic acid, a novel β -lactam isolated from *Streptomyces clavuligerus*: x-ray crystal structure analysis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 266-267 (1976).

Hua W., Ding L., Chen Y., Gong B., He J., Xu G. Determination of berberine in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**, 931–937 (2007).

Huang F. C. und Kutchan T. M. Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **53**, 555-564 (2000).

Ikezawa N., Tanaka M., Nagayoshi M., Shinkyō R., Sakaki T., Inouye K. and Sato F. Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultures *Coptis japonica* cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 38557-39565 (2003).

Ikezawa N., Iwasa K., Sato F. Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylophine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *FEBS J.* **274**, 1019-35 (2007).

Irons M., Elias E. R., Salen G., Tint G. S., Batta A. K. Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet.* **341**, 1414 (1993).

Iwasa K., Kamigauchi M., Ueki M., Taniguchi M. Antibacterial activity and structure-activity relationships of berberine analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **31**, 469-478 (1996).

Iwasa K., Nishiyama Y., Ichimaru M., Moriyasu M., Kim H-S., Wataya Y., Yamori T., Takashi T., Lee D-U. Structure-activity relationships of quarternary protoberberine alkaloids having an antimalarial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **34**, 1077-1083 (1999).

Iwasa, K., Moriyasu, M., Yamori, T., Turuo, T., Lee, D.U., Wiegrebe, W. In vitro cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids. *J. Nat. Prod.* **64**, 896–898 (2001).

Jackson A. H., Martin J. A. Phenol oxidation. Part I. The synthesis of isoboldine and glaucine. *J. Chem. Soc. (C)* 2061-2069 (1966).

Jahnke G. D., Price C. J., Marr M. C., Mayers C. B., George J.D. Developmental toxicity evaluation of Berberine in rats and mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology.* **77**, 195-206 (2006).

Jang H.-H., Daydov D. R., Lee G.-Y., Yun C.-H., Halpert J. R. The role of cytochrome P450B6 and 2B4 substrate access channel residues predicted on ceystal structures of the amlodipine complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **545**, 100–107 (2014).

Jirkovský I., Protiva M. Synthetische Versuche in der Gruppe hypotensiv wirksamer Alkaloide XXXIII. 2-(m-Methoxyphenyl)äthylamin-, 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin- und 13-Methoxyberbin-derivate. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **29**, 400-408 (1964).

Judeh Z. M. A., Ching C. B., Bu J., McCluskey A. The first Bischler–Napieralski cyclization in a room temperature ionic liquid. *Tetrahedron Lett.* **43**, 5089–5091 (2002).

Kametani T., Fukumoto K., Terui T., Yamaki K., Taguchi E. Studies on the syntheses of heterocyclic compounds. Part CDXII. Total Synthesis of Canadine. *J. Chem. Soc. (C)*, 2709-2711 (1971).

Kettmann V., Kosfalova D., Jantova S., Cernakova M., Drimal J. In vitro cytotoxicity of berberine against HeLa and L1210 cancer cell lines. *Pharmazie* **59**, 548-551 (2004).

Kim TS., Kang BY., Cho D., Kim SH. Induction of interleukin-12 production in mouse macrophages by berberine, benzodioxoloquinolizine alkaloid, deviates CD4⁺ T cells from a Th2 to a Th 1 response. *Immunology* **109**, 407-414 (2003).

Kim M. H. und Patel D. V. „BOP“ as a reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Lett.* **35** (31), 5603-5606 (1994).

Kim K. H., Piao C. J., Choi S. U., Son M. W., Lee K. R. New cytotoxic Tetrahydroprotoberberine-Aporphine dimeric and Aporphine alkaloids from *Corydalis Turtschaninovii*. *Planta Med.* **76**, 1732–1738 (2010).

Kuehne M. E., Shannon P. J. Reduction of amides and lactams to amines by reactions with phosphorus oxychloride and sodium borohydride. *J. Org. Chem.* **42**, 2082–2087 (1977).

Kuo CL., Chou CC., Yung B Y-M. Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic *HL-60* cells. *Cancer Lett.* **93**, 193-200 (1995).

Kuo CL., Chi CW., Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* **203**(2), 127-137 (2004).

Kupeli E., Kosar M., Yesilada E., Husnu K., Baser C. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sci.* **72**, 645-657 (2002).

Kutchan T. M. Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In: *The Alkaloids* Vol. **50**, 257-316 (1998).

Larsen R. D., Reamer R. A., Corley E. G., Davis P., Grabowski E. J. J., Reider P. J. and Shinkai I. A modified Bischler-Napieralski procedure for the synthesis of 3-Aryl-3,4-dihydroisoquinolines. *J. Org. Chem.* **56**, 6034-6038 (1991).

Laterra J. J., Goldstein G. W. The blood-brain barrier in vitro and in culture. *Handb. Exp. Pharmacol.* **103**, 417-437 (1992).

Le Bras G., Radanyi C., Peyrat J-F., Brion J-D., Alami M., Marsaud V., Stella B., Renoir J-M. New novobiocin analogues as antiproliferative agents in breast cancer cells and potential inhibitors of heat shock protein 90. *J. Med. Chem.* **50**, 6189-6200 (2007).

- Lewis, D.F.V. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* **5**, 305–318 (2004).
- Li J. F., Jin G. Z., Shen J. S., Shanghai R. A. 1-Chloroscoulerine Mesylate. *Drugs Fut.* **31**, 379–384 (2006).
- Ma Z-Z., Xu W., Jensen N. H., Roth B. L., Liu-Chen L-Y., Lee D. Y. W. Isoquinoline alkaloids isolated from *Corydalis yanhusuo* and their binding affinities at the dopamine D₁ receptor. *Molecules* **13**, 2303-2312 (2008).
- Mahapatra A., Maheswari V., Kalia N. P., Rajput V. S., Khan I. A. Synthesis and antitubercular activity of berberine derivatives. *Chem. Nat. Compd.* **50** (2), 321-325 (2014).
- Mali R. S., Patil S. L., Rodricks N. R. A facile synthesis of 7-Methoxyisochroman-3-one: Synthesis of 2,3-Dialkoxy-10-methoxyberbines. *Indian J. Chem.* **25B**, 256-258 (1986).
- Martin N. H., Jefford C. W. 75. Synthesis and photo-oxygenation of some substituted 1-Benzyl-3,4-dihydroisoquinolines. mechanism of enamine photo-oxygenation. *Helv. Chim. Acta* **65**, 762-774 (1982).
- McDonald E., Wylie R. D. Oxidative coupling of phenols and phenolic ethers. Part 42 Synthesis of dibenz(d,f)azonines and a dibenz(d,f)azecine, via direct coupling. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* 1104-1108 (1980).
- Meise H-J. und Mika W. Cyclisierungen von N-(2-Phenylethyl)-2-(2-hydroxyethyl)-benzamidin. *Arch. Pharm.* **318**, 168-174 (1985).
- Meyer A. Synthese und pharmakologisches Screening von Protoberberin-Alkaloiden an Dopamin-Rezeptoren, Monoaminoxidasen und Cytochrom P450 Oxidasen. Dissertation Halle. Shaker Verlag (2008).
- Min Y. D., Yang M. C., Lee K. H., Kim K. R., Choi S. U., Lee K. R. Protoberberine alkaloids and their reversal activity of P-gp expressed multidrug resistance (MDR) from the rhizome of *Coptis japonica* Makino. *Arch. Pharm. Res.* **29** (9), 757-761 (2006).
- Moebius F. F., Fitzky B. U., Lee J. N., Paik Y.-K., Glossmann H. Molecular cloning and expression of the human Δ^7 -sterol reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **59**, 1899–1902 (1998).
- Morishige T., Tsujita T., Yamada Y., Sato F. Molecular characterization of the *S*-adenosyl-L-methionine 4'-*O*-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **275**, 23398-23405 (2000).
- Morishige T., Dubouzet E., Choi K. B., Yazaki K., Sato, F. Molecular cloning of columbamine *O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5659-67 (2002).
- Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63 (1983).
- Movassaghi M. and Hill M. D. A versatile cyclodehydration reaction for the synthesis of isoquinoline and β -Carboline derivatives. *Org. Lett.* **10** (16), 3485-3488 (2008).

Müller J. Analytik von freien Sterolen und Entwicklung einer Screening-Methode zur Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren. Dissertation. Verlag Dr. Hut, München (2002).

Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage (2001).

Nagata W., Itazaki H., Okada K., Wakabayashi T., Shibata K., Tokutake N. Synthetic Studies on Isoquinoline Alkaloids. I. An Efficient Synthesis of 9,10-Substituted Protoberberine Alkaloids. *Chem. Pharm. Bull.* **23** (11), 2867-2877 (1975).

Nes W.R. and McKean M.L. Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids. *University Park Press, Baltimore* (1977).

Nes W. R. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 63-88 (2000).

Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477 (2007).

Ocio E. M., Oriol A., Bladé J., Teruel A. I., Martín J., de la Rubia J., Gutiérrez N.C., Rodríguez Díaz-Pavón J., Martínez González S., Coronado C., Fernández-García E.M., Sigüero Gómez M., Fernández-Teruel C., San Miguel J. Phase I/II study of weekly PM00104 (Zalypsis®) in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **172** (4), 625-628 (2016).

Oldendorf W. H. Lipid solubility and drug penetration of the blood-brain barrier. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **147**, 813-816 (1974).

Orfila L., Rodriguez M., Colman T., Hasegawa M., Merentes E., Arvelo F. Structural modification of berberine alkaloids in relation to cytotoxic activity in vitro. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 449-546 (2000).

Pan G. Y., Wang G. J., Liu X. D., Fawcett J. P., Xie Y. Y. The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption. *Pharmacol. Toxicol.* **91**, 193-197 (2002).

Paul L. D., Springer D., Staack R. F., Kraemer T., Maurer H. H. Involvement of human hepatic cytochrome P450 isoenzymes in the metabolism of the alkaloids Californine and Protopine. GTFCh - Symposium 2003 Ausgewählte Aspekte der Forensischen Toxikologie Beiträge zum XIII. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie Mosbach, 03.-05. April 2003, 212-220 (2004).

Park K-S., Kang K-C., Kim J-H., Adams D. J., Johng T-N., Paik Y-K. Differential inhibitory effects of protoberberines on sterol and chitin biosyntheses in *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 667-674 (1999).

Parks L., Rodriguez R. The biochemical action of the azasteroid antibiotics. *Biochem. Soc. Trans.* **11** (6), 656 (1983).

Paik Y.-K., Billheimer J. T., Magolda R. L., Gaylor J. L. Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from lanosterol: Solubilization and purification of steroid 8-isomerase. *J. Biol. Chem.* **261**, 6470–6477 (1986).

Petek B. J., Jones R. L. PM00104 (Zalypsis®): A marine derived alkylating agent. *Molecules.* **19**, 12328-12335 (2014).

Pictet A. und Spengler T. Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. *Ber.* **44**, 2030-2036 (1911).

Pilch D. S., Yu C., Makhey D., LaVoie E., Srinivasan A. R., Olson W. K., Sauers R. R., Breslauer K. J., Geacintov N.E., Lin LF. Minor groove-directed and intercalative ligand-DNA intercalations in the poisoning of human DNA topoisomerase I by protoberberine analogs. *Biochemistry* **36**, 12542-12553 (1997).

Pill J., Schmidt F. H., Stegmeier K., Witte E. C. Effects of BM 15.766 on serum lipids in rats. *Horm. Metabol. Res.* **17**, 543-544 (1985).

Pomeranz C. Über eine neue Isochinolinsynthese. *Monatsh.* **14**, 116-119 (1893).

Proksch P., Edrada R. A., Ebel R. Drugs from the sea-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 125-134 (2002).

Raub T. J., Audus K. L. Adsorptive endocytosis and membrane recycling by cultured primary bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J. Cell. Sci.* **97**, 127-138 (1990).

Refolo L. M., Papolla M. A., LaFrancois J., Malester B, Schmidt S. D., Thomas-Bryant T., Tint G. S., Wang R., Mercken M., Petamceska S. S., Duff K. E. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **8**, 890-899 (2001).

Renard D., Perruchon J., Giera M., Müller J., Bracher F. Side chain azasteroids and thiaasteroids as sterol methyltransferase inhibitors in ergosterol biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 8123–8137 (2009).

Rendic S., Di Carlo F. J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug. Metab. Rev.* **29**, 413-580 (1997).

Rice K. C. Method of Synthesis of Hydroxy-substituted-4-alkoxy-phenylacetic acids. Patent 5.008.449 (1991).

Rockova L., Majekova M., Kost D., Stefek M. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 4709-4715 (2004).

Rüffer M. und Zenk M. H. Distant precursors of benzoisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Z. Naturforsch.* **42c**, 319-332 (1987).

Salminen K. A., Meyer A., Jerabkova L., Korhonen L. E., Rahnasto M., Juvonen R. O., Imming P., Raunio H. Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine* **18** (6), 533-538 (2011).

Schlüter G.: Die Bischler-Napieralski-Reaktion zur Synthese von 1-Phenyl[2]benzazepinen und Isochino[1,2-*a*][2]benzazepinen, Dissertation Bonn (1987).

Schulze M., Müller F. K. U., Mason J. M., Görls H., Lehmann J., Enzensperger C. Dibenzazecine scaffold rebuilding - Is the flexibility always essential for high dopamine receptor affinities?. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 6898–6907 (2009).

Shefer S., Salen G., Honda A., Batta A. K., Nguyen L. B., Tint G. S., Ioannou Y. A., Desnick R. Regulation of rat hepatic 3 β -hydroxysterol Δ 7-reductase: substrate specificity, competitive and noncompetitive inhibition, and phosphorylation/dephosphorylation. *J. Lipid Res.* **39**, 2471–2476 (1998).

Simons M., Keller P., De Strooper B., Beyreuther K., Dotti C. G., Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6460-6464 (1998).

Simons M., Schwarzler F., Lutjohann D., von Bergmann K., Beyreuther K., Dichgans J., Wormstall H., Hartmann T., Schulz J. B. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: a 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Neurol.* **52**, 346-350 (2002).

Sjögren M., Gustaffson K., Syversen S., Olsson A., Edman Å., Davidsson P., Wallin A., Blennow K. Treatment with simvastatin in patients with Alzheimer's disease lowers both α - and β -cleaved APP. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **16**, 25-30 (2003).

Smith D. W., Lemli L., Opitz J. M. A newly recognized syndrome of multiple congenital abnormalities. *J. Pediatr.*, **64**, 210–217 (1964).

Smith D. A., Ackland M. J., Jones, B. C. Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates Part 2: properties of cytochrome P450 substrates. *Drug Discov. Today* **2**, 479-486 (1997).

Sun Y., Dai J., Hu Z., Du F., Niu W., Wang F., Liu F., Jin G., Li C. Oral bioavailability and brain penetration of (-)-stepholidine, a tetrahydroprotoberberine agonist at dopamine D1 and antagonist at D2 receptors, in rats. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 1302-1312 (2009).

Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents, Part 84: Microdilution. Special requirements for testing of fungi against antifungal agents. DIN 58940-84; Beuth Verlag, Berlin (2002).

Takakura Y., Audus K. L., Borchardt R. T. Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells. *Advances in Pharmacology* **22**, 137-165 (1991).

Teitel S. und Brossi A. An improved synthesis of various racemic polyphenolic tetrahydroisoquinoline alkaloids. *J. Heterocyclic. Chem.* **5**, 825-829 (1968).

Thöle M. Arzneistofftransport an der Blut-Hirn Schranke: Drug Targeting mit liposomalen Konjugaten. Dissertation, Universität Heidelberg (2000).

Tint G. S., Irons M., Elias E. R., Batta A. K., Frieden R., Chen T. S., Salen G. Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N. Engl. J. Med.* **330**, 107–113 (1994).

Tran QL., Tezuka Y., Ueda JY., Nguyen NT., Maruyama Y., Begum K., Kim HS., Wataya Y., Tran QK., Kadota S. In vitro antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **86**, 249-252 (2003).

Triguero D., Buciak J., Pardridge W. M. Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins. *J. Neurochem.* **54**, 1882-1888 (1990).

Vaccari D., Davoli P., Ori C., Spaggiari A., Prati F. A very mild access to 3,4-Dihydroisoquinolines using triphenyl phosphite-bromine-mediated Bischler-Napieralski-type cyclization. *Synlett.* **18**, 280-2810 (2008).

Vennerstrom J. L., Lovelace J. K., Waits V. B., Hanson W. L., Klayman D. L. Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 918-921 (1990).

Volleková A., Kost D., Kettmann V., Troth J. Antifungal activity of *Mahonia aquifolium* and its major protoberberine alkaloids. *Phytother. Res.* **17**, 834-837 (2003).

Walsky R. L., Gaman E. A., Obach R. S. Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 68-78 (2005).

Walsky R. L., Astuccio A. V., Obach R. S. Evaluation of 227 drugs for in vitro inhibition of cytochrome P4502B6. *J. Clin. Pharmacol.* **46**, 1426-1438 (2006).

Wang Y., Wang S., Liu Y., Yan L., Dou G., Gao Y. Characterization of metabolites and cytochrome P450 isoforms involved in the microsomal metabolism of aconitine. *J. Chromatogr. B.* **844**, 292–300 (2006).

Wang J.-F., Wei D.-Q., Li L., Zheng S.-Y., Li Y.-X., Chou K.-C. 3D structure modeling of cytochrome P450 2C19 and its implication for personalized drug design. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 513–519 (2007a).

Wang J.-F., Wei D.-Q., Li L., Zheng S.-Y., Li Y.-X., Chou K.-C. Corrigendum to “3D structure modeling of cytochrome P450 2C19 and its implication for personalized drug design”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 330-330 (2007b).

Wang B., Yang L. P., Zhang X.Z., Huang S. Q., Bartlam M., Zhou S. F., 2009. New insights into the structural characteristics and functional relevance of the human cytochrome P450 2D6 enzyme. *Drug Metab. Rev.* **41**, 573–643 (2009).

Waterham H. R., Wanders R. J. A. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 340–356 (2000).

Weimar, C., Angerer, S., Wiegrebe, W. Methoxy- and acetoxy-8-oxoberbines – synthesis, antitumor activity, and interaction with DNA. *Arch. Pharm.* **324**, 509–518 (1991).

- Weller D. D., Stirchak E. P., Yokoyama E. P. Preparation of oxygenated phenylacetic acids. *J. Org. Chem.* **49**, 2061-2063 (1984).
- White, R.E. High-throughput screening in drug metabolism and pharmacokinetic support of drug discovery. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 133-157 (2000).
- Whaley W. M., Govindachari T. R. The preparation of 3,4-dihydroisoquinolines and related compounds by the Bischler-Napieralski reaction. *Org. React.* **6**, 74-150 (1951).
- Witt T., Hock F.J., Lehmann J. 7-Methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-benz[*d*]indolo[2,3-*g*]azecine: A new heterocyclic system and a new lead compound for dopamine antagonists, *J. Med. Chem.* **43**, 2079-2081 (2000).
- Wolf S., Seehaus B., Minol K., Gassen H.G. Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozirkulationssystems. *Naturwissenschaften.* **83**, 302-311 (1996).
- Wolozin B. Cholesterol, statins and dementia. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 667-672 (2004).
- Wu N., Sarna L. K., Siow Y. L., O K. Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis by berberine during hyperhomocysteinemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R635-R643 (2011).
- Yano J. K., Wester M. R., Schoch G. A., Griffin K. J., Stout C. D., Johnson E. F. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-angstrom resolution. *J. Biol. Chem.* **279**, 38091-38094 (2004).
- Yardley J. P. Secondary amines via reductive cleavage reactions of N-oxides. *Synthesis* **9**, 543-545 (1973).
- Yesilada E. and Kupeli E. Berberis crataegina DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 237-296 (2002).
- Yu CH., Zhang H., Ren J.-Y., Pan J.-F., Hong Y.-C., Zhu D.-Y., Xu X.-R. Determination and preliminary studies of metabolism of berberine in human urine after oral administration. *Chin. J. Clin. Pharmacol.* **16**, 36-39 (2000).
- Zenk M. H., El-Shagi H., Ulbrich B. Production of rosmarinic acid by cell-suspension cultures of *Coleus blumei*. *Naturwissenschaften* **64**, 585-586 (1977).
- Zenk M. H. Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* **30**, 3861-3863 (1991).
- Zhao Y., Hellum B. H., Liang A., Nilsen O. G. The in vitro inhibition of human CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by tetrahydropalmatine, neferine and berberine. *Phytother. Res.* **26**, 277-283 (2012).
- Zheng L., Zhou Z., Tao D., Lan T. Protective effect of berberine on cardiac myocyte injured by ischemia reperfusion. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban* **34**, 452-454 (2003).
- Zou Y., Xiao C-F., Zhong R.-Q., Wei W., Huang W-M., He S-J. Synthesis of combretastatin A-4 and erianin. *J. Chem. Res.* **6**, 354-356 (2008).

Ziegler J. und Facchini P. J. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **59**, 735–769 (2008).

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesamtheit der zwischen 1981 und 2006 eingeführten Wirkstoffe unterschieden nach Ursprung, abgewandelt nach [Newman and Cragg, 2007]	2
Abbildung 2: Fingolimod (a) und Myriocin (b)	3
Abbildung 3: Berberin, ein Protoberberinium-Salz, und Pflanzenbeispiele seines Vorkommens	4
Abbildung 4: 12-Chlorscoulerin mit integrierter Dopaminstruktur (rot)	5
Abbildung 5: Auswahl einiger Benzylisochinolin-Alkaloide	9
Abbildung 6: Biosynthese der Protoberberin-Alkaloide ausgehend vom L-Tyrosin; modifiziert nach [Ziegler und Facchini, 2008, Facchini, 2001]	12
Abbildung 7: Partialsynthese von Berberrubinchlorid, Canadin und Nandinin	13
Abbildung 8: Partialsynthese von Palmatinioidid, Tetrahydropalmatrubin und Tetrahydropalmatin-N-Methiodid	14
Abbildung 9: Synthese von Palmatinioidid 8, Entstehung des Nebenproduktes 8a	15
Abbildung 10: Darstellung von Tetrahydropalmatrubin und 11-Iod-Tetrahydropalmatrubin durch selektive Demethylierung und anschließender Hydrierung	15
Abbildung 11: Scoulerin	16
Abbildung 12: Darstellung von Tetrahydroxyberbin-Hydrobromid (26) aus Tetrahydropalmatin	16
Abbildung 13: Etherspaltung mit Tribromboran	17
Abbildung 14b: EI-Massenspektrum: Scoulerin	19
Abbildung 15: O-Demethylierung von Alkaloiden durch Natriumbenzylselenolat nach in situ Herstellung aus Dibenzylselenid	20
Abbildung 16: Darstellung von Isochinolinen durch die Pomeranz-Fritsch-Reaktion	21
Abbildung 17: Darstellung von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolinen durch die Pictet-Spengler-Reaktion	22
Abbildung 18: Darstellung von 3,4-Dihydroisochinolinen durch die Bischler-Napieralski-Reaktion	22
Abbildung 19: Reaktionsfolge der Protoberberin-Synthese	23
Abbildung 20: Einführen einer Schutzgruppe in das Phenylacetamid	24
Abbildung 21: Kupplung von Homoisovanillinsäure und Tyramin unter Verwendung von PyBOP/DIPEA	26
Abbildung 22: Synthese von Tetrahydroisochinolinen durch Bischler-Napieralski-Reaktion	27
Abbildung 23: 1-(4-Methoxybenzyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisochinolin	28
Abbildung 24: Massenspektrum von 1-(4-Methoxybenzoyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisochinolin	29
Abbildung 25: Bildung eines Diphenethylamins unter Bischler-Napieralski-Reaktionsbedingungen	30
Abbildung 26: Bildung des Carbenium-Iminium-Ions während der Mannich-Reaktion	32
Abbildung 27: Bildung eines Pseudoprotoberberins durch die Mannich-Reaktion	32
Abbildung 28: vorgeschlagener Mechanismus der Bildung von hydroxylierten Protoberberinen via Mannich-Reaktion	33
Abbildung 29: Hauptfragmente aus 2,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin	34
Abbildung 30: EI-Massenspektren, oben: 2,10-Dimethoxy-11-hydroxyberbin, unten: 2,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin	35
Abbildung 31: Bromierung eines Tetrahydroisochinolins	36
Abbildung 32: Darstellung der selektiven Protodebromierung [Choi et al., 2001]	37
Abbildung 33: Bromierung von 2-Methoxy-5-(2-{[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]amino}ethyl)phenol	38
Abbildung 34: Reaktionsabfolge im Isochromanonweg zum Protoberberin	39
Abbildung 35: Bildung des Isochromanons aus Homoisovanillinsäure	39

Abbildung 36: Ein Isochinolin-3-on-Derivat als Nebenprodukt	40
Abbildung 37: Synthese von 7-Methoxyisochroman-3-on	41
Abbildung 38: Umsetzung eines Gemisches aus Lactam a und Phenylacetamid b unter Bischler-Napieralski-Bedingungen	42
Abbildung 39: 7-Methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-6-ol mit Dopamin-strukturelement (magenta).....	44
Abbildung 40: Dibenz[d,h]azecin	45
Abbildung 41: a 2,3-Dimethoxy-7-methyl-9,10-dimethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[d,h]azecin 25; b 6,7-Dimethoxy-2-methyl-1-(6-methyl-4,5-dimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 25a	46
Abbildung 42: Syntheseversuch zur Spaltung der C-N-Brücke von 2,3,9,10-Tetrahydroxy-7-methyl-5,6,13,13a-tetrahydro-8H-dibenzo[a,g]chinolizin N-Methbromid unter Reaktionsbedingungen nach Birch.....	46
Abbildung 43: Synthese von 2,3,9,10-Tetramethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[d,h]azecin 67	47
Abbildung 44: Synthese von 3,4-Dihydro-1-phenyl-isochinolin [modifiziert nach <i>Movassaghi et al., 2008</i>].....	49
Abbildung 45: Zwischenstufen der Zyklisierung von deaktivierten Phenylacetamiden nach vorangegangenem Schutz der Methylhydroxygruppierung durch Chlorameisensäurethylester [modifiziert nach <i>Mohr, 2005</i>].....	51
Abbildung 46: Entscheidungsbaum mit Kurzanweisungen zur Synthese von Tetrahydroprotoberberinen.....	52
Abbildung 47: Der Weg von Lanosterol zu Ergosterol, verkürzte Darstellung, nach [Nes, 2000].....	63
Abbildung 48: Zymosterol als Substrat von 24-SMT in Hefen, Einführung einer Methyleinheit.....	67
Abbildung 49: Inhibitoren der 24-SMT und Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase	69
Abbildung 50: Keimung von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach 15 und 30 Tagen.....	70
Abbildung 51: Post-Squalen-Weg der Cholesterolsynthese; a katalysiert durch $\Delta 8,7$ -Isomerase, b katalysiert durch 7-Dehydrocholesterolreduktase (7-DHCR)	72
Abbildung 52: Strukturen der bekannten Inhibitoren der 7-Dehydrocholesterolreduktase und der potente und selektive Inhibitor 5f.....	76
Abbildung 53: Ergebnisse aus dem Vorscreening auf Zytotoxizität.....	80
Abbildung 54: Bedeutung der Cytochrome im Arzneistoffmetabolismus [modifiziert nach <i>Rendic et al., 1997</i>].....	84
Abbildung 55: Im CYP-Screening eingesetzte Testverbindungen.....	86
Abbildung 56: Emetin und Cephaelin, Isochinolin-Alkaloide mit dem Grundskelett des Benzo[a]hexahydrochinolizins.....	87
Abbildung 57: Schematische Darstellung der Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke [Urheber: Armin Kübelbeck]	92
Abbildung 58: allgemeine Struktur der Morphinan-Alkaloide	96
Abbildung 59: Chromatogramme der isolierten Sterolfractionen (nach Inkubation mit Inhibitor)	197

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss von Arylsubstituenten auf die Ausbeute der Synthese von Tetrahydroisochinolin durch Bischler-Napieralski-Zyklisierung und Hydrierung.....	31
Tabelle 2: Übersicht der aus Isochromanon synthetisierten Protoberberine	43
Tabelle 3: Testergebnisse des Agar-Diffusionstests, hier: Protoberberin-Alkaloide	57
Tabelle 4: Testergebnisse des Agar-Diffusionstests, hier: Phenethyltetrahydroisochinoline	60
Tabelle 5: ermittelte IC ₅₀ -Werte der Hemmung der Gesamtcholesterolsynthese aus der Bestimmung des Einbaus von ¹³ C in neu synthetisiertes Cholesterol.....	75
Tabelle 6: Übersicht der mittleren inhibitorischen Konzentrationen der Testverbindungen auf HL-60-Zellen.....	81
Tabelle 7: Übersicht der Inhibition der CYP-Enzyme durch die Testverbindungen.....	86
Tabelle 8: Alkaloide zur Untersuchung der Hirngängigkeit	93
Tabelle 9: Testergebnisse zur Untersuchung der ZNS-Gängigkeit, Darstellung des B/P,	95
Tabelle 10: Details aus dem Screening auf Inhibition von CYP450-Enzymen, IC ₅₀ und Konfidenzintervall (r ²).....	191

10. Anhang

10.1 Synthesen

10.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien und Reagenzien wurden entweder kommerziell erworben, Bezugsquelle in Klammern angegeben, oder stammen aus den Chemikalienbeständen der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Aceton

Acetylchlorid

Aluminiumchlorid

Aluminiumoxid, neutral, Aktivität I (6 % Wasserzugabe für Aktivität III)

Aluminiumoxid, basisch

Ameisensäure

Ammoniak (Air Liquide)

Ammoniak-Lösung 32 %

Ammoniumchlorid

Benzenboronsäure (Alfa Aesar)

Benzol

Berberinchlorid-Dihydrat (Alfa Aesar)

Brom

Bromwasserstoffsäure (48 %)

n-Buthyllithium, 2.5 M in Hexan (Sigma Aldrich)

Chlorameisensäureethylester

Chloroform

Chloroform-D1 (Merck)

m-Chlorperbenzoesäure (Alfa Aesar)

Dibenzylselenid (Sigma-Aldrich)

2,4-Dichlorophenylethylamin (Acros Organics)

Diethylether

Diisopropylether

Diisopropylethylamin (Sigma Aldrich)

3,4-Dimethoxyphenylethylamin (Sigma Aldrich)

3,4-Dimethoxyphenylethylamin (Sigma-Aldrich)

Dimethylformamid
DMAP (Acros Organics)
DMSO-D6 (Armar)
Dopamin-HCl (Acros Organics)
EDC (Acros Organics)
Ethanol
Ethylacetat
4-Fluorophenethylamin (Sigma Aldrich)
4-Chlorphenethylamin (Sigma Aldrich)
Formalin-Lösung 37 %
Harnstoff
Heptan
Hexan
Homoveratrumsäure (Fluka)
4-Hydroxy-3-methoxyphenylelessigsäure (Sigma Aldrich)
Iod
Kaliumcyanid
Kaliumhydroxid
Kupfersulfat-pentahydrat
Lithiumaluminiumhydrid (Alfa Aesar)
Magnesiumsulfat
Methanol
3-Methoxyphenylelessigsäure (Sigma Aldrich)
4-Methoxyphenylelessigsäure (Sigma Aldrich)
4-Methoxyphenylethylamin (Sigma Aldrich)
3-Methoxyphenylethylamin (Fluka)
2-Methoxyphenethylamin (Sigma Aldrich)
3,4-Methylenedioxyphenylelessigsäure (Sigma Aldrich)
Methylenchlorid
Methyliodid
Natrium
Natriumborhydrid (Serva)
Natriumchlorid
Natriumfluorid

Natriumhydrogencarbonat
Natriumhydrogensulfit
Natriumiodid
Natriumthiosulfat
Natronlauge
Paraformaldehyd
Phenethylamin (Sigma Aldrich)
Phenyllessigsäure (Sigma Aldrich)
Phosphorpentoxid
Phosphorylchlorid
PyBOP (Fluka)
Salzsäure 37 %
tert. Butylmethylether
Tetrahydrofuran
Tetrahydropalmin (Advanced Technology and Industrial, C.O., Ltd., China)
Tribromboran (Sigma-Aldrich)
Triethylamin
Toluol
Tyramin (Alfa Aesar)
Harnstoff
Xylol

10.1.2 Geräte

EI-MS: AMD Intectra DP 10 Massenspektrometer mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV
Die Mengenverteilung der Massensignale wird relativ zum größten Signal in Prozent nach der Massenzahl angegeben.

ESI-MS: LCQ-Classic der Firma Thermo Finnigan, Ionisation: positiv oder negativ, Kapillartemperatur 220 °C, Spannung: 4.5 kV, Scanbereich: 50-2000, Direktinjektion mittels Spritzenpumpe (20 µl/min)

Schmelzpunktbestimmung: Die Bestimmung der Schmelzbereiche erfolgte an einem Boëtius-Heiztischmikroskop. Die Schmelzbereiche sind als unkorrigierte Werte wiedergegeben.

Dünnschichtchromatographie: Das Monitoring der Reaktionen und die Kontrolle der Reinheit der isolierten Produkte erfolgten dünn-schichtchromatographisch. Hierbei wurden Fertigplatten, der Firmen Merck und Macherey-Nagel (Darmstadt, Deutschland), beschichtet mit 0.2 mm Kieselgel 60 und Fluoreszenzindikator F₂₅₄, verwendet. Die Detektion der Verbindungen erfolgte mittels UV-Licht der Wellenlänge 254 nm aufgrund der fluoreszenzlöschenden Eigenschaften der Substanzen oder durch Anfärben in der Iodkammer.

MPLC: Fa. Büchi mit Pumpen-Modul C601, UV Detektor C-630, Fraktionssammler C-660, Büchi Sepacore Record Software V. 1.0 und Cartridge C-670.

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60, Korngröße 40-63 µm (230-400 mesh ASTM) der Fa. Merck, Darmstadt. Die UV-Detektion erfolgte je nach UV-Cutoff der verwendeten Laufmittel und Laufmittelgemische bei 254 oder 280 nm.

NMR: Varian Gemini 2000 mit 400 MHz Arbeitsfrequenz für ¹H-NMR und 100 MHz für ¹³C-NMR und ein Varian Unity Inova 500 mit 500 MHz Arbeitsfrequenz für ¹H-NMR und 125 MHz für ¹³C-NMR.

Alle chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten sind auf die zweite Nachkommastelle gerundet.

Die Signalbezeichnung ist in der Auswertung wie folgt angegeben:

- s - Singulett
- d - Dublett
- dd - Dublett von Dublett
- dt - Dublett von Triplet
- t - Triplet
- q - Quartett
- m - Multiplett

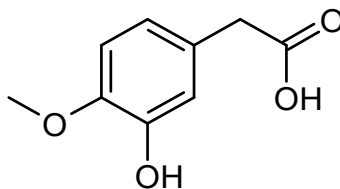
Elementaranalyse: LECO CHNS-932, Analyseautomat C,H,N im automatischen Mikroverfahren. Die Angaben, in Prozent, sind auf die zweite Nachkommastelle als Mittelwert einer Doppelbestimmung gerundet.

Zentrifuge: Beckman Coulter, Modell Avanti J-20 XP, Rotor JA 25.50 (8x50 mL) bis 80.000 ref (relative centrifugal force).

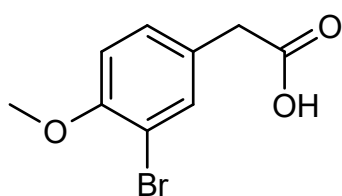
10.1.3 Monographien

1 Synthese von Ausgangsstoffen

Homoisovanillinsäure **14**



Stufe 1: 3-Brom-4-methoxyphenylelessigsäure **13** [Zou et al., 2008]



24.9 g (0.15 mol) 4-Methoxyphenylelessigsäure werden in 65 mL Essigsäure gerührt. Dabei werden 30 g Brom tropfenweise dazugegeben. Nach 1.5 Stunden Rühren unter Rückfluss wird die Reaktionsmischung auf Eis gegossen, der entstandene

Niederschlag mit Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 28.9 g (74.4 %), gelbe Nadeln

Molmasse: 245.07 g/mol

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 246 (42, M+2), 244 (43), 201 (94), 199 (100), 121 (8), 105 (19), 77 (26), 51 (11)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.45-7.46 (m, 1H, 1 x Ar-H), 7.15-7.18 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.84 (d, 1H, J= 8.30 Hz, 1 x Ar-H), 3.86 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.55 (s, 2H, -Ar-CH₂-COOH).

Stufe 2: 3-Hydroxy-4-methoxyphenylelessigsäure (Homoisovanillinsäure) **14**

Zu 15 g (61.2 mmol) **13** werden 13 mL Wasser und 4 g NaOH gegeben. Mittels Destillation werden 4.5 mL Wasser entfernt und erneut 4.5 mL Wasser hinzugegeben. Nach Zusatz von 13 mL Wasser und 17 g NaOH wird unter Argon 10 Minuten mit einem Glasstab gerührt. Dabei wird das Natrium-Salz der 3-Brom-4-methoxyphenylelessigsäure aufgeschlämmt.

1.08 g Kupfersulfat-pentahydrat in 13 mL Wasser werden hinzugegossen. Diese dunkle Aufschlämmung wird ca. 72 Stunden auf 109-115 °C erhitzt.

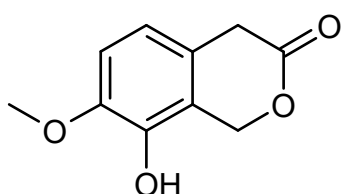
Die Mischung wird nach Abkühlung mit 37 %iger Salzsäure neutralisiert und über Celite filtriert. Nach tropfenweiser Zugabe von 20 mL 37 %iger Salzsäure unter Rühren bei 10-15 °C

fällt das Produkt kristallin aus. Dieses wird abfiltriert und dreimal mit eiskaltem Wasser bis im Waschwasser mit 10 %ige Silbernitrat-Lösung kein Chlorid mehr nachweisbar ist, gewaschen. Der Rückstand wird aus wenig Ethylacetat oder Chloroform umkristallisiert.

Ausbeute: 3.6 g (32.8 %)
 Molmasse: 182.18 g/mol
 Schmelzpunkt: 124-129 °C Lit: 125-129 °C [Rice et. al, 1991]
 MS (EI, 70 eV): m/z (%): 182 (76, M+), 137 (100), 94 (11)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.75-6.85 (m, 3H, 3 x Ar-H), 5.56 (s, br, 1H, Ar-OH), 3.86 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.54 (s, 2H, -Ar-CH₂-COOH).

8-Hydroxy-7-methoxyisochroman-3-on **15** [Ahmad et al., 1982]



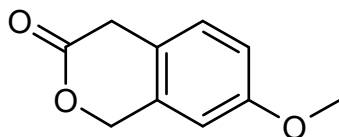
4.0 g (22 mmol) **14** und 4.4 g Benzenboronsäure werden in einem mit 300 mL Benzol gefüllten Dreihalskolben mit Wasserabscheider für eine Stunde gerührt. Dabei wird zum Sieden erhitzt. Danach werden 2.2 g Paraformaldehyd hinzugefügt und weitere neun Stunden gerührt. In Abständen von zwei Stunden werden jeweils 4.4 g Paraformaldehyd hinzugegeben. Nach Zugabe von weiteren 2.2 g Benzenboronsäure am folgenden Tag beträgt die gesamte Reaktionszeit 28 Stunden an vier Tagen, wobei über jeweils sieben Stunden alle zwei Stunden 4.4 g Paraformaldehyd dem Reaktionsgemisch hinzugefügt werden.

Nach Abdestillieren von Benzol wird der Rückstand mit 80 mL Wasser versetzt und eineinhalb Stunden bei 95-100 °C gerührt. Nach Zugabe von 80 mL Dichlormethan wird solange gerührt, bis sich der schleimige Rückstand löst. Im Anschluss an die Phasentrennung wird die organische Phase mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und abgezogen. Der verbleibende fest-ölige Rückstand wird mit wenig Dichlormethan übergossen und der beigefarbene Feststoff abgetrennt.

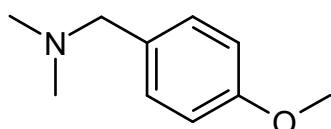
Ausbeute: 1.7 g (39.8 %)
 Molmasse: 194.19 g/mol
 R_f- Wert: 0.65 (CHCl₃/MeOH 10 %), OP: gelborange
 MS (ESI): m/z 195.2 (100, M⁺+1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 6.79 (d, 1H, $J=8.10$ Hz, Ar-H), 6.66 (d, 1H, $J=8.30$ Hz, Ar-H), 5.79 (s, br, 1H, Ar-OH), 5.39 (s, 2H, -Ar-CH₂-O-CO), 3.88 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.61 (s, 2H, -Ar-CH₂-CO).

7-Methoxyisochroman-3-on 103



Stufe 1: 4-Methoxybenzyl dimethylamin 101



40.8 g (0.3 mol) Anisaldehyd, 87.6 g (1.2 mol) Dimethylformamid (DMF) und 5.1 g Ameisensäure werden 15 Stunden bei 180-190 °C am Rückflusskühler erhitzt. Nach

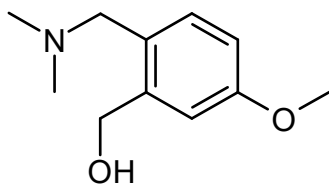
Abkühlung des Reaktionsgemisches werden 21 mL 5 M HCl zugefügt und anschließend zweimal mit Diethylether extrahiert. Nach Zugabe von 30 mL 40 %iger Kaliumhydroxid-Lösung wird dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Zur weiteren Reinigung des Rohproduktes wird der Rückstand in 200 mL 1 M HCl aufgenommen und zweimal mit je 200 mL Toluol ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit 23 mL 40 %iger KOH-Lösung auf einen pH-Wert größer 9 gebracht. Anschließend wird diese Phase dreimal mit je 200 mL Diethylether extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt.

Ausbeute: 15.7 g (32 %), gelbliches Öl

Molmasse: 165.24 g/mol

R_f- Wert: 0.39 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.18 (dd, 2H, $J=2.08/8.51$ Hz, 2 x Ar-H), 6.84 (dd, 2H, $J=1.89/8.72$ Hz, 2 x Ar-H), 3.77 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.33 (s, 2H, N-CH₂-Ar), 2.19 (s, 6H, 2 x N-CH₃).

Stufe 2: 3-Methoxy-6-dimethylaminomethylbenzen-methanol **102** [Mali et al., 1986]

2.0 g (12.1 mmol) von **101** werden in 50 mL getrocknetem Diethylether gelöst, in einem Dreihalskolben auf 0 °C gekühlt und mit Argon entgast. Innerhalb von 10 Minuten werden 72 mL n-Buthyllithium (2.5 M) durch ein Septum zu dem Reaktionsgemisch gegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgt über einen Zeitraum von 20 Minuten eine portionsweise Zugabe von 5 g Paraformaldehyd. Es wird für weitere 2 Stunden gerührt. Im Anschluss wird der Kolben in Eiswasser gestellt und das überschüssige n-BuLi durch Zugabe von 25 mL Wasser zerstört. Die organische Phase wird von der wässrigen separiert. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 25 mL Diethylether extrahiert. Die so erhaltenen Etherphasen und die zuvor abgetrennte organische Phase werden vereinigt und dreimal mit 1 M HCl (1:1) ausgeschüttelt. Die saure wässrige Phase wird mit 140 mL 20 %iger Natronlauge alkalisiert (pH 9) und mit Ether ausgeschüttelt. Diese Phase wird anschließend über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Das ölige Produkt wird bei 1 bar und 58-65 °C destilliert.

Ausbeute: 2.2 g (95 %), Öl

Molmasse: 195.26 g/mol

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.08 (d, 1H, J= 8.30 Hz, 1 x Ar-H), 6.86 (d, 1H, J= 2.70 Hz, 1 x Ar-H), 6.70-6.73 (m, 1H, 1 x Ar-H), 4.51 (s, 2H, Ar-CH₂-OH), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.43 (s, 2H, N-CH₂-Ar), 2.19 (s, 6H, 2 x N-CH₃).

Stufe 3: 7-Methoxyisochroman-3-on **103** [Mali et al., 1986]

1.2 g (6.1 mmol) **102** und 3.5 g Natriumhydrogencarbonat werden in Benzol gelöst und gerührt. Eine Lösung von 6 mL Chlorameisensäureethylester in 12 mL Benzol wird dem Reaktionsansatz hinzugefügt und über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert, das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird in 12 mL DMF aufgenommen und nach Zugabe von

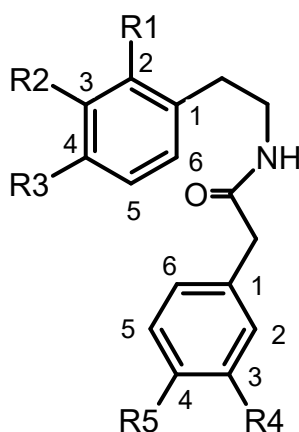
2.36 g Kaliumcyanid und 0.118 g Kaliumiodid erneut über Nacht gerührt. Nach Zusatz von 50 mL Wasser wird dreimal mit Diethylether extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird in 24 mL Methanol aufgenommen, methanolische KOH (0.7 g KOH in 2.3 mL Wasser und 5 mL Methanol) zugegeben und 24 Stunden unter Rückfluss gehalten. Anschließend wird Methanol abgezogen, 50 mL Wasser hinzugefügt und dreimal mit Ether extrahiert. Die wässrige Phase wird nach Ansäuern mit 1 M HCl 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach zweifacher Extraktion mit Ether wird der verbleibende Rückstand der organischen Phase mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (9:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.4 g (36 %), Öl
Molmasse: 178.19 g/mol
R_f- Wert: 0.75 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)

¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.10 (d, 1H, J= 8.30 Hz, 1 x Ar-H), 6.84-6.86 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.76 (d, 1H, J= 2.49 Hz, 1 x Ar-H), 5.25 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CO), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.63 (s, 2H, Ar-CH₂-CO).

2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Phenylacetamide

Die Reaktion wird unter Argonatmosphäre durchgeführt. Das Phenylethylsäurederivat sowie 1.1 molare Äquivalente des entsprechenden Phenylethylamins werden in getrocknetem Xylol suspendiert und anschließend zum Sieden erhitzt. Die Temperatur wird für 16 Stunden gehalten. Nach Abzug des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wird der verbleibende Feststoff aus Ethylacetat und Heptan (2:1) umkristallisiert. Ölige Rückstände werden an Kieselgel chromatographiert (Gradient CHCl_3 100 % \rightarrow $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10).



Einzelverbindungen

2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3a**

3.0 g (16.5 mmol) Homoisovanillinsäure **14** und 2.8 g (18.5 mmol) 4-Methoxyphenethylamin, suspendiert in 40 mL Xylol, ergeben nach Umkristallisation aus 18 mL Ethylacetat und 9 mL Heptan 7.3 g (93 %) **3a** (weißer, fluffiger Niederschlag).

Ausbeute: 7.3 g (93 %)
Molmasse: 315.37 g/mol
R_f- Wert: 0.58 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 96-101 °C
MS (ESI): m/z 316.1 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.93 (dd, 2H, J= 1.87/8.51 Hz, 2 x Ar-H), 6.75 (dd, 2H, J= 1.87/8.51 Hz, 2 x Ar-H), 6.72-6.60 (m, 3H, Ar-H), 5.46 (s, br, 1H, -CO-NH), 3.87 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.44 (s, 2H, -CO-CH₂-Ar), 3.42-3.37 (dd, 2H, J=6.23/12.87 Hz, -NH-CH₂-CH₂), 2.64 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -CH₂-CH₂-Ar).

2-(3-Methoxyphenyl)-N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3b**

3-Methoxyphenylessigsäure (2.6 g, 15.4 mmol) und 4-Methoxyphenethylamin (2.4 g, 16.1 mmol) in 20 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 3.3 g (71 %) **3b** in weißen Kristallen.

Ausbeute: 3.3 g (71 %)
Molmasse: 299.37 g/mol
R_f- Wert: 0.74 (CHCl₃/MeOH 10 %)
MS (ESI): m/z 300.1 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.21 (t, 1H, J=7.68 Hz, 1 x Ar-H), 6.91 (dd, 2H, J=2.08/8.72 Hz, 2 x Ar-H), 6.79-6.81 (d, 1H, J=6.02 Hz), 6.75 (dd, 2H, J=2.08/8.72 Hz, 2 x Ar-H), 6.68-6.78 (m, 2H, 2 x Ar-H), 5.36 (s, br, 1H, -CO-NH), 3.76 (s, 6H, 2 x Ar-OCH₃), 3.49 (s, 2H, -CO-CH₂-Ar), 3.40 (dd, 2H, cJ=5.81/6.84, -NH-CH₂-CH₂), 2.64 (t, 2H, J= 6.64 Hz, -CH₂-CH₂-Ar).

2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3c**

3,4-Methylendioxyphenylelessigsäure (1.2 g, 6.9 mmol) und 4-Methoxyphenethylamin (1.1 g, 7.2 mmol) in 20 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 1.7 g (80 %) **3c** in weißen Kristallen.

Ausbeute: 1.7 g (80 %)
Molmasse: 313.36 g/mol
R_f- Wert: 0.68 (CHCl₃/MeOH 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.94 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.77 (dd, J=1.96/8.61 Hz, 2H), 6.72 (d, J=7.82 Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.58 (d, J= 6.65 Hz, 1H), 5.95 (s, 2H), 5.39 (s, br, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.43-3.39 (m, 4H), 2.66 (t, J= 6.65 Hz, 2H).

2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3d**

4-Hydroxy-3-methoxyphenylelessigsäure (1.0 g, 5.5 mmol) und 4-Methoxyphenethylamin (0.9 g, 5.8 mmol) in 15 mL Xylol ergeben nach Säulenchromatographie 1.6 g (95 %) **3d** als öliger Rückstand.

Ausbeute: 1.6 g (95 %)
Molmasse: 315.37 g/mol
R_f- Wert: 0.62 (CHCl₃/MeOH 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.90 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.83 (d, J=8.61 Hz, 1H), 6.74 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.63-6.60 (m, 2H), 5.39 (s, br, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.45 (s, 2H), 3.40 (dd, J= 6.26/6.65 Hz, 2H), 2.64 (t, J= 6.65 Hz, 2H).

2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-N-[2-(2-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3g**

Homoisovanillinsäure **14** (4.0 g, 22.0 mmol) und 2-Methoxyphenethylamin (3.5 g, 23.1 mmol) in 40 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 4.3 g (62 %) **3g** als weiße Kristalle.

Ausbeute: 4.3 g (62 %)
Molmasse: 315.37 g/mol
R_f- Wert: 0.52 (CHCl₃/MeOH 10 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.16 (t, $J=7.82$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J=7.04$ Hz, 1H), 6.82-6.71 (m, 4H), 6.63 (d, $J=6.26$ Hz, 1H), 5.66 (s, br, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.45-3.40 (m, 4H), 2.73 (t, $J=6.26$ Hz, 2H)

Elementaranalyse:

berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4$:	C(%)= 68.55	H(%)= 6.71	N(%)= 4.44
gefunden:	C(%)= 68.54	H(%)= 7.03	N(%)= 4.17.

2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-*N*-[2-(3-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3h**

[Weller et al., 1984]

Homoisovanillinsäure **14** (3.0 g, 16.5 mmol) und 3-Methoxyphenethylamin (2.6 g, 17.2 mmol) in 30 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 5.0 g (96 %) **3h** als weiße Kristalle.

Ausbeute: 5.0 g (96 %)
Molmasse: 315.37 g/mol
 R_f - Wert: 0.63 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)
MS (ESI): m/z 316.1 (100, M^++1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.16 (t, $J=7.82$ Hz, 1H), 6.78-6.61 (m, 6H), 5.39 (s, br, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.46-3.41 (m, 4H), 2.69 (t, $J=6.65$ Hz, 2H).

N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-acetamid **3i**

[McDonald et al, 1980]

Homoisovanillinsäure **14** (1.0 g, 5.5 mmol) und 3,4-Dimethoxyphenethylamin (1.0 g, 5.5 mmol) in 17 mL Xylol ergeben nach Säulenchromatographie 1.4 g (75 %) **3i** als öligen Rückstand.

Ausbeute: 1.4 g (75 %)
Molmasse: 345.40 g/mol
 R_f - Wert: 0.61 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.75-6.71 (m, 3H), 6.62-6.54 (m, 3H), 5.57 (s, br, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.50 (s, 2H), 3.44 (dd, J= 5.87/6.26 Hz, 2H), 2.67 (t, J= 6.65 Hz, 2H).

2-(3-Methoxyphenyl)-N-phenethyl-acetamide **3j** [*Jirkovský et al., 1964*]

3-Methoxyphenylelessigsäure (2.0 g, 12.1 mmol) and Phenethylamin (1.6 g, 12.8 mmol) in 20 mL Xylol ergeben nach Säulenchromatographie 2.2 g (69 %) **3j** als öligen Rückstand.

Ausbeute: 2.2 g (69 %)
Molmasse: 269.35 g/mol
R_f- Wert: 0.75 (CHCl₃/MeOH 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.28-7.20 (m, 4H), 7.03 (d, J=6.65 Hz, 2H), 6.83 (d, J=6.26 Hz, 1H), 6.77-6.74 (m, 2H), 5.61 (s, br, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 3.47 (dd, J= 5.87/6.65 Hz, 2H), 2.74 (t, J= 7.04 Hz, 2H).

3,4-Dimethoxyphenyl-N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3k**

3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (4.0 g, 20.4 mmol) und 4-Methoxyphenethylamin (3.4 g, 22.4 mmol) in 40 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 6.3 g (94%) **3k** als weiße Kristalle.

Ausbeute: 6.3 g (94 %)
Molmasse: 329.40 g/mol
R_f- Wert: 0.71 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 90-93 °C Lit. 125 °C aus Xylol [*Jackson et al., 1966*]
MS (ESI): m/z 330.2 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.91 (dd, J = 2.28/8.72 Hz, 2H), 6.78 (d, J = 8.09 Hz, 1H), 6.75 (dd, J = 2.28/8.72, 2H), 6.96-6.65 (m, 2H), 5.34 (s, br, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 3.43-3.38 (dd, J = 6.64/12.66 Hz, 2H), 2.64 (t, J= 6.64 Hz, 2H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₂₃ NO ₄ :	C(%)= 69.28	H(%)= 7.04	N(%)= 4.25
gefunden:	C(%)= 68.88	H(%)= 6.95	N(%)= 4.24.

N-[2-(4-Fluorophenyl)-ethyl]-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-acetamid **3e**

2.0 g (11.0 mmol) Homoisoivanillinsäure **14** und 1.6 g (11.5 mmol) 4-Fluorophenethylamin in 40 mL Xylol ergeben 4.3 g (62 %) **3e** (blassgelbe Kristalle).

Ausbeute: 1.6 g (95 %)
Molmasse: 303.34 g/mol
R_f- Wert: 0.66 (CHCl₃/MeOH 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.02-6.87 (m, 4H), 6.81-6.71 (m, 2H), 6.60 (d, J=7.82 Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.34 (s, br, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.43-3.38 (m, 4H), 2.68 (t, J= 6.65 Hz, 2H).

N-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-acetamid **3f**

1.6 g (8.6 mmol) Homoisoivanillinsäure **14** und 1.3 g (8.5 mmol) 4-Chlorphenethylamin in 25 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 1.8 g (65 %) **3f** als beigefarbene Kristalle.

Ausbeute: 1.8 g (65 %)
Molmasse: 319.79 g/mol
R_f- Wert: 0.61 (CHCl₃/MeOH 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 450 MHz) δ [ppm]: δ = 7.17 (dd, J = 1.83/8.24 Hz, 2H), 6.94 (dd, J = 1.83/8.55 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 7.94 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.59 (d, J = 7.94 Hz, 1H), 5.32 (br s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.43 3.38 (m, 4H), 2.67 (t, J = 6.71 Hz, 2H).

N-[2-(3-Methoxyphenyl)ethyl]-2-(4-methoxyphenyl)-acetamid **3l**

5.0 g (30.1 mmol) 4-Methoxyphenylessigsäure und 4.7 g (31 mmol) 3-Methoxyphenethylamin in 25 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 8.1 g (90 %) **3l** als perlmuttfarbene Kristalle.

Ausbeute: 8.1 g (90 %)
Molmasse: 299.37 g/mol
R_f- Wert: 0.42 (Ethylacetat/Diethylether 1:1)
Schmelzpunkt: 74-76 °C

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.11-7.15 (m, 1H, Ar-**H**), 7.05 (dd, 2H, J= 1.66/8.51 Hz, 2 x Ar-**H**), 6.81 (dd, 2H, J= 1.87/8.72 Hz, 2 x Ar-**H**), 6.59-6.73 (m, 3H, 3 x Ar-**H**), 5.31 (s, br, 1H, -CO-NH), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.75 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.47 (s, 2H, -CO-CH₂-Ar), 3.41-3.47 (dd, 2H, J= 6.02/12.66 Hz, -NH-CH₂-CH₂), 2.68 (t, 2H, J= 6.64 Hz, -CH₂-CH₂-Ar).

3,4-Dimethoxyphenyl-N-[2-(2-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3m**

4.0 g (20.4 mmol) 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure und 3.4 g (22.5 mmol) 2-Methoxyphenethylamin in 30 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 6.3 g (94 %) **3m** als längliche weiße Nadeln.

Ausbeute: 6.3 g (94 %)
Molmasse: 329.40 g/mol
R_f- Wert: 0.71 (Chloroform/Methanol 10 %)
Schmelzpunkt: 99-106 °C

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.14 – 7.17 (m, 1H, 1 x Ar-**H**), 6.67 – 6.93 (m, 5H, 5 x Ar-**H**), 6.64 (s, 1H, 1 x Ar-**H**), 5.53 (s, br, 1H, -CO-NH), 3.86 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.69 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.45 (s, 2H, -CO-CH₂-Ar), 3.40 – 3.45 (dd, 2H, J= 6.43/12.24 Hz, -NH-CH₂-CH₂), 2.73 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -CH₂-CH₂-Ar)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₂₃ NO ₄ :	C(%)= 69.28	H(%)= 7.04	N(%)= 4.25
gefunden:	C(%)= 68.60	H(%)= 7.03	N(%)= 4.17.

3-Hydroxy-4-methoxyphenyl-N-[2-(3-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3n**

3.0 g (16.5 mmol) Homoisovanillinsäure **14** und 2.6 g (17.2 mmol) 3-Methoxyphenethylamin in 30 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 5.0 g (96 %) **3n** als beigefarbenen fluffigen Niederschlag.

Ausbeute: 5.0 g (96 %)
Molmasse: 315.37 g/mol
R_f- Wert: 0.65 (Chloroform/Methanol 10 %)
MS (ESI): m/z 316.1 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.12-7.16 (m, 1H, 1 x Ar-**H**), 6.61-6.76 (m, 6H, 6 x Ar-**H**), 5.38 (s, br, 1H, -CO-NH), 3.87 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.42 (s, 2H, -CO-CH₂-Ar), 3.42 (dd, liegt unter Singulett, 2H, -NH-CH₂-CH₂), 2.69 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -CH₂-CH₂-Ar).

N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-benzenacetamid **3o**

5.0 g (36.7 mmol) Phenyllessigsäure und 7.4 g (41.3 mmol) 3,4-Dimethoxyphenethylamin in 40 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 10.3 g (96 %) **3o** als beigefarbenen fluffigen Niederschlag.

Ausbeute: 10.3 g (96 %)
Molmasse: 299.37 g/mol
R_f- Wert: 0.69 (Chloroform/Methanol 10 %)
Schmelzpunkt: 99-102 °C

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.24-7.29 (m, 3H, 3 x Ar-**H**), 7.13-7.15 (m, 2H, 2 x Ar-**H**), 6.70 (d, 1H, J= 8.09 Hz, 1 x Ar-**H**), 6.51-6.58 (m, 2H, 2 x Ar-**H**), 5.40 (s, br, 1H, -CO-NH), 3.83 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.53 (s, 2H, -CO-CH₂-Ar), 3.41-3.45 (dd, 2H, J= 6.65/12.66 Hz, -NH-CH₂-CH₂), 2.66 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -CH₂-CH₂-Ar).

N-[2-(4-Methoxyphenyl)-ethyl]-benzenacetamid **3p**

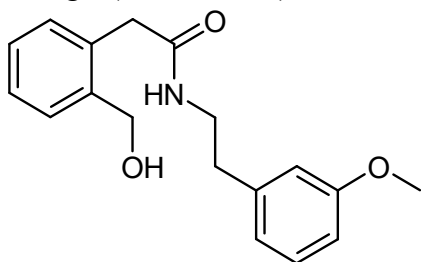
5.0 g (36.7 mmol) Phenyllessigsäure und 6.1 g (40.3 mmol) 4-Methoxyphenethylamin in 40 mL Xylol ergeben nach Umkristallisation 9.0 g **3p** als weiße kristalline Nadeln.

Ausbeute:	9.0 g (91 %)
Molmasse:	269.35 g/mol
R _f - Wert:	0.65 (Chloroform/Methanol 10 %)
MS (ESI):	m/z 292.04 (100, M ⁺ +Na)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.26-7.33 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.15-7.17 (m, 2H, 2 x Ar-H), 6.90 (dd, 2H, J= 1.96/8.61 Hz, 2 x Ar-H), 6.74 (dd, 2H, J= 1.96/8.61 Hz, 2 x Ar-H), 5.31 (s, br, 1H, -CO-NH), 3.77 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.52 (s, 2H, -CO-CH₂-Ar), 3.38-3.43 (dd, 2H, J= 6.65/12.72 Hz, -NH-CH₂-CH₂), 2.62 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -CH₂-CH₂-Ar).

2-(2-Hydroxymethylphenyl)-N-[2-(3-methoxyphenethyl)]-acetamid **30**

2.0 g (13.7 mmol) 3-Isochromanon werden zusammen mit 2.5 g (16.5 mmol)

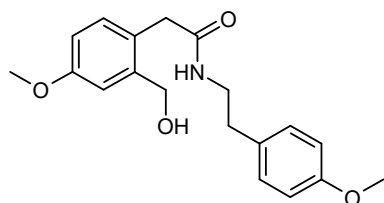


3-Methoxyphenethylamin in 22 mL Xylol unter Argon und Wasserabscheider mit einem CaCl₂-gefüllten Trockenrohr für 12 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen wird das Lösungsmittel abgezogen, es verbleibt ein gelblicher öliger Rückstand. Dieser wird in 11.5 mL

Dichlormethan aufgenommen und unter Rückfluss zum Sieden gebracht. Beim beginnenden Sieden werden langsam 5.5 mL Cyclohexan zugegeben. Es wird bei Raumtemperatur abgekühlt. Es entsteht ein fein weißer Kristallniederschlag.

Ausbeute:	0.34 g (87 %)
Molmasse:	299.37 g/mol

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.12-7.34 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.71-6.74 (m, 2H, 2 x Ar-H), 6.66 (s, 1H, Ar-H), 6.34 (s, br, 1H, OH), 4.61 (s, 2H, Ar-CH₂-OH), 3.75 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.58 (s, 2H, NH-CO-CH₂-Ar), 3.47 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂-NH-CO), 2.69 (t, 2H, J= 6.61 Hz, Ar-CH₂-CH₂-NH), 2.39 (s, 1H, NH).

2-[2-(Hydroxymethyl)-4-methoxyphenyl]-N-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]acetamid **104**

0.8 g (4.4 mmol) 7-Methoxyisochroman-3-on **103** werden in einem Dreihalskolben mit Wasserabscheider in 40 mL Xylol gerührt. Nach Zugabe von 0.7 g (4.9 mmol) 4-Methoxyphenethylamin in 5 mL Xylol wird zum Rückfluss erhitzt. Während der Reaktionszeit von 15 Stunden wird das Reaktionsgemisch mit Argon entgast. Zur Aufarbeitung wird Xylol abdestilliert, der verbleibende dunkle Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit 1 N HCl zweimal geschüttelt. Die organische Phase wird im Anschluss einmal mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wird aus Ethylacetat/Heptan umkristallisiert.

Ausbeute: 0.72 g (50 %), weiß-gelblicher Feststoff

Molmasse: 329.40 g/mol

R_f- Wert: 0.59 (CHCl₃/MeOH 10 %)

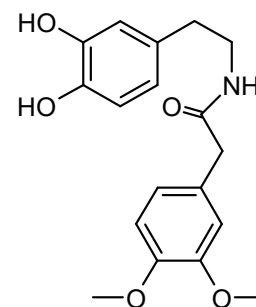
MS (EI, 70 eV): m/z (%): 329 (16, M⁺), 193 (57), 151 (50), 134 (100), 121 (59)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.06-7.08 (d, 1H, J= 8.51 Hz, 1 x Ar-H), 6.91-6.95 (m, 3H, 3 x Ar-H), 6.76-6.78 (m, 3H, 3 x Ar-H), 5.90 (s, br, 1H, NH), 4.5 (s, 2H, Ar-CH₂-OH), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.77 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.48 (s, 2H, NH-CO-CH₂-Ar), 3.39 (dd, 2H, J= 6.23/12.24 Hz, Ar-CH₂-CH₂-NH-CO), 2.65 (t, 2H, J= 6.64 Hz, Ar-CH₂-CH₂-NH).

2.1 Abwandlungen der allgemeinen PhenylacetamidsyntheseN-[2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl](3,4-dimethoxy-phenyl)acetamid **19**

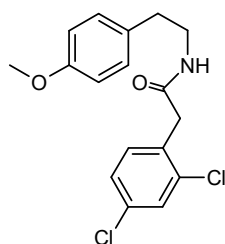
3.3 g (16.8 mmol) Homoveratrumsäure werden in 80 mL Dichlormethan gelöst und in Argonatmosphäre gerührt. Nach Zusatz von 3.0 g (15.8 mmol) Dopamin-Hydrochlorid sowie 4.8 mL (34.8 mmol) Triethylamin, 750 mg (6.1 mmol) DMAP und 118 mg (6.1 mmol) EDC (Hydrochlorid) wird für 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung dreimal mit 1 M HCl und einmal mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird einer Säulenchromatographie an Kieselgel unterworfen.

Ausbeute:	0.84 g (15 %), helles Öl
Molmasse:	331.37 g/mol
R _f - Wert:	0.33 (CHCl ₃ /MeOH 10 %), OP: gelb
MS (ESI):	m/z 332.3 (100, M ⁺ +1)



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.81-6.39 (m, 6H, 6 x Ar-H), 5.53 (t, 1H, J= 5.81 Hz, -CO-NH), 3.86 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.47 (s, 2H, -Ar-CH₂-CO-NH), 3.42-3.37 (dd, 2H, J= 6.64/12.87 Hz, -CH₂-CH₂-NH-CO), 2.58 (t, 2H, J= 6.64 Hz, -Ar-CH₂-CH₂).

2-(2,4-Dichlorophenyl)-N-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]acetamid **89**



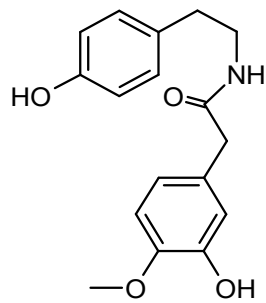
2.0 g (9.8 mmol) 2,4-Dichlorophenylessigsäure werden in 65 mL Dichlormethan gerührt. Es werden 1.4 g (9.6 mmol) 4-Methoxyphenethylamin, 0.4 g (3.6 mmol) DMAP sowie 0.7 g (3.6 mmol) EDC (Hydrochlorid) hinzugefügt und 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch dreimal mit Wasser und einmal mit wässriger gesättigter Kochsalzlösung geschüttelt. Nach Zugabe von wenig Diisopropylether bildet sich ein weiß-gelblicher Niederschlag, der DMAP enthält. Der Niederschlag wird in Chloroform aufgenommen und über eine mit Kieselgel gefüllte Fritte gegeben. Es wird mit Chloroform/Methanol 5-10 % nachgespült. DMAP wird auf dem Kieselgel zurückgehalten.

Ausbeute:	0.8 g (24 %), weiße Kristalle
Molmasse:	338.24 g/mol
R _f - Wert:	0.51 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.37 (s, 1H, 1 x Ar-H), 7.19 (d, 2H, J= 1.25 Hz, 2 x Ar-H), 6.95 (dd, 2H, J= 2.28/8.72 Hz, 2 x Ar-H), 6.75 (dd, 2H, J= 2.08/8.51 Hz, 2 x Ar-H), 5.33 (s, br, 1H, NH), 3.77 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.57 (s, 2H, -Ar-CH₂-CO-NH), 3.41 (dd, 2H, J= 6.85/12.66 Hz, -CH₂-CH₂-NH-CO), 2.66 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -Ar-CH₂-CH₂).

N-[2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl]-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-acetamid **128**

0.2 g (1.1 mmol) Homoisovanillinsäure **14** und 1.2 molare Äquivalente Tyramin (1.3 mmol, 0.18 g) werden in 20 mL DMF gerührt und dabei im Eiswasser auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 0.57 g PyBOP (1.1 mmol) zugegeben und unmittelbar 0.6 mL (3.5 mmol) Hünig-Base hinzugegeben. Es wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird DMF einrotiert, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 M HCl gewaschen. Nach zweifacher Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient CHCl₃ 100 % → CHCl₃/MeOH 98:2) bleibt ein weißes Pulver.



Ausbeute:	0.23 g (70 %)
Molmasse:	301.35 g/mol
R _f - Wert:	0.36 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)
MS (ESI):	m/z 302.08 (100, M ⁺ +1)

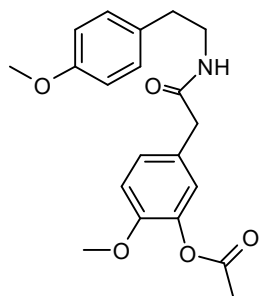
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.81 (dd, 2H, J= 2.15/8.61 Hz, 2 x Ar-**H**), 6.70 (d, 1H, J= 8.22 Hz, 1 x Ar-**H**), 6.65 (s, 1H, 1 x Ar-**H**), 6.63 (dd (teilweise vom Singulett überlagert), 2H, J= 2.15/6.65 Hz, 2 x Ar-**H**), 6.55-6.57 (m, 2H, 2 x Ar-**H**), 5.32 (s, br, 1H, **NH**), 3.83 (s, 3H, Ar-O**CH**₃), 3.37 (s, 2H, -Ar-**CH**₂-CO-NH), 3.32 (dd, 2H, J= 6.65/12.72 Hz, -**CH**₂-**CH**₂-NH-CO), 2.56 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -Ar-**CH**₂-**CH**₂).

3 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Acetylierung hydroxylierter Verbindungen

Nach Lösen bzw. Suspensieren des Phenylacetamids in destilliertem Dichlormethan wird die Reaktionsmischung auf 0 °C (Eisbad) gekühlt. 1.1 molare Äquivalente Triethylamin werden hinzugefügt. Anschließend erfolgt die tropfenweise Zugabe von 1.05 molaren Äquivalenten Acetylchlorid. Dabei ist die Reaktionstemperatur auf unter 10 °C zu halten. Nach der vollständigen Zugabe aller Reagenzien wird das Eisbad entfernt und der Reaktionsansatz insgesamt für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das verbleibende Öl wird in Ethylacetat gelöst, dreimal mit 1 M Salzsäure und zweimal mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird die organische Phase am Rotationsverdampfer eingedunstet und der verbleibende Feststoff mehrere Stunden an der Ölpumpe getrocknet.

Einzelverbindungen**2-(3-Acetoxy-4-methoxyphenyl)-N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid 72**

Synthese mit 2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-N-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid **3a**



(4.5 g, 14.3 mmol), 1.6 g (15.8 mmol) Triethylamin und 1.2 g (15.3 mmol) Acetylchlorid in 20 mL destilliertem Dichlormethan. Der ölige Rückstand wird in 15 mL Ethylacetat gelöst und dreimal mit 5 mL 1 M Salzsäure sowie zweimal mit 5 mL gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen. Ausbeute: 4.4 g (87 %) **72** (heller Feststoff).

Ausbeute:	4.4 g (87 %)
Molmasse:	357.41 g/mol
R _f - Wert:	0.54 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)
Schmelzpunkt:	68-72 °C
MS (ESI):	m/z 358.10 (100, M ⁺ +1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.93 (dd, J = 2.28/8.30 Hz, 2H), 6.75 (dd, J = 1.87/8.51 Hz, 2H), 6.72-6.60 (m, 3H), 5.46 (s, br, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 3.42-3.37 (dd, J = 6.02/12.66 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 6.85 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H)

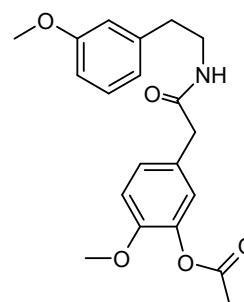
Elementaranalyse:

berechnet für C ₂₀ H ₂₃ NO ₅ :	C(%)= 67.21	H(%)= 6.49	N(%)= 3.92
gefunden:	C(%)= 67.14	H(%)= 6.25	N(%)= 3.58.

2-(3-Acetoxy-4-methoxyphenyl)-N-[2-(3-methoxyphenyl)-ethyl]-acetamid 42

5.5 g (17.5 mmol) **3h**, 1.4 g (18.3 mmol) CH₃COCl und 1.9 g (19.2 mmol) Triethylamin in 40 mL trockenem Dichlormethan ergeben 4.6 g **42**.

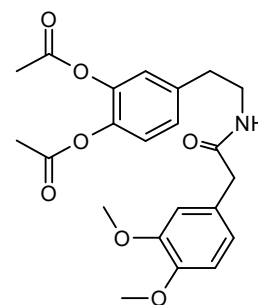
Ausbeute:	4.6 g (74 %), heller Feststoff
Molmasse:	357.41 g/mol
R _f - Wert:	0.54 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.11-7.15 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.62-6.97 (m, 6H, 6 x Ar-H), 5.51 (s, br, 1H, -CO-NH), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.74 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.42 (s, 2H, -CO-CH₂-Ar), 3.40-3.43 (dd, liegt unter Singulett, 2H, -NH-CH₂-CH₂), 2.69 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -CH₂-CH₂-Ar), 2.28 (s, 3H, -O-CO-CH₃).

N-[2-(3,4-Diacetoxyphenyl)ethyl](3,4-dimethoxyphenyl)-acetamid **20**

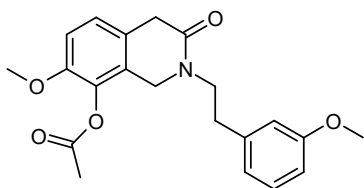
795 mg (2.4 mmol) **19** werden in einem Dreihalskolben mit Thermometer, Rückflusskühler und Septum in 10 mL destilliertem Dichlormethan gerührt. Nach Herunterkühlen der Mischung auf 0 °C werden durch das Septum 2.2 molare Äquivalente (0.53 g) Triethylamin und 2.1 molare Äquivalente (0.40 g) Acetylchlorid in 5 mL Dichlormethan über einen Tropftrichter hinzugegeben. Nach ca. 4 h ist die Reaktion beendet, wobei diese mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt wird.



Nach Beendigung der Reaktion wird der entstandene Feststoff von der Lösung abgetrennt und das Filtrat eingengt. Das verbleibende Öl wird in 15 mL Ethylacetat gelöst, dreimal mit 5 mL 1 M HCl und zweimal mit 5 mL gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt und der verbleibende Feststoff mehrere Stunden an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 0.65 g (65 %)
Molmasse: 415.45 g/mol
R_f- Wert: 0.64 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %), OP: gelb

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 6.67-7.03 (m, 6H, 6 x Ar-H), 5.46 (t, 1H, J= 6.02 Hz, -CO-NH), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.81 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.45 (s, 2H, -Ar-CH₂-CO-NH), 3.40-3.45 (dd, 2H, J= 6.43/13.07 Hz, -CH₂-CH₂-NH-CO), 2.72 (t, 2H, J= 6.85 Hz, -Ar-CH₂-CH₂), 2.26 (s, 3H, -O-CO-CH₃), 2.25 (s, 3H, -O-CO-CH₃).

8-Acetoxy-7-methoxy-2-[2-(3-methoxyphenyl)-ethyl]-1,4-dihydro-2H-isochinolin-3-on **17**

0.65 g (1.99 mmol) **16** werden in einem Dreihalskolben mit Thermometer, Rückflusskühler und Septum in 10 mL destilliertem Dichlormethan gerührt. Nach Herunterkühlen der Mischung auf 0 °C werden durch das Septum 1.1 molare

Äquivalente (0.22 g) Triethylamin und 1.05 molare Äquivalente (0.17 g) Acetylchlorid in 10 mL Dichlormethan über einen Tropftrichter hinzugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wird der entstandene Feststoff von der Lösung abgetrennt und das Filtrat eingengt. Das verbleibende Öl wird in 10 mL Ethylacetat gelöst, dreimal mit 3 mL 1 M HCl und zweimal mit 3 mL gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt und der verbleibende Feststoff mehrere Stunden an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute:	0.52 g (71 %), weißer Feststoff
Molmasse:	369.42 g/mol
R _f - Wert:	0.79 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)
Schmelzpunkt:	132-136 °C
MS (ESI):	m/z 368.9 (100, M ⁺ -1); 392.2 (100, M ⁺ +Na)
EI-MS (70 eV):	m/z (%):369 (49, M ⁺), 327 (6), 220 (67), 193 (100), 178 (59)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.15-7.19 (m, 1H Ar-**H**), 6.71-6.98 (m, 5H, 5 x Ar-**H**), 4.15 (s, 2H, -Ar-CH₂-NR-CO), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.70 (t (überlagert vom Signal der Methoxygruppe), 2H, -CH₂-CH₂-NR-CO), 3.72 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.56 (s, 2H, -Ar-CH₂-CO), 2.86 (t, 2H, J= 7.26 Hz, -Ar-CH₂-CH₂), 2.29 (m, 3H, Ar-O-CO-CH₃).

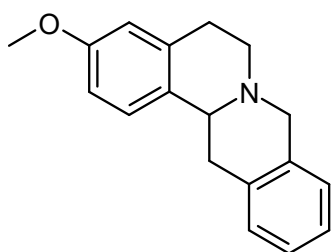
4 Synthese von Di- und Tetrahydroisochinolininen via Bischler-Napieralski-Reaktion4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Edukte mit aktivierten A-Aromaten

Die entsprechenden Phenylacetamide liegen je nach ihren Lösungseigenschaften entweder gelöst oder suspendiert in Toluol vor. In Argonatmosphäre werden 10 molare Äquivalente frisch destilliertes Phosphorylchlorid zugefügt und das Gemisch fünf bis sechs Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung unter Vakuum destilliert, bis ein dickes Öl verbleibt. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen und unter Eiskühlung portionsweise mit Natriumborhydrid (25 molare Äquivalente) über eine Stunde versetzt.

Danach wird eine Stunde zum Rückfluss erhitzt, um gegebenenfalls eine zuvor eingeführte Schutzgruppe der Phenolfunktion abzuspalten. Andernfalls wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das gesamte Gemisch wird auf Eis gegossen und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über Natrium- oder Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Anschließend erfolgt entweder eine Reinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{Methanol } 95:5$) oder es wird umkristallisiert.

Einzelverbindungen

3-Methoxyberbin 27



170 mg (5.69 mmol) 2-(2-Hydroxymethylphenyl)-*N*-[2-(3-methoxyphenethyl)]-acetamid werden in 20 mL trockenem Toluol gelöst und mit einem molaren Überschuss (6.54 mmol) frisch destilliertem Phosphorylchlorid versetzt. Unter Argon wird die Mischung 2-3 h lang unter Rückfluss gekocht. Der

Reaktionsablauf wird über DC kontrolliert. Danach wird die braune Mischung abgekühlt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt. Der ölige Rückstand wird in 39 mL vorgetrocknetem Methanol gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Portionsweise werden innerhalb einer Stunde unter weiterer Kühlung 4 bis 7 g Natriumborhydrid zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Mischung wird anschließend auf 70 mL Eiswasser gegossen und dreimal mit 70 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird abgetrennt, fünfmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Es bleibt ein gelblich fester Rückstand, welcher aus 2 mL Methanol umkristallisiert wird.

Ausbeute: 0.55 g (32 %), weiß-gelblicher Feststoff

Molmasse: 265.36 g/mol

Schmelzpunkt: 95-96 °C Lit. 90-92 °C [Meyer, 2008]

¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.23 (s, 1H, Ar-H), 7.15 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.07 (m, 1H, Ar-H), 6.77 (dd, 1H, $J = 2.51/8.60$ Hz, Ar-H), 6.65 (d, $J = 2.51$ Hz, 1H, Ar-H), 4.10 (d, 1H, $J = 14.90$ Hz, N-CH₂-Ar), 3.84 (m, 1H, N-CH₂-Ar), 3.80 (m, 1H, Ar-CH-CH₂), 3.78 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.25-3.37 (m, 3H, Ar-CH₂-CH₂-N, Ar-CH-CH₂), 2.78-2.98 (m, 3H, Ar-CH₂-CH₂-N, Ar-CH-CH₂)

Elementaranalyse:

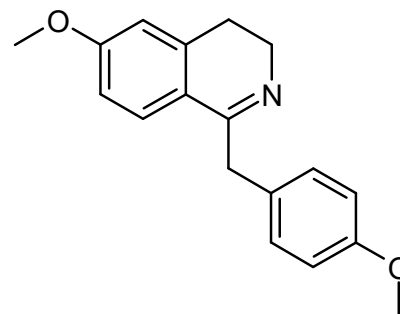
berechnet für C ₁₈ H ₁₉ NO _x CH ₃ OH:	C(%)= 72.69	H(%)= 6.44	N(%)= 4.71
gefunden:	C(%)= 73.17	H(%)= 7.07	N(%)= 4.27.

1-(4-Methoxybenzyl)-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 23a

2.5 g (8.4 mmol) *N*-[2-(3-Methoxyphenyl)ethyl]-2-(4-methoxyphenyl)-acetamid **31** werden in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler eingewogen und mit 70 mL Toluol versetzt. In Argonatmosphäre wird gerührt. Durch ein Septum werden 8.4 g (54.8 mmol) POCl₃ hinzugefügt und das Reaktionsgemisch zum Rückfluss erhitzt. Während des Erhitzens erfolgt die portionsweise Zugabe von 12 g (84.5 mmol) P₂O₅. Die Reaktion wird vier Stunden am Kochen gehalten. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz auf 200 g Eis gegossen, der pH-Wert der wässrigen Phase mit 20 %iger NaOH auf über 10 angehoben und dreimal mit 150 mL Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Abzug des Lösungsmittels wird der Rückstand in 55 mL trockenem Methanol aufgenommen und nachdem die Reaktionsmischung auf 0 °C abgekühlt wurde, wird mit 8 g (210 mmol) NaBH₄ versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Extraktion des Rohproduktes erfolgt mit Dichlormethan nachdem das Gemisch auf Eis gegossen wurde. Der nach Abzug des Extraktionsmittels verbleibende Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient CHCl₃ → CHCl₃/Methanol 95:5) gereinigt und dabei das Di- und Tetrahydroisochinolin fraktioniert.

1-(4-Methoxybenzyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisochinolin 23

Molmasse:	281.36 g/mol
R _f - Wert:	0.79 (CHCl ₃ /MeOH 15 %)



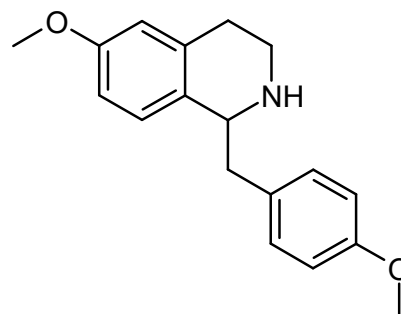
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.38 (d, 1H, J= 8.51 Hz, 1 x Ar-H), 7.18 (dd, 2H, J= 2.08/8.72 Hz, 2 x Ar-H), 6.78 (dd, 2H, J= 2.09/8.72 Hz, 2 x Ar-H), 6.68 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.66 (s, 1H, 1 x Ar-H), 3.96 (s, 2H, -Ar-CH₂-C=N), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.73 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.70 (t, 2H, J= 7.47 Hz, -Ar-CH₂-CH₂-N), 2.67 (t, 2H, J= 7.26 Hz, -Ar-CH₂-CH₂-N).

1-(4-Methoxybenzyl)-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **23a**

Ausbeute: 0.89 g (37 %),
weiß-gelblicher Feststoff

Molmasse: 283.37 g/mol

R_f- Wert: 0.61 (CHCl₃/MeOH 15 %)



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.15 (d, 2H, J= 8.51 Hz, 2 x Ar-H), 7.10 (d, 1H, J= 8.51 Hz, 1 x Ar-H), 6.85 (d, 2H, J= 8.51 Hz, 2 x Ar-H), 6.71-6.73 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.62 (s, 1H, 1 x Ar-H), 4.11-4.15 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.77 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.15-3.20 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂), 2.76-2.92 (m, 4H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂).

1-(3-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **57**

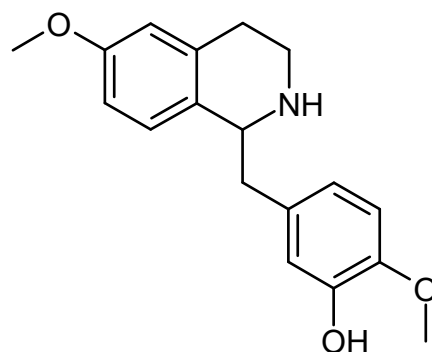
1.8 g (5.0 mmol) **3h** 7.7 g (50.0 mmol) POCl₃ und 1.9 g (50.2 mmol) NaBH₄ ergeben nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient CHCl₃ → CHCl₃/Methanol 95:5) 161 mg (0.5 mmol) **57** als beigefarbenen Feststoff. Das gesamte Syntheseprodukt wird zu **60** umgesetzt.

Ausbeute: 161 mg (10 %), beiger Feststoff

Molmasse: 299.37 g/mol

R_f- Wert: 0.41 (CHCl₃/MeOH 10 %)

MS (ESI): m/z 300.40 (100, M⁺+1)

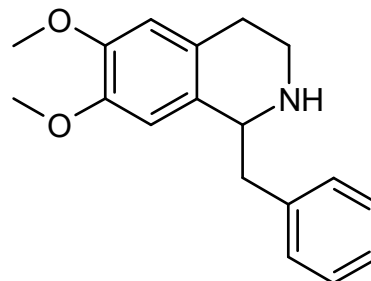


¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.06 (d, 1H, J= 8.51 Hz, 1 x Ar-H), 6.58-6.76 (m, 5H, 5 x Ar-H), 5.29 (s, br, 1H, NH), 4.10-4.13 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.81 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.73 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.09-3.16 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH), 2.75-2.88 (m, 4H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂).

6,7-Dimethoxy-1-(phenylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 115

3.0 g (10 mmol) **107**, 15.3 g (100 mmol) POCl₃ sowie 5.7 g (151 mmol) NaBH₄ ergeben nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient CHCl₃ → CHCl₃/Methanol 95:5) 2.3 g **115**.

Ausbeute: 2.3 g (80 %)
Molmasse: 283.37 g/mol
R_f- Wert: 0.44 (CHCl₃/MeOH 10 %)
MS (ESI): m/z 284.18 (100, M⁺+1)

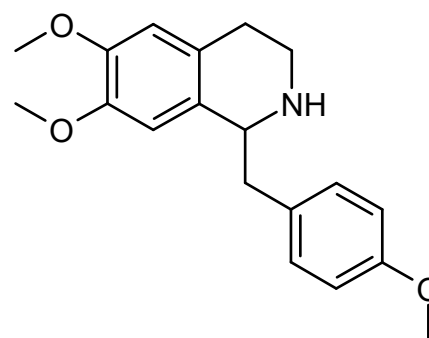


¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.21-7.29 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.56 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.44 (s, 1H, 1 x Ar-H), 4.22-4.25 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.82 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.70 (s, 3H, Ar-OCH₃), 2.97-3.24 (m, 6H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂).

6,7-Dimethoxy-1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 120

3.0 g (9.1 mmol) *N*-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]-2-(4-methoxybenzyl)-acetamid (Verbindung aus Meyer, 2008), 14 g (91.3 mmol) POCl₃ sowie 4.5 g (170 mmol) NaBH₄ ergeben nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient CHCl₃ → CHCl₃/Methanol 95:5) 2.2 g **120** als Öl.

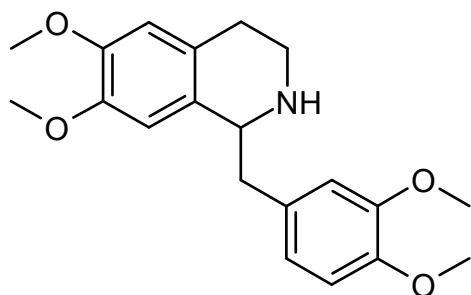
Ausbeute: 2.2 g (77 %), Öl
Molmasse: 313.40 g/mol
R_f- Wert: 0.49 (CHCl₃/MeOH 10 %)
MS (ESI): m/z 314.1 (100, M⁺+1)



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.12 (dd, 2H, J= 2.08/8.72 Hz, 2 x Ar-H), 6.82 (dd, 2H, J= 2.08/8.72 Hz, 2 x Ar-H), 6.56 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.51 (s, 1H, 1 x Ar-H), 4.14-4.17 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.83 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.77 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.75 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.20-3.23 (m, 2H), 2.92-2.98 (m, 2H), 2.74-2.76 (m, 2H).

6,7-Dimethoxy-1-(3,4-dimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 110

In einem Zweihalskolben wird 3,4-Dimethoxyphenyl-*N*-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethyl]-acetamid (3.0 g, 8.4 mmol, Verbindung von Katja Laqua, AK Imming, zur Verfügung gestellt) in 70 ml Toluol gelöst und mit Argon geflutet. Anschließend erfolgt die tropfenweise Zugabe von frisch destilliertem POCl₃ (7.6 ml, 83 mmol). Das Gemisch wird langsam unter Rückfluss erhitzt. In der Hitze erfolgt die portionsweise Zugabe von P₂O₅ (12 g, 83.9 mmol), die Suspension wird für weitere 4 h unter Rückfluss erhitzt wobei sich eine rötlich braune Kruste bildet. Das Gemisch wird anschließend auf Eis gegossen und mit 20%iger NaOH alkalisiert (pH = 14). Das Produkt wird mittels Dichlormethan extrahiert, wobei gegebenenfalls eine erneute pH-Einstellung erfolgen muss. Die organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und nur kurz über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Vakuumrotationsverdampfer verbleibt ein ölig-gelber Rückstand der sogleich mit 60 mL MeOH langsam wieder in Lösung gebracht wird. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und NaBH₄ (7.9 g, 209 mmol) portionsweise ergänzt. Die Suspension wird langsam auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend erfolgt die Zerstörung des überschüssigen NaBH₄, in dem das Gemisch auf Eiswasser gegossen wird. Das Produkt wird nun mit Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Der nach Abzug des Extraktionsmittels verbleibende Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient CHCl₃ → CHCl₃/Methanol 95:5) gereinigt. (350 mg, 12 %, brauner Sirup).



Ausbeute:	2.2 g (78 %), Öl
Molmasse:	343.42 g/mol
R _f - Wert:	0.45 (CHCl ₃ /MeOH 15 %)
MS (ESI):	m/z 344.1 (100, M ⁺ +1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 6.79 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.76 (d, 1H, 1 x Ar-H), 6.73-6.74 (m, 2H, 2 x Ar-H), 6.56 (s, 1H, 1 x Ar-H) 4.22 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.82-3.85 (4 x s, 12H, 4 x Ar-OCH₃), 3.15-3.21 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar), 2.98-3.13 (m, 2H), 2.74-2.76 (m, 2H).

4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Edukte mit nicht aktivierten A-Aromaten

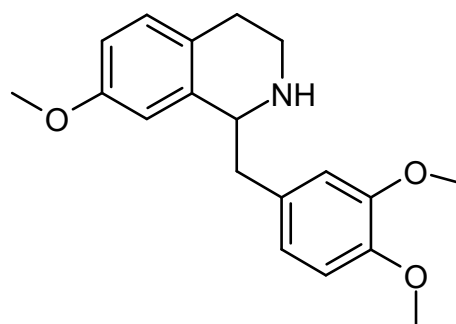
Die entsprechenden Phenylacetamide liegen je nach ihren Lösungseigenschaften entweder gelöst oder suspendiert in Toluol vor. In Argonatmosphäre werden 6 molare Äquivalente frisch destilliertes Phosphorylchlorid zugefügt und während des Erhitzens portionsweise 10 molare Äquivalente Phosphorpentoxid zugegeben. Das Gemisch wird fünf bis sechs Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Eis gegossen und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Natrium- oder Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen und unter Eiskühlung portionsweise mit Natriumborhydrid (25 molare Äquivalente) über eine Stunde versetzt. Danach wird eine Stunde zum Rückfluss erhitzt, um gegebenenfalls eine zuvor eingeführte Schutzgruppe der Phenolfunktion abzuspalten. Andernfalls wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das gesamte Gemisch wird auf Eis gegossen, mit 20 %iger Natriumhydroxidlösung alkalisiert und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über Natrium- oder Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Anschließend erfolgt entweder eine Reinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{Methanol } 95:5$) oder es wird umkristallisiert.

Einzelverbindungen

1-(3,4-Dimethoxybenzyl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **112**

2.5 g (7.6 mmol) **3k**, 11.4 g (75 mmol) POCl_3 , 10.8 g (76 mmol) P_2O_5 sowie 7.2 g (190 mmol) NaBH_4 ergeben nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3/\text{Methanol } 95:5 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{Methanol } 97:3$) 0.2 g **112** als Öl.

Ausbeute: 0.2 g (10 %), beiger Feststoff
Molmasse: 313.40 g/mol
 R_f - Wert: 0.57 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 15 \%$)

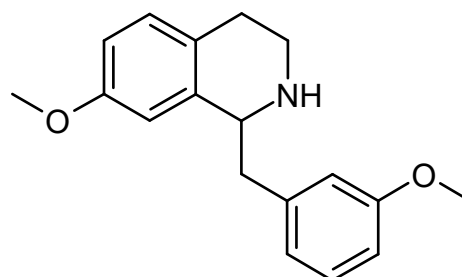


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 6.99 (d, $J = 8.30$ Hz, 1H, 1 x Ar-H), 6.69-6.80 (m, 5H, 5 x Ar-H), 4.14-4.20 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.83 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.13-3.24 (m, 2H), 2.82-2.91 (m, 2H), 2.68-2.74 (m, 2H).

1-(3-Methoxybenzyl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 63

2.3 g (7.7 mmol) **3b**, 9.5 g (62 mmol) POCl_3 , 11 g (78 mmol) P_2O_5 sowie 7.3 g (192 mmol) NaBH_4 ergeben nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ 95:5) 0.2 g **63** als Öl.

Ausbeute: 0.2 g (10 %), Öl
Molmasse: 283.37 g/mol
 R_f - Wert: 0.49 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)
MS (ESI): m/z 284.30 (100, M^{+1})

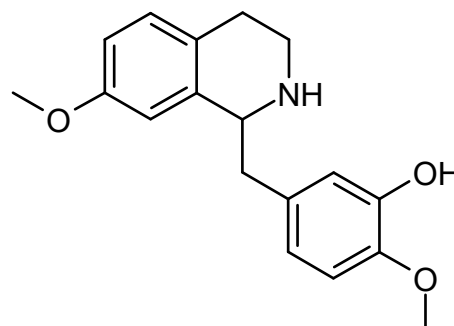


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.00 (d, $J = 8.51$ Hz, 1H, 1 x Ar-H), 6.72-6.83 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.55 (s, 1H, 1 x Ar-H), 4.36-4.40 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.68 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.04-3.26 (m, 4H), 2.83-2.86 (m, 2H).

1-(3-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 73

2.8 g (7.8 mmol) **3a**, 7.2 g (47 mmol) POCl_3 , 11 g (77.5 mmol) P_2O_5 sowie 7.4 g (196 mmol) NaBH_4 ergeben nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ 95:5) 120 mg **73** als gelblichen Feststoff.

Ausbeute: 0.12 g (5 %),
gelblicher Feststoff
Molmasse: 299.37 g/mol
 R_f - Wert: 0.24 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)
MS (ESI): m/z 300.20 (100, M^{+1})

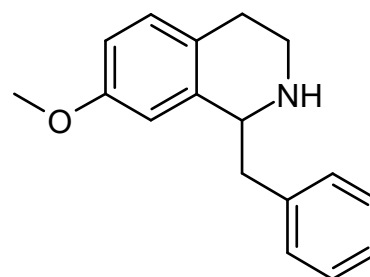


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.00 (d, $J= 8.51$ Hz, 1H, 1 x Ar-H), 6.72-6.83 (m, 4H, 4 x Ar-H), 6.62-6.63 (m, 2H, 2 x Ar-H), 5.37 (s, br, -NH), 4.25-4.29 (m, 1H, -Ar-CH-CH₂), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.72 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.13-3.25 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH), 2.96-3.02 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar), 2.81-2.84 (m, 2H, -Ar-CH₂-CH₂).

7-Methoxy-1-(phenylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 138

3 g (11.2 mmol) **3p**, 8.4 g (54.8 mmol) POCl_3 , 12.4 g (87.4 mmol) P_2O_5 sowie 4.6 g (121.6 mmol) NaBH_4 ergeben nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ 95:5) 0.85 g **138** als öligen Rückstand.

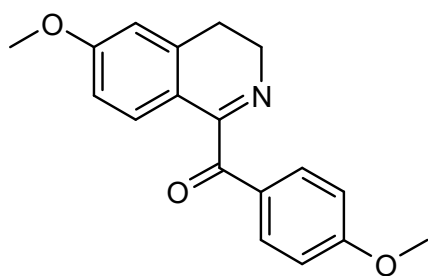
Ausbeute: 0.85 g (30 %), Öl
 Molmasse: 253.35 g/mol
 R_f - Wert: 0.48 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)
 MS (ESI): m/z 254.11 (100, $\text{M}^+ + 1$)



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.17-7.28 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.94 (d, $J= 8.41$ Hz, 1H, 1 x Ar-H), 6.62-6.68 (m, 2H, 2 x Ar-H), 4.13-4.17 (m, 1H, -Ar-CH-CH₂), 3.68 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.11-3.19 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH), 2.83-3.93 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar), 2.67-2.72 (m, 2H, -Ar-CH₂-CH₂).

4.3 Sonstige Verbindungen via Bischler-Napieralski-Reaktion

1-(4-Methoxybenzoyl)-6-methoxy-3,4-dihydroisochinolin 18



2.5 g (8.4 mmol) *N*-[2-(3-Methoxyphenyl)ethyl]-(4-methoxyphenyl)-acetamid **3l** werden in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler eingewogen und mit 70 mL Toluol versetzt. In Argonatmosphäre wird gerührt. Durch ein Septum werden 8.4 g (54.8 mmol) POCl_3 hinzugefügt und das Reaktionsgemisch zum Rückfluss erhitzt. Während des Erhitzens erfolgt die portionsweise Zugabe von 12 g (84.5 mmol) P_2O_5 . Die Reaktion wird vier Stunden am Kochen gehalten. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz

auf 200 g Eis gegossen, der pH-Wert der wässrigen Phase mit 20 %iger NaOH auf über 10 angehoben und dreimal mit 150 mL Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der feste Rückstand aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 0.80 g (32 %), weiße Kristalle
 Molmasse: 295.34 g/mol
 R_f- Wert: 0.74 (CHCl₃/MeOH 10 %)
 MS (FT): m/z 296.13 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.95 (d, 2H, J= 8.72 Hz, 2 x Ar-H), 7.32 (d, 1H, J= 8.51 Hz, 1 x Ar-H), 6.93 (d, 2H, J= 8.72 Hz, 2 x Ar-H), 6.78 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.72-6.75 (m, 1H, 1 x Ar-H), 3.95 (t, 2H, J= 7.68 Hz, -Ar-CH₂-CH₂-N), 3.86 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH₃), 2.93 (t, 2H, J= 7.68 Hz, -Ar-CH₂-CH₂-N)

¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 192.3, 165.3, 164.3, 162.2, 139.6, 132.7, 128.9, 128.4, 120.0, 113.9, 113.5, 112.2, 55.5, 55.4, 46.7, 26.2

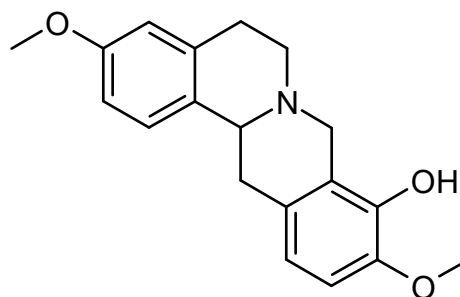
Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₈ H ₁₇ NO ₃ :	C(%)= 73.20	H(%)= 5.80	N(%)= 4.74
gefunden:	C(%)= 73.46	H(%)= 5.62	N(%)= 4.66.

3,10-Dimethoxy-9-Hydroxyberbin 141

1.1 g (3.0 mmol) **17**, 1.0 g (6.6 mmol) POCl₃ sowie 3 g (81.3 mmol) NaBH₄ ergeben nach zweifacher Säulenchromatographie an Kieselgel (isokratisch, CHCl₃) 0.24 g **141** als Öl.

Ausbeute: 0.24 g (26 %), Öl
 Molmasse: 311.38 g/mol
 R_f- Wert: 0.65 (CHCl₃/MeOH 10 %)
 MS (ESI): m/z 312.28 (100, M⁺+1)

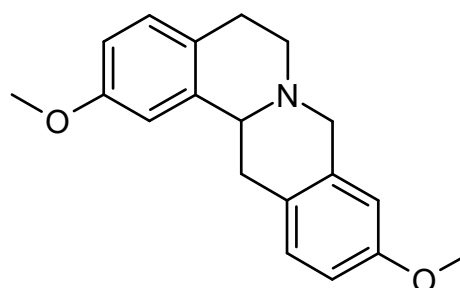


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.17 (d, 1H, $J= 8.61$ Hz, 1 x Ar-H), 6.66-6.80 (m, 4H, 4 x Ar-H), 5.72 (s, br, 1H, OH), 4.23 (d, $J= 15.45$ Hz, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.87 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.54-3.57 (m, 2H), 3.20-3.31 (m, 3H), 2.66-2.86 (m, 3H).

2,10-Dimethoxyberbin 136

0.4 g (1.2 mmol) **104**, 0.34 g (2.2 mmol) POCl_3 , 1.8 g (12.7 mmol) P_2O_5 sowie 1.1 g (30 mmol) NaBH_4 ergeben nach Säulenchromatographie an Kieselgel (isokratisch, CHCl_3) 23 mg **136** als gelblichen Feststoff. Es wird nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (4.2) verfahren.

Ausbeute: 23 mg (7 %), gelber Feststoff
 Molmasse: 295.38 g/mol
 R_f - Wert: 0.67 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)
 0.72 (Ethylacetat/TBME 20 %)
 MS (ESI): m/z 296.15 (100, $\text{M}^+ + 1$)



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 6.98-7.02 (m, 2H, 2 x Ar-H), 6.73 (d, 1H, $J= 2.54$ Hz, 1 x Ar-H), 6.67-6.71 (m, 2H, 2 x Ar-H), 6.55 (d, $J= 2.74$ Hz, 1H, OH), 3.92 (d, $J= 15.06$ Hz, 1H, -N-CH₂-Ar), 3.75 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.72 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.58-3.62 (m, 1H), 3.20-3.25 (dd, $J= 3.91/16.04$ Hz, 1H), 3.04-3.13 (m, 2H), 2.81-2.85 (m, 2H), 2.53-2.70 (m, 3H)

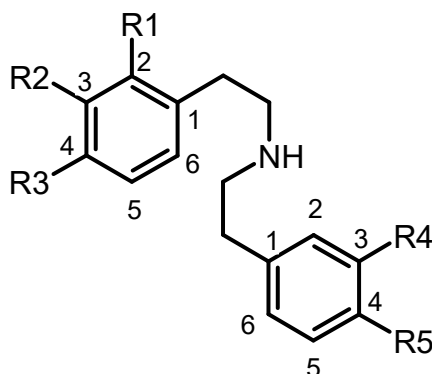
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ [ppm]: 157.97, 157.82, 138.76, 129.72, 129.68, 126.52, 126.39, 112.74, 112.13, 110.88, 110.84, 60.11, 58.63, 55.33, 55.29, 51.27, 35.68, 28.53.

5 Reduktion von Amiden

5.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Reduktion von Amiden mit Lithiumaluminiumhydrid

Für die Reduktion von Amiden wird die entsprechende Substanz, abhängig von ihren Lösungseigenschaften, entweder in trockenem THF oder trockenem tert. Butylmethylether (TBME) gelöst, in Argonatmosphäre gerührt und auf 0 °C gekühlt. Die 2.5- bis 5-fache molare Menge LiAlH_4 wird in einer Portion hinzugefügt. Nachdem der Reaktionsansatz Raumtemperatur erreicht hat wird für 14 bis 16 Stunden gerührt. Anschließend wird der Ansatz wieder auf 0 °C gekühlt und so viel Wasser hinzugefügt bis kein Entweichen von Wasserstoff

mehr feststellbar ist. Der Feststoff wird separiert und fünfmal mit einem Lösungsmittelgemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 9:1 extrahiert. Die flüssige Phase wird ebenso behandelt. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Ein nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibender öliger Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{Methanol } 97:3$) gereinigt.



Einzelverbindungen

[2-(3-Methoxyphenyl)ethyl]-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]amine **4b**

Amid **3b** (3.3 g, 10.9 mmol), gelöst in 50 mL trockenem TBME, und LiAlH_4 (0.6 g, 16.4 mmol) ergeben 0.88 g **4b** (26 %) als weiße Kristalle.

Ausbeute:	0.88 g (26 %)
Molmasse:	321.85 g/mol (Hydrochlorid)
R_f - Wert:	0.40 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 10 \%$)
MS (ESI):	m/z 286.1 (100, M^{+1})

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ [ppm]: 7.21 (t, $J=7.68$ Hz, 1H), 6.91 (dd, $J=2.08/8.72$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J=6.02$ Hz, 1H), 6.75 (dd, $J=2.08/8.72$ Hz, 2H), 6.78-6.68 (m, 2H), 3.77 (s, 6H), 2.98-2.86 (m, 8H).

(2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-ethyl)[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]amine **4c**

1.7 g (5.5 mmol) **3c**, gelöst in 50 mL getrocknetem TBME, und 0.3 g LiAlH_4 (9.1 mmol) ergeben 0.87 g **4c** (47 %). Weiße Kristalle.

Ausbeute:	0.87 g (47 %)
Molmasse:	335.83 g/mol (Hydrochlorid)
R_f - Wert:	0.44 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 10 \%$)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.19 (dd, J= 1.56/8.61 Hz, 2H), 6.90 (dd, J= 1.56/8.61 Hz, 2H), 6.79-6.76 (m, 2H), 6.73 (d, J= 6.65 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.25-3.20 (m, 4H), 2.95-2.89 (m, 4H).

2-Methoxy-4-{2-[2-(4-methoxyphenyl)ethylamino]ethyl}phenol **4d**

Amid **3d** (1.6 g, 5.2 mmol), gelöst in 100 mL trockenem THF, und LiAlH₄ (0.19 g, 5.0 mmol) ergeben 0.40 g **4d** (23 %) als weiße Kristalle.

Ausbeute: 0.40 g (23 %)
Molmasse: 337.85 g/mol (Hydrochlorid)
R_f- Wert: 0.23 (CHCl₃/MeOH 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.03 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.75 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.71-6.67 (m, 2H), 6.56 (d, J=6.65 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.06-2.86 (m, 8H).

5-{2-[2-(4-Fluorophenyl)ethylamino]ethyl}-2-methoxyphenol **4e**

Amid **3e** (3.1 g, 10.3 mmol), gelöst in 50 mL trockenem THF, und LiAlH₄ (0.7 g, 17.0 mmol) ergeben 0.80 g **4e** (24 %) als weiße Kristalle.

Diese Verbindung wurde für den folgenden synthetischen Schritt ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 0.80 g (24 %)
Molmasse: 325.81 g/mol (Hydrochlorid)
R_f- Wert: 0.26 (CHCl₃/MeOH 10 %)

5-{2-[2-(4-Chlorophenyl)ethylamino]ethyl}-2-methoxyphenol **4f**

1.4 g (4.3 mmol) **3f**, gelöst in 50 mL trockenem TBME, und 1.0 g LiAlH₄ (26.4 mmol) ergeben 0.42 g **4f** (29 %) als weiße Kristalle. Diese Verbindung wurde für den folgenden synthetischen Schritt ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 0.42 g (29 %)
Molmasse: 342.27 g/mol (Hydrochlorid)
R_f- Wert: 0.49 (CHCl₃/MeOH 10 %)

2-Methoxy-5-{2-[2-(2-methoxyphenyl)ethylamino]ethyl}phenol **4g**

Amid **3g** (2.4 g, 6.7 mmol), gelöst in 50 mL getrocknetem TBME, und LiAlH₄ (0.4 g, 11.1 mmol) ergeben 0.37 g **4g** (18 %). Öliges Rückstand.

Ausbeute: 0.37 g (18 %)
Molmasse: 301.39 g/mol
R_f- Wert: 0.15 (CHCl₃/MeOH 10 %)
MS (ESI): m/z 302.1 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.16 (t, J=7.82 Hz, 1H), 7.08 (d, J=7.04 Hz, 1H), 6.85-6.71 (m, 4H), 6.64 (d, J=7.82 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 2.98-2.80 (m, 8H).

2-Methoxy-5-{2-[2-(3-methoxyphenyl)ethylamino]ethyl}phenol **4h**

Amid **3h** (0.6 g, 2.0 mmol), gelöst in 50 mL getrocknetem TBME, und LiAlH₄ (0.3 g, 8.7 mmol) ergeben 81 mg **4h** (14 %). Weiße Kristalle.

Diese Verbindung wurde für den folgenden synthetischen Schritt ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 81 mg (14 %)
Molmasse: 337.85 g/mol (Hydrochlorid)
R_f- Wert: 0.50 (CHCl₃/MeOH 10 %)

5-{2-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamino]ethyl}-2-methoxyphenol **4i**

1.4 g (4.1 mmol) **3i**, gelöst in 50 mL trockenem TBME, und 0.3 g LiAlH₄ (6.8 mmol) ergeben 0.21 g **4i** (14%) als weiße Kristalle.

Ausbeute: 0.21 g (24 %)
Molmasse: 367.88 g/mol (Hydrochlorid)
R_f- Wert: 0.20 (CHCl₃/MeOH 10 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.80–6.61 (m, 6H), 3.85 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.082 (s, 3H), 3.50 (s, 2H), 3.22–3.13 (m, 8H).

[2-(3-Methoxyphenyl)ethyl]phenethylamine 4j

Amid **3j** (2.2 g, 8.3 mmol), gelöst in 50 mL trockenem TBME, und LiAlH₄ (0.5 g, 12.5 mmol) ergeben 0.46 g **4j** (19 %) als weiße Kristalle.

Ausbeute: 0.46 g (19 %)
Molmasse: 291.82 g/mol (Hydrochlorid)
R_f- Wert: 0.39 (CHCl₃/MeOH 10 %)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.36-7.24 (m, 6H), 6.89-6.83 (m, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.35-3.26 (m, 4H), 3.05-2.97 (m, 4H).

[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-amine 4k

Amid **3k** (4.0 g, 12.2 mmol), gelöst in 30 mL trockenem TBME, und LiAlH₄ (1.2 g, 30.5 mmol) ergeben 1.7 g **4k** (44 %) als Öl.

Ausbeute: 1.7 g (44 %)
Molmasse: 315.42 g/mol
R_f- Wert: 0.34 (CHCl₃/MeOH 10 %)
MS (ESI): m/z 316.1 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ =7.03 (dd, J = 2.08/8.72 Hz, 2H), 6.78 (dd, J = 2.08 /8.51 Hz, 2H), 6.76-6.66 (m, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 2.89-2.84 (m, 4H), 2.77-2.71 (m, 4H).

5.2 Reduktion von Amiden unter Verwendung von POCl₃ und NaBH₄

2-Methoxy-5-(2-{[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]amino}ethyl)phenol **4a**

Das Amid **3a** (4.4 g, 12.3 mmol) wird in trockenem Toluol gelöst und unter Argon gerührt. Während des Erhitzens zum Rückfluss werden 19.0 g (124 mmol) frisch destilliertes POCl₃ hinzugefügt. Nach 3.5 h wird das Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende ölige Rückstand in 50 mL trockenem Methanol aufgenommen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 0 °C abgekühlt und 122 mmol NaBH₄ in mehreren Portionen innerhalb von einer Stunde zugefügt. Anschließend wird für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird in Wasser gegossen und mit Dichlormethan extrahiert (3 x 50 mL). Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibt ein öliges Rückstand, welcher durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient CHCl₃ 100 % → CHCl₃/MeOH 95:5) gereinigt wird.

Ausbeute: 0.93 g (25 %), Öl
Molmasse: 301.39 g/mol
R_f- Wert: 0.44 (CHCl₃/MeOH 10 %)
MS (ESI): m/z 302.1 (100, M⁺+1)

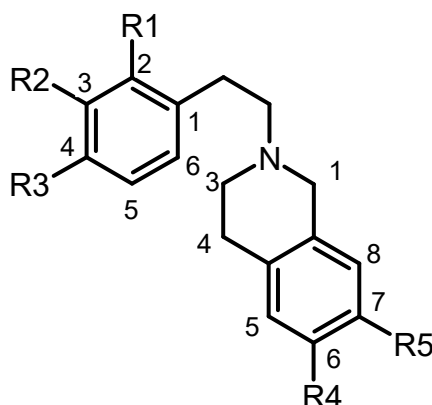
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm]: 7.03 (dd, J = 2.08/8.55 Hz, 2H), 6.77 (dd, J = 1.98/8.70 Hz, 2H), 6.72 (d, J = 8.24 Hz, 1H), 6.68-6.58 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 2.85-2.81 (m, 4H), 2.72-2.66 (m, 4H).

6 Mannich-Reaktion: Allgemeine Arbeitsvorschrift

Zur Bildung von Phenethyltetrahydroisochinolinen werden die entsprechenden Amine, zur Bildung von Tetrahydroprotoberberinen die entsprechenden Tetrahydroisochinoline mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure in trockenem Methanol gerührt. Der pH-Wert der Lösung sollte etwa 1-2 betragen. Eine 37 %ige wässrige Formalin-Lösung wird zugefügt und anschließend das Reaktionsgemisch 3 h unter Rückfluss gehalten. Methanol wird abdestilliert, der Rückstand mit 10 %igem Ammoniak alkalisiert und dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Der Extrakt wird mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Produkte werden anschließend durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient Chloroform 100 % →

Chloroform/Methanol 95:5) gereinigt. Abweichungen sind in den entsprechenden Einzelmonographien aufgeführt.

allgemeine Struktur der Phenethyltetrahydroisochinoline



Einzelverbindungen

7-Methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-6-ol **5a**

Amin **4a** (0.5 g, 1.7 mmol), gelöst in 35 mL trockenem Methanol, und 35 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 0.26 g (49 %) **5a**.

Ausbeute:	0.26 g (49 %), hellgelber Feststoff		
Molmasse:	313.40 g/mol		
R _f - Wert:	0.33 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)		
Schmelzpunkt:	168-170 °C		
MS (ESI):	m/z 314.1 (100, M ⁺ +1)		
MS (EI, 70 eV):	m/z (%): 313 (4, M ⁺), 192 (100), 177 (10), 135 (16), 121 (13)		

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.14 (dd, J= 2.08/8.51 Hz, 2H), 6.82 (dd, J= 2.08/8.51 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.77 (s, 5H), 2.93-2.87 (m, 8H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ [ppm]: 158.0, 145.2, 144.3, 132.0, 129.6, 126.5, 125.0, 114.3, 113.9, 108.8, 60.0, 56.0, 55.4, 55.2, 32.7, 27.9

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₇ H ₂₃ NO ₃ :	C(%)= 72.82	H(%)= 7.40	N(%)= 4.47
gemessen:	C(%)= 72.55	H(%)= 7.23	N(%)= 4.42.

6-Methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 5b

Amin **4b** (0.9 g, 2.8 mmol), gelöst in 15 mL trockenem Methanol, und 15 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 0.34 g (41 %) **5b**.

Ausbeute: 0.34 g (41 %), gelber Feststoff
Molmasse: 297.40 g/mol
R_f- Wert: 0.48 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 61-63 °C
MS (ESI): m/z 298.1 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.15 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.84 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.71 (d, J= 8.61 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.66 (s, 2H), 2.94-2.69 (m, 8H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₂₃ NO ₂ :	C(%)= 76.74	H(%)= 7.80	N(%)= 4.71
gemessen:	C(%)= 76.59	H(%)= 7.77	N(%)= 4.77.

6-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7,8-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isochinolin 5c

Amin **4c** (0.9 g, 2.6 mmol), gelöst in 15 mL trockenem Methanol, und 15 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 0.26 g (32 %) **5c**.

Ausbeute: 0.26 g (32 %), hellgelber Feststoff
Molmasse: 311.38 g/mol
R_f- Wert: 0.64 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 100-102 °C
MS (ESI): m/z 312.2 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.15 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.84 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.87 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.86-2.69 (m, 8H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₂₁ NO ₃ :	C(%)= 73.29	H(%)= 6.80	N(%)= 4.50
gemessen:	C(%)= 73.57	H(%)= 6.54	N(%)= 4.50.

6-Methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-7-ol 5d

Amin **4d** (0.4 g, 1.2 mmol), gelöst in 15 mL trockenem Methanol, und 15 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 0.17 g (45 %) **5d**.

Ausbeute:	0.17 g 452 %), hellgelber Feststoff
Molmasse:	313.40 g/mol
R _f - Wert:	0.43 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)
Schmelzpunkt:	161-164 °C
MS (ESI):	m/z 314.2 (100, M ⁺ +1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.15 (dd, J = 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.84 (dd, J= 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.60 (s, 2H), 2.86-2.69 (m, 8H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₂₃ NO ₃ :	C(%)= 72.82	H(%)= 7.40	N(%)= 4.47
gemessen:	C(%)= 72.42	H(%)= 7.35	N(%)= 4.43.

2-[2-(4-Fluorophenyl)ethyl]-6-hydroxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 5e

Amin **4e** (0.8 g, 2.3 mmol), gelöst in 15 mL trockenem Methanol, und 15 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 0.55 g (78 %) **5e**.

Ausbeute:	0.55 g (78 %), gelber Feststoff
Molmasse:	301.36 g/mol
R _f - Wert:	0.40 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)
Schmelzpunkt:	139-142 °C
MS (ESI):	m/z 302.2 (100, M ⁺ +1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.25 (t, J= 8.61 Hz, 2H), 7.00 (t, J= 8.61 Hz, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 2.91-2.87 (m, 2H), 2.80 (s, 4H), 2.75-2.71 (m, 2H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₈ H ₂₀ FNO ₂ :	C(%)= 71.74	H(%)= 6.69	N(%)= 4.65
gemessen:	C(%)= 71.52	H(%)= 6.62	N(%)= 4.62.

2-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-6-hydroxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin 5f

Amin **4f** (0.4 g, 1.4 mmol), gelöst in 15 mL trockenem Methanol, und 15 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 0.19 g (43 %) **5f**.

Ausbeute: 0.19 g (43 %), gelber Feststoff
Molmasse: 317.82 g/mol
R_f- Wert: 0.42 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 168-171 °C
MS (ESI): m/z 318.2 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.28 (dd, J= 2.35/8.61 Hz, 2H), 7.24 (dd, J= 2,35/8.61 Hz, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 2.92-2.88 (m, 2H), 2.80 (s, 4H), 2.76-2.72 (m, 2H)

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ [ppm]: 145.0, 144.2, 138.8, 131.8, 130.1, 128.5, 126.8, 125.6, 114.3, 108.8, 59.8, 56.0, 55.8, 51.0, 33.3, 28.3

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₈ H ₂₀ ClNO ₂ :	C(%)= 68.03	H(%)= 6.34	N(%)= 4.41
gemessen:	C(%)= 68.22	H(%)= 6.21	N(%)= 4.35.

6-Hydroxy-7-methoxy-2-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **5g**

Amin **4g** (0.4 g, 1.3 mmol), gelöst in 25 mL trockenem Methanol, und 25 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 0.16 g (43 %) **5g**.

Ausbeute: 0.16 g (43 %), orangefarbener Feststoff
Molmasse: 313.40 g/mol
R_f- Wert: 0.35 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 96-98 °C
MS (ESI): m/z 314.2 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.21-7.15 (m, 2H), 6.92 (d, J= 7.43 Hz, 1H), 6.87 (dt, J= 1.17/7.43 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 2.94-2.90 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.72-2.68 (m, 2H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₂₃ NO ₃ :	C(%)= 72.82	H(%)= 7.40	N(%)= 4.47
gemessen:	C(%)= 72.63	H(%)= 7.34	N(%)= 4.34.

6-Hydroxy-7-methoxy-2-[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **5h**

Amin **4h** (81 mg, 0.3 mmol), gelöst in 8 mL trockenem Methanol, und 8 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 48 mg (57 %) **5h**.

Ausbeute: 48 mg (57 %), hellgelber Feststoff
Molmasse: 313.40 g/mol
R_f- Wert: 0.38 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 119-121 °C
MS (ESI): m/z 314.2 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.19 (t, J= 8.22 Hz, 1H), 6.82 (d, J= 7.04 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.74 (d, J= 8.22 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 2.90-2.86 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.78-2.73 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ [ppm]: 161.3, 147.6, 146.3, 142.7, 130.5, 127.2, 126.0, 122.0, 115.9, 115.4, 112.6, 110.8, 61.1, 56.6, 56.4, 55.6, 52.1, 34.3, 28.9

Elementaranalyse:

berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$:	C(%)= 72.82	H(%)= 7.40	N(%)= 4.47
gemessen:	C(%)= 72.44	H(%)= 7.28	N(%)= 4.31.

2-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]-6-hydroxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **5i**

Amin **4i** (210 mg, 0.6 mmol), gelöst in 15 mL trockenem Methanol, und 15 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 79 mg (36 %) **5i**.

Ausbeute: 79 mg (36 %), hellgelber Feststoff
Molmasse: 343.43 g/mol
 R_f - Wert: 0.41 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %)
Schmelzpunkt: 142-145 °C
MS (ESI): m/z 344.2 (100, $\text{M}^+ + 1$)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ [ppm]: 6.87 (d, $J = 7.83$, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.79 (dd, $J = 1.96/7.83$ Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 2.87-2.72 (m, 8H)

Elementaranalyse:

berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_4$:	C(%)= 69.95	H(%)= 7.34	N(%)= 4.08
gemessen:	C(%)= 69.60	H(%)= 7.30	N(%)= 4.13.

6-Methoxy-2-phenethyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **5j** [Jirkovský et al., 1964]

Amin **4j** (0.5 g, 1.6 mmol), gelöst in 15 mL trockenem Methanol, und 15 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 114 mg (27 %) **5j**.

Ausbeute: 0.11 g (27 %), hellgelber Feststoff
Molmasse: 267.37 g/mol
R_f- Wert: 0.57 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 39-42 °C
MS (ESI): m/z 268.2 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.30-7.23 (m, 4H), 7.18 (t, J= 7.04 Hz, 1H), 6.98 (d, J= 8.22 Hz, 1H), 6.73-6.68 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 2.94-2.74 (m, 8H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₈ H ₂₁ NO:	C(%)= 80.86	H(%)= 7.92	N(%)= 5.24
gemessen:	C(%)= 79.85	H(%)= 7.95	N(%)= 5.10.

6,7-Dimethoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin **5k**

Amin **4k** (0.5 g, 1.6 mmol), gelöst in 25 mL trockenem Methanol, und 25 mL wässrige Formalin-Lösung (37 %) ergeben 0.11 g (21 %) **5k**.

Ausbeute: 0.11 g (21 %), weiße Kristalle
Molmasse: 327.43 g/mol
R_f- Wert: 0.50 (CHCl₃/MeOH 10 %)
Schmelzpunkt: 80-82 °C
MS (ESI): m/z 328.1 (100, M⁺+1)

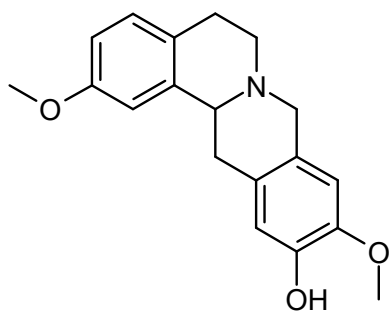
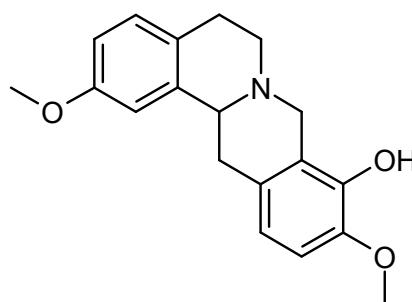
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.14 (dd, J= 2.15/8.80 Hz, 2H), 6.82 (dd, J= 2.15/8.61 Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.77(s, 3H), 3.68 (s, 2H), 2.90-2.85 (m, 8H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₂₀ H ₂₅ NO ₃ :	C(%)= 73.37	H(%)= 7.70	N(%)= 4.28
gemessen:	C(%)= 73.17	H(%)= 7.55	N(%)= 4.30.

2,10-Dimethoxy-11-hydroxyberbin 74 und 2,10-Dimethoxy-9-hydroxyberbin 74a

120 mg (0.4 mmol) **73**, gelöst in 9 mL trockenem Methanol, und 9 mL 37 %ige wässrige Formalin-Lösung ergeben nach zweimaliger Säulenchromatographie an Kieselgel mit CHCl_3 als Eluent 58 mg **74a** (umkristallisiert aus tert. Butylmethylether) und 35 mg **74** (umkristallisiert aus Methanol).

**74****74a**

Ausbeute:	74 : 35 mg (28 %), 74a : 58 mg (47 %)
Molmasse:	311.38 g/mol
R _f - Wert:	0.55 für 74 OP: gelborange 0.64 für 74a OP: rot ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10%)
MS (ESI):	m/z 312.20 (100, M^{++1})
EI-MS (70 eV):	m/z (%): 74 : 311 (69, M^+), 162 (100), 150 (38), 135 (16) 74a : 311 (67, M^+), 162 (100), 150 (95), 135 (22)

74

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.03 (d, 1H, $J = 8.30$ Hz; Ar-H), 6.75-6.77 (m, 2H, 2 x Ar-H), 6.68 (s, 1H, Ar-H), 6.53 (s, 1H, Ar-H), 3.95 (d, 1H, $J = 14.32$ Hz, -N- CH_2 -Ar), 3.83 (s, 3H, Ar-O CH_3), 3.80 (s, 3H, Ar-O CH_3), 3.65-3.78 (m, 2H, -N- CH_2 -Ar, -Ar- CH-CH_2), 3.15-3.23 (m, 3H, -CH- CH_2 -Ar, -Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.64-2.88 (m, 3H, -CH- CH_2 -Ar, -Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$).

74a

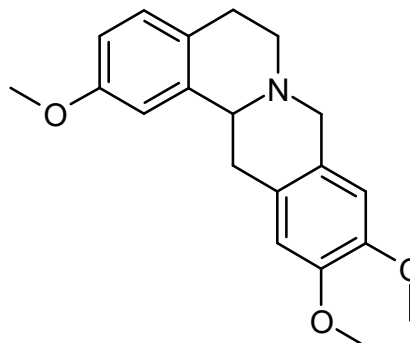
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.04 (d, 1H, $J = 8.30$ Hz; Ar-H), 6.74-6.79 (m, 4H, 4 x Ar-H), 4.24 (d, 1H, $J = 15.56$ Hz, -N- CH_2 -Ar), 3.83 (s, 3H, Ar-O CH_3), 3.80 (s, 3H, Ar-O CH_3), 3.49-3.62 (m, 2H, -N- CH_2 -Ar, -Ar- CH-CH_2), 3.13-3.29 (m, 3H, -CH- CH_2 -Ar, -Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.88-2.91 (m, 1H, -Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.63-2.72 (m, 2H, -CH- CH_2 -Ar, -Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 157.8, 144.0, 141.5, 138.8, 129.6, 127.9, 126.7, 121.1, 119.2, 112.0, 110.9, 109.0, 59.7, 56.2, 55.3, 53.5, 51.5, 36.2, 28.8.

2,10,11-Trimethoxyberbin 41

330 mg (1.05 mmol) **112**, gelöst in 30 mL trockenem Methanol, und 30 mL 37 %ige wässrige Formalin-Lösung ergeben nach Umkristallisation aus Methanol 138 mg **41**.

Ausbeute: 138 mg (40 %), weiße Kristalle
 Molmasse: 325.41 g/mol
 R_f- Wert: 0.70 (CHCl₃/MeOH 5 %)
 Schmelzpunkt: 145-146 °C
 MS (ESI): m/z 326.1 (100, M⁺+1)



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.04 (d, 1H, J= 8.51 Hz, 1 x Ar-H), 6.73-6.79 (m, 2H, 2 x Ar-H), 6.64 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.56 (s, 1H, 1 x Ar-H), 3.87-3.97 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.844 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.837 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.55-3.70 (m, 2H, -Ar-CH₂-N), 3.14-3.28 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂, -Ar-CH₂-CH₂), 2.62-2.91 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂, -Ar-CH₂-CH₂)

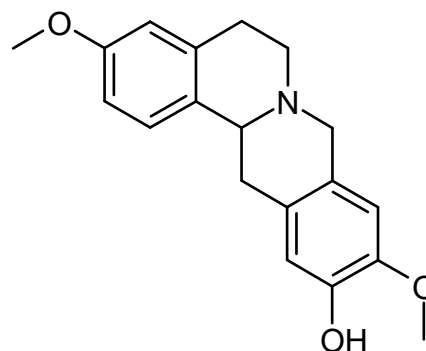
Elementaranalyse:

berechnet für C ₂₀ H ₂₃ NO ₃ :	C(%)= 73.82	H(%)= 7.12	N(%)= 4.30
gemessen:	C(%)= 73.61	H(%)= 6.94	N(%)= 4.17.

3,10-Dimethoxy-11-hydroxyberbin 60

161 mg (0.5 mmol) **57**, je 16 mL Methanol und 37 %ige wässrige Formalin-Lösung ergeben nach Umkristallisation aus Chloroform 43 mg **60**.

Ausbeute: 43 mg (26 %), weiße Kristalle
 Molmasse: 311.38 g/mol
 R_f- Wert: 0.64 (CHCl₃/MeOH 10 %)
 Schmelzpunkt: 194-197 °C Lit. 203 °C aus Ethanol
 [Grewe et al., 1963]
 MS (ESI): m/z 312.4 (100, M⁺+1)



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.14 (d, 1H, $J=8.72$ Hz; Ar-H), 6.75-6.78 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.69 (s, 1H, Ar-H), 6.66 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.53 (s, 1H, Ar-H), 3.95 (d, 1H, $J=14.53$ Hz, -N-CH₂-Ar), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.78 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.66-3.75 (m, 2H, -N-CH₂-Ar, -Ar-CH-CH₂), 3.17-3.31 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂), 2.69-2.87 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂)

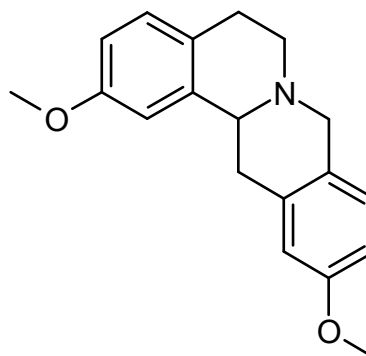
Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₂₁ NO ₃ :	C(%)= 73.29	H(%)= 6.80	N(%)= 4.50
gemessen:	C(%)= 72.79	H(%)= 6.61	N(%)= 4.59.

2,11-Dimethoxyberbin 65

210 mg (0.74 mmol) **63**, 35 mL Methanol sowie 35 mL 37%ige Formalin-Lösung ergeben nach Umkristallisation aus Diethylether 132 mg **65**.

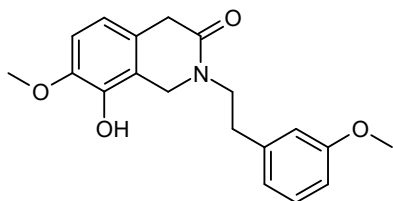
Ausbeute:	132 mg (60 %), gelbe Kristalle
Molmasse:	295.38 g/mol
R _f - Wert:	0.75 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 8 %)
MS (ESI):	m/z 296.4 (100, M ⁺ +1)



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.04 (d, 1H, $J=8.09$ Hz; Ar-H), 6.98 (d, 1H, $J=8.51$ Hz; Ar-H), 6.74-6.77 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.74 (t, 1H, $J=2.91$ Hz, 1 x Ar-H), 6.71 (m, 1H, 1 x Ar-H), 6.68 (m, 1H, Ar-H), 4.02 (d, 1H, $J=14.53$ Hz, -N-CH₂-Ar), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.77 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.72-3.82 (m, 2H), 3.30-3.35 (m, 1H), 3.19 (m, 2H), 3.00 (m, 1H), 2.69-2.78 (m, 2H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₂₁ NO ₂ :	C(%)= 77.26	H(%)= 7.17	N(%)= 4.74
gemessen:	C(%)= 76.32	H(%)= 7.59	N(%)= 4.68.

7 Sonstige Verbindungen8-Hydroxy-7-methoxy-2-[2-(3-methoxyphenyl)-ethyl]-1,4-dihydro-2H-isochinolin-3-on **16**

1.7 g (8.76 mmol) 8-Hydroxy-7-methoxyisochroman-3-on **15** werden in einem Dreihalskolben mit Wasserabscheider in 50 mL Xylol gerührt. Nach Zugabe von 1.5 g (9.9 mmol) 3-Methoxyphenethylamin in 5 mL Xylol wird zum Rückfluss

erhitzt. Während der Reaktionszeit von 15 Stunden wird das Reaktionsgemisch mit Argon entgast. Zur Aufarbeitung wird Xylol abdestilliert, der verbleibende dunkle Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit 1N HCl zweimal geschüttelt. Die organische Phase wird im Anschluss einmal mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wird einer Flashchromatographie an Kieselgel mit dem Elutionsmittelgemisch Ethylacetat/tert. Butylmethylether im Verhältnis 1:1 unterworfen.

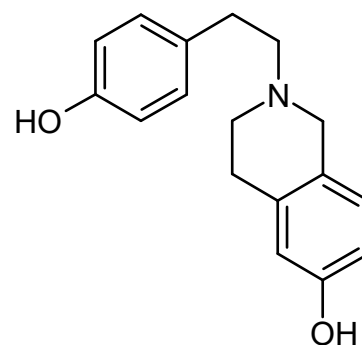
Ausbeute:	1.5 g (49 %)
Molmasse:	327.38 g/mol
R _f - Wert:	0.43 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)
MS (ESI):	m/z 328.3 (100, M ⁺ +1)
MS (EI, 70 eV):	m/z (%): 327 (100, M ⁺), 193 (69), 178 (78)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.17-7.18 (m, 1H Ar-**H**), 6.62-6.83 (m, 5H, 5 x Ar-**H**), 4.38 (s, 2H, -Ar-CH₂-NR-CO), 3.87 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.72-3.76 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NR-CO), 3.72 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.57 (s, 2H, -Ar-CH₂-CO), 2.90 (t, 2H, J= 7.89 Hz, -Ar-CH₂-CH₂).

2-[2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-6-ol Hydrobromid **6**

Phenethyltetrahydroisochinolin **5b** (0.13 g, 0.44 mmol) in 15 mL 48 % wässriger Bromwasserstoffsäure wird für 5 h in Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung wird das Reaktionsgemisch in Eiswasser gegossen und mit 10 %igem wässrigem Ammoniak neutralisiert. Nach 30minütigem Rühren wird das entstandene Präzipitat abgetrennt und mit Wasser gewaschen. Nach Lyophilisation, wurden 67 mg von **6** erhalten.

Ausbeute: 67 mg (44 %), beigefarbener Feststoff
 Molmasse: 350.26 g/mol (Hydrobromid)
 R_f- Wert: 0.19 (CHCl₃/MeOH 10 %)
 Schmelzpunkt: 103-106 °C
 MS (ESI): m/z 270 (100, M⁺+1)



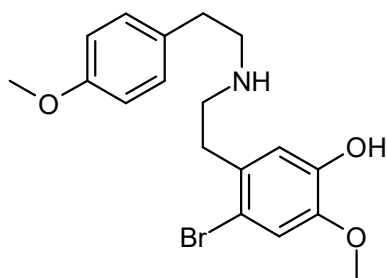
¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ [ppm]: 7.09 (dd, J = 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.95 (d, J = 8.22 Hz, 1H), 6.74 (dd, J = 1.96/8.61 Hz, 2H), 6.64 (d, J = 8.22 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.16-2.89 (m, 8H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₇ H ₁₉ O ₄ NHBr:	C(%)= 58.30	H(%)= 5.76	N(%)= 4.00
gemessen:	C(%)= 56.40	H(%)= 5.57	N(%)= 3.66.

4-Bromo-2-methoxy-5-(2-{[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]amino}ethyl)phenol **134**

155 mg (0.51 mmol) **4a** werden in 15 mL 10 %iger Essigsäure gerührt. Eine Mischung aus 82 mg Brom in 1 mL Eisessig wird bei 5 °C hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 10 %iger NaOH-Lösung alkalisiert (pH 8-9) und mit tert. Buthylmethylether (dreimal) extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand ohne weitere Reinigung zu **134** umgesetzt.

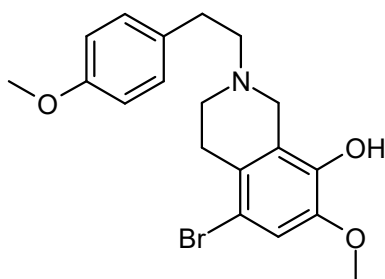


Molmasse: 380.28 g/mol
 MS (ESI): m/z 380.0 (100, M⁺+1)

5-Bromo-7-methoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinol-8-ol **135**

Ca. 60 mg (0.16 mmol) **134** werden in 10 mL Methanol gerührt und mit 2 Tropfen konzentrierter HCl versetzt. Es werden 10 mL 37 %ige Formalin-Lösung zugegeben und zum Rückfluss erhitzt. Nach 3 h wird Methanol abgezogen und die wässrige Lösung mit 10 %iger

NH₃-Lösung auf pH 9 gebracht. Es wird mit Chloroform ausgeschüttelt und der Rückstand nach Abziehen des Lösungsmittels mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform als Eluent gereinigt.



Molmasse: 392.30 g/mol

R_f- Wert: 0.58 (CHCl₃/MeOH 10 %)

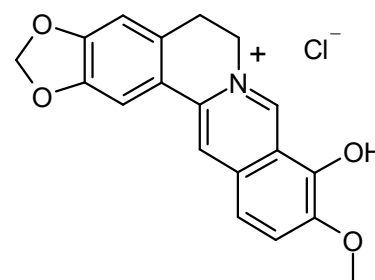
MS (ESI): m/z 392.1 (100, M⁺+1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 7.09 (dd, J = 2.15/8.80 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 6.91 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.77 (dd, J = 2.15/8.80 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 3.80 (s, 3H), 3.77 (s, 4H), 2.83-2.89 (m, 9H).

8 Partialsynthesen

Berberrubinchlorid 1

5.0 g (12.26) mmol Berberinchlorid-Dihydrat werden mit 10 g Harnstoff bei 200 °C zusammengeschmolzen. Für 30 Minuten wird diese Temperatur gehalten. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches und Zugabe von 200 mL destilliertem Wasser wird dieses mit Chloroform kontinuierlich (im Perforator) extrahiert. Nach Einengen des Chloroforms verbleiben 3 g eines dunkelroten Rückstandes, welcher über 400 g neutralem Aluminiumoxid gereinigt wird.



Dabei wird die gelbe Fraktion mit einem Lösungsmittelgemisch von Toluol/Methanol (99:1) eluiert und verworfen. Die nachfolgenden roten Fraktionen werden mit einem Toluol – Methanol-Gemisch (95:5) eluiert und gesammelt. Nach Einengen dieser Fraktionen wird Berberrubinchlorid in Form rubinroter Nadeln erhalten.

Ausbeute: 1.0 g (23 %)

Molmasse: 357.8 g/mol

R_f- Wert: 0.11 (CHCl₃/MeOH 10 %), rot

Schmelzpunkt: > 320 °C Lit.: 285 °C [Frerichs, 1910]

MS (ESI): m/z 323.2 (100, M⁺+1-Cl)
 MS (EI, 70 eV): m/z (%): 321 (100, M⁺), 306 (32), 292 (38), 278 (79)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 400 MHz) δ [ppm]: 9.03 (s, 1H, -CH=CH-Ar), 7.93 (s, 1H, Ar-H), 7.56 (s, 1H, Ar-H), 7.16 (d, 1H, J= 7.89 Hz, Ar-H), 6.91 (s, 1H, -N⁺=CH-Ar), 6.30 (d, 1H, J= 7.89 Hz, Ar-H), 6.05 (s, 2H, -O-CH₂-O), 4.44 (t, 2H, J= 6.02 Hz, -CH₂-CH₂-N⁺), 3.69 (s, 3H, Ar-OCH₃), 2.97 (t, 2H, J= 6.02 Hz, -Ar-CH₂-CH₂)

¹³C-NMR (DMSO-D₆, 400 MHz) δ [ppm]: 167.2, 149.6, 148.2, 147.1, 145.6, 133.1, 131.9, 129.1, 121.7, 121.3, 119.9, 116.9, 108.1, 104.6, 101.4, 100.5, 55.7, 52.2, 27.5

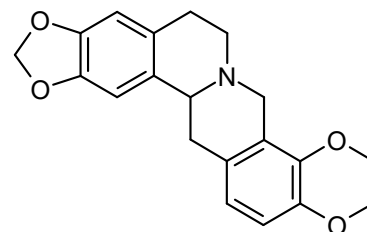
Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₁₇ O ₄ N:	C(%)= 70.81	H(%)= 4.97	N(%)= 4.35
gemessen:	C(%)= 70.88	H(%)= 4.66	N(%)= 4.40.

Canadin 2

2.0 g (4.9 mmol) Berberinchlorid-Dihydrat werden in 30 mL Methanol unter Rühren gelöst. Bei einer Temperatur von 0 °C werden über einen Zeitraum von einer Stunde 1.2 g (37.7 mmol) Natriumborhydrid portionsweise hinzugegeben.

Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und danach auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wird mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung und Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Chloroform am Rotationsverdampfer abgezogen. Der verbleibende Rückstand wird aus heißem 96 %igen Ethanol umkristallisiert. Es wird ein weißer Feststoff mit grünem Schimmer erhalten.



Ausbeute: 1.3 g (76 %)
 Molmasse: 339.39 g/mol
 R_f- Wert: 0.76 (CHCl₃/MeOH 10 %), OP: kräftiges Gelb
 Schmelzpunkt: 171-172 °C Lit.: 170-171 °C [Bentley und Murray, 1963]
 MS (ESI): m/z 340.3 (100, M⁺+1)
 MS (EI, 70 eV): m/z (%): 339 (100, M⁺), 174 (16), 164 (66), 149 (41)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 6.85 (d, 1H, $J= 8.30$ Hz, Ar-H), 6.78 (d, 1H, $J= 8.51$ Hz, Ar-H), 6.71 (s, 1H, Ar-H), 6.58 (s, 1H, Ar-H), 4.26 (d, 1H, $J= 15.77$ Hz, -N-CH₂-Ar), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.83 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.56-3.65 (m, 2H, -N-CH₂-Ar, -Ar-CH-CH₂), 3.20-3.24 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂), 2.67-2.87 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂)

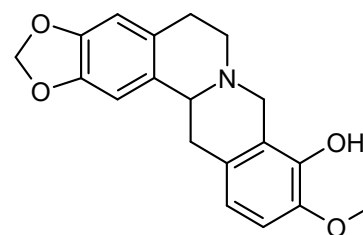
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 150.3, 146.2, 145.9, 145.2, 130.8, 128.6, 127.8, 127.7, 123.9, 111.1, 108.4, 105.5, 100.8, 60.2, 59.7, 56.0, 54.0, 51.4, 36.5, 29.6

Elementaranalyse:

berechnet für C ₂₀ H ₂₁ O ₄ N:	C(%)= 70.78	H(%)= 6.24	N(%)= 4.13
gemessen:	C(%)= 70.75	H(%)= 6.20	N(%)= 3.93.

Nandinin 7

283 mg (0.79 mmol) Berberrubinchlorid **1** werden in 30 mL Methanol unter Rühren gelöst. Bei einer Temperatur von 0 °C werden über einen Zeitraum von einer Stunde 450 mg



(11.90 mmol) Natriumborhydrid portionsweise hinzugegeben.

Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur

gerührt und danach auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wird nach Einstellen des pH-Wertes auf 8-9 mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit Wasser und Trocknung über Magnesiumsulfat, wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der verbleibende Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert. Es entsteht ein Feststoff mit rötlichem Schimmer.

Ausbeute:	0.21 g (83 %)
Molmasse:	325.37 g/mol
R _f - Wert:	0.85 (CHCl ₃ /MeOH 10 %), OP: rot
Schmelzpunkt:	168-172 °C Lit.: 170 °C [Barton et al., 1965]
MS (EI, 70 eV):	m/z (%): 325 (29, M ⁺), 176 (100), 150 (57), 135 (32)

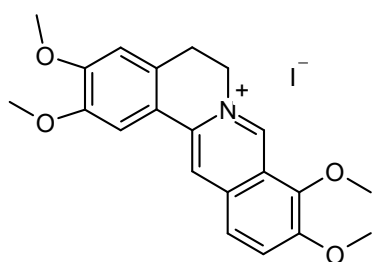
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 6.71 (s, 1H, Ar-H), 6.70 (d, 1H, $J=6.02$ Hz, Ar-H), 6.64 (d, 1H, $J=8.51$ Hz, Ar-H), 6.57 (s, 1H, Ar-H), 5.89 (s, 2H, -O-CH₂-O), 5.72 (s, br, 1H, Ar-OH), 4.21 (d, 1H, $J=15.56$ Hz, -N-CH₂-Ar), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.49 (m, 2H, -N-CH₂-Ar, -Ar-CH-CH₂), 3.10-3.22 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂), 2.77-2.84 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 2.59-2.65 (m, 2H, -Ar-CH₂-CH₂)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 146.1, 145.9, 144.0, 141.5, 130.9, 128.0, 127.8, 121.2, 109.1, 108.4, 105.5, 100.7, 59.6, 56.2, 53.4, 51.3, 50.7, 36.5, 29.6

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₉ H ₁₉ O ₄ N:	C(%)= 70.14	H(%)= 5.89	N(%)= 4.30
gemessen:	C(%)= 70.20	H(%)= 5.90	N(%)= 4.32.

Palmatin 8



0.5 g (1.4 mmol) Tetrahydropalmatin werden in 45 mL 95 %igem Ethanol, welcher 0.6 g Iod enthält gelöst und 3 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die entstandene dunkelbraune Reaktionslösung wird mit 20 mL 5 %iger NaHSO₃-Lösung versetzt. Daraufhin schlägt die dunkle Farbe innerhalb von 30 Sekunden in ein leuchtendes Gelb um. Das

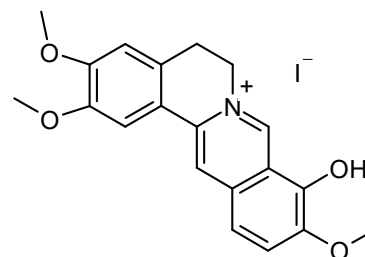
Rohprodukt kristallisiert in einem Eisbad aus. Eine Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluent: CHCl₃/MeOH 5 % → CHCl₃/MeOH 10 %) ist nötig, um das Produkt vom Edukt zu trennen.

Ausbeute:	0.40 g (60 %)
Molmasse:	479.3 g/mol
R _f - Wert:	0.33 (CHCl ₃ /MeOH 10 %), gelb
MS (ESI):	m/z 353.3 (100, M ⁺ +1)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6 , 400 MHz) δ [ppm]: 9.84 (s, 1H, -N⁺=CH-Ar), 8.98 (s, 1H, -C=CH-Ar), 8.17 (d, 1H, $J=9.34$ Hz, Ar-H), 7.99 (d, 1H, $J=8.92$ Hz, Ar-H), 7.67 (s, 1H, Ar-H), 7.06 (s, 1H, Ar-H), 4.91 (t, 2H, $J=6.23$ Hz, -CH₂-CH₂-N⁺), 4.07 (s, 3H, -Ar-OCH₃), 4.06 (s, 3H, -Ar-OCH₃), 4.04 (s, 3H, -Ar-OCH₃), 4.03 (s, 3H, -Ar-OCH₃), 3.19 (t, 2H, $J=6.02$ Hz, -Ar-CH₂-CH₂).

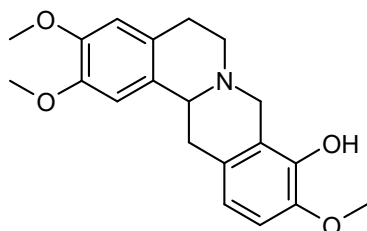
Palmatrubin 9

104 mg (0.22 mmol) **8** und 200 mg Harnstoff werden bei 200 °C auf einem Ölbad zusammengeschmolzen. Diese Temperatur wird für 30 Minuten gehalten. Anschließend wird der schwarzrote Rückstand in 15 mL Wasser gelöst und die wässrige Phase achtmal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen.



Nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibt ein rubinroter fester Rückstand, der ohne Reinigung sofort weiter zu **10** umgesetzt wird.

Ausbeute:	67 mg (65 %)
Molmasse:	465.29 g/mol
R _f - Wert:	0.03 (CHCl ₃ /MeOH 10 %), rot
Schmelzpunkt:	288-292 °C
MS (ESI):	m/z 339.3 (100, M ⁺ +1).

Tetrahydropalmatrubin 10

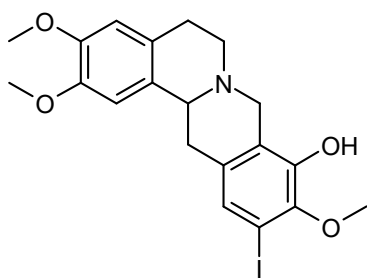
0.8 g (1.72 mmol) **9** werden in 30 mL Methanol unter Rühren gelöst. Bei einer Temperatur von 0 °C werden über einen Zeitraum von einer Stunde 1.2 g (31.7 mmol) Natriumborhydrid portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und danach auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wird nach Einstellen des pH-Wertes auf 8-9 mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit Wasser und Trocknung über Magnesiumsulfat, wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Nach einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform als Laufmittel und Umkristallisation aus tert. Butylmethylether verbleiben 25 mg **10**.

Ausbeute:	25 mg (4 %)
Molmasse:	341.41 g/mol
R _f - Wert:	0.55 (CHCl ₃ /MeOH 10 %), rot
Schmelzpunkt:	143-144 °C

MS (ESI): m/z 342.5 (100, M^{+1})
MS (EI, 70 eV): m/z (%): 341 (98, M^{+}), 192 (100), 150 (55), 135 (31)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 6.60-6.73 (m, 4H, 4 x Ar-H), 5.69 (s, br, 1H, Ar-OH), 4.19 (d, 1H, $J = 15.56$ Hz, -N-CH₂-Ar), 3.87 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.852 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.847 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.51-3.59 (m, 2H, -N-CH₂-Ar, -Ar-CH-CH₂), 3.19-3.27 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂), 2.85-2.88 (m, 1H, -Ar-CH₂-CH₂), 2.65-2.69 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂).

11-Iod-Tetrahydropalmatrubin 12



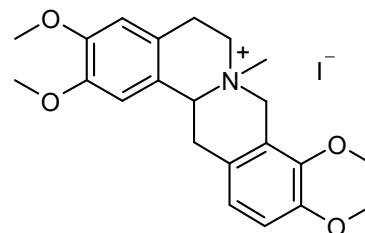
Nebenprodukt von **10**. Entstanden bei der Umsetzung des Eduktes Tetrahydropalmatin. Nach Reduktion von 0.8 g (1.72 mmol) **9** in 30 mL Methanol mit 1.2 g (31.7 mmol) Natriumborhydrid und der Aufarbeitung wie bei Verbindung **10** beschrieben, werden nach einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform als Laufmittel und Umkristallisation aus Methanol 32 mg **12** erhalten.

Ausbeute: 32 mg (4 %)
Molmasse: 467.31 g/mol
 R_f - Wert: 0.03 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10 %), rot
MS (ESI): m/z 368.1 (100, M^{+1})

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm]: 7.16 (s, 1H, Ar-H), 6.76 (s, 1H, Ar-H), 6.60 (s, 1H, Ar-H), 4.19 (d, 1H, $J = 15.77$ Hz, -N-CH₂-Ar), 3.88 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.81 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.47-3.62 (m, 2H, -N-CH₂-Ar, -Ar-CH-CH₂), 3.10-3.19 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂), 2.62-2.71 (m, 3H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂).

2,3,9,10-Tetramethoxy-7-methyl-5,6,13,13a-tetrahydro-8H-dibenzo[a,g]chinolizin *N*-Methiodid **24**

5.0 g (14.07 mmol) Tetrahydropalmatin **22** werden bei 65 °C in 60 mL Aceton unter Zugabe von 4.4 mL Methyljodid (70.45 mmol) 24 Stunden gerührt. Ein weißer Feststoff kristallisiert aus, der anschließend abgesaugt wird. Eine weitere Reinigung ist nicht nötig.



Ausbeute: 6.7 g (96 %)
 Molmasse: 497.38 g/mol
 R_f- Wert: 0.39 tailing (CHCl₃/MeOH 10 %)
 MS (ESI): m/z 371.3 (100, M⁺+1)

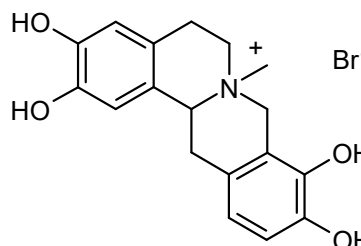
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.88 (d, 1H, J= 8.30 Hz, Ar-H), 6.83 (d, 1H, J= 8.51 Hz, Ar-H), 6.79 (s, 1H, Ar-H), 6.69 (s, 1H, Ar-H), 5.39-5.43 (m, 1H, -Ar-CH-CH₂), 5.30 (d, 1H, J= 15.77 Hz, -N-CH₂-Ar), 5.05 (d, 1H, J= 15.98 Hz, -N-CH₂-Ar), 4.00 (m, 1H, -Ar-CH₂-CH₂), 3.92 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.864 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.856 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.83 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.67-3.71 (m, 1H, -Ar-CH-CH₂), 3.64 (s, 3H, -N⁺-CH₃), 3.36-3.41 (m, 2H, -CH-CH₂-Ar, -Ar-CH₂-CH₂), 3.15-3.19 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 2.98-3.05 (m, 1H, -Ar-CH₂-CH₂)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₂₂ H ₂₈ O ₄ N ⁺ I ⁻ :	C(%)= 53.01	H(%)= 5.66	N(%)= 2.81
gemessen:	C(%)= 52.54	H(%)= 5.62	N(%)= 2.94.

2,3,9,10-Tetrahydroxy-7-methyl-5,6,13,13a-tetrahydro-8H-dibenzo[a,g]chinolizin *N*-Methbromid **29**

1.5 g (3.0 mmol) **24** werden 3 Stunden in 100 mL 48%iger wässriger HBr-Lösung in einem lichtgeschützten Dreihalskolben in Argonatmosphäre am Kochen gehalten. Der ausgefallene Feststoff wird abgefrittet und getrocknet.



Ausbeute: 0.64 g (54 %)
 Molmasse: 394.27 g/mol
 MS (ESI): m/z 315.2 (100, M⁺+1)

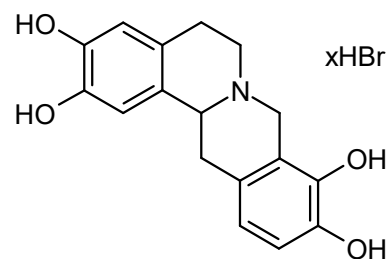
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6 , 400 MHz) δ [ppm]: 9.21 (s, br, 1H, OH), 6.82 (d, 2H, $J= 8.30$ Hz, 2 x Ar-H), 6.77 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.67 (d, 2H, $J= 8.30$ Hz, 2 x Ar-H), 6.63 (s, 1H, 1 x Ar-H), 4.88-4.92 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 4.62 (d, 1H, $J= 15.36$ Hz, -Ar-CH₂-N), 4.49 (d, 1H, $J= 15.77$ Hz, -Ar-CH₂-N), 3.93-3.96 (m, 1H, -Ar-CH₂-CH₂), 3.68-3.76 (m, 2H, -Ar-CH₂-CH₂, -CH-CH₂-Ar), 2.87-2.99 (m, 3H, -Ar-CH₂-CH₂, -CH-CH₂-Ar), 2.77 (s, 3H, N-CH₃)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₈ H ₂₀ O ₄ NBr:	C(%)= 54.68	H(%)= 5.06	N(%)= 3.54
gemessen:	C(%)= 54.24	H(%)= 5.06	N(%)= 3.50.

2,3,9,10-Tetrahydroxyberbin-Hydrobromid 26

1.5 g (4.2 mmol) **22** werden 3 Stunden in 100 mL 48%iger wässriger HBr-Lösung in einem lichtgeschützten Dreihalskolben in Argonatmosphäre am Kochen gehalten. Der ausgefallene Feststoff wird abgefrittet, aus Ethanol umkristallisiert und getrocknet.

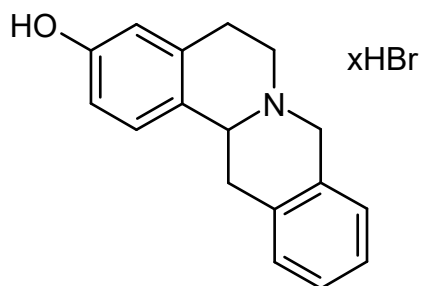


Ausbeute:	0.86 g (54 %)
Molmasse:	380.21 g/mol
MS (ESI):	m/z 300.1 (100, M ⁺ +1)
EI-MS (70 eV):	m/z (%): 299 (29, M ⁺), 178 (63), 164 (100), 162 (43), 136 (42)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6 , 400 MHz) δ [ppm]: 10.01 (s, br, 1H, N⁺-H), 9.42 (s, 1H, OH), 9.19 (s, 1H, OH), 8.96 (s, 1H, OH), 8.93 (s, 1H, OH), 6.78 (d, 1H, $J= 7.89$ Hz, 1 x Ar-H), 6.76 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.61 (d, 1H, $J= 8.09$ Hz, 1 x Ar-H), 6.57 (s, 1H, 1 x Ar-H), 2.83-4.62 (7 x m, 9H)

Elementaranalyse

berechnet für C ₁₇ H ₁₈ NO ₄ Br:	C(%)= 53.70	H(%)= 4.77	N(%)= 3.68	Br(%)= 21.01
gemessen:	C(%)= 52.12	H(%)= 4.64	N(%)= 3.63	Br(%)= 21.27.

3-Hydroxyberbin-Hydrobromid 28

200 mg (0.75 mmol) 3-Methoxyberbin **27** werden mit 22.5 mL 48%iger wässriger HBr-Lösung fünf Stunden lang unter Rückfluss und in Argonatmosphäre erhitzt. Der nach Einrotieren des Lösungsmittels verbleibende braune Rückstand wird in 2 mL Ethanol unter Rückfluss zum Sieden gebracht. Nach Abkühlung wird

der weiße Niederschlag abgefrittet und an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute:	115 mg (57%)
Molmasse:	332.24 g/mol
Schmelzpunkt:	240-246 °C Lit. 245 °C aus Methanol/Diethylether [Schulze et al., 2009]
MS (ESI):	m/z 252.1 (100, M ⁺ +1)
EI-MS (70 eV):	m/z (%): 330 (6), 251 (100, M ⁺), 250 (33), 146 (69), 104 (67)

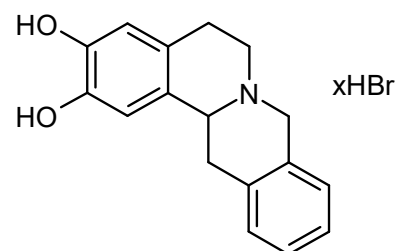
¹H-NMR (DMSO-D₆; 400 MHz) δ [ppm]: 10.26 (s, 1H, NH), 7.10-7.30 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.76 (d, 1H, J = 2.51 Hz, Ar-H), 6.60 (s, 1H, Ar-H), 4.35 (m, 1H, Ar-CH₂-CH), 3.95-4.10 (m, 3H), 3.29-3.55 (m, 3H), 2.95-3.10 (m, 2H)

Elementaranalyse:

berechnet für C ₁₇ H ₁₈ NOBr:	C(%)= 61.46	H(%)= 5.46	N(%)= 4.22
gemessen:	C(%)= 58.32	H(%)= 5.12	N(%)= 4.08.

2,3-Dihydroxyberbin-Hydrobromid 111

Nach viereinhalbständigem Erhitzen unter Rückfluss und Argonatmosphäre von 0.25 g (0.75 mmol) 2,3-Dimethoxyberbin-Hydrochlorid (Verbindung aus Meyer, 2008) und 50 mL 48%iger wässriger HBr-Lösung entsteht ein weißer flockiger Niederschlag (Hydrobromid), der abgefrittet und ohne weitere Aufarbeitung getrocknet wird



(62 mg **111**). Der Überstand wird mit 2 %iger Natriumhydroxidlösung auf pH 9 gebracht und

mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Abzug des Lösungsmittels und Trocknung verbleiben 60 mg eines gelben kristallinen Feststoffes (Base).

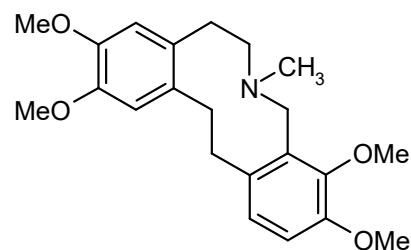
Ausbeute:	Hydrobromid: 62 mg (24 %) weißer flockiger Niederschlag Base: 60 mg (30 %), gelber kristalliner Niederschlag
Molmasse:	Hydrobromid: 348.24 g/mol Base: 267.16 g/mol
Schmelzpunkt:	218-223 °C (Hydrobromid)
MS (ESI):	m/z 268.27 (100, M ⁺¹)
EI-MS (70 eV):	m/z (%): 267 (100, M ⁺), 162 (61), 104 (80)

¹H-NMR (DMSO-D₆; 400 MHz) δ [ppm]: 10.27 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, OH), 8.95 (s, 1H, OH), 7.24-7.33 (m, 4H, 4 x Ar-H), 6.79 (s, 1H, Ar-H), 6.58 (s, 1H, Ar-H), 4.63-4.75 (m, 1H, Ar-CH₂-CH), 3.72-3.77 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.98-3.09 (m, 3H).

2,3-Dimethoxy-7-methyl-9,10-dimethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[d,h]azecin 25

1.5 g (3.0 mmol) **24** werden in einem Dreihalskolben mit Thermometer und Kühlfinger (enthält Aceton und Trockeneis) eingewogen und mit Argon bedampft. Unter Kühlung werden 50 mL Ammoniak eingeleitet und kondensiert. Zuvor wird der Argonstrom unterbrochen. Nach Entfernen des Trockeneisbades und erneutem Einleiten von Argon wird das Reaktionsgemisch zügig mit kleinen Natriumstücken versetzt bis eine tiefblaue Farbe bestehen bleibt. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung bis zur Entfärbung der Lösung beendet. Ammoniak wird bei Raumtemperatur und unter Argon abgedampft. Der Rückstand wird in 50 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je 50 mL TBME extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der verbleibende Rückstand einer ersten Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluent: Chloroform/Methanol 5 %) unterzogen und 400 mg eines Nebenproduktes isoliert. Nach einer 2. Säulenchromatographie an Kieselgel mit anschließender Umkristallisation aus Ethanol konnten 350 mg des gewünschten Produktes **25** isoliert werden.

Ausbeute: 0.35 g (31 %), lange weiße Nadeln
 Molmasse: 371.48 g/mol
 R_f- Wert: 0.66 (CHCl₃/MeOH 5 %)
 Schmelzpunkt: 88-92 °C
 MS (ESI): m/z 372.1 (100, M⁺+1)



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.85 (d, 1H, J= 8.30 Hz, 1 x Ar-H), 6.71 (d, 1H, J= 5.40 Hz, 1 x Ar-H), 6.70 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.66 (s, 1H, 1 x Ar-H), 3.88 (s, 5H, Ar-OCH₃, N-CH₂-Ar), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.83 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.03 (t, 2H, J= 6.84 Hz, -Ar-CH₂-CH₂), 2.83 (t, 2H, J= 7.68 Hz, -Ar-CH₂-CH₂), 2.74 (s, 4H, Ar-CH₂-CH₂-Ar), 2.08 (s, 3H, -N-CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 150.9, 147.8, 147.1, 146.5, 135.8, 134.7, 132.2, 131.5, 125.4, 114.2, 112.4, 109.9, 60.6, 60.2, 56.0, 56.0, 55.7, 51.9, 43.1, 38.3, 33.2, 32.9

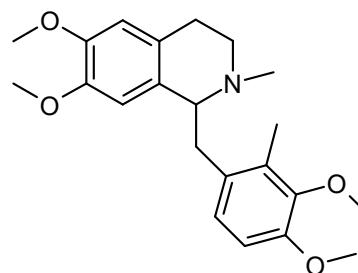
Elementaranalyse:

berechnet für C ₂₂ H ₂₉ O ₄ NxEtOH:	C(%)= 63.31	H(%)= 6.95	N(%)= 3.36
gemessen:	C(%)= 63.11	H(%)= 6.88	N(%)= 3.34.

Nebenprodukt 25a

6,7-Dimethoxy-2-methyl-1-(6-methyl-4,5-dimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin

Ausbeute: 0.40 g (36 %), Öl
 Molmasse: 371.48 g/mol
 R_f- Wert: 0.27 (CHCl₃/MeOH 5 %)

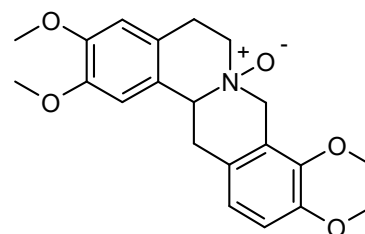


¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.66 (s, 2H, 2 x Ar-H), 6.55 (s, 1H, 1 x Ar-H), 5.64 (s, 1H, 1 x Ar-H), 3.81 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.72 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.64-3.67 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 3.41 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.25-3.32 (m, 1H, -Ar-CH₂-CH₂), 3.14-3.18 (m, 1H, -CH-CH₂-Ar), 2.82-2.91 (m, 2H, -Ar-CH₂-CH₂, -CH-CH₂-Ar), 2.60-2.75 (m, 2H, -Ar-CH₂-CH₂, -Ar-CH₂-CH₂), 2.55 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.01 (s, 3H, N-CH₃).

2,3,9,10-Tetramethoxy-7-methyl-5,6,13,13a-tetrahydro-8H-dibenzo[a,g]chinolizin N-oxid **66**

1 g (2.82 mmol) THP werden in 20 mL Chloroform gelöst und gerührt. Bei 0 °C werden 0.5 g (2.84 mmol) m-Chlorperbenzoesäure, gelöst in 20 mL Chloroform, hinzugegeben. Es wird vier Stunden gerührt und dabei bis auf Raumtemperatur erwärmt. Das gesamte Reaktionsgemisch wird auf eine mit basischem Aluminiumoxid gefüllte Chromatographiesäule gegeben und mit Chloroform eluiert. Das Produkt konnte auf diese Weise nicht vollständig vom Edukt getrennt werden. Nach einer Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluent: Chloroform/Methanol 10 %) konnten 960 mg des Produktes gewonnen werden.

Ausbeute:	0.96 g (92 %), gelber Feststoff
Molmasse:	371.45 g/mol
R _f - Wert:	0.32 (CHCl ₃ /MeOH 10 %)
MS (ESI):	m/z 372.4 (100, M ⁺ +1)

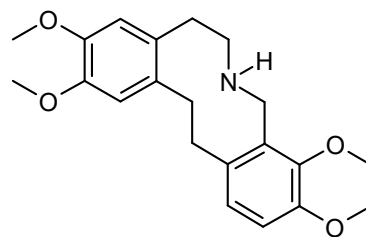


¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.94 (d, 1H, J= 8.51 Hz, Ar-H), 6.84 (d, 1H, J= 8.51 Hz, Ar-H), 6.65 (s, 1H, Ar-H), 6.63 (s, 1H, Ar-H), 4.61-4.70 (m, 2H), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.83 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.45-3.72 (m, 5H), 3.27-3.32 (m, 1H), 2.67 (d, 1H, J= 12.24 Hz).

2,3,9,10-Tetramethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[d,h]azecin **67**

0.5 g (1.35 mmol) **66** (N-Oxid) sowie 3.5 g trockenes THF werden in einen Dreihalskolben mit Thermometer und Kühlfinger (enthält Aceton und Trockeneis) eingewogen und mit Argon bedampft. Unter Kühlung werden 50 mL Ammoniak eingeleitet und kondensiert. Zuvor wird der Argonstrom unterbrochen. Nach Entfernen des Trockeneisbades und erneutem Einleiten von Argon wird das Reaktionsgemisch zügig mit kleinen Natriumstücken versetzt bis eine tiefblaue Farbe bestehen bleibt. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung bis zur Entfärbung der Lösung beendet. Ammoniak wird bei Raumtemperatur und unter Argon abgedampft. Der Rückstand wird in 50 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je 50 mL CHCl₃ extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der verbleibende Rückstand der Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluent: Chloroform/Methanol 10 %) unterzogen. Es konnten 50 mg des gewünschten Produktes **67** als hellgelber Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 50 mg (10 %)
Molmasse: 357.45 g/mol
R_f- Wert: 0.40 (CHCl₃/MeOH 10 %)
MS (ESI): m/z 358.2 (100, M⁺+1)



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm]: 6.80 (d, 1H, J= 8.30 Hz, 1 x Ar-H), 6.74 (d, 1H, J= 8.30 Hz, 1 x Ar-H), 6.58 (s, 1H, 1 x Ar-H), 6.55 (s, 1H, 1 x Ar-H), 4.07 (s, 2H), 3.86 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.83 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.82 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.75-3.77 (m, 2H), 3.09 (t, 2H, J= 6.23 Hz, -Ar-CH₂-CH₂), 3.04 (s, 2H), 2.84 (t, 2H, J= 5.19 Hz, -Ar-CH₂-CH₂).

10.2 Biologische Testung

10.2.1 Agar-Diffusionstest

10.2.1.1 Nährmedien und Mikroorganismen

Alle sterilen Arbeiten wurden in einer Laminar-Airflow-Arbeitsbank vom Typ HeraSafe 12 der Firma Heraeus Instruments, Hanau Deutschland, durchgeführt.

Es wurde mit Agar der Firma Sigma Aldrich (Deutschland) gearbeitet. Die Mikroorganismen wurden vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) in Braunschweig bezogen und nach der mitgelieferten Vorschrift in einer Flüssigkultur gezüchtet.

All Culture Agar (AC Agar)

Eine Suspension aus 35.2 g AC Agar und 20.0 g Agar (zur Verfestigung) in einem Liter Wasser wurde autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen wurden je 25 mL des noch warmen, flüssigen Agars in Petrischalen gefüllt und 30 Minuten stehen gelassen.

Eingesetzt für: *Candida glabrata*, *Hyphopichia burtonii*, *Yarrowia lipolytica*,
Escherichia coli, *Staphylococcus equorum*,
Pseudomonas antimicrobia, *Streptococcus entericus*

Potato Dextrose Agar

Eine Suspension aus 39.0 g Potato Dextrose Agar und 10.0 g Agar (zur Verfestigung) in einem Liter Wasser wurde autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen werden je 25 mL des noch warmen, flüssigen Agars in Petrischalen gefüllt und 30 Minuten stehen gelassen.

Eingesetzt für: *Aspergillus brasiliensis*

Die festen Agar-Böden wurden mit einem mit einer Flüssigkultur des jeweiligen Keims getränkten Wattestäbchen bestrichen und sofort mit drei Substanzplättchen sowie dem als Blindwert und dem als Referenz präparierten Plättchen belegt.

Die Inkubationszeit der Agar-Platten betrug 36 Stunden bei 32 °C (Bakterien) bzw. 28 °C (Pilze). Die Durchmesser der Hemmhöfe wurden manuell ausgemessen.

10.2.2 MTT-Test

10.2.2.1 Zelllinie

Alle sterilen Arbeiten wurden in einer Laminar-Airflow-Arbeitsbank vom Typ MSC Advantage der Firma Thermo Fischer (Schwerte, Deutschland), durchgeführt.

Verwendet wurden Zellen der humanen Leukämiezelllinie *HL-60* (DSMZ Braunschweig). Diese wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das bereits 2 mM L-Glutamin enthielt und mit 10 % Foetalem Kälberserum (Foetal Calf Serum Gold) supplementiert wurde.

Medium und Serum wurden von PAA Laboratories, Pasching (Österreich) bezogen.

10.2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen, wobei die Zelldichte unter 2 Millionen pro Milliliter gehalten wurde. Dreimal pro Woche fand eine Passage der Zellen statt. Für die Testung wurden Zellen der Passagen 5 bis 60 eingesetzt.

Sterile Kunststoffwaren für die Zellkultur wurden von der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen. Die Kultivierung der Zellen und Inkubation während der Testdurchführung erfolgte in einem Inkubationsschrank der Firma Binder (Tuttlingen, Deutschland) bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5 %.

10.2.2.3 Aussäen der Zellen

Für die Durchführung des MTT-Tests wurde die Zellzahl pro Milliliter auf 9×10^5 Zellen eingestellt. Die Bestimmung der aktuellen Zelldichte der Kultur erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Zellsuspension wurde anschließend in einer Petrischale auf die erforderliche Dichte mit Medium verdünnt. In einer 96-Well-Zellkultur-Testplatte wurden 99 µL Zellsuspension pro Well ausgesät und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

10.2.2.4 MTT-Reagenz

Das MTT-Reagenz wurde als Stammlösung von 5 mg MTT (Sigma Aldrich) pro Milliliter einer phosphatgepufferten Kochsalz-Lösung (PBS-Puffer), pH 7.4, hergestellt, steril filtriert und vor Licht geschützt aufbewahrt.

PBS-Puffer	NaCl	0.800 g
	Na ₂ HPO ₄	0.144 g
	KH ₂ PO ₄	0.024 g
	KCl	0.020 g
	H ₂ O dest.	ad 100.0 mL

Die Einstellung des Puffers erfolgte mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf pH 7.4. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

10.2.3 Screening an Cytochrom P450 Oxidasen

10.2.3.1 *Material und Methoden*

cDNA-exprimierte humane Wildtyp Cytochrom P450 Oxidasen (Supersomes™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA)

Substrate und Metabolitenstandards (BD Biosciences Discovery Labware und Sigma Chemical Company, St. Louis):

7-Ethoxyresorufin and Resorufin für CYP1A2,

Coumarin und 7-Hydroxycoumarin für CYP2A6,

7-Ethoxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (EFC) und 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (HFC) für CYP2B6,

Dibenzylfluorescein (DBF) und Fluorescein für CYP2C8 und CYP2C19,

7-Methoxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (MFC) und HFC für CYP2C9 und CYP3A4,

7-Methoxy-4-(aminomethyl)coumarin (MAMC) und 7-Hydroxy-4-(aminomethyl)coumarin (HAMC) für CYP2D6

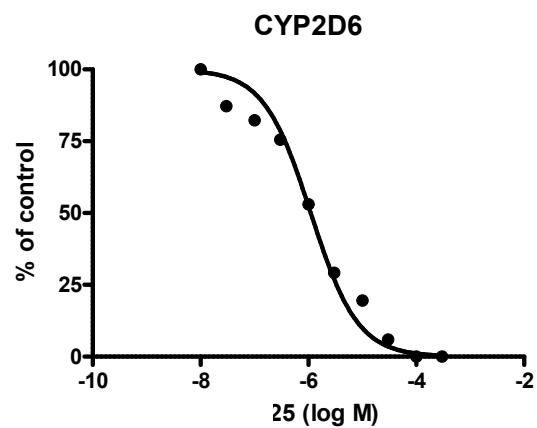
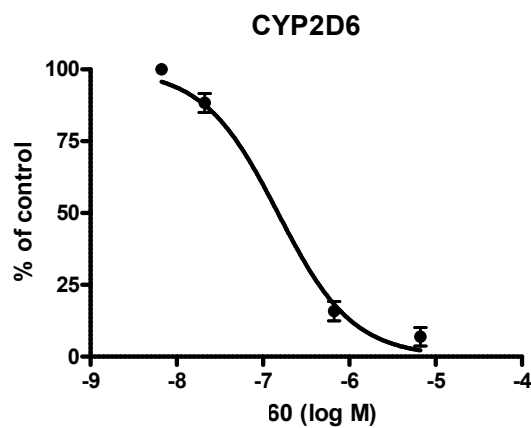
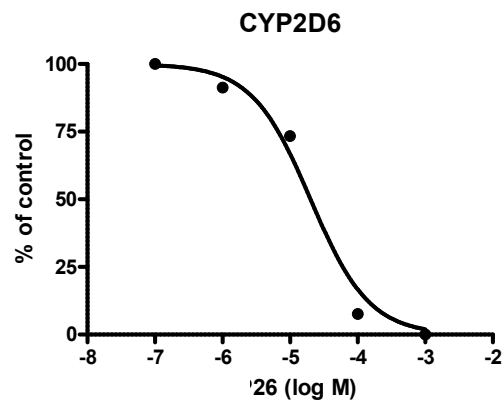
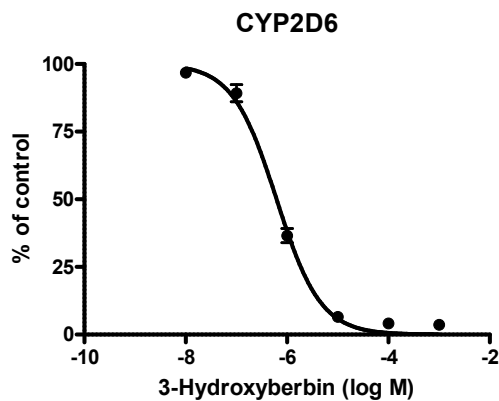
Allgemeiner Ablauf der Assays

Die Inkubationen wurden in 96-Well-Platten durchgeführt. Es wurde für jede Testverbindung eine Verdünnungsreihe hergestellt (0.01 bis 1000 µM). Die Inkubationsmischung bestand beginnend aus 50 µL einer jeden Konzentration und 50 µL einer Mischung aus Substrat und Enzym in einer Pufferlösung (Tris/HCl, pH 7.4). Nach zehnmütiger Vorinkubation (37 °C) wurden 50 µL einer NADPH-Regenerationslösung zur Initiierung der Enzym-Substrat-Reaktion zugegeben. Nach einer vom jeweiligen CYP-Enzym abhängigen Inkubationszeit (10 bis 60 Minuten), wurde die Reaktion gestoppt (110 µL) und die Fluoreszenz mit einem Victor

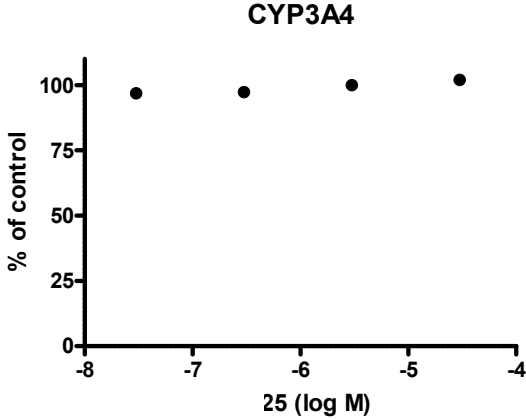
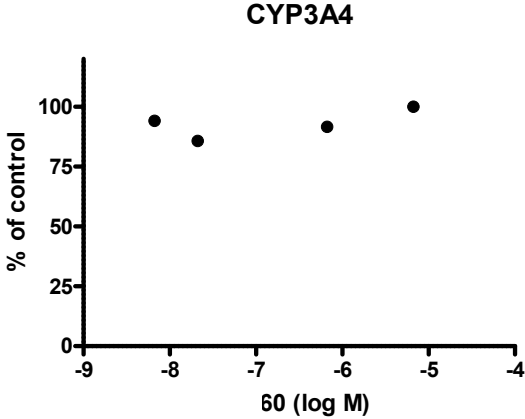
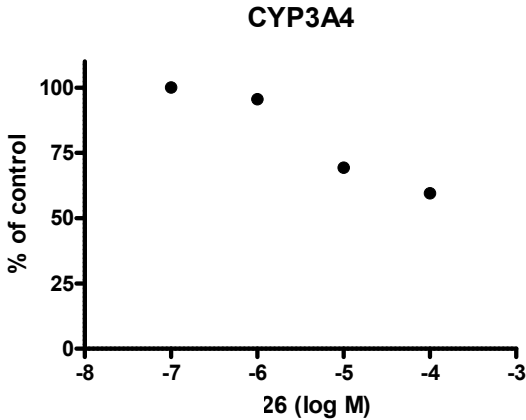
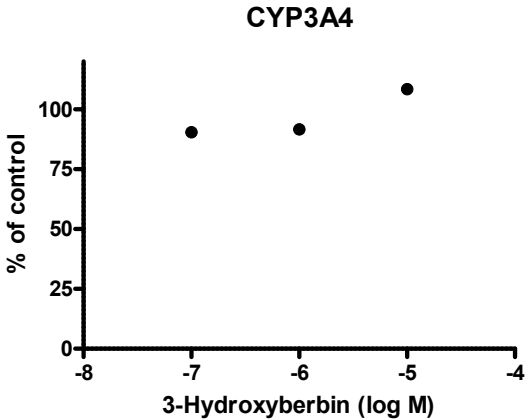
Plattenreader (Perkin-Elmer Life Sciences Wallac, Turku, Finland) bestimmt. Als Fluoreszenzpositivprobe diente eine Lösung des Metaboliten (Standard), als Negativprobe destilliertes Wasser. Für die Bestimmung der Eigenfluoreszenz eventuell gebildeter Metabolite wurde ein Well mit der maximalen Testkonzentration mit Enzym-Puffer-Lösung anstelle Enzym-Substrat-Mischung pipettiert. Weiterhin wurde ein Blank zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Testverbindung vorbereitet, indem die Zugabe der Stopplösung vor Zugabe der NADPH-Regenerationslösung zur Denaturierung des Enzyms führt. Die IC_{50} -Werte wurden unter Verwendung einer nichtlinearen Regressionsanalyse mit der Prism 4.0 Software (San Diego, USA) berechnet.

10.2.3.2 IC_{50} -Kurven

A) Inhibition von CYP2D6



B) Non-Inhibition von CYP3A4



10.2.3.3 Detaillierte Darstellung der Ergebnisse

Tabelle 10: Details aus dem Screening auf Inhibition von CYP450-Enzymen, IC₅₀ und Konfidenzintervall (r²)

CYP isoform	Compound							
	28		26		60		25	
	Category (IC ₅₀ , μM)	95% confidence intervals, (r ²)	Category (IC ₅₀ , μM)	95% confidence intervals, (r ²)	Category (IC ₅₀ , μM)	95% confidence intervals, (r ²)	Category (IC ₅₀ , μM)	95% confidence intervals, (r ²)
1A2	weak (47.7)	40.7–55.9 -0.996	weak (18.7)	9.2–37.7 (0.981)	non-inhibitor (>100)		non-inhibitor (>100)	
2B6	non-inhibitor (>100)	97.7–582.4 (0.940)	weak (20.6)	13.4–31.6 (0.991)	non-inhibitor (>100)		non-inhibitor (>100)	
2C8	non-inhibitor (>100)	93.2–334.7 (0.915)	moderate (7.5)	4.6–12.3 (0.959)	non-inhibitor (>100)		non-inhibitor (>100)	
2C9	non-inhibitor (>100)	79.9–144.9 (0.982)	moderate (6.5)	3.2–12.8 (0.945)	non-inhibitor (>100)		non-inhibitor (>100)	
2C19	weak (13.1)	10.4–16.4 (0.991)	weak (19.7)	13.9–28.0 (0.981)	non-inhibitor (>100)		non-inhibitor (>100)	
2D6	potent (0.62)	0.51–0.76 (0.992)	weak (20.1)	10.7–37.7 (0.984)	potent (0.15)	0.098–0.23 (0.989)	moderate (1.1)	0.78–1.56 (0.978)
3A4	non-inhibitor (>100)		non-inhibitor (>100)		non-inhibitor (>100)		non-inhibitor (>100)	

10.2.4 Untersuchung der Blut-Hirnschrankgängigkeit

10.2.4.1 Aufarbeitung der CFS-, Plasma- und Gehirnproben

Das Gehirngewebe wurde mittels Ultraschall in Milli-Q-Wasser (1:7) homogenisiert (Bandelin Sonopuls, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland).

Jeweils 10 μL der CSF-, Plasma- und Gehirnproben wurden mit 10 μL einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (80:20) und 80 μL einer Mischung aus Acetonitril und Methanol (50:50) verdünnt um Proteine auszufällen. Die Proben wurden für 15 Minuten bei -20°C kaltgestellt um die Ausfällung zu verbessern. Anschließend wurden sie 15 Minuten bei 4°C und 3200 x g zentrifugiert und die Überstände der LC-MS/MS-Analyse zugeführt.

10.2.4.2 LC-MS/MS-Analyse

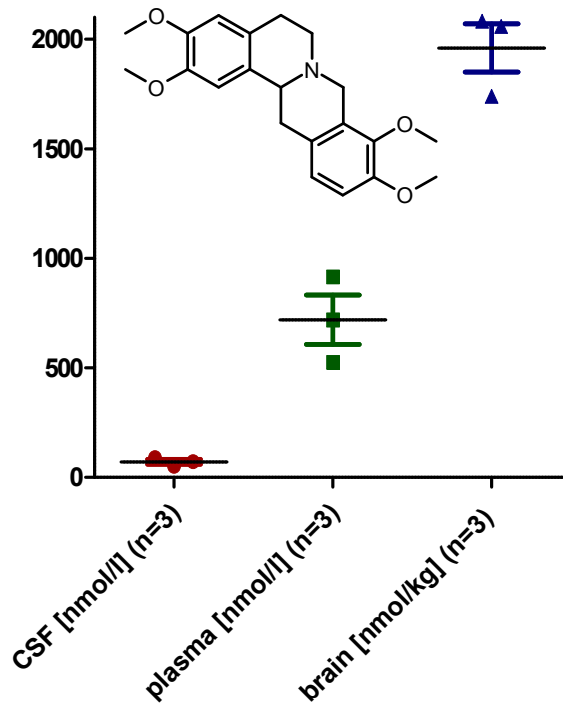
Die Proben wurden jeweils auf die entsprechenden Alkaloide mittels LC-MS/MS analysiert (API 4000™ triple quadrupole mass spectrometer (MDS Sciex, Ontario, Kanada)). Das verwendete Fließmittel war eine dem Gradienten entsprechende Mischung aus LC-MS-grade

Wasser (+ 0,1% Ameisensäure) und LC-MS-grade Acetonitril. Als Säule wurde eine XTerra®-RP-Säule verwendet (XTerra® MS C18, 50 x 2.1 mm i. d., 5 µm particles, Waters Corporation, Milford, MA, USA).

10.2.4.3 Graphische Darstellung der Ergebnisse

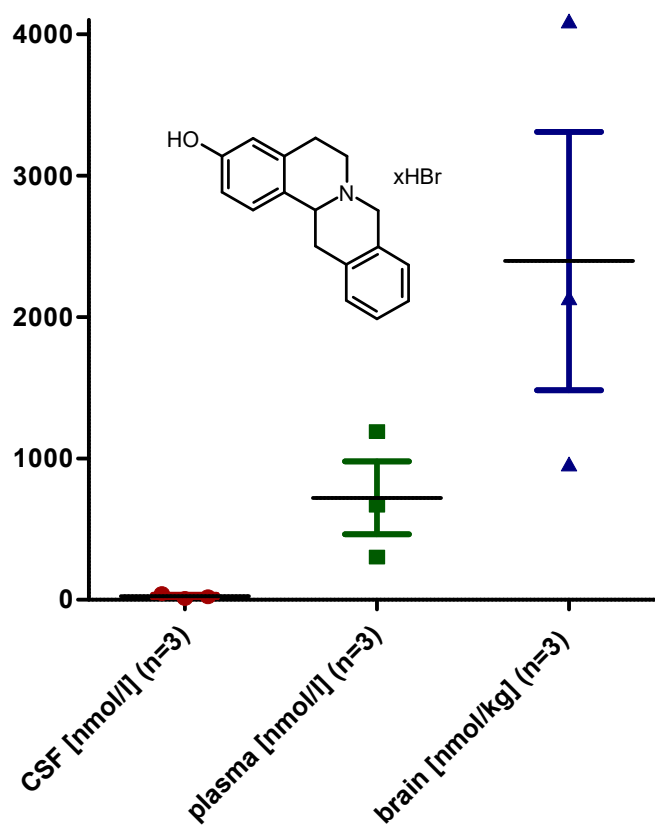
THP (22)

B/P = 2.72



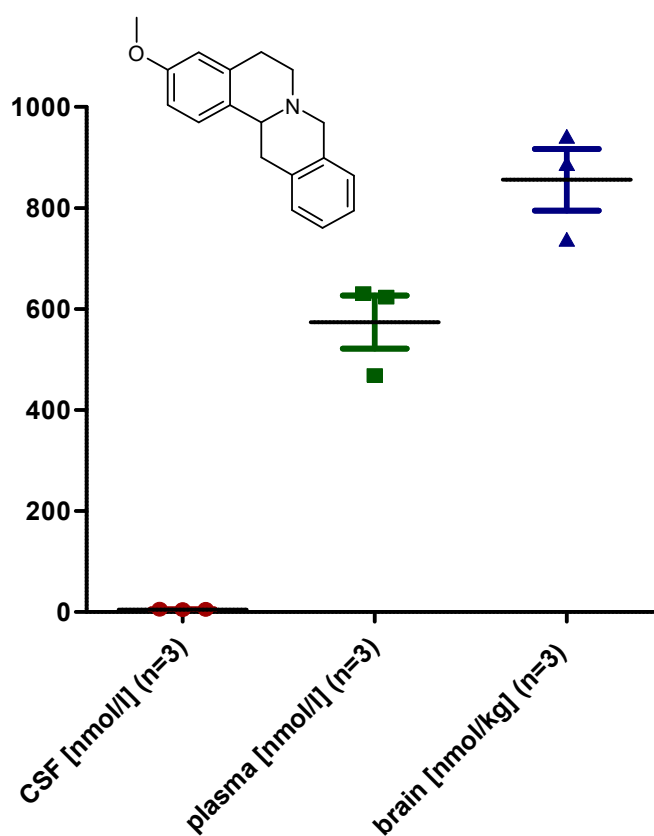
3-Hydroxyberbin (28)

B/P= 3.32



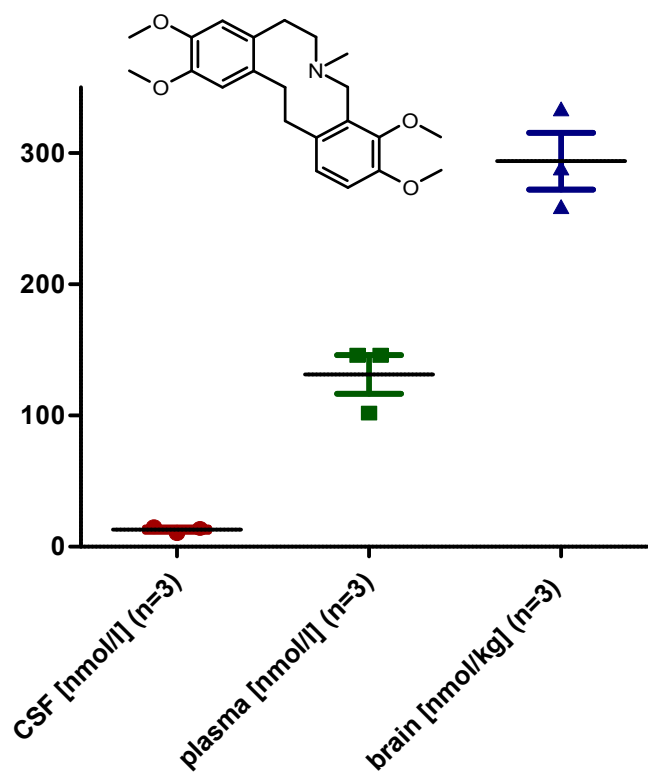
3-Methoxyberbin (27)

B/P= 1.49

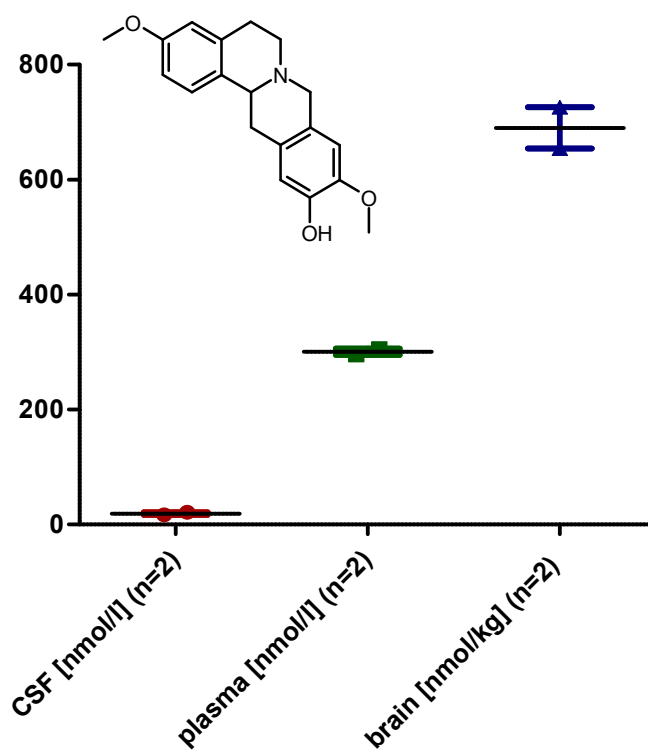


2,3-Dimethoxy-7-methyl-9,10-dimethoxy-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[d,h]azecin (**25**)

B/P= 2.24

3,10-Dimethoxy-11-hydroxyberbin (**60**)

B/P= 2.30



10.2.5 Screening auf Inhibition der Cholesterolsynthese in humanen Zellen

Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion

Nach der Inkubation (3.2.3.4) der *HL-60*-Zellen mit einem potenziellen Inhibitor wurden die Suspension in 2.0 mL Mikrozentrifugen Safe-lock Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Röhrchen wurden für 5 Minuten bei 9000 g zentrifugiert (Zentrifuge, Eppendorf 5415 D, Hamburg, Deutschland). Die verbleibenden Pellets wurden in 1 mL 1 M wässriger Natriumhydroxid-Lösung suspendiert, für 30 Sekunden gevortext (Vortex Genie 2, Scientific Apparatus, Bohemia, USA) und in 4 mL Glasvials mit Teflonseptum überführt. Die Vials wurden mit Stickstoff geflutet und dicht verschlossen. Danach lagerten sie bei 70 °C für eine Stunde im Trockenschrank (WTB Binder, Tuttlingen, Germany). Im Ultraschallbad wurden die Lösungen auf Raumtemperatur abgekühlt (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Deutschland) und anschließend zurück in Safe-lock Reaktionsgefäße überführt, 700 µL TBME und 50 µL Cholestan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; 10 µg/mL in TBME) als internen Standard zugefügt. Alle Reaktionsgefäße wurden für eine Minute geschüttelt und erneut zentrifugiert (5 min, 9000 g). Der organische Überstand wurde in ein zweites 2.0 mL Mikrozentrifugen Safe-lock Reaktionsgefäß überführt, welches 40 ± 2 mg einer Mischung von wasserfreiem Natriumsulfat und PSA (primary secondary amine, 40 µm Partikelgröße, Varian, Harbor City, USA) im Verhältnis 7:1 enthielt. Die Extraktion mit 750 µL TBME wurde zweimal wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen wurden 1 min intensiv geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min, 9000 g). Jeweils 1.0 mL der gereinigten Extrakte wurden in Braunglasvials überführt und im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Die Rückstände wurden in 950 µL TBME und 50 µL Silylierungsreagenz (MSTFA/TSIM 9:1, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgenommen. Vor Injektion zur GC-MS-Analyse wurden die Proben mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt.

GC-MS-Analyse

Eine Varian Saturn 2200 Ionenfalle wurde mit einem Varian 3800 Gaschromatographen (Darmstadt, Deutschland) gekoppelt. Als automatischen Probengeber wurde ein CombiPal von CTC Analytics (Zwingen, Schweiz) eingesetzt. Ein 1177 Injektor von Varian (Darmstadt, Germany) wurde im splitless injection Modus verwendet. Zur Datenanalyse und Instrumentensteuerung diente die Software Varian Workstation 6.9 SP 1. Für die Analyse wurde eine Varian VF-5ms Kapillarsäule von 30 m Länge, 0.25 mm inneren Durchmessers and 0.25 µm Schichtdicke mit einer 10 m EZ-Guard Säule eingesetzt.

GC-MS-Parameter:

Fließmittel:	Helium 5.0 (99.9990 %)
Fluß:	1.3 mL/min
Einlasstemperatur:	250 °C
Injektionsvolumen:	1 µL
Temperatur MS Transfer Line:	270 °C
Ofentemperatur:	50 °C (1 min) → 260 °C (50 °C pro min) → 310 °C (4 °C pro min)
Laufzeit:	18.2 min
MS (full scan):	50 bis 450 m/z (9-12 min) 100 bis 650 m/z (12-18.2 min)

Die Sterole wurden durch Vergleich mit authentischen Standardsubstanzen oder mit Spektren aus der Datenbank NISTTM 2005 identifiziert. Charakteristische Ionen für Zymostenol sind m/z 458, 353, 213, für 7-Dehydrocholesterol m/z 351, 325, 366, and für Cholestan m/z 357, 217, 203.

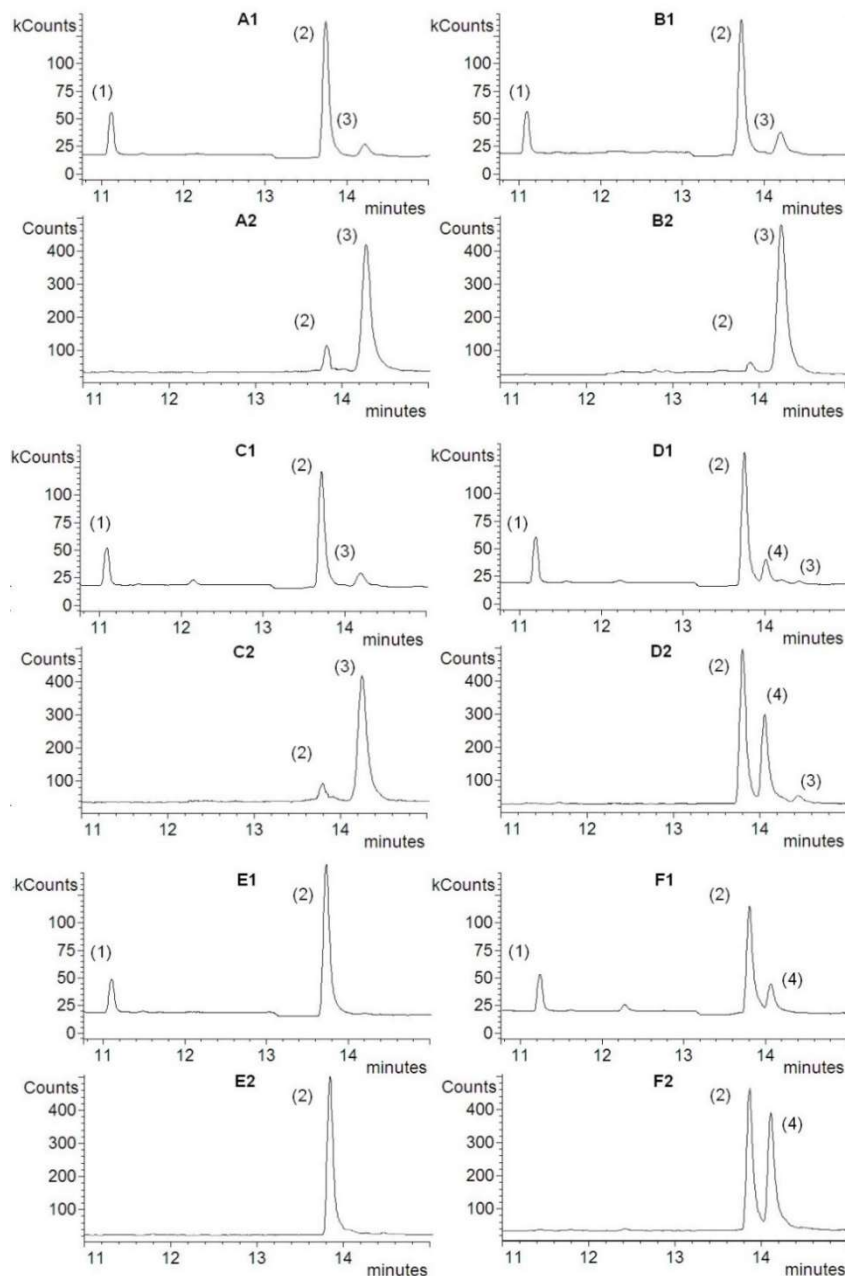


Abbildung 59: Chromatogramme der isolierten Sterolfractionen (nach Inkubation mit Inhibitor)
A1, B1, C1, D1, E1, F1: im full scan Modus (m/z 100 to 650); **A2, B2, C2, D2, E2, F2:** im selected ion Modus. **A1 5h** 1 μM (full scan), **A2 5h** 1 μM (selected ion scan), **B1 5h** 50 μM (full scan), **B2 5h** 50 μM (selected ion scan), **C1 5e** 1 μM (full scan), **C2 5e** 1 μM (selected ion scan), **D1 5e** 50 μM (full scan), **D2 5e** 50 μM (selected ion scan), **E1 5k** 1 μM (full scan), **E2 5k** 1 μM (selected ion scan), **F1 5k** 50 μM (full scan), **F2 5k** 50 μM (selected ion scan); (1) Cholestan (Interner Standard), (2) Cholesterol, (3) 7-Dehydrocholesterol, (4) Zymostenol

10.2.6 Screening auf Inhibition der Ergosterolbiosynthese in Hefen: Probenvorbereitung zur GC-MS-Analyse

Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion

Der Inhalt jedes einzelnen Wells mit genügend Zellwachstum und einer hohen Inhibitorkonzentration (MIC/2 und/oder MIC/4) wurde in 2.0 mL Mikrozentrifugen Safe-lock Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Röhrchen wurden für 5 Minuten bei 9000 g zentrifugiert (Zentrifuge, Eppendorf 5415 D, Hamburg, Deutschland). Die verbleibenden Pellets wurden mit 1.0 mL PBS (phosphate buffered saline) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets in 2 M wässriger Natriumhydroxid-Lösung suspendiert, für 30 Sekunden gevortext (Vortex Genie 2, Scientific Apparatus, Bohemia, USA) und in 4 mL Glasvials mit Teflonseptum überführt. Die Vials wurden mit Stickstoff geflutet und dicht verschlossen. Danach lagerten sie bei 70 °C für eine Stunde im Trockenschrank (WTB Binder, Tuttlingen, Germany). Im Ultraschallbad wurden die Lösungen auf Raumtemperatur abgekühlt (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Deutschland) und anschließend zurück in Safe-lock Reaktionsgefäße überführt, 700 µL TBME und 50 µL Cholestan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; 10 µg/mL in TBME) als internen Standard zugefügt. Alle Reaktionsgefäße wurden für eine Minute geschüttelt. Zur schneller Phasentrennung wurde erneut zentrifugiert (5 min, 9000 g). Der organische Überstand wurde in ein zweites 2.0 mL Mikrozentrifugen Safe-lock Reaktionsgefäß überführt, welches 40 ± 2 mg einer Mischung von wasserfreiem Natriumsulfat und PSA (primary secondary amine, 40 µm Partikelgröße, Varian, Harbor City, USA) im Verhältnis 7:1 enthielt. Die Extraktion mit 750 µL TBME wurde wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen wurden 1 min intensiv geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min, 9000 g). Jeweils 1.0 mL der gereinigten Extrakte wurden in Braunglasvials überführt und im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Die Rückstände wurden in 950 µL TBME und 50 µL Silylierungsreagenz (MSTFA/TSIM 9:1, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgenommen. Vor Injektion zur GC-MS-Analyse wurden die Proben mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt.

10.3 Reinheitsbestimmung der Substanzen mittels HPLC

Die Reinheit der Verbindungen **5h**, **5i**, **5f** wurde mittels HPLC (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Deutschland) bestimmt. Die Verbindungen wurden in einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (80:20) aufgenommen (Konzentration: 200 µg/mL), 5 µL davon wurden in das System injiziert. Als mobile Phase diente eine Mischung aus Acetonitril/Wasser (80:20) und 1 % THF bei einer Flussrate von 0.700 mL/min. Als Säule wurde eine Kinetex C18-Säule (100 x 2.10 mm, 2.6 µm) von Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) verwendet. Die Peakflächen wurden bei einer festen Wellenlänge von 210 nm aufgezeichnet, Die Datenerfassung und -verarbeitung erfolgte mit einer Agilent ChemStation Software (Waldbronn, Deutschland). Alle Verbindungen wiesen eine Reinheit größer als 97 % auf.

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Imming für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas, sein Vertrauen und seine unermüdliche Geduld. Seine uneingeschränkte Unterstützung in all den Jahren trug zum erfolgreichen Abschluß der wissenschaftlichen Arbeit neben Studium und Berufstätigkeit bei.

Allen Kooperationspartnern, die einen wesentlichen Beitrag zu dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit leisteten, danke ich recht herzlich.

Dazu zählen in erster Linie Herr Prof. Dr. Franz Bracher von der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ihm danke ich für die Bereitschaft, das externe Gutachten zu der vorliegenden Arbeit anzufertigen, für seine Unterstützung bei der Erstellung unserer Publikation und für die Möglichkeit, unsere synthetisierten Verbindungen im Department Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München hinsichtlich antimykotischer, antibakterieller und cytotoxischer Aktivitäten zu untersuchen. Darüberhinaus danke ich Frau Martina Stadler aus dem Arbeitskreis um Prof. Dr. Bracher für ihre kompetente und freundliche Unterstützung bei der Durchführung des Agar-Diffusions- sowie des cytotoxischen MTT-Tests. Herrn Christoph Müller danke ich besonders für die Durchführung der Screeningassays auf Hemmung der Cholesterol- und Ergosterolbiosynthese und seine stete fachliche Ansprechbarkeit.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Kaisa Salminen aus dem Arbeitskreis um Prof. Dr. Raunio der Fakultät für Gesundheitswissenschaften, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Kuopio, Finnland, für die Durchführung der Screeningassays an Cytochrom P450 Oxidasen und Frau Patrizia Vöhringer, Mitarbeiterin der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, für die *in vivo* Untersuchung ausgewählter synthetisierter Verbindung auf ihre Hirngängigkeit.

Frau Ilona Fritsche aus dem Arbeitskreis um Prof. Dr. Imming danke ich für die Synthese von Edukten und das Vorbereiten von synthetischen Arbeiten, wenn ich einmal wieder zwischen Vorlesung und Labor umher huschte.

Den Diplomanden Octavie Djeugoue Tchentchue und Richard Barthel danke ich für die Optimierung der Isochromanonsynthese bzw. der Erweiterung der Substanzbibliothek der Phenethyltetrahydroisochinoline.

Sehr großer Dank gilt dem gesamten Arbeitskreis Imming. Hier meine ich insbesondere die PI-Mädels Tody, Ines, Lily und Katja. Ihr habt mir die Promotionszeit, den Stress und allen

Kummer mit netten Kaffeerunden, interessanten Gesprächen, kulinarischen Momenten mit frisch gebackenem Brot und Olivenöl und unsere daraus entstandene und fortbestehende Freundschaft versüßt. Dafür danke ich euch sehr.

Abschließend möchte ich mich bei Alex bedanken, der mir von Beginn an beiseite stand und mir den Rücken freihielt, wo er nur konnte.

Liste der Veröffentlichungen

Publikationen

Horling, A., Müller C., Barthel R., Bracher F., Imming P. A new class of selective and potent 7-dehydrocholesterol reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **55** (17), 7414-7622 (2012).

Salminen KA., Rahnasto-Rilla M., Väänänen R., Imming P., Meyer A., Horling A., Poso A., Laitinen T., Raunio H., Lathela-Kakkonen M. Time-dependent inhibition of CYP2C19 by Isoquinoline alkaloids: in vitro and in silico analysis. *Drug Metab. Dispos.* **43** (12), 1891-1904 (2015).

Poster

Paul A., Müller C., Krauss J., Bracher F., Imming P. Synthesis and biological evaluation of berberine derivatives. *58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – Gesellschaft für Arzneipflanzen- und Naturstoff-Forschung e.V.* 29. August – 2. September 2010, Berlin.

und *DPhG-Jahrestagung* vom 4. Bis 7. Oktober 2010, Braunschweig.

Horling A., Müller C., Barthel R., Bracher F., Imming P. Tetrahydroisoquinoline alkaloid derivatives inhibit 7-dehydrocholesterol reductase. *60th International Congress on Natural Products Research.* 28. Juli bis 2. August 2012, New York.

Lebenslauf

**Aline
Horling**

geb. Paul

geboren am

24.02.1982

in Luckenwalde

Ausbildung

1994 bis 06/2001	Friedrich-Gymnasium Luckenwalde Allgemeine Hochschulreife
10/2002 bis 09/2006	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/2004	1. Staatsexamen
09/2006	2. Staatsexamen
10/2006 bis 09/2007	Praktisches Jahr Pharmazie
bis 03/2007	Diplomarbeit, Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Garching-Hochbrück, universitäre Betreuung: Prof. K. Mäder, MLU Halle-Wittenberg
04/2007 bis 09/2007	Neue Apotheke / Halle a. d. Saale
08/2007	Diplomprüfung und Erlangung des akademischen Grades zur Diplom-Pharmazeutin
11/2007	3. Staatsexamen Pharmazie und Approbation
10/2007 bis 04/2010	Studium der Lebensmittelchemie (ab 5. FS), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
04/2010	Zweiter Abschnitt der Staatsprüfung und Diplomprüfung akademischer Grad: Diplom-Lebensmittelchemikerin
05/2010 bis 04/2011	Praktisches Jahr Lebensmittelchemie, Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Halle a. d. Saale
04/2011	Dritter Abschnitt zur Staatsprüfung, Erlangung der Berufsbezeichnung „Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin“

Aline Horling

geb. Paul

geboren am

24.02.1982

in Luckenwalde

Berufstätigkeit

01/2002	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter Apotheker
01/2008 bis 07/2009	Nebentätigkeit als Apothekerin in der Neuen Apotheke Halle
seit 02/2008	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, MLU Halle-Wittenberg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Imming
05/2011 bis 04/2015	Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Laborleiterin in der Abteilung Lebensmittel- und Ökochemie
05/2015 bis 10/2016	Überwachungsstelle für öffentlich-rechtliche Aufgaben des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Sachverständige in den Bereichen Pharmazie und Lebensmittelchemie
seit 11/2016	Kommando Sanitätsdienst der Bundeswehr Koblenz, Referentin (Lebensmittelchemie/Verbraucherschutz)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, die vorliegende wissenschaftliche Arbeit in dieser oder in einer anderen Fassung keiner anderen Fakultät vorgelegt zu haben. Mit der vorliegenden Dissertation bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades.

Ferner erkläre ich gemäß § 5 der geltenden Promotionsordnung, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Aline Horling

Kiel, Februar 2017