

**Detektion, Isolierung und Strukturaufklärung von
Sekundärmetaboliten aus *Ancistrocladus congolensis*
und *Arabidopsis thaliana***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Claudia Steinert
aus Dresden

Würzburg 2015

Eingereicht am:.....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:.....

2. Gutachter:.....

der Dissertation

1. Prüfer:.....

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2008 bis Mai 2013
am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. G. Bringmann danke ich für
die Bereitstellung der Ressourcen, die die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben
und die wissenschaftliche Unterstützung und Ausbildung.

Zudem danke ich ihm für die Ermöglichung
der eigenständigen Sammlung des *Ancistrocladus*-Pflanzenmaterials in der DR Kongo
und des Besuchs von Konferenzen und Symposien innerhalb und außerhalb Deutschlands.

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits
Gegenstand von Publikationen,^[39,103,142] wissenschaftlichen Vorträgen und
Posterpräsentationen, sowie eines Kurzfilms.^[194]

MEINER FAMILIE

"Wissenschaft ist Arbeit. Unser Wissen über die Funktionen der Welt wurde nicht an einer goldenen Schnur vom Himmel heruntengelassen."

(David Ellyard, 2009; *Scientifica*)

"Mit dem Wissen wächst der Zweifel."

"Gewisse Bücher scheinen geschrieben zu sein, nicht damit man daraus lerne, sondern damit man wisse, dass der Verfasser etwas gewusst hat."

(Johann Wolfgang von Goethe, 1749 bis 1832 n. Chr.)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Isolierung und Strukturaufklärung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus <i>Ancistrocladus</i>-Pflanzen.....	6
2.1	Kenntnisstand über <i>Ancistrocladus</i> -Gewächse und ihre Inhaltsstoffe, die Naphthylisochinolin-Alkaloide.....	6
2.2	Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe von <i>Ancistrocladus congolensis</i>	13
2.3	Isolierung und Strukturaufklärung von Naphthylisochinolin aus <i>Ancistrocladus congolensis</i>	13
2.3.1	Identifizierung der bekannten Naphthylisochinoline Korupensamin A (10a), Korupensamin D (20), Ancistrobrevin B (26), Hamatin (27), 5'- <i>O</i> -Demethylhamatin (28) und 6- <i>O</i> -Methylhamatin (29).....	15
2.3.2	Strukturaufklärung von bekannten und neuen dimeren Naphthylisochinolin vom Michellamin-Typ.....	16
2.4	Bedeutung der aus <i>A. congolensis</i> isolierten Naphthylisochinoline.....	27
2.5	Phytochemische und populationsgenetische Untersuchungen an <i>Ancistrocladus spec.</i> 032.....	34
2.5.1	Sammlung von <i>Ancistrocladus spec.</i> 032.....	34
2.5.2	Phytochemische Untersuchungen an <i>Ancistrocladus spec.</i> 032: Isolierung und Strukturaufklärung von neuartigen dimeren Naphthylisochinolin.....	36
2.5.3	Populationsgenetische Untersuchungen von <i>Ancistrocladus spec.</i> 032.....	51
3	Strukturaufklärung von Polyketiden aus dem Bakterienstamm <i>Streptomyces spec.</i> AK 671.....	53
3.1	Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe aus <i>Streptomyces spec.</i> AK 671.....	53
3.2	Bestimmung der Absolutkonfiguration von EM18.....	55
3.3	Identifizierung von Bhimamycin F (53).....	60
3.4	Strukturaufklärung von Bhimamycin H (54).....	61
3.5	Strukturaufklärung von Bhimamycin I (55).....	62
3.6	Bhimamycin F (53), H (54) und I (55) – echte Naturstoffe oder nicht?.....	63
3.7	Bioaktivitäten von Bhimamycin F (53), H (54) und I (55).....	64
4	Metabolitprofile in <i>Arabidopsis thaliana</i>: Detektion von Glucosinolaten im Phloemsaft mittels CZE-ESI-oTOF-MS.....	65
4.1	Kenntnisstand über Glucosinolate im Phloemsaft von <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
4.1.1	CZE-ESI-oTOF-MS-Methode.....	67
4.1.2	Sammlung von Phloem-Exsudaten aus <i>Arabidopsis-thaliana</i> -Blättern.....	68
4.1.3	Detektion von Glucosinolaten in Phloemsaften von <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
4.2	Detektion von Glucosinolaten im Phloemsaft von <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
4.2.1	Verbesserung des Analyten-Matrix-Verhältnisses in Phloemsaft-Exsudaten.....	73
4.2.2	Detektion von Glucosinolaten in Phloemsaft-Exsudaten von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Abhängigkeit von der Zeit nach Infiltration mit MgCl ₂	86
5	Zusammenfassung.....	96
6	Summary.....	101
7	Experimenteller Teil.....	106
7.1	Allgemeine Methoden.....	106
7.1.1	Verwendete Apparaturen und Messgeräte.....	106

7.1.2	Chromatographische Methoden	108
7.1.3	Quantenchemische Rechnungen	109
7.1.4	Lösungsmittel und Chemikalien	109
7.2	Isolierung von monomeren und dimeren Naphthylisochinolinen aus <i>Ancistrocladus congolensis</i>	110
7.2.1	Isolierungsprozedur.....	110
7.2.2	Aus <i>Ancistrocladus congolensis</i> isolierte Verbindungen.....	112
7.3	Isolierung von dimeren Naphthylisochinolinen aus <i>Ancistrocladus</i> spec. 032.....	144
7.3.1	Isolierungsprozedur.....	144
7.3.2	Aus <i>Ancistrocladus</i> spec. 032 isolierte Verbindungen.....	145
7.4	Strukturaufklärung von Polyketiden aus <i>Streptomyces</i> spec. AK671	151
7.4.1	Aufklärung der Absolutkonfiguration von EM18 (48)	151
7.4.2	Identifizierung von bekannten Substanzen	153
7.4.3	Strukturaufklärung von neuen Substanzen.....	154
7.5	Detektion von Glucosinolaten im Phloemsaft von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels CZE-ESI- oTOF-MS	156
7.5.1	Auflistung der durchgeführten Phloemsammlungen.....	156
7.5.2	Messdaten und Berechnungen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-4-2.....	160
7.5.3	Messdaten und Berechnungen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-0-5.....	163

1 EINLEITUNG

"Nicht der Arzt heilt, sondern die Natur. Der Arzt kann nur ihr getreuer Helfer und Diener sein. Er wird von ihr, niemals aber die Natur von ihm lernen."

(Hippokrates von Kos, 460 bis ca. 377 v. Chr.)

Dieses Zitat von Hippokrates beschreibt wie kein anderes die Beziehung zwischen Mensch und Natur, in der Vergangenheit, in der Gegenwart und auch in der Zukunft. Seit Menschengedenken werden Pflanzen und ihre Inhaltsstoffe zur Heilung von Krankheiten und Linderung von Gebrechen eingesetzt.^[1,2] Zwar beginnt der Mensch in Zeiten der kontrollierten gentechnischen Veränderung von Organismen, des "Genetic Engineering",^[3] und der Computer-basierten Vorhersage von physikalischen und chemischen Eigenschaften biologischer Systeme, dem "Molecular Modelling",^[4] mit der gezielten künstlichen Generierung von Substanzen, doch die Bandbreite an pharmakologisch wirksamen Substanzen in Kombination mit einer effizienten (Bio-) Synthese wird er vermutlich nie erreichen. Dass die Natur den Menschen immer noch mit neuen (und alten) Heilmitteln versorgen kann, erscheint logisch unter dem Aspekt, dass die Ursachen der humanen Krankheiten – sei es endogen auf molekularer Ebene oder exogen durch Pathogene aus dem Bereich der Mikroorganismen – ebenfalls natürlichen Ursprungs sind. Dabei sind Bakterien, Viren und Pilze nicht nur für höher entwickelte Organismen pathogen, auch zwischen den Mikroorganismen herrscht ein erbitterter Kampf, welcher mit chemischen Waffen ausgetragen wird.^[5] Die Absonderung von Verbindungen, die toxisch für den Konkurrenten sind, sichert das eigene Überleben. Dabei ist es keine Seltenheit, dass Bakterien selbst Produzenten von Antibiotika sind, wie zum Beispiel die Gattung *Streptomyces* der Actinobakterien.^[6,7] Auch Pflanzen wissen sich mit "Giften" gegen Pathogene und Fraßfeinde zu verteidigen.^[8-10]

Diese Art von Naturstoffen, die nicht für das primäre Überleben des Organismus wie zum Beispiel Zucker und Aminosäuren vonnöten sind, aber deren konstante Absens die Vitalität und Überlebensfähigkeit einschränken würde, werden Sekundärmetabolite genannt.^[11] Organismen, die in ihrer Mobilität eingeschränkt sind oder über kein Immunsystem im klassischen Sinne verfügen, sichern ihr langfristiges Überleben durch die Produktion von Sekundärmetaboliten, welche oft eine negative pharmakologische Wirkung auf Feinde und Konkurrenten und eine positive auf Symbionten und andere nützliche Partnerorganismen haben.

Diese Klassen von Naturstoffen, zu denen zum Beispiel die Alkaloide und die Glycoside gehören,^[11] sind hochinteressant für den Menschen, denn auch auf ihn haben diese Substanzen meist eine pharmakologische Wirkung. Ist diese Wirkung einmal entdeckt, wie zum Beispiel die schmerzlindernde Wirkung eines Weidenrindenextrakts, so hat die Vergangenheit gezeigt, dass es sich lohnt, die dafür verantwortlichen Substanzen zu identifizieren und zu charakterisieren, und, bei Bedarf, zu modifizieren.

Das aus der Weidenrinde isolierte Salicin (**1**) hat eine analgetische Wirkung, reizt aber zugleich auch den Magen, erst das synthetische, magenfreundliche Derivat Acetylsalicylsäure (**2**) wurde zum weltweit meistverkauften Schmerzmittel (Abbildung 1).^[12,13]

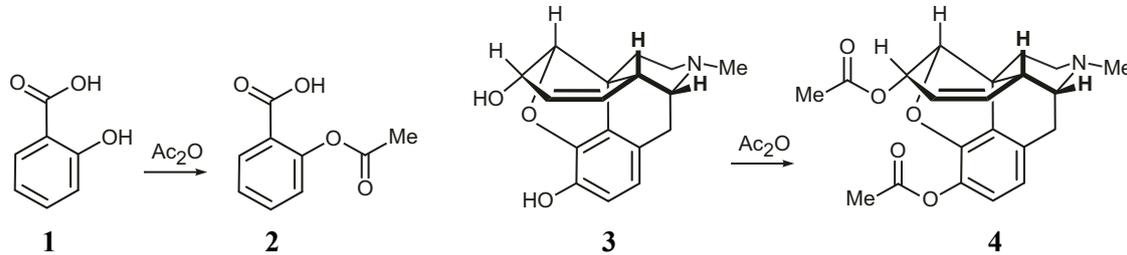


Abbildung 1. Die Naturstoffe Salicin (**1**) und Morphin (**3**) mit ihren synthetischen Derivaten Acetylsalicylsäure (**2**) und Diacetylmorphin/Heroin (**4**).

Auch das synthetische Derivat des Alkaloids Morphin (**3**), Diacetylmorphin oder Heroin genannt (**4**), ist wirksamer als der Naturstoff, da die durch die Acetylierung erhöhte Lipophilie die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke vereinfacht (Abbildung 1).^[14,15]

Die Erfolge der Wissenschaftler, die für den Menschen essentielle Medikamente aus Naturstoffen entwickelten, waren und sind immer noch ein großer Ansporn, um in der instrumentellen Analytik geeignete empfindliche und leistungsstarke Methoden zu entwickeln, denn bevor die synthetische Modifikation interessanter Naturstoffe erfolgen kann, müssen diese zunächst detektiert, isoliert und strukturell analysiert werden. Dabei liegt das Augenmerk einerseits auf der größtmöglichen Sensitivität der Detektionsmethoden bei einer gleichzeitigen Trennung von Substanzgemischen, was durch die Kopplung von chromatographischen Trennsystemen – wie zum Beispiel HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und CZE (Kapillarzonenelektrophorese) – mit sensiblen Detektoren – wie UV und MS (Massenspektrometer) – erreicht wird.^[16-19] Andererseits sollen die analytischen Methoden die Möglichkeit bieten, die Naturstoffe in ihrer gesamten strukturellen Komplexität – also von der Konstitution^[20] über die relative Konfiguration^[20] bis hin zur absoluten Konfiguration^[20] – aufzuklären. Dafür geeignet sind moderne spektroskopische Methoden wie hochauflösende Massenspektroskopie (HRMS),^[21] NMR- (Nuclear-Magnetic-Resonance-) oder Kernresonanz-Spektroskopie^[22] und CD- (Circular-Dichroismus-) Spektroskopie.^[23]

Diese – und weitere – Methoden der instrumentellen Analytik wurden in der vorliegenden Arbeit zur Detektion, Auftrennung und Isolierung, Analyse und Strukturaufklärung von Naturstoffen aus den Klassen der Alkaloide – den Naphthylisochinolin – und der Senfölglycoside – den Glucosinolaten – eingesetzt.

Naphthylisochinolin-Alkaloide bestehen aus einer Naphthalin- und einer Isochinolin-Einheit, die über eine – meist rotationsgehinderte – Biarylachse miteinander verbunden sind (Abbildung 2).^[24] Viele der monomeren Naphthylisochinoline weisen Bioaktivitäten gegen die Erreger tropischer Krankheiten auf, wie zum Beispiel Dioncophyllin C (**5**) gegen *Plasmodium falciparum* (Malaria)^[25], Ancistrolikokin B (**6**) gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Afrikanische Schlafkrankheit)^[26] und Ancistrocladinium B (**7**) gegen *Leishmania major* (Cutane Leishmaniose)^[27] (Abbildung 2).

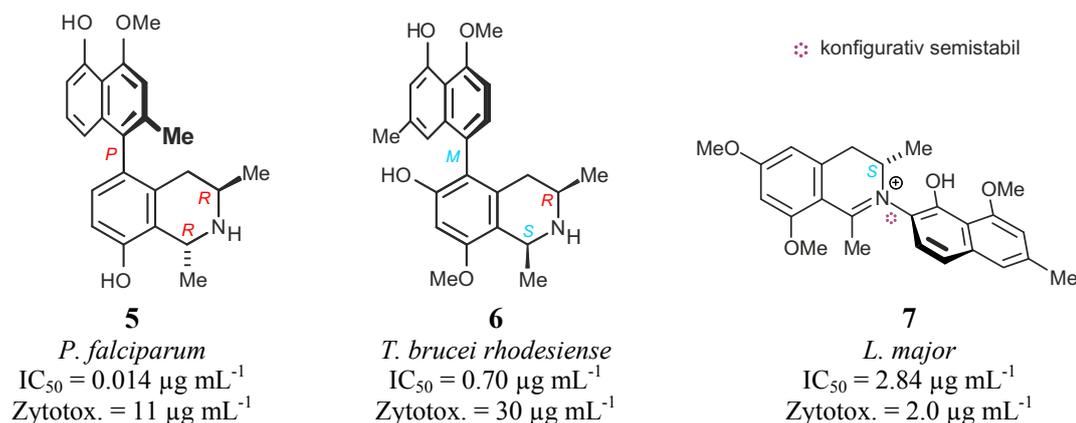


Abbildung 2. Bioaktivitäten ausgewählter Naphthylisochinolin-Monomere: Dioncophyllin C (**5**), Ancistrolikokin B (**6**) und Ancistrocladinium B (**7**).

Auch dimere Naphthylisochinoline, die aus zwei miteinander verknüpften identischen oder verschiedenen Monomeren bestehen, zeigen interessante Bioaktivitäten. Das erst kürzlich isolierte Jozimin A₂ (**8**; Abbildung 3) ist *in vitro* deutlich wirksamer als das aktivste Naphthylisochinolin-Monomer Dioncophyllin C (**5**; Abbildung 2) und sogar wirksamer als der momentan als Arzneimittel eingesetzte Standard Chloroquin ($IC_{50} = 0.003 \mu\text{g mL}^{-1}$; Zytotoxizität: $IC_{50} = 17.5 \mu\text{g mL}^{-1}$).^[28] Ein synthetischer Zugang zu dem Naturstoff wurde bereits etabliert,^[28] momentan ist die Synthese in größerem Maßstab in Arbeit, um genügend Material für *in-vivo*-Tests zu liefern.

Dimere vom Michellamin-Typ – wie zum Beispiel die Michellamine A und B (**9a** und **9b**; Abbildung 3) zeigen HIV-inhibitorische Eigenschaften, wobei Michellamin B (**9b**) gegen verschiedene HIV-Stämme wirksam ist und zusätzlich cytoprotektive Eigenschaften besitzt.^[29-31] Die vielversprechenden pharmakologischen Eigenschaften der Michellamine initiierten die Entwicklung verschiedenster Totalsynthesen von Michellamin B (**9b**) und struktureller Analoga,^[32-36] sowie die Entwicklung analytischer Screening-Methoden zur direkten Detektion von Dimeren in Pflanzenextrakten, basierend auf der violetten Färbung einer Dimer-enthaltenden Fraktion, wenn diese mit Bleitetraacetat behandelt wird.^[37,38] *Ancistrocladus congolensis*, eine tropische Lianenart aus dem Kongobecken, wurde dabei als potenzieller Michellamin-enthaltender Kandidat identifiziert.^[37]

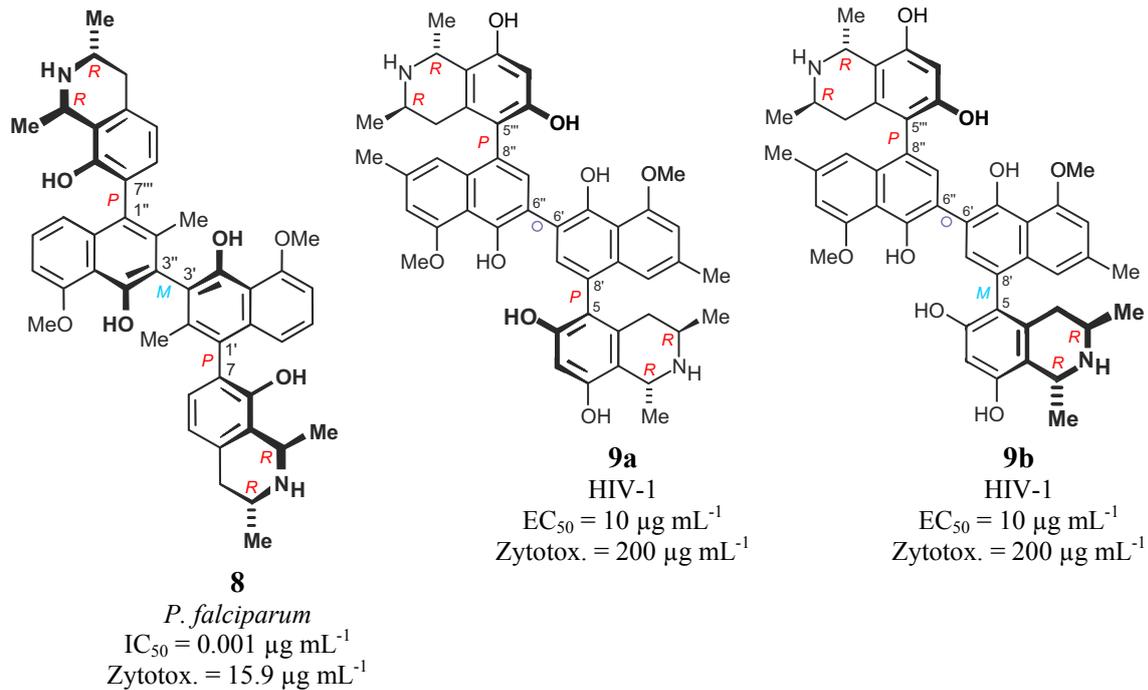


Abbildung 3. Bioaktivitäten ausgewählter Naphthylisochinolin-Dimere: Jozimin A₂ (**8**), Michellamin A (**9a**) und Michellamin B (**9b**).

Das Kongobecken erwies sich in den letzten Jahren als ein Ort von großer Biodiversität in Bezug auf *Ancistrocladus*-Arten. Diese konnten zwar botanisch noch nicht klassifiziert werden, waren aber trotzdem ergiebige Quellen von neuen, wertvollen Naphthylisochinolinen, wie zum Beispiel von Jozimin A₂ (**8**; Abbildung 3).^[28,39-41]

Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit unbekannte *Ancistrocladus*-Arten aus dem Kongobecken gesammelt, phylogenetisch eingeordnet und, ebenso wie *A. congolensis*, phytochemisch näher untersucht werden.

Des Weiteren sollten Naturstoffe aus der Klasse der Senfölglycoside, die sogenannten Glucosinolate, im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Diese schwefelhaltigen, anionischen Naturstoffe (Abbildung 4) sind aus einer β -Thioglucose-Einheit, einer *N*-Hydroxyiminosulfat-Gruppe und einem variablen Rest *R* aufgebaut, und bilden die Hauptinhaltsstoffe in Pflanzen der Brassicaceae-Familie, wie zum Beispiel Radieschen, Kohlrabi und Brokkoli.^[10,42]

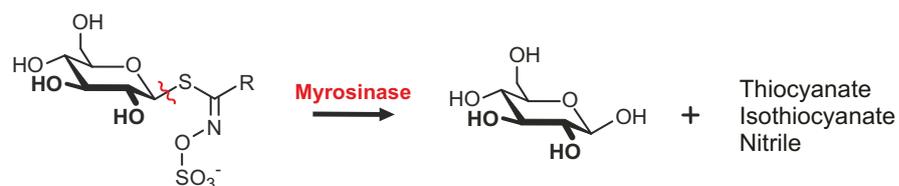


Abbildung 4. Chemische Grundstruktur der Glucosinolate und Spaltung durch das Enzym Myrosinase.

Der typische Rettich- oder Kohlgeschmack von Brassicaceae-Gemüsesorten stammt von den Abbauprodukten der Glucosinolate durch das Enzym Myrosinase, welches mit der Spaltung beginnt, sobald das Pflanzengewebe zerstört wird. Die entstehenden Thiocyanate, Iso-Thiocyanate und Nitrile haben eine toxische Wirkung auf Insekten, Pilze und Bakterien.^[10,42] In der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, einem geeigneten Modellorganismus, wurde zusätzlich zu der lokalen Abwehrreaktion, in welche die Glucosinolate involviert sind, eine globale Signalkaskade beobachtet, welche in anderen Teilen die Synthese weiterer Glucosinolate und von anderen Abwehrmolekülen induzierte.^[43] Auf Grund dieser und weiterer Eigenschaften werden die Glucosinolate als potenzielle Signaltransmitter diskutiert, die nicht nur lokal, sondern auch global agieren könnten. Dabei sollten die Glucosinolate aus dem Geleitzellsystem (auch Phloem genannt) von *A. thaliana* aufgefangen und dieses Exsudat anschließend analysiert werden.

Ihre hohe Polarität sowie ihre permanente negative Ladung machen die Glucosinolate zu optimalen Analyten für eine kapillarelektrophoretische Trennung. Die Detektion musste im Picogramm-Maßstab ermöglicht werden, da eine höhere Konzentration der Verbindungen im Phloem nicht gegeben ist. Erste Ergebnisse wurden in der Vergangenheit durch die Kopplung der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) mit einem hochauflösenden Time-of-Flight-Massenspektrometer (oTOF-MS) erreicht.^[44,45]

Im Detail ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Aufgabenstellungen:

- Detektion, Isolierung und Strukturaufklärung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus Pflanzen der Gattung *Ancistrocladus* mittels HPLC-UV, HPLC-MS, hochauflösender Massenspektroskopie, 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie, CD-Spektroskopie und anderer Methoden zur Bestimmung der Absolutkonfiguration;
- Aufklärung der Absolutkonfiguration von Substanzen aus einem *Streptomyces*-Stamm mittels hochauflösender Massenspektroskopie, 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie, HPLC-CD sowie quantenmechanischer Berechnungen; und
- (zeitabhängige) Detektion von Glucosinolaten in dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* mittels CZE-oTOF-MS.

2 ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG VON NAPHTHYLISOCHINOLIN-ALKALOIDEN AUS *ANCISTROCLADUS*-PFLANZEN

2.1 *Kenntnisstand über Ancistrocladus-Gewächse und ihre Inhaltsstoffe, die Naphthylisochinolin-Alkaloide*

Die einzige Gattung der Ancistrocladaceae-Familie, *Ancistrocladus*, umfasst aktuell 18 botanisch klassifizierte Lianenarten, die in den tropischen Regenwäldern Afrikas und Asiens wachsen (Abbildung 5).^[46-48] Die Ancistrocladaceae-Gewächse sind eng verwandt mit den Dioncophyllaceae-Gewächsen, ebenfalls tropische Lianen, die bisher jedoch nur in wenigen der paläotropischen Regionen Afrikas entdeckt wurden (Abbildung 5).^[24,49]

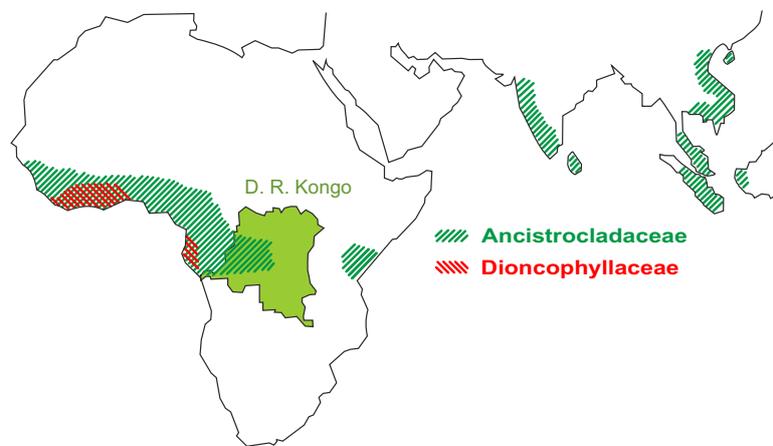


Abbildung 5. Lebensräume der Ancistrocladaceae- und Dioncophyllaceae-Gewächse.

Während die Dioncophyllaceae-Pflanzen, die sogenannten Zweikrallenblatt-Gewächse, hakenartige Fortsätze an den Blättern nutzen, um in das Dach des Regenwaldes empor zu klettern (Abbildung 6a), wird diese Aufgabe bei den Ancistrocladaceae – den Hakenast-Gewächsen – von Haken an den Ästen der Pflanzen übernommen (Abbildung 6b).

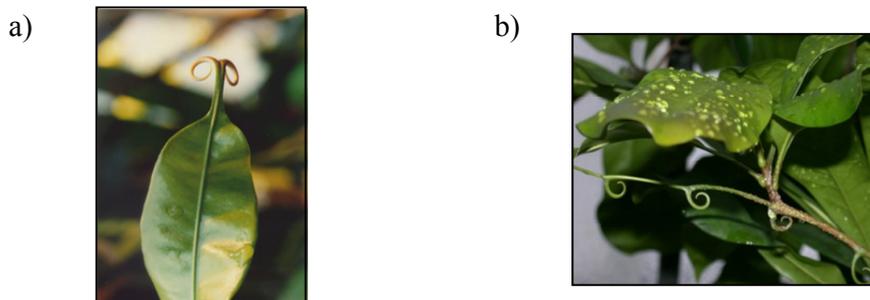
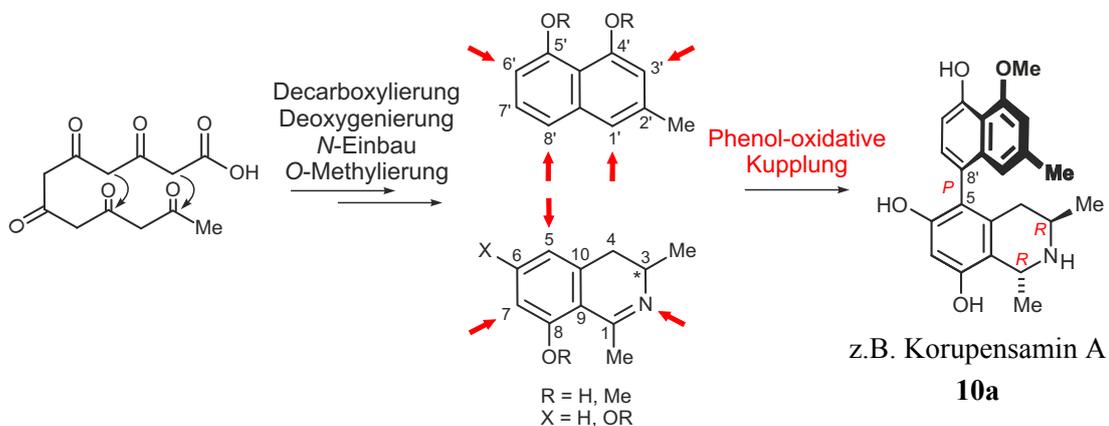


Abbildung 6. a) Krallenblatt des Dioncophyllaceae-Gewächses *Triphyphyllum peltatum* (Foto: H. Bringmann); und b) Hakenast einer *Ancistrocladus*-Pflanze (Foto: H. Rischer).

In der asiatischen Volksmedizin werden *Ancistrocladus*-Pflanzen gegen Durchfall, Entzündungen und Fieber eingesetzt,^[50] sowie als Heilmittel gegen Malaria.^[51] Auch in Afrika ist die Wirkung gegen Protozoen und andere Mikroorganismen traditionell bekannt.^[52] Die biologische Aktivität der *Ancistrocladus*-Gewächse wird durch Sekundärmetabolite hervorgerufen, die in zum Teil hohen Konzentrationen in den Pflanzen enthalten sind, die sogenannten Naphthylisochinolin-Alkaloide. Wie in Kapitel 1 bereits erwähnt, bestehen Naphthylisochinoline aus einer Naphthalin- und einer Isochinolin-Einheit, die über eine – meist rotationsgehinderte – Biarylachse miteinander verbunden sind (Schema 1).^[24] Obwohl seit der Beschreibung des ersten Naphthylisochinolin-Alkaloids 1971 durch Govindachari und Parthasarathy,^[53] fast 45 Jahre vergangen sind und seitdem über 100 weitere Naphthylisochinoline mit außergewöhnlichen strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften isoliert wurden, gelingt es auch heute noch, Naphthylisochinoline mit neuartigen Charakteristika zu entdecken.^[28,39,54,55] Die strukturelle Vielfalt der Verbindungen ist auf den für Alkaloide untypischen biosynthetischen Ursprung zurückzuführen. Beide Naphthylisochinolin-Einheiten bestehen aus Polyketidketten, die gefaltet, verbunden und anschließend durch Deoxygenierung, Stickstoffeinbau und / oder Methylierung modifiziert werden (Schema 1).^[24,56-58] Als abschließender Schritt der Biosynthese erfolgt eine Phenol-oxidative Kupplung, die die Kupplung der beiden Hälften in *ortho*- und / oder *para*-Position der Sauerstoff-Funktionen erlaubt (Schema 1). Auch der Stickstoff des Isochinolins kann als Kupplungsposition dienen (Schema 1), von diesem Typ sind jedoch deutlich weniger Vertreter bekannt.^[27,59]



Schema 1. Biosynthetische Entstehung der Naphthylisochinolin-Alkaloide.

Somit können Naphthylisochinolin-Alkaloide in ihrem Oxygenierungs- und Methylierungsmuster, der Kupplungsposition, der Konfiguration der Stereozentren und der Biarylachse variieren, was die große Vielzahl der bereits isolierten Verbindungen erklärt, und noch viele weitere, bisher unentdeckte Derivate vermuten lässt.

Die strukturelle Vielfalt der Naphthylisochinoline macht die Aufklärung der Absolutkonfiguration zu einer Herausforderung. Durch Anwendung der in unserem Arbeitskreis etablierten "analytischen Triade" (Abbildung 7)^[37,38,60] – einer Reihe von spektroskopischen Methoden, unter anderem in Kombination mit chromatographischen Trennmethode – lassen sich die Konstitution und die Konfiguration der chiralen Zentren und Achsen uneindeutig ermitteln.

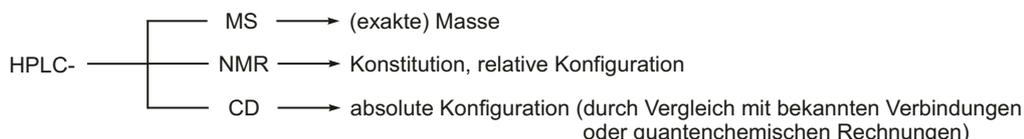


Abbildung 7. Die "analytische Triade".

Durch die Aufnahme eines exakten Massenspektrums lässt sich die Elementarzusammensetzung der Naphthylisochinoline ermitteln. Dabei wird die experimentell bestimmte exakte Masse mit der Summe einer rechnerisch möglichen, theoretischen Anzahl an Atomen abgeglichen, deren Masse nur minimal von der experimentellen abweichen darf.

Mit den Spektren der Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) lassen sich Atome identifizieren, deren Kerne miteinander wechselwirken. Dabei geben die 1D-Spektren – Protonen- und Kohlenstoffspektrum (¹H- und ¹³C-Spektrum) – über die Kopplungskonstante J [Hz] Aufschluss über die Anzahl gleichartiger Kerne, von denen das betrachtete Atom beeinflusst wird, die chemische Verschiebung δ [ppm] lässt auf die Elektronegativität der benachbarten funktionellen Gruppen rückschließen (Abbildung 8a).^[22,61] Die 2D-Spektren, COSY- (CORrelation SpectroscopY), HSQC- (Heteronuclear Single Quantum Calculations) und HMBC- (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) Spektrum, zeigen Korrelationen zwischen ¹H-¹H- und ¹H-¹³C-Atomkernen, die über eine oder mehrere Bindungen kovalent miteinander verknüpft sind (Abbildung 8b).^[22]

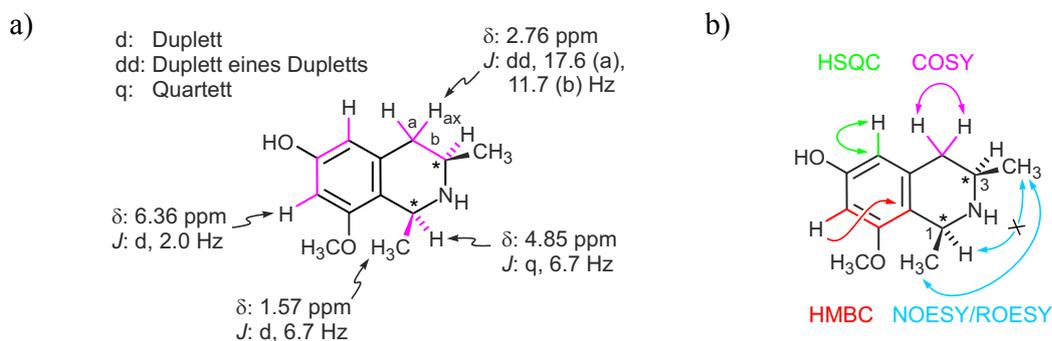


Abbildung 8. Interaktion der ¹H- und ¹³C-Nuclei bei verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Experimenten am Beispiel eines 1,3-Dimethyltetrahydroisochinolins: a) Kopplungskonstanten und chemische Verschiebungen; und b) COSY-, HSQC-, HMBC- und NOESY-/ROESY-Korrelationen.

Die Anordnung der Atome im Raum wird durch NOESY- (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) oder ROESY- (Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy) Spektren bestimmt, welche die Interaktionen von Atomkernen in räumlicher Nähe widerspiegeln, auch wenn diese nicht kovalent miteinander verbunden sind (Abbildung 8b).^[22]

Die Aussagen der NOESY- und ROESY-Spektren sind vor allem für die Bestimmung der relativen Konfiguration einer Substanz von Bedeutung. Enthält ein Molekül mehrere Chiralitätszentren, so kann damit die Stellung der beteiligten Gruppen zueinander bestimmt werden. Das Isochinolin in Abbildung 8 zeigt NOESY-Interaktionen zwischen den Methylgruppen (und den Protonen) an C-1 und C-3, aber nicht zwischen einer Methylgruppe und einem Proton, folglich müssen sich die Methylgruppen und die Protonen jeweils beide oberhalb (oder beide unterhalb) der Isochinolin-Ebene befinden. Man nennt diese Stellung der Methylgruppen *cis* zueinander, sind sie auf entgegengesetzten Seiten der Isochinolin-Ebene, stehen sie *trans* zueinander.^[20]

Sind in Molekülen mit einem oder mehreren Chiralitätszentren die Konstitution und die relative Konfiguration ermittelt, so bleibt die absolute Konfiguration, also die Konfigurationen aller Chiralitätszentren, aufzuklären. Mit den oben beschriebenen Methoden kann zwar die relative Beziehung der Chiralitätszentren untereinander bestimmt werden – also ob *like* (*R,R* oder *S,S*) oder *unlike* (*R,S* oder *S,R*) – aber es kann nicht aufgeklärt werden, welche der beiden möglichen *like*- oder *unlike*-Konfigurationen vorliegt, da sie sich zueinander wie Bild und Spiegelbild verhalten.^[62] Mit herkömmlichen spektroskopischen und chromatographischen Methoden kann nicht zwischen Substanzen, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten (Abbildung 9a) – sogenannten Enantiomeren – unterschieden werden, da sie exakt die gleichen physikalischen Eigenschaften zeigen.^[20] Kommen sie aber in eine chirale Umgebung, wie zum Beispiel in das aktive Zentrum eines Enzyms, so können sie sich sehr unterschiedlich verhalten. Ein prominentes Beispiel für signifikant verschiedene Reaktionen hervorgerufen durch Enantiomere ist Thalidomid, bei welchem das *R*-Enantiomer (**11a**) eine sedierende Wirkung zeigt, wohingegen das *S*-Enantiomer (**11b**) starke fötale Schäden induziert (Abbildung 9b).^[63]

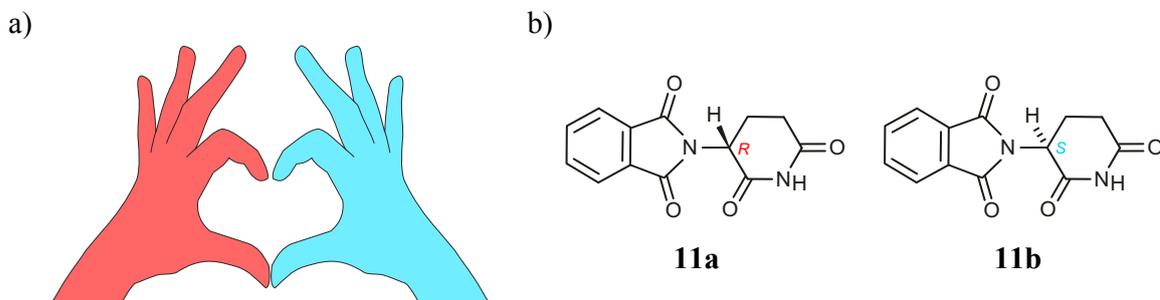


Abbildung 9. Das Prinzip Enantiomer: Dinge, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten und sich nicht durch Drehung auf Deckung bringen lassen: a) die menschlichen Hände; und b) *R*-Thalidomid (**11a**) und *S*-Thalidomid (**11b**).

Der Contergan[®]-Skandal hat gezeigt, welche verheerende Auswirkungen es zur Folge haben kann, wenn die absolute Konfiguration nicht ermittelt wird, oder wenn nicht überprüft wird, ob es sich um reine Enantiomere oder eine Mischung derer handelt.^[64] Auch eine Umwandlung der Enantiomere ineinander – die sogenannte Racemisierung,^[20] wie sie bei Thalidomid im Körper stattfindet – muss ausgeschlossen werden.^[65]

Eine Verbindung kann in enantiomerer Form vorliegen, wenn Chiralitätselemente existieren.^[20] Das umfasst nicht nur Strukturen mit Stereozentren wie Thalidomid (**11**; Abbildung 9b), sondern auch Verbindungen mit stereogenen Achsen, wie zum Beispiel die Naphthylisochinoline. Diese Biarylverbindungen besitzen meist eine chirale Biarylachse, da die Größe und Anzahl der Substituenten in *ortho*-Position zur Biarylachse eine Rotation dieser unterbindet (Abbildung 10a).^[24] Dieses Phänomen axialchiraler Verbindungen nennt sich Atropisomerie und lässt sich mit den Stereodeskriptoren *M* und *P* beschreiben (Abbildung 10a).^[66] Für die Bestimmung der Achsenkonfiguration in Naphthylisochinolinen hat sich die Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) bewährt, eine Messmethodik, bei welcher die spezifische Absorption von circular polarisiertem Licht gemessen wird.^[67] Bedingt durch die gegensätzliche Orientierung des Biaryl-Chromophors weisen Atropisomere der Naphthylisochinoline spiegelbildliche CD-Spektren auf (Abbildung 10b).^[24]

Durch Vergleich der CD-Spektren mit denen ähnlicher oder spiegelbildlicher Verbindungen, oder durch quantenmechanische Berechnung des CD-Spektrums^[24] lässt sich die absolute Achsenkonfiguration ermitteln. Basierend auf dieser kann – anhand von NOESY-Korrelationen zwischen den Protonen an C-4 und den Protonen des Naphthalinteils – die absolute Konfiguration des Stereozentrums an C-3 bestimmt werden (Abbildung 8a).

Durch die ebenfalls durch NOESY-Wechselwirkungen ermittelte relative *cis*- oder *trans*-Konfiguration der Methylgruppen im Isochinolinteil (Abbildung 8b) kann die Absolute Konfiguration an C-1 abgeleitet werden.

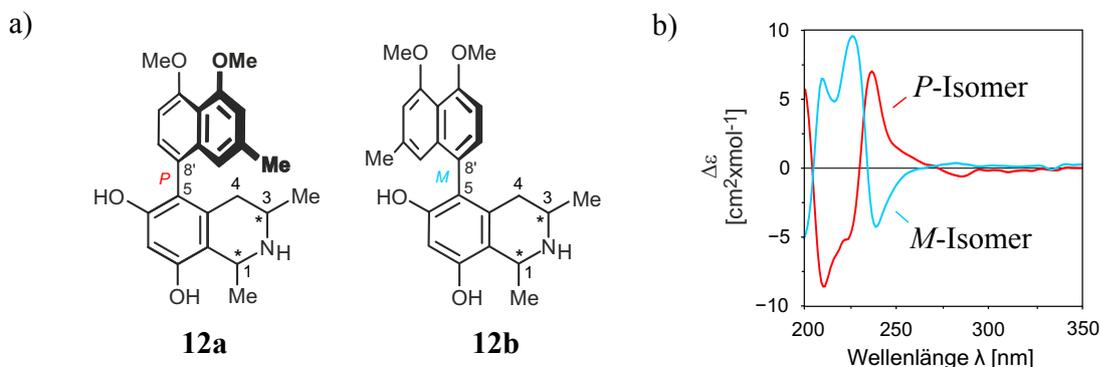


Abbildung 10. Axialchiralität am Beispiel der Naphthylisochinoline: a) Ein *P*- (**12a**) und ein *M*-Isomer (**12b**); und b) CD-Spektren zweier Atropisomere.

Als weitere Methode zur Bestimmung der Absolutkonfiguration an C-3 von Naphthylisochinolinen wurde ein oxidativer Abbau entwickelt, der je nach Konfiguration des Stereozentrums *R*- oder *S*-3-Aminobuttersäure (**13**; Abbildung 11) liefert. Bei Verbindungen mit einer relativen *trans*-Konfiguration der Methylgruppen kann zusätzlich der Abbau zu D- oder L-Alanin (**14**) analysiert werden, was auf die absolute Konfiguration an C-1 schließen lässt (Abbildung 11).^[68-70]

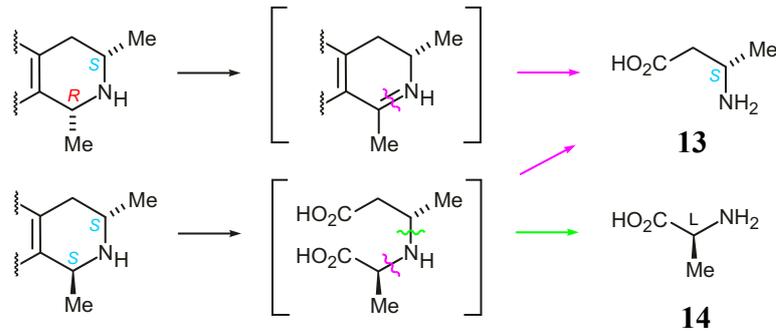


Abbildung 11. Oxidativer Abbau von Naphthylisochinolinen zur Bestimmung der Absolutkonfiguration an C-3: Bildung von *R*- oder *S*-3-Aminobuttersäure (**13**) und an C-1: Bildung von D- oder L-Alanin (**14**).

Die Kombination und Kopplung der aufgeführten chromatographischen und spektroskopischen Methoden bietet die Möglichkeit, die Absolutkonfiguration monomerer sowie auch dimerer Naphthylisochinolin-Alkaloide verlässlich aufzuklären und zu überprüfen.

Sind die monomeren Naphthylisochinoline schon strukturell, biosynthetisch und pharmakologisch interessant und vielversprechend, so eröffnen die Naphthylisochinolin-Dimere neue Dimensionen. Dimere Naphthylisochinoline bestehen aus zwei Naphthylisochinolin-Monomeren, die, ebenfalls in *ortho*- und *para*-Position zu Sauerstofffunktionen, über eine dritte Biarylachse miteinander verknüpft sind. Diese zentrale Achse ist, in Abhängigkeit der *ortho*-Substituenten, entweder rotationslabil, wie bei den Michellaminen (**9a** und **9b**; Kapitel 1, Abbildung 3), oder rotationstabil, wie bei Jozimin A₂ (**8**; Kapitel 1, Abbildung 3). Somit findet sich in den Dimeren die doppelte Anzahl an Chiralitätselementen im Vergleich zu den Monomeren, oder, im Falle einer rotationsgehinderten zentralen Achse, sogar noch ein Chiralitätselement mehr.

Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, lösten die einzigartigen Bioaktivitäten von Michellamin B (**9b**; Abbildung 3b, Kapitel 1) eine Reihe synthetischer Arbeiten sowie die Entwicklung analytischer Screening-Methoden zur direkten Detektion von Dimeren in Pflanzenextrakten aus. Mit der neuen Methodik gelang die Aufklärung eines neuen Dimers aus *A. griffithii*, Ancistrogriffithin A (**15**; Abbildung 36a, Kapitel 2.6.2), *A. congolensis* fiel als potenziell Michellamin-enthaltender Kandidat auf.^[37]

Bis zur Anfertigung dieser Arbeit wurden neben Michellamin A (**9a**) und B (**9b**) noch vier weitere Dimere vom Michellamin-Typ, die Michellamine C–F (**9c**, **16–18**; Abbildung 12), isoliert, alle aus der afrikanischen *Ancistrocladus*-Art *A. korupensis*.^[29,71] Auch die monomeren Bausteine der Michellamine, die Korupensamine A–D (**10a**, **10b**, **19–20**; Abbildung 12), wurden aus *A. korupensis* isoliert.^[72]

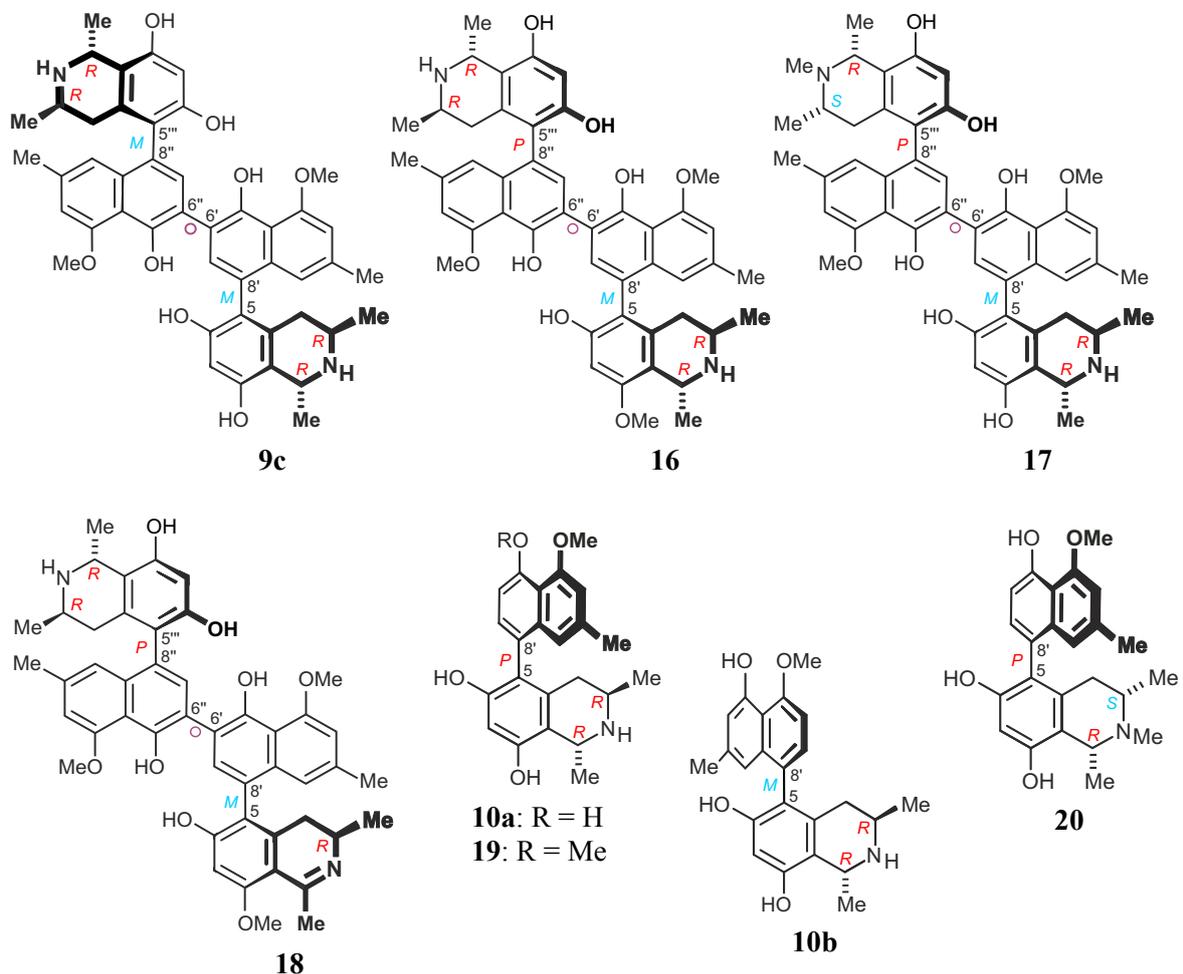


Abbildung 12. Naphthylisochinolone aus *A. korupensis*: die Michellamine C–F (**9c**, **16–18**) und die Korupensamine A–D (**10a**, **10b**, **19–20**).

2.2 Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe von *Ancistrocladus congolensis*

Aus *A. congolensis*, einer *Ancistrocladus*-Art aus dem Kongobecken (Abbildung 5),^[46] gelang in der Vergangenheit die Isolierung der Ancistrocongoline A–D (**21–24**; Abbildung 13) sowie von Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12, Kapitel 2.1).^[73]

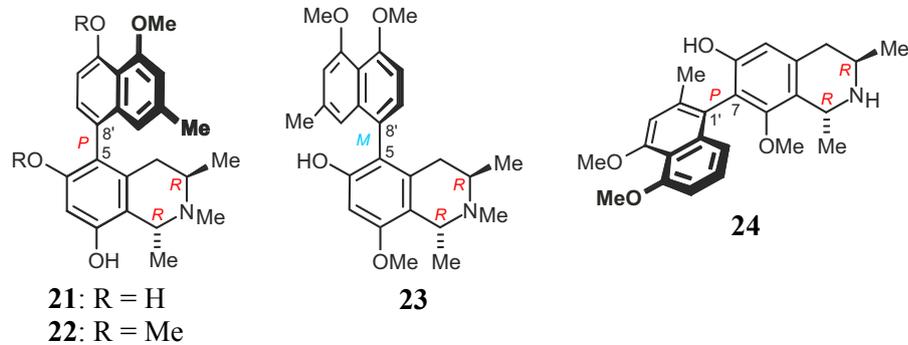


Abbildung 13. Monomere Naphthylisochinoline aus *A. congolensis*: die Ancistrocongoline A–D (**21–24**).

2.3 Isolierung und Strukturaufklärung von Naphthylisochinolininen aus *A. congolensis*

Das in dieser Arbeit untersuchte *Ancistrocladus-congolensis*-Exemplar wurde von Prof. V. Mudogo^[74] im Kongo-Becken, Demokratische Republik Kongo, gesammelt, ein Herbarbeleg ist im Herbarium Bringmann (Universität Würzburg; Beleg Nr. 55) hinterlegt.

Aus Blattmaterial dieser Pflanze hatte Dr. A. Debella vor Anfertigung dieser Arbeit zwei neue Dimere isoliert (Abbildung 14), **25**, ein Derivat von Michellamin A (**9a**; Abbildung 3, Kapitel 1), und **26**, ein Ancistrogriffithin-A-Derivat (**15**; Abbildung 36a, Kapitel 2.6.2), bei dem jedoch aufgrund zu geringer Mengen die Absolutkonfiguration nicht aufgeklärt werden konnte.

Da das Blattmaterial von Dr. Debella aufgebraucht worden war, sollte für diese Arbeit in Wurzelmaterial, von dem noch ausreichend vorhanden war, nach diesen und weiteren Dimeren gesucht werden. Im HPLC-MS-Chromatogramm des Rohextraktes (MeOH / CH₂Cl₂, 1:1, v/v) konnten jedoch keine Molekülmassen, die Hinweise auf Naphthylisochinolin-Dimere gegeben hätten ($m/z = 750\text{--}850$ Da), festgestellt werden.

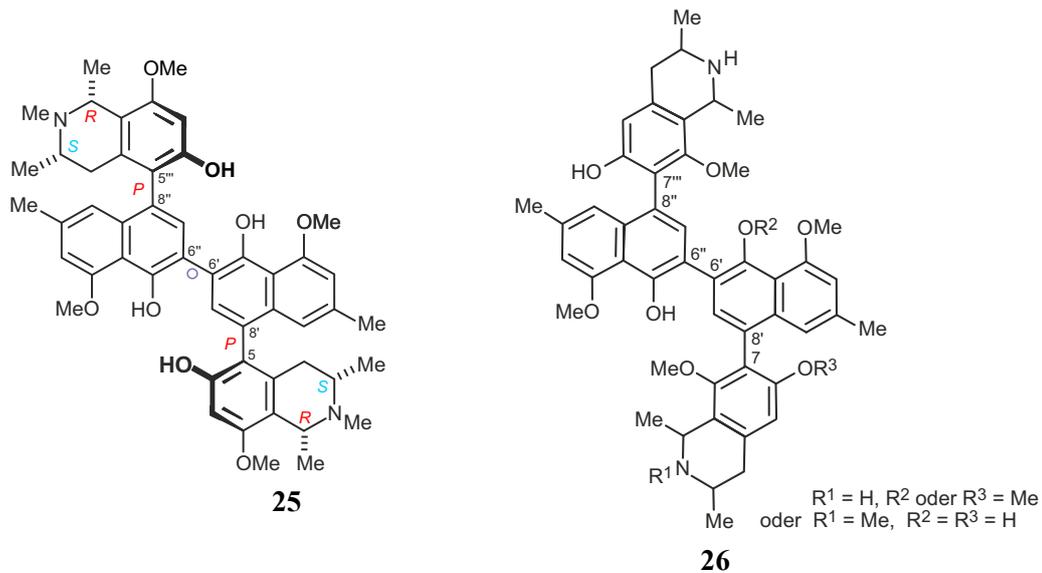


Abbildung 14. Naphthylisochinolin-Dimere, die von Dr. A. Debella aus *A. congolensis* (Herbarium Bringmann, Nr. 55) isoliert wurden: **25**, *N,N*-Dimethyl-*O,O*-dimethyl-Michellamin A; und **26**, ein *O*- oder *N*-Methylderivat von Ancistrogriffithin A.

Da viele Dimere durch die hohe Anzahl an Hydroxyfunktionen sehr polar sind, wurde der Rohextrakt der Wurzeln von *A. congolensis* in Wasser mazeriert und erneut per HPLC-MS untersucht. Tatsächlich wurden in der wässrigen Fraktion mehrere Peaks mit den Massen $m/z = 757.5$ Da und 771.5 Da detektiert (Abbildung 15).

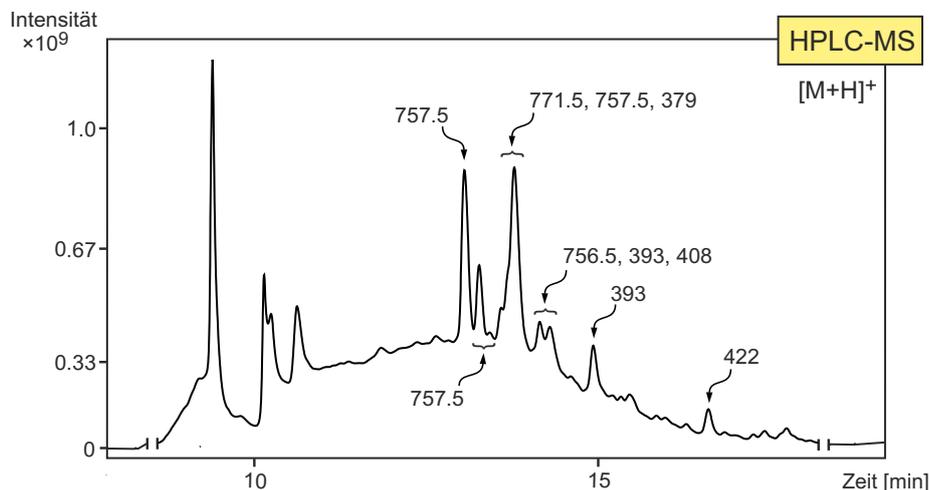


Abbildung 15. HPLC-MS-Chromatogramm des in Wasser mazerierten Rohextraktes von *A.-congolensis*-Wurzelmaterial (Herbarium Bringmann Nr. 55).

Daher wurden insgesamt 1.1 kg des Wurzelmaterials mit MeOH / CH₂Cl₂ (1:1, v/v) extrahiert und anschließend in H₂O mazeriert. Der erhaltene Extrakt wurde filtriert, lyophilisiert und durch präparative HPLC an RP-C₁₈-Phase aufgetrennt. So wurden sechs monomere und sieben dimere Naphthylisochinoline in Reinform gewonnen.

2.3.1 Identifizierung der bekannten Naphthylisochinoline Korupensamin A (**10a**), Korupensamin D (**20**), Ancistrobrevin B (**26**), Hamatin (**27**), 5'-O-Demethylhamatin (**28**) und 6-O-Methylhamatin (**29**)

Mittels exakter Massenspektrometrie (HRESIMS), magnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) und den in unserem Arbeitskreis angewandten und etablierten Methoden Circular-Dichroismus (CD)^[75-78] und oxidativer Abbau^[68-70] wurden die Relativ- und Absolutkonfigurationen der isolierten Substanzen aufgeklärt.

Die sechs Naphthylisochinolin-Monomere waren bereits aus anderen *Ancistrocladus*-Arten isoliert worden. Die oben bereits erwähnten Korupensamine A (**10a**) und D (**20**; Abbildung 12) sind beide bekannt aus *A. korupensis*^[72] und vom 5,8'-Kupplungstyp, durch die unterschiedliche Konfiguration an C-3 sind sie jedoch verschiedenen Strukturtypen zugehörig. Naphthylisochinoline vom Ancistrocladaceae-Typ, wie zum Beispiel Korupensamin D (**20**), weisen an C-6 eine Sauerstofffunktion auf, die Naphthylisochinoline vom Dioncophyllaceae-Typ, wie zum Beispiel Dioncophyllin C (**5**; Abbildung 2, Kapitel 1), fehlt.^[24] Zudem sind Ancistrocladaceae-Naphthylisochinoline an C-3 *S*-konfiguriert, wohingegen Dioncophyllaceae-Naphthylisochinoline eine *R*-Konfiguration an C-3 zeigen.^[24] Naphthylisochinoline wie Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12), mit einer Hydroxygruppe an C-6, jedoch mit *R*-Konfiguration an C-3, werden dem sogenannten Dioncophyllaceae / Ancistrocladaceae-Hybrid-Typ zugeordnet.^[24] Ebenfalls 5,8'-gekuppelt war Ancistrobrevin B (**26**; Abbildung 16), seit langem bekannt aus *A. abbreviatus*.^[79] Des Weiteren wurden drei 5,1'-gekuppelte Naphthylisochinolin-Alkaloide vom Ancistrocladaceae-Typ isoliert: Hamatin (**27**; Abbildung 16), das zuerst aus der asiatischen *Ancistrocladus*-Art *A. hamatus* isoliert wurde, seitdem aber in vielen weiteren asiatischen und afrikanischen *Ancistrocladus*-Arten gefunden wurde,^[24,79-82] und die Hamatin-Derivate 5'-O-Demethylhamatin (**28**) und 6-O-Methylhamatin (**29**; Abbildung 16), beide bereits bekannt aus einer *Ancistrocladus*-Art aus dem Kongobecken, die botanisch bislang unbeschriebenen ist.^[40,41] Alle vier waren dem Ancistrocladaceae-Typ (3*S*, OH-6 / OMe-6) zugehörig.

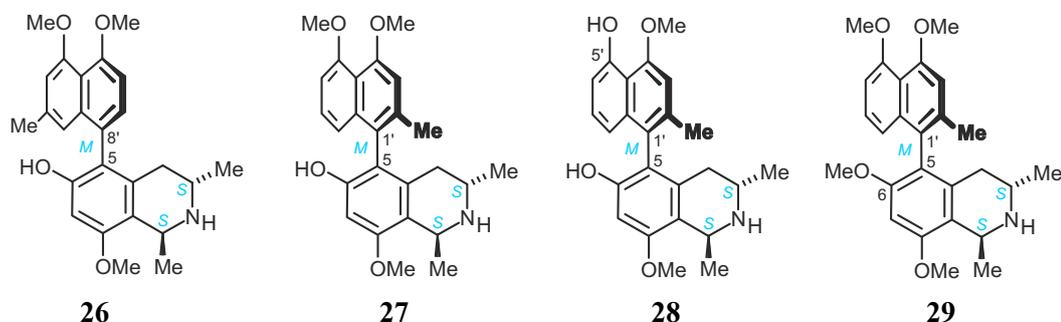


Abbildung 16. Bekannte Naphthylisochinolin-Alkaloide, zum ersten Mal aus *A. congolensis* isoliert: Ancistrobrevin B (**26**), Hamatin (**27**), 5'-O-Demethylhamatin (**28**) und 6-O-Methylhamatin (**29**).

2.3.2 *Strukturaufklärung von bekannten und neuen dimeren Naphthylisochinolin- vom Michellamin-Typ*

Zwei der sieben Naphthylisochinolin-Dimere wurden anhand der oben beschriebenen Methoden als Michellamin A und B (**9a** und **9b**; Abbildung 3, Kapitel 1)^[29,31,83] identifiziert, die restlichen fünf Dimere waren nicht literaturbekannt.

2.3.2.1 *Strukturaufklärung von Michellamin A₂ (30a)*

Verbindung **30a** war, mit einer exakten Masse von 757.34721 Da ($[M+H]^+$) und der sich daraus ergebenden Molekularzusammensetzung von C₄₆H₄₉N₂O₈, isomer zu Michellamin A (**9a**) und B (**9b**). Im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum war jedoch ein voller Signalsatz detektierbar, womit ein Dimer mit homomorphen Hälften – wie Michellamin A (**9a**) – oder mit enantiomorphen Hälften ausschied, da in beiden Fällen nur der halbe Signalsatz im NMR aufgetreten wäre. Im Einzelnen zeigte Verbindung **30a** im ¹H-Spektrum die Signale von acht aromatischen Protonen, zwei Protonen-Quartetts im Bereich von 4.7 ppm, zwei Signale von aromatischen Methoxygruppen, zwei Multipletts mit Verschiebungen von 3.7 ppm und 3.3 ppm, vier Protonen im aliphatischen Bereich mit Aufspaltungen von je 18 Hz und 12 Hz sowie von 18 Hz und 4 Hz, zwei Signale von aromatischen Methylgruppen, sowie die Signale von vier Methylgruppen (Dupletts, je 6.7 Hz) im aliphatischen Bereich. Die gerade Anzahl an Protonensignalen ließ ein Dimer mit konstitutionell identischen, aber konfigurativen Hälften vermuten, wie zum Beispiel Michellamin B (**9b**).

Von den aromatischen Protonen, die alle als Singulets erschienen, waren zwei in die ROESY-Serie H-1'' – Me-2'' – H-3'' – OMe-4'' eingebunden, H-1'' zeigte HMBC-Resonanzen zu einem Kohlenstoffatom (C-9''), das mit einem weiteren aromatischen Proton, H-7'', korrelierte (Abbildung 17b). Die HMBC-Korrelationen von H-1'' zu C-8'', und von H-7'' zu zwei weiteren quartären Kohlenstoffen, die nicht Teil dieses Naphthalinsystems waren, C-5''' und C-6' (Abbildung 17b), ließen ein Naphthalin vermuten, das in 6- und 8-Position gekuppelt war. ROESY-Interaktionen zwischen H-1'' und H_{ax}-4''', sowie zwischen H-7'' und H_{eq}-4''' (Abbildung 17c) bewiesen die Kupplung von Isochinolin- und Naphthalinteil in 5'''- und 8''-Position für diese 'nord-westliche' Naphthylisochinolin-Hälfte **30a-I**. Die bereits erwähnte HMBC-Resonanz von H-7'' zu C-6', einem Kohlenstoffatom der 'süd-östlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **30a-II** (Abbildung 17a), bestimmte C-6' als Kupplungsposition der zentralen Achse (Abbildung 17b). Die Signale der Methylgruppen im aliphatischen Bereich, Me-1''' (1.63 ppm) und Me-3''' (1.22 ppm), ließen auf eine 1,3-Dimethyltetrahydroisochinolineinheit schließen (Abbildung 17a).

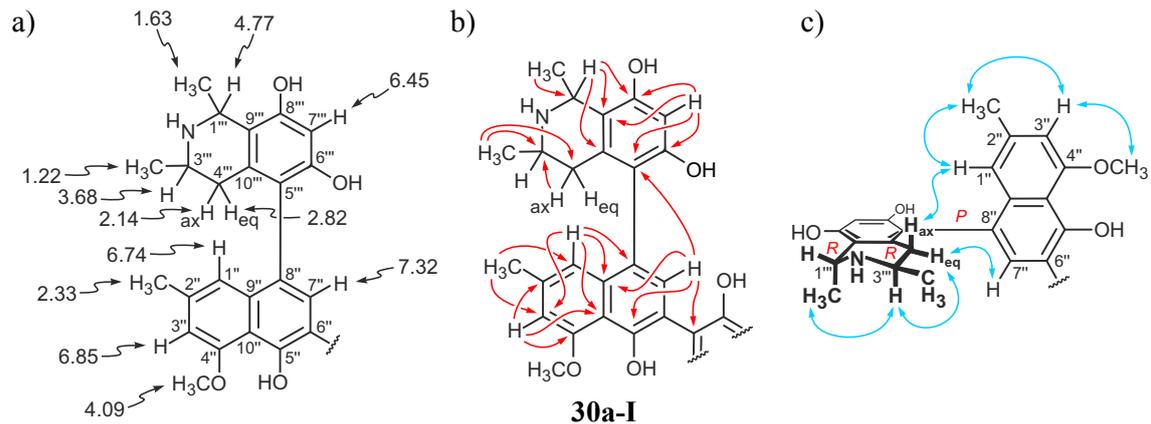


Abbildung 17. Ausgewählte NMR-Daten der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **30a-I** von **30a**: a) ¹H-NMR-Verschiebungen (ppm); b) HMBC-Korrelationen; und c) ROESY-Wechselwirkungen.

Eine ROESY-Korrelation zwischen H-1''' (4.77 ppm) und Me-3''' legte eine relative *trans*-Konfiguration der Stereozentren an C-1''' und C-3''' fest (Abbildung 17c).

Die absolute Konfiguration an C-3 wurde anhand des Ruthenium-vermittelten oxidativen Abbaus und der GC-MS-Analyse der Mosher-Derivate, die bei einer *R*-Konfiguration (*R*)-3-Aminobuttersäure und bei einer *S*-Konfiguration entsprechend (*S*)-3-Aminobuttersäure liefern,^[10] als *R* bestimmt. Aufgrund der relativen *trans*-Konfiguration der Zentren musste C-1 ebenso *R*-konfiguriert sein (Abbildung 17c). Basierend auf der Absolutkonfiguration von C-3 und bereits erwähnten ROESY-Interaktionen zwischen H-1''' und H_{ax}-4''', sowie zwischen H-7''' und H_{eq}-4''' konnte der Biarylachse zwischen Naphthalin- und Isochinolinteil die *P*-Konfiguration zugeordnet werden (Abbildung 17c).

Somit entsprach diese 'nord-westliche' Naphthylisochinolin-Hälfte von **30a**, **30a-I**, Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12), das sich bereits in den Michellaminen A und B (**9a** und **9b**; Abbildung 3, Kapitel 1), sowie D und F (**16** und **18**; Abbildung 12; Kapitel 2.1) wiederfindet. Da Michellamin A (**9a**) aufgrund des vollen Signalsatzes im NMR, und Michellamin D (**16**) und F (**18**) aufgrund der Molekularzusammensetzung ausschieden, blieb noch die Möglichkeit, dass **30a** identisch mit Michellamin B war, je nach der konfigurativen Beschaffenheit der zweiten Naphthylisochinolin-Hälfte **30a-II**.

Diese 'süd-östliche' Hälfte, die konstitutionell ebenfalls einem Korupensamin entsprach, nämlich mit OMe-4' und C-6' als Kupplungsposition für die zentrale und C-8' und C-5 für die äußere Achse (Abbildung 18b), zeigte jedoch für die Protonen H-1, Me-1, H-3, H_{ax}-4 und H_{eq}-4 (Abbildung 18a) im Isochinolinteil andere chemische Verschiebungen als die entsprechenden Protonen in der *R,R,M*-konfigurierten Hälfte von Michellamin B (**9b**). Eine ROESY-Korrelation zwischen H-1 und H-3 (Abbildung 18c) ließ, anders als in Michellamin B (**9b**), eine relative *cis*-Konfiguration der Stereozentren an C-1 und C-3 erkennen. Da der oxidative Abbau nur (*R*)-3-Aminobuttersäure für Verbindung **30a** geliefert hatte, musste C-3 auch in der zweiten Dimerhälfte *R*-konfiguriert sein. Somit

ergab sich die *S*-Konfiguration für C-1, und, durch die beobachteten ROESY-Korrelationen von H-1' und H_{ax}-4 sowie von H-7' und H_{eq}-4, die *P*-Konfiguration für die zweite äußere Biarylachse (Abbildung 18c).

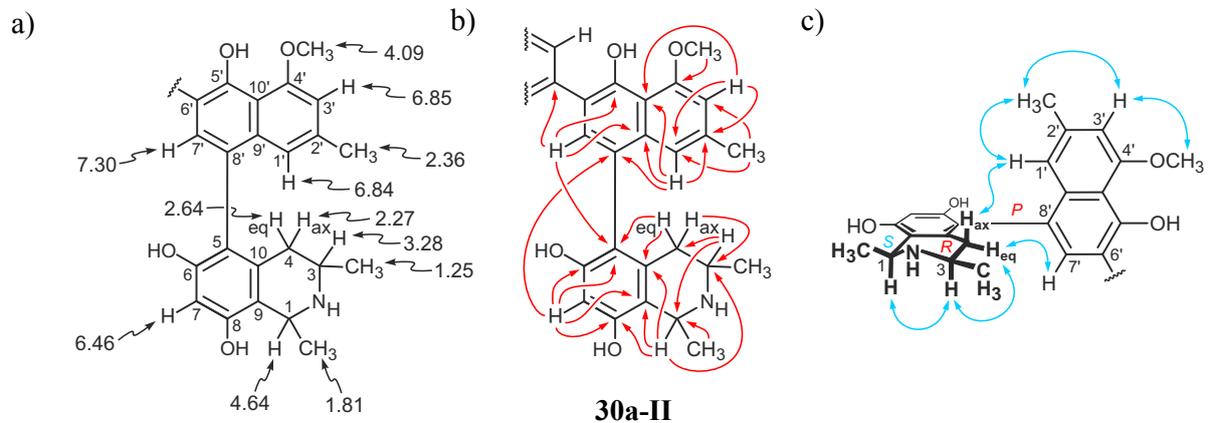


Abbildung 18. Ausgewählte NMR-Daten der 'süd-östlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **30a-II** von **30a**: a) ¹H-NMR-Verschiebungen (ppm); b) HMBC-Korrelationen; und c) ROESY-Wechselwirkungen.

Das CD-Spektrum von **30a** war fast deckungsgleich mit dem von Michellamin A (**9a**)^[84] (Abbildung 19a), während das von Michellamin B (**9b**) mit seinen hetero-chiralen Achsen deutlich anders aussieht, was die *P*-Konfiguration der beiden rotationsstabilen Achsen in den Naphthylisochinolin-Hälften zusätzlich bewies.

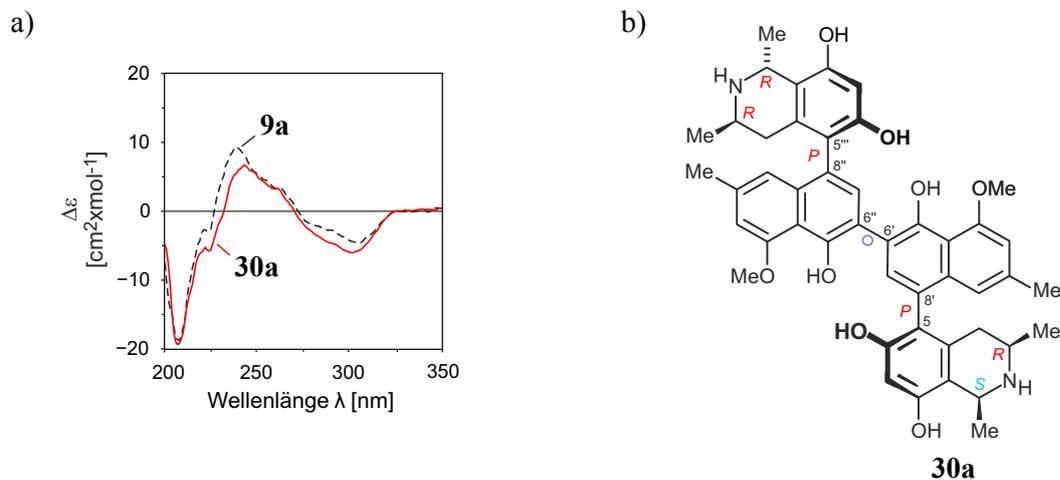


Abbildung 19. a) CD-Spektren von Michellamin A (**9a**; schwarze, unterbrochene Kurve) und **30a** (rote Kurve); und b) absolute Stereostruktur von Michellamin A₂ (**30a**).

Somit war **30a** ein Heterodimer aus Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12) und 1-*epi*-Korupensamin A, und ist durch die absolute Stereostruktur in Abbildung 19b repräsentiert. Da der einzige stereochemische Unterschied zu Michellamin A (**9a**; Abbildung 3, Kapitel 1) die Konfiguration des Stereozentrums an C-1 ist, wurde die Verbindung Michellamin A₂ genannt.

2.3.2.2 *Strukturaufklärung von Michellamin B₂ (30b)*

Verbindung **30b** besaß laut HRESIMS die gleiche Molekularzusammensetzung $C_{46}H_{49}N_2O_8$ wie **30a** (Abbildung 19b), und war somit auch ein Isomer von Michellamin A und B (**9a** und **9b**; Abbildung 3, Kapitel 1). Die chemischen Verschiebungen der Protonen der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **30b-I** waren fast identisch mit denen der 'nord-westlichen' Hälfte von **30a** (Abbildung 17a). Anhand der HMBC- und ROESY-Daten ließen sich die relativen Konfigurationen der Zentren und der Achse bestimmen, die ebenfalls identisch zu denen von **30a-I** waren (Abbildung 17). Der oxidative Abbau von Verbindung **30b** lieferte ausschließlich (*R*)-3-Aminobuttersäure, somit ließ sich C-3 und C-1 die *R*-Konfiguration, und der Biarylachse zwischen Naphthalin- und Isochinolinteil die *P*-Konfiguration zuordnen (Abbildung 20a). Folglich entsprach die 'nord-westliche' Naphthylisochinolin-Hälfte **30b-I** konstitutiv und konfigurativ dem 'nord-westlichen' Teil von Verbindung **30a** (Abbildung 17) und somit Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12).

Für die 'süd-östliche' Hälfte von **30b**, **30b-II**, zeigte das ROESY-Spektrum konsequente Korrelationen zwischen H-1' (6.76 ppm), Me-2' (2.35 ppm), H-3' (6.86 ppm) und OMe-4' (4.10 ppm) im Naphthalinteil (Abbildung 18c), ein weiteres isoliertes aromatisches Proton, H-7' (7.31 ppm), das mit C-5', C-9' und C-6'' korrelierte (Abbildung 18b), bewies die Kupplung zum Isochinolinteil in 8'-Position, und zum Naphthalin von **30b-I** in 6'-Position. Die HMBC-Resonanz dieses Protons zu einem quartären Kohlenstoff des Isochinolins, der zugleich mit H_{eq}-4 korrelierte (Abbildung 18b), legte C-5 als Kupplungsposition im Isochinolin fest. Die relative Konfiguration der zwei Stereozentren an C-1 und C-3 wurde als *cis* bestimmt, erkennbar an einer ROESY-Interaktion zwischen H-1 (4.66 ppm) und H-3 (3.22 ppm) (Abbildung 18c). Da beim oxidativen Abbau von **30b** ausschließlich (*R*)-3-Aminobuttersäure detektiert wurde, musste C-3, ebenso wie C-3''', *R*-konfiguriert sein.

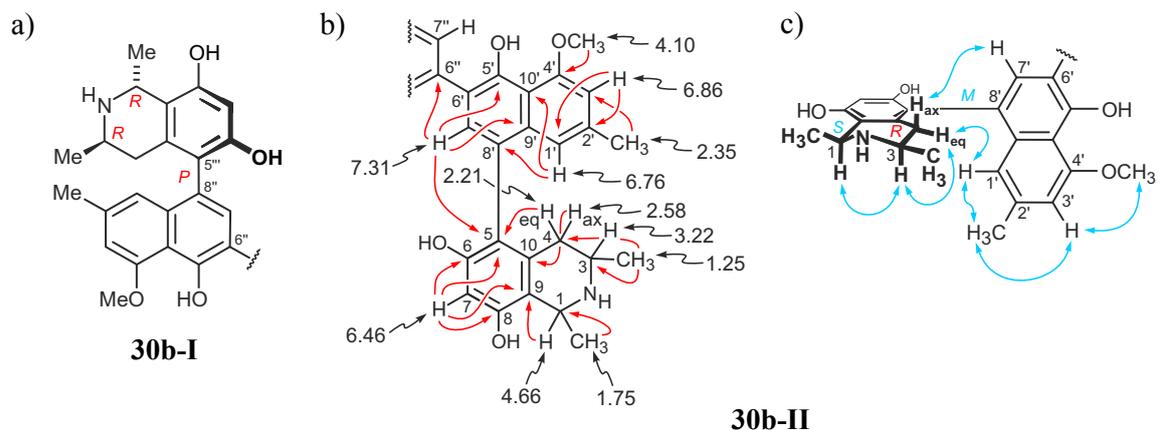


Abbildung 20. a) Absolute Konfiguration der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **30b-I** von **30b**; und ausgewählte NMR-Daten der 'süd-östlichen' Hälfte **30b-II**: b) ¹H-NMR-Verschiebungen (ppm) und HMBC-Korrelationen (rote Pfeile); und c) ROESY-Wechselwirkungen.

Basierend auf der relativen *cis*-Konfiguration der Stereozentren, ließ sich für C-1 die *S*-Konfiguration zuordnen. Die Konfiguration der Biarylachse wurde anhand von ROESY-Korrelationen bestimmt, die zwischen dem H_{ax}-4 und H-7' oberhalb, und zwischen H_{eq}-4 und H-1' unterhalb der Isochinolinebene detektiert wurden (Abbildung 18c). Somit musste die Achse in **30b-II** *M*-konfiguriert sein, während die entsprechende Achse in **30b-I** *P*-konfiguriert war. Erwartungsgemäß führte die gegensätzliche Orientierung der Chromophore in den Naphthylisochinolin-Hälften zu einer starken Kompensation der CD-Effekte im Gesamt-CD-Spektrum (Abbildung 21a), wie es auch von Michellamin B (**9b**) bekannt ist.^[84]

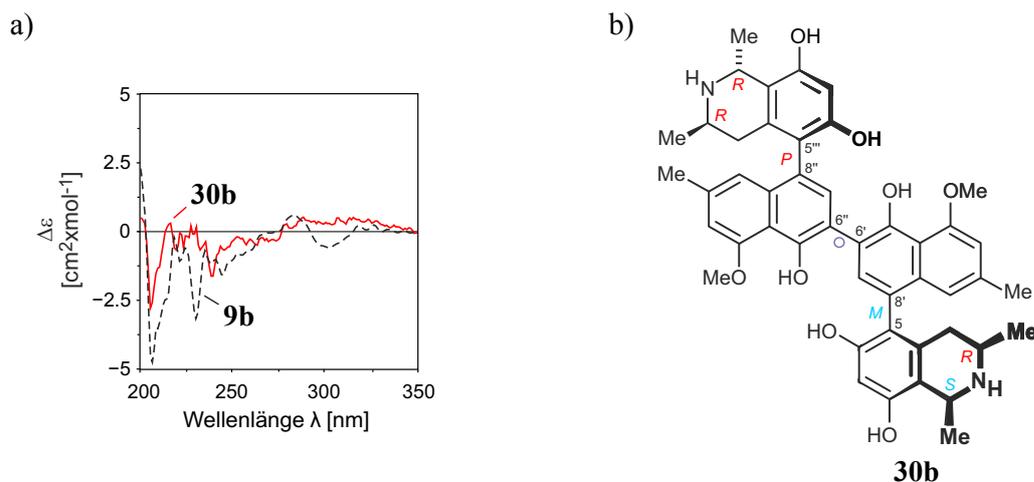


Abbildung 21. a) CD-Spektren von Michellamin B (**9b**; schwarze, unterbrochene Kurve) und **30b** (rote Kurve); und b) absolute Stereostruktur von Michellamin B₂ (**30b**).

Dieses Dimer, bestehend aus einer Korupensamin-A- (**10a**; Abbildung 12) und einer 1-*epi*-Korupensamin-B-Hälfte, unterschied sich von Michellamin B (**9b**; Abbildung 3, Kapitel 1) nur in der Konfiguration an C-1 und wurde daher Michellamin B₂ genannt.

2.3.2.3 *Strukturaufklärung von Michellamin A₃ (31a)*

Für Verbindung **31a** wurde eine Molekularzusammensetzung von C₄₇H₅₁N₂O₈ errechnet, basierend auf der exakten Masse 771.36483 ([M+H]⁺). Dies deutete auf ein Naphthylisochinolin-Dimer mit einer zusätzlichen Methylgruppe hin, im Vergleich zu den Michellaminen A und B (**9a** und **9b**; Abbildung 3, Kapitel 1), und ihren Stereoisomeren Michellamin A₂ (**30a**; Abbildung 19b) und B₂ (**30b**; Abbildung 21b). Ein zusätzliches Singulett bei 3.02 ppm im ¹H-NMR-Spektrum ließ auf eine *N*-Methylgruppe schließen, da das Signal einer *O*-Methylgruppe zwischen 3.50 ppm und 4.10 ppm erschienen wäre.^[24]

Für die 'nord-westliche' Hälfte **31a-I** wurde anhand der NMR-Daten – ¹H- und ¹³C-Verschiebungen, ROESY- und HMBC-Korrelationen – die gleiche Konstitution und die gleichen relativen Konfigurationen wie auch für die 'nord-westlichen' Hälften der Verbindungen **30a** und **30b** ermittelt (Abbildung 22a). Beim oxidativen Abbau wurden jedoch (*R*)- und (*S*)-3-Aminobuttersäure in einem Verhältnis von 1:1 detektiert, was auf verschiedene Konfigurationen an C-3 und C-3''' schließen ließ.^[68-70] Die simultane Detektion von (*S*)-*N*-Methyl-3-aminobuttersäure bewies, dass das *S*-konfigurierte C-Atom neben einer *N*-Methylgruppe lokalisiert sein musste, was für die Hälfte **31a-I** nicht der Fall war. Somit konnte C-3''' und C-1''' die *R*-Konfiguration zugeordnet werden, die Biarylachse war entsprechend *P*-konfiguriert (Abbildung 22a), und die 'nord-westliche' Hälfte **31a-I** von **31a** entsprach, wie auch bei den Verbindungen **30a** und **30b**, Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12).

Die 'süd-östliche' Hälfte von **31a**, **31a-II**, zeigte im Naphthalinteil drei isolierte Protonen (H-1' 6.77 ppm, H-3' 6.85 ppm und H-7' 7.31 ppm; Abbildung 22b), von denen zwei in die ROESY-Serie H-1' – Me-2' – H-3' – OMe-4' eingebunden waren (Abbildung 22c). HMBC-Resonanzen von H-1' zu C-8' und von H-7' zu C-5, das ebenfalls mit H_{eq}-4 korrelierte (Abbildung 22b), bewiesen die 5,8'-Kupplung von Naphthalin und Isochinolin.

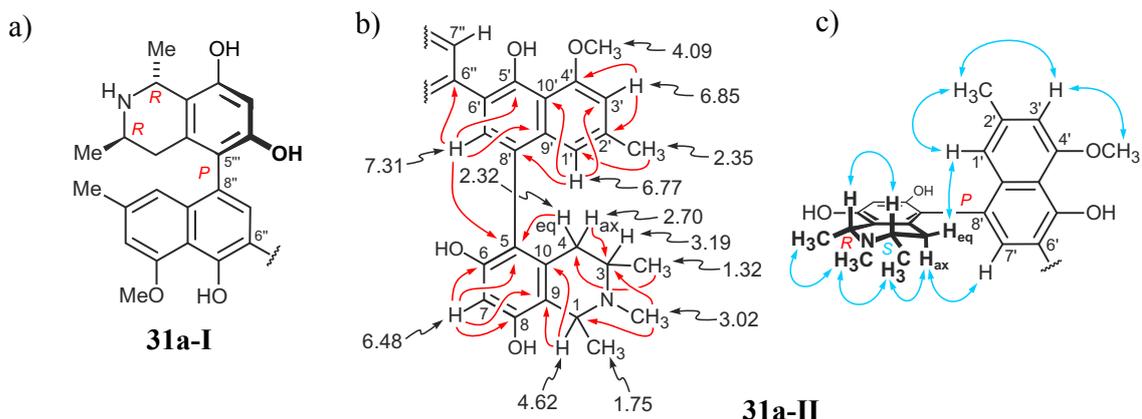


Abbildung 22. a) Absolute Konfiguration der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **31a-I** von **31a**; und ausgewählte NMR-Daten der 'süd-östlichen' Hälfte **31a-II**: b) ¹H-NMR-Verschiebungen (ppm) und HMBC-Korrelationen (rote Pfeile); und c) ROESY-Wechselwirkungen.

Die zentrale Achse war an C-6' gebunden, erkennbar an einer HMBC-Korrelation von H-7' zu C-6'' (Abbildung 22b). Im Isochinolinteil bewies die ROESY-Serie Me-1 – N-Me – Me-3 (Abbildung 22c), dass in der Tat eine Methylgruppe am Stickstoff vorhanden war. Die Protonen an C-1 (4.62 ppm) und C-3 (3.19 ppm) standen *cis* zueinander und wiesen dementsprechend eine ROESY-Interaktion auf (Abbildung 22c). Die beim oxidativen Abbau ermittelte *S*-Konfiguration von C-3 ordnete C-1 die *R*-Konfiguration zu, die äußere Biarylachse war *P*-konfiguriert, erkennbar an den ROESY-Wechselwirkungen zwischen H-1' und H_{eq}-4 sowie zwischen H-7' und H_{ax}-4 (Abbildung 22c).

Die *P*-Konfiguration beider chiraler Achsen in den Naphthylisochinolin-Hälften wurde durch das CD-Spektrum unterstützt, welches – ebenso wie bei Michellamin A₂ (**30a**; Abbildung 19) – deckungsgleich mit dem CD-Spektrum von Michellamin A (**9a**) war (Abbildung 23a).

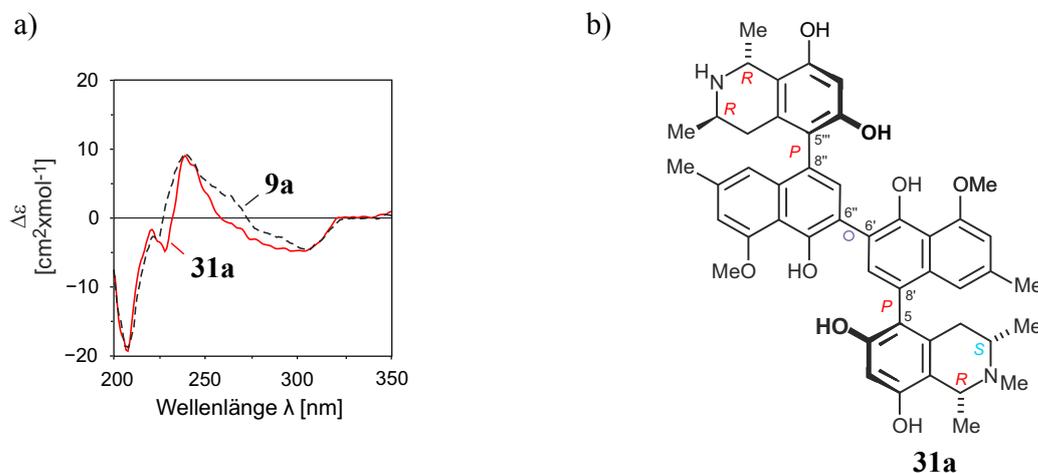


Abbildung 23. a) CD-Spektren von Michellamin A (**9a**; schwarze, unterbrochene Kurve) und **31a** (rote Kurve); und b) absolute Stereostruktur von Michellamin A₃ (**31a**).

Verbindung **31a** besaß die in Abbildung 23b gezeigte absolute Stereostruktur. Es war damit ein Heterodimer aus Korupensamin A und D (**10a** und **20**; Abbildung 12), und unterschied sich nur durch die Achsenkonfiguration in der *trans*-konfigurierten Naphthylisochinolin-Hälfte von Michellamin E (**17**; Abbildung 12), welches ein Kreuzkupplungsprodukt aus Korupensamin B (**10b**; Abbildung 12) und Korupensamin D ist. Für die Namensgebung wurden jedoch die Achsenkonfigurationen im Vergleich zu den Michellaminen A, B und C (**9a**, **9b** und **9c**; alle Abbildung 12) als ausschlaggebend betrachtet. Durch die *P,P*-Konfiguration war Verbindung **31a** ein Michellamin-A-Derivat und wurde Michellamin A₃ genannt.

2.3.2.4 *Strukturaufklärung von Michellamin B₃ (31b)*

Verbindung **31b** war, laut exakter Masse (771.36463 Da; $[M+H]^+$) mit der Molekularzusammensetzung $C_{47}H_{51}N_2O_8$, isomer zu **31a**. Ein Singulett bei 2.99 ppm im 1H -NMR-Spektrum deutete auch bei diesem Dimer auf eine *N*-Methylfunktion hin, also auf ein Konfigurationsisomer von **31a** (Abbildung 23).

Die Konstitution und die relativen Konfigurationen der 'nord-westlichen' Hälfte **31b-I** wurden anhand der NMR-Daten – 1H , ^{13}C , ROESY und HMBC – als äquivalent zu denen der 'nord-westlichen' Hälfte von **31a** (Abbildung 22a) bestimmt. Der oxidative Abbau lieferte (*R*)- und (*S*)-Aminobuttersäure, sowie (*S*)-*N*-Methyl-3-aminobuttersäure, somit musste das *S*-konfigurierte Kohlenstoffatom, ebenso wie bei **31a**, neben einer *N*-Methylfunktion lokalisiert sein.^[68-70] Da es in den NMR-Spektren keinerlei Hinweise auf eine Methylgruppe am Stickstoff des Isochinolins von **31b-I** gab, konnte C-3''' die *R*-Konfiguration zugeordnet werden. Dementsprechend musste C-1''' ebenfalls *R*-konfiguriert sein, die Konfiguration der Biarylachse zwischen Naphthalin- und Isochinolineinheit wurde als *P* bestimmt (Abbildung 24a). Somit entsprach diese Naphthylisochinolin-Hälfte **31b-I** einer Korupensamin-A-Einheit (**10a**; Abbildung 12), äquivalent zu den 'nord-westlichen' Hälften der Verbindungen **30a**, **30b** und **31a**.

In der 'süd-östlichen' Naphthylisochinolin-Einheit **31b-II** deuteten die 1H -NMR-Signale von drei isolierten aromatischen Protonen (H-1' 6.81 ppm, H-3' 6.87 ppm und H-7' 7.29 ppm), einer Methyl- (Me-2' 2.37 ppm) und einer Methoxygruppe (OMe-4' 4.10 ppm) sowie die ROESY-Serie H-1' – Me-2' – H-3' – OMe-4' auf ein Naphthalin hin, das in 6'- und 8'-Position gekuppelt war (Abbildung 24b). Dies wurde unterstützt durch HMBC-Korrelationen von H-1' zu C-8' und von H-7' zu C-6'' und zu C-5 (Abbildung 24b), sowie durch ROESY-Interaktionen zwischen H-1' und H_{ax} -4 und zwischen H-7' und H_{eq} -4 (Abbildung 24c).

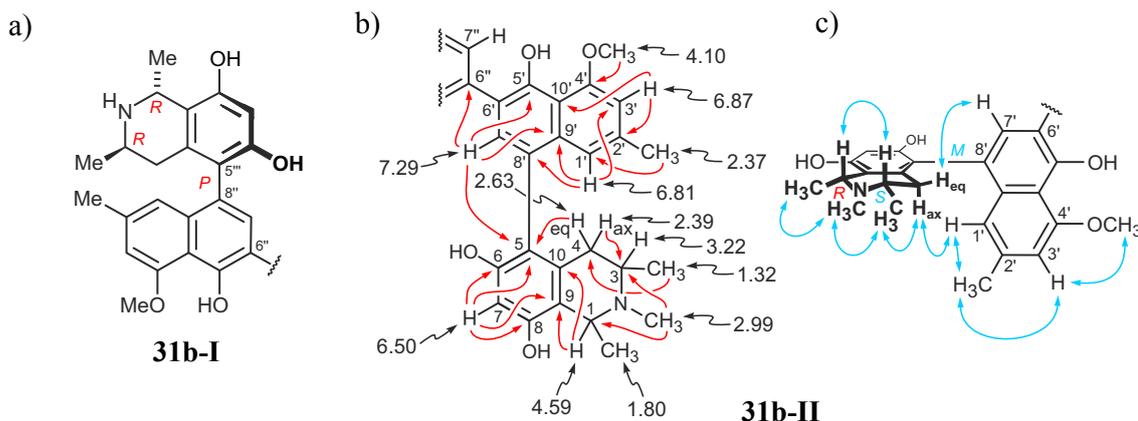


Abbildung 24. a) Absolute Konfiguration der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **31b-I** von **31b**; und ausgewählte NMR-Daten der 'süd-östlichen' Hälfte **31b-II**: b) 1H -NMR-Verschiebungen (ppm) und HMBC-Korrelationen (rote Pfeile); und c) ROESY-Wechselwirkungen.

Die Position der Achse an C-5 der Isochinolineinheit wurde durch HMBC-Resonanzen von H_{eq} -4 und H-7 zu diesem Kohlenstoff untermauert (Abbildung 24b). Drei Signale in der aliphatischen Region, die jeweils für drei Protonen integrierten, ließen sich drei benachbarten Methylgruppen im Isochinolinteil zuordnen, erkennbar an konsekutiven ROESY-Korrelationen von Me-1 (1.80 ppm) zu *N*-Me (2.99 ppm) und zu Me-3 (1.32 ppm) (Abbildung 24c). Diese Korrelationen zeigten, dass sich alle Methylgruppen auf derselben Seite der Isochinolin-Ebene befinden mussten, was durch die komplementäre ROESY-Interaktion auf der anderen Seite zwischen H-1 und H-3 bestätigt wurde (Abbildung 24c). Folglich waren die Stereozentren an C-1 und C-3 *cis* zueinander. Da der oxidative Abbau (*S*)-*N*-Methyl-3-aminobuttersäure geliefert hatte, wurde C-3 die *S*-Konfiguration zugeordnet und C-1 entsprechend die *R*-Konfiguration (Abbildung 24c). Die bereits erwähnten ROESY-Korrelationen zwischen H-1' und H_{ax} -4 sowie zwischen H-7' und H_{eq} -4 definierten die Konfiguration der Achse zwischen Naphthalin und Isochinolin als *M* (Abbildung 24c).

Die gegensätzlichen Konfigurationen der chiralen Achsen in den Naphthylisochinolin-Hälften – *P* in **31b-I** und *M* in **31b-II** – manifestierten sich, äquivalent zu Michellamin B (**9b**) und Michellamin B₂ (**30b**; Abbildung 21) im CD-Spektrum, das nur eine schwache Kurve zeigte (Abbildung 25a).

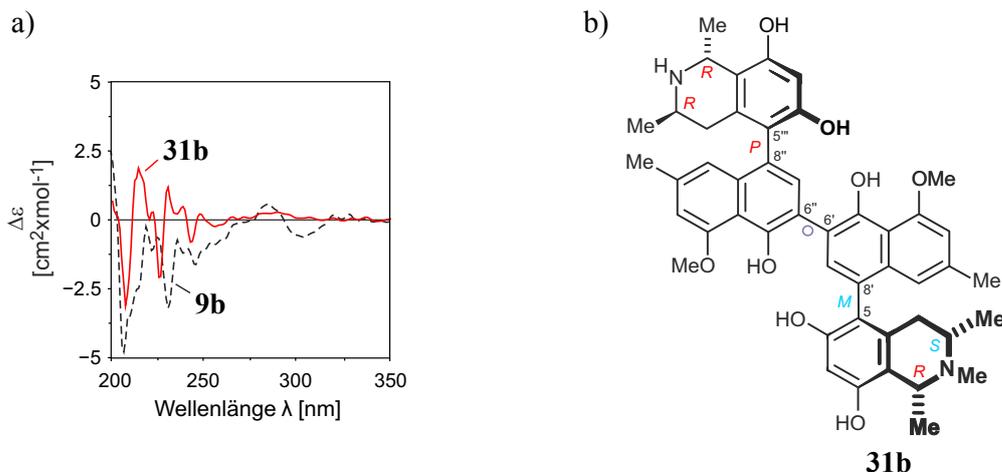


Abbildung 25. a) CD-Spektren von Michellamin B (**9b**; schwarze, unterbrochene Kurve) und **31b** (rote Kurve); und b) absolute Stereostruktur von Michellamin B₃ (**31b**).

Somit war **31b** durch die in Abbildung 25b gezeigte absolute Stereostruktur – ein Heterodimer aus Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12) und 5-*epi*-Korupensamin D – repräsentiert. Aufgrund der *M,P*-Achsenkonfiguration war Verbindung **31b** ein Äquivalent von Michellamin B (**9b**; Abbildung 3) und wurde Michellamin B₃ genannt.

2.3.2.5 *Strukturaufklärung von Michellamin A₄ (32)*

Die Molekularzusammensetzung C₄₆H₄₇N₂O₈ von **32**, die anhand der exakten Masse von 755.33246 ([M+H]⁺) berechnet wurde, deutete auf ein Naphthylisochinolin-Dimer mit einer 1,3-Dimethyldihydro-Isochinolineinheit hin, da es zwei Wasserstoffatome weniger als Michellamin A₂ (**30a**) und B₂ (**30b**) besaß. Diese Annahme wurde durch das Tieffeldverschobene Signal im ¹H-Spektrum einer der aliphatischen Methylgruppen, das zudem nur als Singulett erschien, unterstützt, sowie dem Fehlen eines der Quartetts, welche die Protonen an C-1' und C-1''' repräsentieren.

Für die 'nord-westliche' Hälfte des Moleküls, **32-I**, wurden jedoch die gleiche Konstitution sowie die gleichen relativen Konfigurationen der Zentren und der Achse wie für **30a-I** und **30b-I** bestimmt. Beim oxidativen Abbau wurde in der GC-MS nur das Mosher-Derivat der (*R*)-3-Aminobuttersäure detektiert, so dass C-3 und C-1 *R*- und die äußere Biarylachse *P*-konfiguriert sein mussten (Abbildung 26a). Somit entsprach diese 'nord-westliche' Hälfte **32-I** von **32**, wie auch bei **30a**, **30b**, **31a** und **31b** Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12).

Für den Naphthalinteil der 'süd-östlichen' Hälfte **32-II** wurden die Signale von drei aromatischen Protonen (H-1' 6.73 ppm, H-3' 6.86 ppm und H-7' 7.32 ppm; alle als Singulets), einer Methyl- (Me-2' 2.36 ppm) und einer Methoxygruppe (4.09 ppm) im ¹H-NMR-Spektrum detektiert (Abbildung 26b). Die ROESY-Serie H-1' – Me-2' – H-3' – OMe-4' (Abbildung 26c) sowie HMBC-Korrelationen von H-7' zu C-6'' und von H-1' zu C-8' (Abbildung 26b) deuteten darauf hin, dass die zentrale Achse an C-6' und die äußere Achse an C-8' gebunden war. Dies wurde durch ROESY-Interaktionen zwischen H-1' und H_{ax}-4 und zwischen H-7' und H_{eq}-4 (Abbildung 26), sowie durch eine HMBC-Resonanz von H-7' zu C-5 bestätigt. Die Position der Biarylachse an C-5 wurde durch HMBC-Interaktionen von H_{eq}-4 und H-7 (Abbildung 26b) zu diesem Atom weiter untermauert.

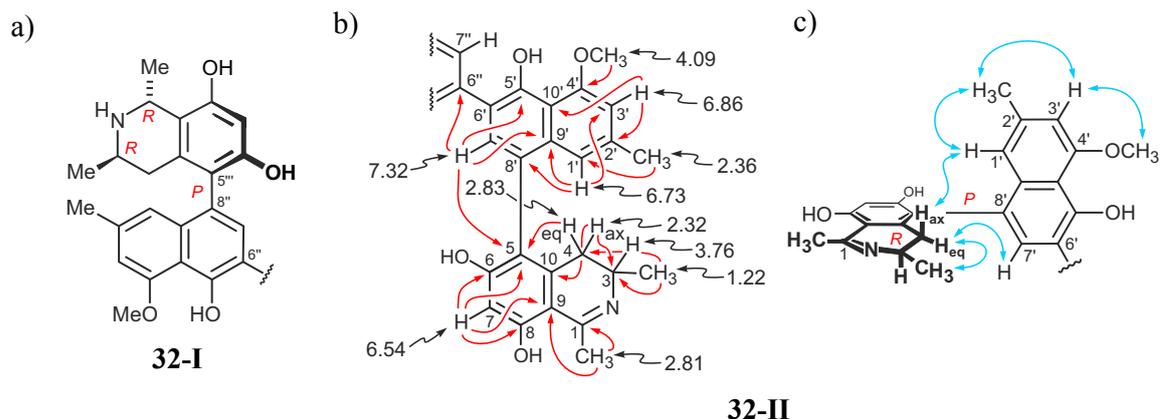


Abbildung 26. a) Absolute Konfiguration der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **32-I** von **32**; und ausgewählte NMR-Daten der 'süd-östlichen' Hälfte **32-II**: b) ¹H-NMR-Verschiebungen (ppm) und HMBC-Korrelationen (rote Pfeile); und c) ROESY-Wechselwirkungen.

Die Tieffeld-verschobenen Signale von Me-1 (2.81 ppm) und H-3 (3.76 ppm; Abbildung 26b) und das fehlende Signal für H-1 zeigten, dass es sich um ein Dihydroisochinolin handeln musste. Da der oxidative Abbau nur (*R*)-3-Aminobuttersäure geliefert hatte, musste C-3 (auch) *R*-konfiguriert sein. Die ROESY-Korrelationen zwischen H_{ax}-4 und H-1' und H_{eq}-4 und H-7' (Abbildung 26c) wiesen der chiralen Achse die *P*-Konfiguration zu.

Das CD-Spektrum von **32** war, wie auch bei **30a** (Abbildung 19a) und **31a** (Abbildung 23), deren Achsen ebenfalls in beiden Naphthylisochinolin-Hälften *P*-konfiguriert waren, fast deckungsgleich mit dem von Michellamin A (**9a**; Abbildung 27a).

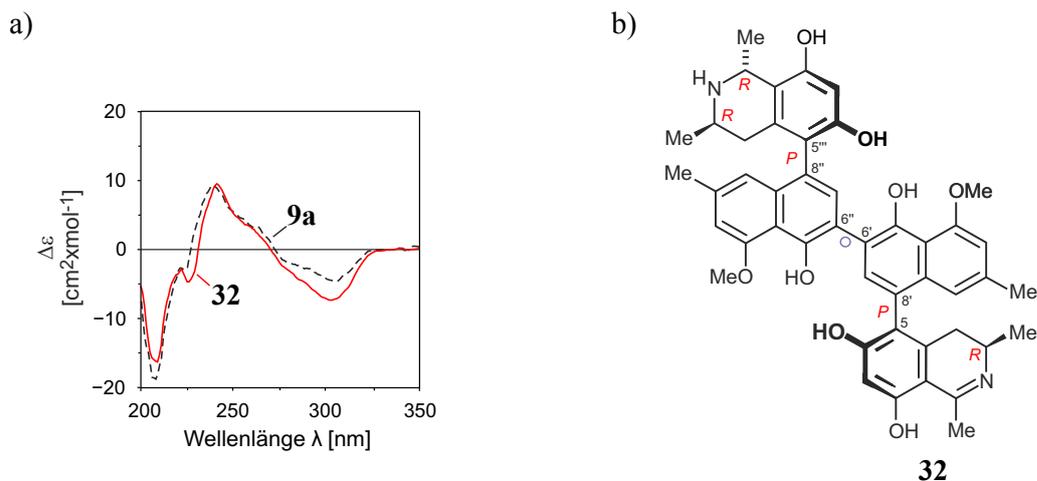


Abbildung 27. a) CD-Spektren von Michellamin A (**9a**; schwarze, unterbrochene Kurve) und **32** (rote Kurve); und b) absolute Stereostruktur von Michellamin A₄ (**32**).

Somit besaß Verbindung **32** die in Abbildung 27b abgebildete absolute Stereostruktur, ein Heterodimer aus Korupensamin A (**10a**; Abbildung 12, Kapitel 2.1) und Dihydro-Korupensamin A. Da der einzige Unterschied zu Michellamin A (**9a**, Abbildung 3, Kapitel 1) nur die zwei fehlenden Wasserstoffatome im Dihydroisochinolinteil waren, wurde die Substanz **32** Michellamin A₄ genannt.

2.4 Bedeutung der aus *A. congolensis* isolierten Naphthylisochinoline

Die Naphthylisochinolin-Monomere und -Dimere, die im Rahmen dieser Arbeit aus der zentralafrikanischen Liane *Ancistrocladus congolensis* isoliert und strukturell aufgeklärt wurden, sind alle 5,1'- oder 5,8'-gekuppelt, wie es auch bei vielen anderen Naphthylisochinolininen aus west- und zentralafrikanischen *Ancistrocladus*-Pflanzen der Fall ist. Während westafrikanische *Ancistrocladaceae*-Gewächse Alkaloide vom *Ancistrocladaceae*- (3*S*, OH-6 / OMe-6) und *Dioncophyllaceae*-Typ (3*R*, H-6) nebeneinander enthalten, produzieren ostafrikanische und asiatische fast ausschließlich Alkaloide vom *Ancistrocladaceae*-Typ. *A. congolensis*, sowie andere *Ancistrocladus*-Arten aus dem Kongobecken, bildet *Ancistrocladaceae*-Typ-Alkaloide sowie den gemischten *Dioncophyllaceae* / *Ancistrocladaceae*-Hybrid-Typ (3*R*, OH-6 / OMe-6).^[24] Dies deutet auf eine mögliche Migration der Arten von West nach Ost hin, beginnend bei den *Dioncophyllaceae*-Gewächsen, über die west- und zentralafrikanischen *Ancistrocladus*-Arten, bis hin zu den ostafrikanischen und asiatischen, und daher auf eine phytochemische Weiterentwicklung der reinen *Ancistrocladaceae*- und *Dioncophyllaceae*-Typen zum Hybrid, der Elemente beider Typen enthält.

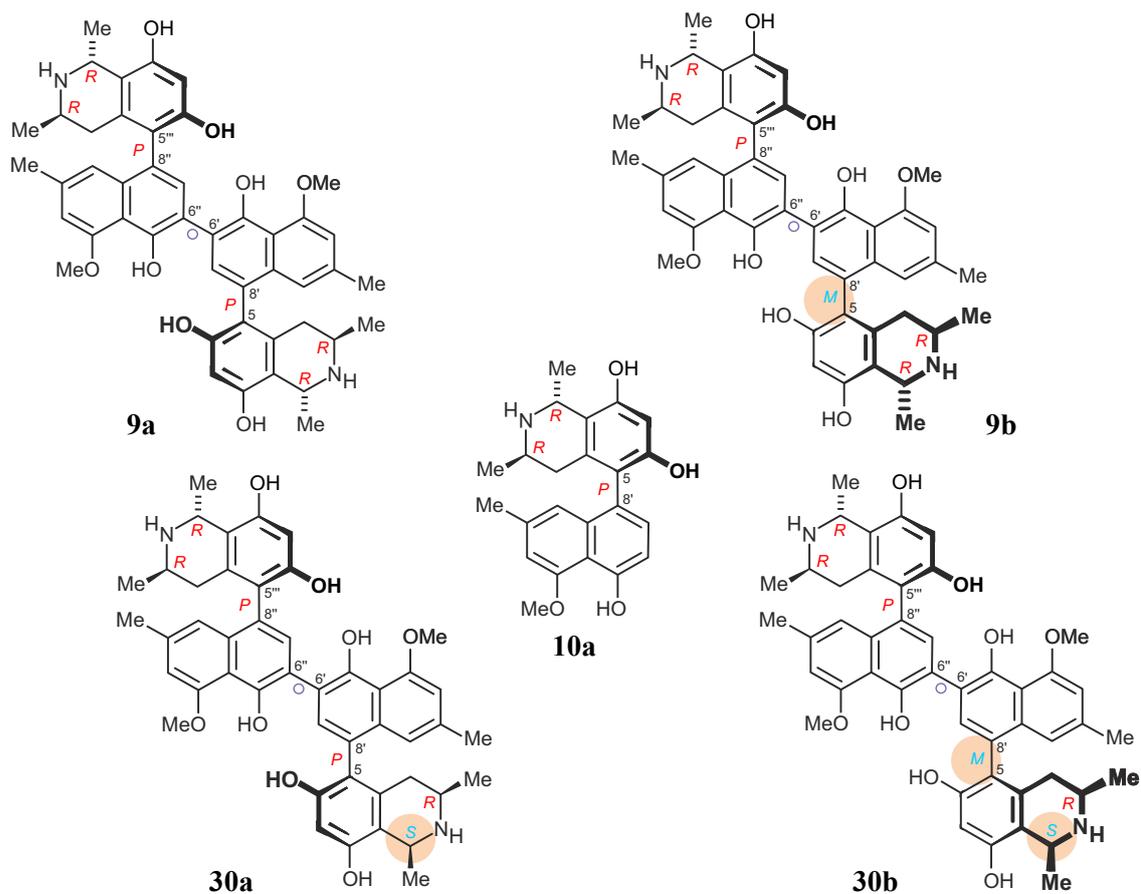


Abbildung 28. Strukturen der aus *A. congolensis* isolierten Michellamin-Dimere Michellamine A (9a), B (9b), A₂ (30a), B₂ (30b) und von Korupensamin A (10a). Die roséfarbenen Kreise markieren einen konfigurativen Unterschied zu Korupensamin A (10a).

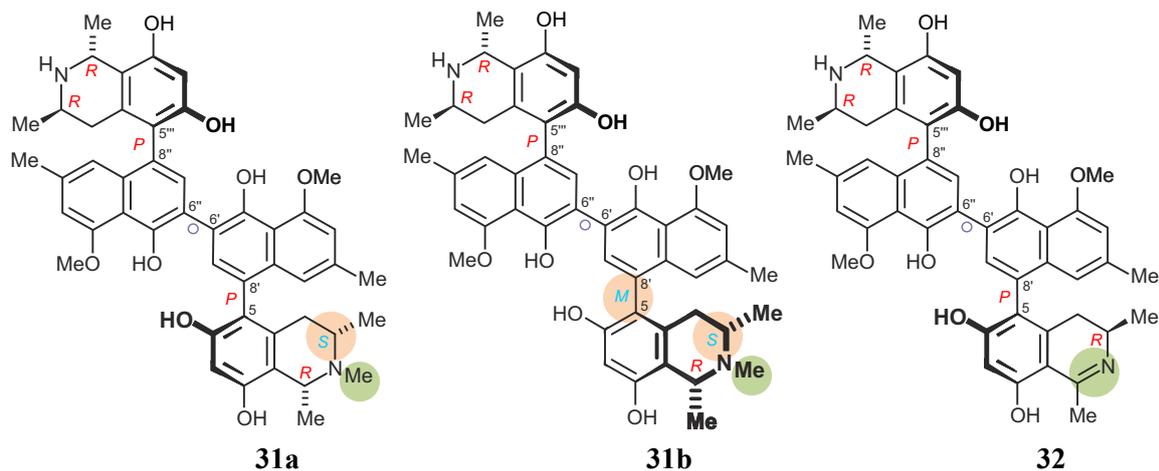


Abbildung 29. Strukturen weiterer aus *A. congolensis* isolierter Michellamin-Dimere: die Michellamine A₃ (**31a**), B₃ (**31b**) und A₄ (**32**). Die roséfarbenen Kreise markieren einen konfigurativen, die grünen Kreise einen konstitutionellen Unterschied zu Korupensamin A (**10a**; Abbildung 28).

Eine große Besonderheit von *A. congolensis* sind, in zweierlei Hinsicht, die sieben dimeren Naphthylisochinoline, die aus dieser Pflanze isoliert wurden. Zum Einen bedeutet allein die Anzahl ein Novum, denn aus anderen *Ancistrocladus*-Arten wurden *bis dato* maximal sechs Dimere nebeneinander isoliert. Zum Anderen ist die strukturelle Beschaffenheit der Dimere von Interesse, denn alle sieben Verbindungen enthalten eine konservierte 'nord-westliche' Korupensamin-A-Hälfte, die mit einer weiteren, mindestens konfigurativen – wenn nicht sogar konstitutionell – verschiedenen 'süd-östlichen' Korupensamin-Hälfte verknüpft ist (Abbildung 28 und Abbildung 29).

Michellamin A (**9a**; Abbildung 28) repräsentiert ein Kreuzkupplungsprodukt aus zwei Korupensamin-A-Monomeren (**10a**; Abbildung 28), während in Michellamin B (**9b**; Abbildung 28) das zweite Monomer Korupensamin B (**10b**; Abbildung 12) gleicht, welches ein Atropisomer von Korupensamin A ist. Die Michellamine A₂ und B₂ (**30a** und **30b**; Abbildung 28) sind beide – im Gegensatz zu den Michellaminen A (**9a**) und B (**9b**) – an C-1 *S*-konfiguriert und weisen somit 'süd-östliche' Naphthylisochinolin-Hälften entsprechend eines 1-*epi*-Korupensamin-A- (im Fall von Michellamin A₂, **30a**) oder eines 1-*epi*-Korupensamin-B- (im Fall von Michellamin B₂, **30b**) Bausteins auf. Diese vier Dimere sind alle – trotz ihrer konfigurativen Unterschiede – dem gemischten Dioncophyllaceae / Ancistrocladaceae-Hybrid-Typ (3*R*, OH-6 / OMe-6) zugehörig.^[24]

Die Michellamine A₃, B₃ und A₄ (**31a**, **31b** und **32**; Abbildung 29) sind Konstitutionsisomere von Michellamin A (**9a**) oder B (**9b**; beide Abbildung 28), da sie in der 'süd-östlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte entweder eine zusätzliche Methylgruppe (Michellamin A₃, **31a**, und B₃, **31b**) oder eine Doppelbindung (Michellamin A₄, **32**) im Isochinolin zeigen. Die Michellamine A₃ und B₃ (**31a** und **31b**) sind zusätzlich, im Gegensatz zu allen anderen im Rahmen dieser Arbeit isolierten Michellamine –

Michellamin A (**9a**), B (**9b**), A₂ (**30a**), B₂ (**30b**) und A₄ (**32**) – an C-3 *S*-konfiguriert (Abbildung 29). Die 'süd-östlichen' Naphthylisochinolin-Hälften von Michellamin A₃ (**31a**) und B₃ (**31b**; beide Abbildung 29) entsprachen somit einem Korupensamin-D-Monomer (**20**; Abbildung 12), welches durch die 3*S*-Konfiguration und die 6-OH-Funktion dem Ancistrocladaceae-Typ angehörte. Die 'nord-westliche' Korupensamin-A-Hälfte repräsentierte jedoch den gemischten Dioncophyllaceae / Ancistrocladaceae-Hybrid-Typ (3*R*, OH-6 / OMe-6).

Somit produziert *A. congolensis* nicht nur Kreuzkupplungsprodukte monomerer Naphthylisochinoline-Bausteine die entweder dem reinen Ancistrocladaceae- oder dem reinen Dioncophyllaceae / Ancistrocladaceae-Hybrid-Typ angehören, sondern sogar Naphthylisochinolin-Dimere, die beide Typen vereinen.

Diese neuen Dimere, sowie das erst neulich isolierte Jozimin A₂ (**8**; Abbildung 3, Kapitel 1), mit herausragender Bioaktivität gegen den Malariaerreger, und die im Rahmen dieser Arbeit entdeckten Mbandakamine A und B (**33a** und **33b**; Kapitel 2.6.2), mit neuartigen strukturellen Eigenschaften, beweisen, dass die *Ancistrocladus*-Arten aus dem Kongobecken immer noch reiche Quellen für verschiedenartigste Naphthylisochinolin-Alkaloide sind, und vermutlich auch noch viele interessante, bisher unentdeckte Verbindungen enthalten.

2.5 Anti-HIV-Aktivitäten der aus *A. congolensis* isolierten Michellamine

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten und Diagramme wurden der Bachelorarbeit von Julia Betzin^[85,86] entnommen, die diese am Institut für Virologie (Universität Würzburg) im Arbeitskreis von Prof. Carsten Scheller^[87] durchgeführt hat. Die experimentelle Durchführung sowie andere Details sind der Bachelorarbeit zu entnehmen.^[85]

In der Vergangenheit haben die Michellamine – zum Teil sehr vielversprechende – anti-HIV-Aktivitäten gezeigt, wobei Michellamin B (**9b**; Abbildung 3) der aussichtsreichste Kandidat für die Entwicklung eines Wirkstoffes gegen das HI-Virus gewesen war.^[29-31,71] Dabei waren die Michellamine – vermutlich durch die erhöhte Wasserlöslichkeit – als Bromid- oder Acetat-Salz wirksamer als in Form der freien Base.^[29,31]

Da im Institut für Virologie der Universität Würzburg diese Art von HIV-Experimenten noch nicht durchgeführt worden war, sollte zur Etablierung und Überprüfung der Methodik die Aktivität von Michellamin B (**9b**) bestimmt werden. Dazu wurden A3.01-Zellen mit dem HI-Virus (HIV-1_{HXB2}) und gleichzeitig mit Michellamin B (**9b**; HBr-Salz) in verschiedenen Konzentrationen (10 μ M, 30 μ M und 100 μ M) versetzt.^[85] Als Kontrolle wurden zum Einen A3.01-Zellen die nur mit dem HI-Virus behandelt worden waren ("Positivkontrolle") und zum Anderen A3.01-Zellen in reinem Medium ("Negativkontrolle") herangezogen. Parallel zur antiretroviralen Aktivität wurde auch die Zytotoxizität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 gezeigt.

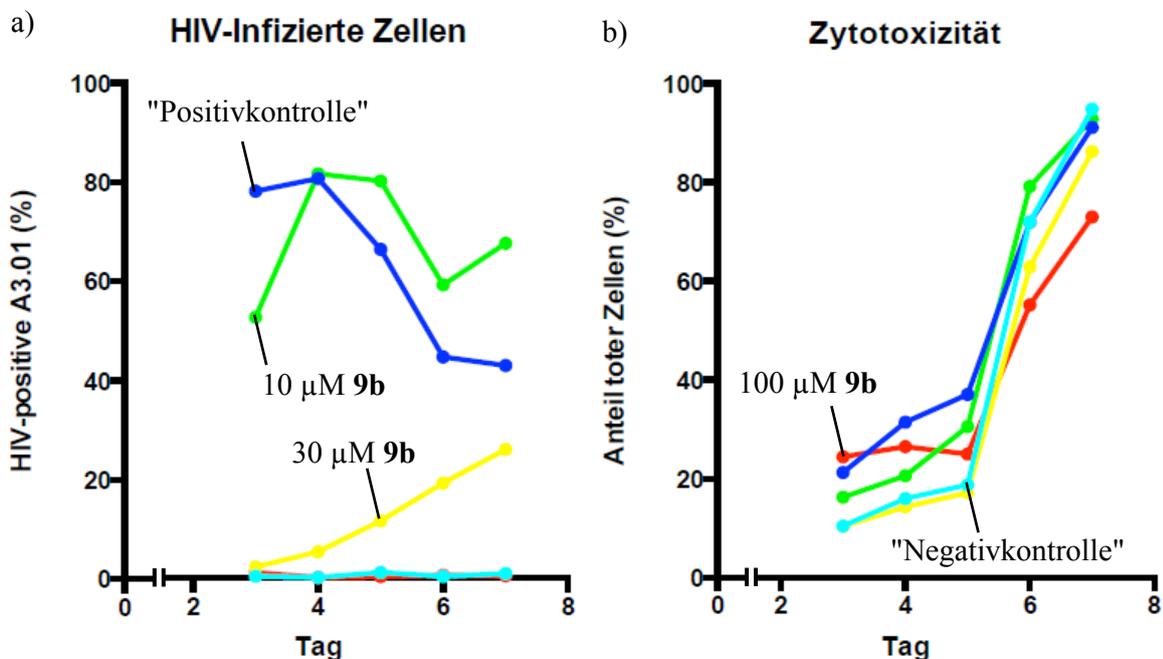


Abbildung 30. a) Antiretrovirale Aktivität und b) Zytotoxizität von: Michellamin B (**9b**; HBr-Salz) 10 μ M (grüne Linie), 30 μ M (gelbe Linie), 100 μ M (rote Linie); "Negativkontrolle" (hellblaue Linie) und "Positivkontrolle" (dunkelblaue Linie).

Michellamin B (**9b**) weist in einer Konzentration von 10 μM keine antiretroviralen Eigenschaften auf, da die damit behandelten A3.01-Zellkulturen – bis auf Tag 3 – höhere Infektionszahlen aufweisen als die Zellkultur der "Positivkontrolle" (Abbildung 30a), der keinerlei HIV-hemmende Stoffe zugesetzt wurden, und die somit – theoretisch – die höchste Anzahl an HIV-infizierten Zellen zeigen sollte. Bei 30 μM Michellamin B (**9b**) ist die Replikation des HI-Virus schon deutlich reduziert, an Tag 3 sind nur noch 11.6%^[85] der A3.01-Zellen infiziert. Im Laufe des Versuchs steigt die Zahl der infizierten Zellen bis auf 26.0%^[85] an Tag 7 an (Abbildung 30a), was jedoch durch eine verringerte Vitalität, erkennbar an der deutlich erhöhten Zahl toter Zellen ab Tag 5 (Abbildung 30b), erklärt werden kann. In einer Konzentration von 100 μM ist Michellamin B (**9b**) in der Lage, die HIV-Replikation vollständig zu unterbinden, in den Zellkulturen sind – ebenso wie bei der "Negativkontrolle", der kein HIV zugesetzt wurde – keine infizierten Zellen vorhanden (Abbildung 30a). Diese Ergebnisse deckten sich mit den in der Literatur berichteten Konzentrationen, in denen Michellamin B (**9b**) in der Lage ist, die HIV-Replikation zu verhindern,^[29,31] sodass mit dieser Methodik nun auch die anderen Michellamine in der Virologie der Universität Würzburg getestet werden konnten.

Die Michellamine A (**9a**), B (**9b**), A₂ (**30a**; alle Abbildung 28), A₃ (**31a**), B₃ (**31b**) und A₄ (**32**; alle Abbildung 29) wurden auf ihre antiretrovirale Aktivität gegen den Stamm HIV-1_{HXB2} hin getestet. Von Michellamin B₂ (**30b**; Abbildung 28) war nicht ausreichend Substanz für diese Bioaktivitätstests vorhanden. Zusätzlich zu den Michellaminen sollte auch die antiretrovirale Aktivität von Jozimin A₂ (**8**; Abbildung 3; isoliert/synthetisiert von G.-L. Zhang)^[88] ermittelt werden.

Die Substanzen wurden als HBr-Salz jeweils in einer Konzentration von 100 μM in mit HI-Viren infizierten A3.01-Zellkulturen eingesetzt, als "Positivkontrolle" diente eine A3.01-Zellkultur, der nur HI-Viren und keine (möglichen) Hemmstoffe zugesetzt worden waren. Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet, da ab dem fünften Tag die Vitalität der Zellen kulturbedingt beeinträchtigt war (Abbildung 30b).

In den Zellkulturen die mit Michellamin A (**9a**) und B₃ (**31b**) behandelt worden waren fanden sich über den gesamten Versuchszeitraum in etwa so viele HIV-infizierte Zellen wie bei der "Positivkontrolle" (Abbildung 31a), diese Substanzen waren also nicht in der Lage das Viruswachstum zu verhindern. Michellamin A₂ (**30a**), A₃ (**31a**) und A₄ (**32**) hingegen zeigten ähnlich potente Inhibierungseigenschaften wie Michellamin B (**9b**), sie verursachten eine deutliche Hemmung der Virusreplikation (Abbildung 31a).

Jozimin A₂ (**8**) zeigte in dieser Konzentration eine starke Zytotoxizität (Abbildung 30b), sodass die Ergebnisse der mit dem HI-Virus infizierten Zellkulturen (Abbildung 30a) nicht zur Beurteilung der antiretroviralen Aktivität herangezogen werden konnten.

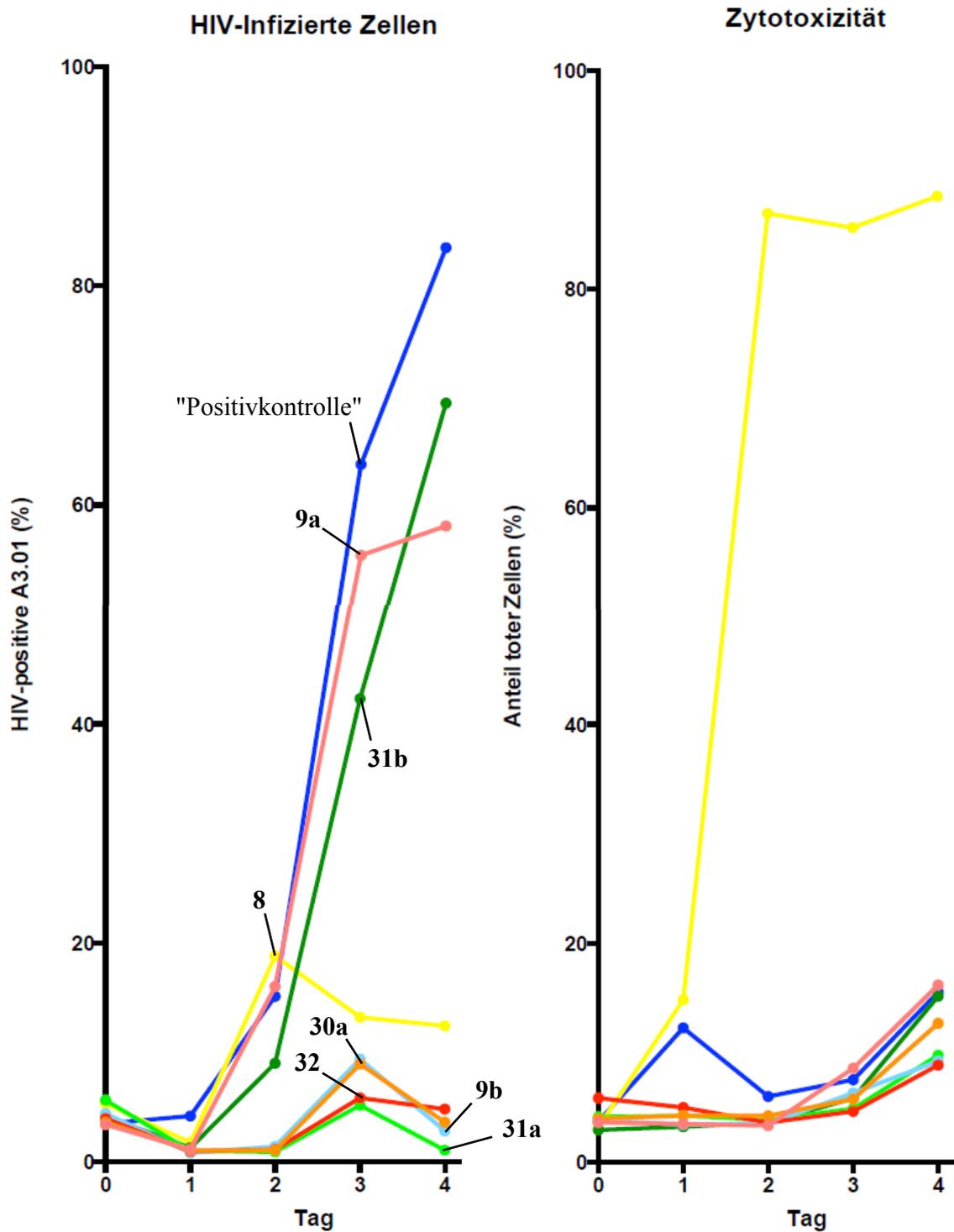


Abbildung 31. a) Antiretrovirale Aktivität und b) Zytotoxizität von: verschiedenen Michellaminen (100 μ M, HBr-Salz): Michellamin A (**9a**, roséfarbene Linie), Michellamin B (**9b**, hellblaue Linie), Michellamin A₂ (**30a**, orange Linie), Michellamin A₃ (**31a**, hellgrüne Linie), Michellamin B₃ (**31b**, dunkelgrüne Linie), Michellamin A₄ (**32**, rote Linie); Jozimin A₂ (**8**; gelbe Linie); und der "Positivkontrolle" (dunkelblaue Linie).

Für die Michellamine B (**9b**), A₂ (**30a**), A₃ (**31a**) und A₄ (**32a**) wurde anhand einer Konzentrationsreihe (0 µM, 10 µM, 30 µM, und 100 µM) und über drei Tage je ein IC₅₀-Wert bestimmt.^[85]

Michellamin A₃ (**31a**) zeigte mit einem IC₅₀ von 15.8 µM die wirksamste Inhibierung, gefolgt von Michellamin B (**9b**) mit 22.9 µM.^[85] Michellamin A₄ (**32**) verursachte in einer Konzentration von 23.6 µM und Michellamin A₂ (**30a**) in einer Konzentration von 30.0 µM eine halbmaximale Inhibierung.^[85]

Eine Beurteilung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) kann anhand dieser Ergebnisse nicht vorgenommen werden, da die wirksamen Konzentrationen nicht nur die gleiche Größenordnung aufweisen, sondern zudem so nah beieinander liegen, dass die Unterschiede allein durch Zellkultur-bedingte Schwankungen hervorgerufen worden sein könnten. Unklar ist, warum Michellamin A (**9a**) bei diesen Experimenten nicht in der Lage war, das Viruswachstum zu inhibieren, da dies im Gegensatz zu den in der Literatur berichteten Eigenschaften steht.^[29,31] Da Michellamin A (**9a**) in dieser Konzentration auch als freie Base wirksam sein sollte,^[29] kann die nicht-vollständige Umwandlung in das HBr-Salz und damit eine geringere Verfügbarkeit nicht als Fehlerquelle herangezogen werden. Möglicherweise war aber nicht ausreichend Substanz in den Kolben zu Generierung des HBr-Salzes transferiert worden, sodass real keine Konzentration von 100 µM erreicht worden war. Diese Möglichkeiten müssen auch als Fehlerquellen für die Ergebnisse von Michellamin B₃ (**31b**) in Betracht gezogen werden, sodass eine Wiederholung dieser Experimente durchgeführt werden sollte.

2.6 *Phytochemische und populationsgenetische Untersuchungen an *Ancistrocladus spec.* 032*

2.6.1 *Sammlung von *Ancistrocladus spec.* 032*

Im Sommer 2008 wurde, gemeinsam mit A. Irmer (Universität Würzburg), Prof. V. Mudogo und Prof. D. Kalenda (beide Universität Kinshasa)^[89] sowie ortskundigen Biologen^[90] (Abbildung 32a), eine Expedition in das Gebiet um die Stadt Mbandaka der Demokratischen Republik Kongo (D. R. Kongo) unternommen (Abbildung 32b).

a)



b)



Abbildung 32. a) Expeditionsteam in der D. R. Kongo, mit: A. Irmer (liegend, im Vordergrund), Prof. D. Kalenda (3. Reihe links außen) und Prof. V. Mudogo (3. Reihe 2. von links); und b) Lage der Stadt Mbandaka in der D. R. Kongo (grün).

Dabei wurde zum Einen Blattmaterial aller gesichteten *Ancistrocladus*-Individuen gesammelt und zur populationsgenetischen Untersuchung anhand von Mikrosatelliten zu Prof. G. Heubl, Ludwig-Maximilians-Universität München, geschickt (Kapitel 2.6.3). Zum Anderen wurden zahlreiche *Ancistrocladus*-Pflanzen gesammelt, die in unserem Arbeitskreis auf ihre chemischen Konstituenten hin untersucht werden sollten. Da das Kongobecken in dieser Hinsicht als wenig untersucht gilt und in den letzten Jahren bereits Quelle für mehrere Arten war, die sich keiner bekannten Spezies zuordnen ließen,^[48,54,40] schien die Untersuchung dieser Region und seiner Arten lohnenswert. Im Umkreis der Stadt Mbandaka wurden an vier Orten (Abbildung 33), je im Umkreis von ein bis zwei Kilometern, einzelne, blühende *Ancistrocladus*-Exemplare ausgewählt und als komplette Pflanzen (Blätter, Äste, Stamm und Wurzeln) gesammelt. Die Blätter und Äste sowie die Rinde der Stämme und Wurzeln wurden getrocknet.



Abbildung 33. Sammelorte im Umkreis der Stadt Mbandaka.

Insgesamt wurden 53 *Ancistrocladus*-Exemplare beprobt, von den Pflanzen mit den Nummern 002, 015, 032, 039 und 049 wurde Material zur phytochemischen Untersuchung gesammelt. Das Exemplar mit der Nummer 032, das ungewöhnliche Blüten aufwies (Abbildung 34a) und zusätzlich unreife Früchte trug (Abbildung 34b) wurde im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet. Ein Herbarbeleg (Nummer 093) wurde im Herbarium Bringmann, Universität Würzburg, hinterlegt.

a)



b)



Abbildung 34. *Ancistrocladus* spec. 032: a) Blüten; und b) Früchte (Fotos: C. Steinert / A. Imer im August 2008; Sammelort 'Bonsolerville', 00°06.191 S, 018°20.506 E bei Mbandaka, D. R. Kongo).

2.6.2 Phytochemische Untersuchungen an *Ancistrocladus spec. 032*: Isolierung und Strukturaufklärung von neuartigen dimeren Naphthylisochinolin

2.6.2.1 Isolierung von Mbandakamin A (**33a**)

Die in diesem Kapitel vorgestellten Verbindungen wurden in enger Zusammenarbeit mit dem kongolesischen BEBUC-Stipendiaten^[91] Blaise Kimbadi Lombe isoliert und aufgeklärt und sind Bestandteil seiner Masterarbeit.^[92,93]

Um den Gehalt und die Diversität an Naphthylisochinolin in den gesammelten *Ancistrocladus*-Pflanzen zu bestimmen, wurde ein HPLC-MS-Screening aller Sammel-exemplare durchgeführt. Dabei fiel auf, dass vor allem in den Blättern eine hohe Konzentration an Naphthylisochinolin vorlag, erkennbar an den Massenpeaks im Bereich 379–436 Da ($[M+H]^+$, Monomere) und 756–813 Da ($[M+H]^+$, Dimere) (Abbildung 1). *Ancistrocladus spec. 032* zeigte im HPLC-MS-Chromatogramm zahlreiche Peaks, die Molekülmassen im Bereich dimerer Naphthylisochinoline aufwiesen, sowie einen chromatographisch leicht zugänglichen Hauptmetaboliten (Peak 1, Abbildung 35).

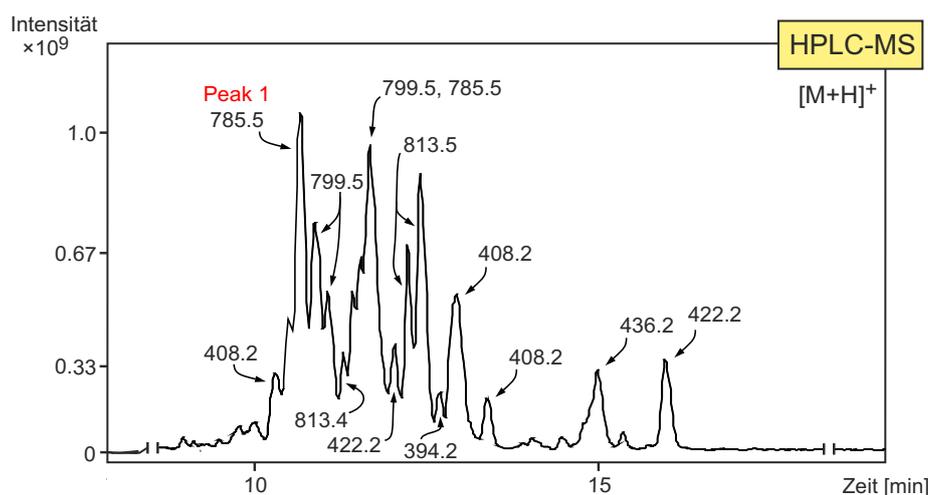


Abbildung 35. HPLC-MS-Chromatogramm des Blattextraktes von *Ancistrocladus spec. 032*.

Dessen Peak wies eine Masse von 785.5 Da ($[M+H]^+$, HPLC-MS) auf, die bereits von Ancistrogriffithin A (**15**, Abbildung 36a), einem aus *Ancistrocladus griffithii* isolierten Dimer,^[38] bekannt war, sodass zunächst überprüft werden musste, ob Peak 1 identisch mit Ancistrogriffithin A (**15**) war. Ein Coelutionsexperiment des Blattextraktes mit authentischem, reinen Ancistrogriffithin A (**15**) zeigte, dass Peak 1 nicht identisch mit diesem Naphthylisochinolin war.

Wie in Abbildung 36b gut zu sehen ist, eluierten Peak 1 und Ancistrogriffithin A (**15**) auf achiraler RP-C₁₈-Phase deutlich getrennt voneinander.

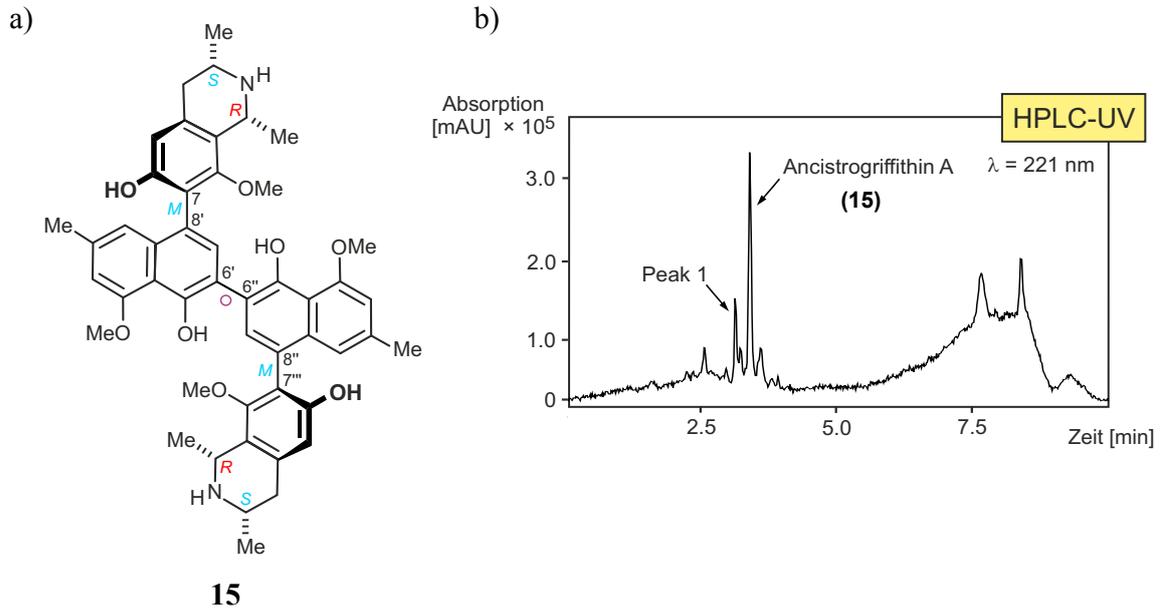


Abbildung 36. a) Ancistrogriffithin A (**15**); und b) Coelution von *Ancistrocladus* spec. 032 (Blattextrakt) und Ancistrogriffithin A (**15**) mittels HPLC-UV.

Da Ancistrogriffithin A (**15**) das einzige bekannte Naphthylisochinolin mit dieser Masse war, musste es sich bei Peak 1 um eine neue Verbindung handeln. Deshalb wurden 400 g gemahlene Blätter im Ultraschallbad und auf einem Schüttler mit einem Methanol-Dichlormethan-Gemisch sauer extrahiert. Zur Abtrennung unpolarer Substanzen und des Chlorophylls wurde der Rohextrakt in Chloroform mazeriert. Der feste Rückstand zeigte, in Methanol gelöst, das gleiche Naphthylisochinolin-Muster wie der Rohextrakt der Blätter (Abbildung 35). Somit war sichergestellt, dass die Extraktion im Säuren keine Verbindungen zerstört oder Artefakte generiert hatte. Der Extrakt wurde präparativ an einer RP-C₁₈-Phase aufgetrennt und Peak 1 als Reinsubstanz erhalten.^[92]

Anhand der exakten Masse von $[M+H]^+ = 785.37964$ Da wurde eine Elementarzusammensetzung von C₄₈H₅₂N₂O₈ für Peak 1 bestimmt. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte den vollen Signalsatz, ein weiteres Ausschlusskriterium für Ancistrogriffithin A (**15**; Abbildung 36a), das aufgrund seiner symmetrischen Struktur nur einen halben Signalsatz im NMR-Spektrum liefert.^[38]

2.6.2.2 *Strukturaufklärung von Mbandakamin A (33a)*

Im Protonenspektrum zeigte **33a** in der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **33a-I** ein *meta*-Kopplungsmuster zweier aromatischer Protonen (H-1' 6.62 ppm und H-3' 6.74 ppm), die ROESY-Korrelationen mit einer Methyl- (Me-2' 2.34 ppm) und einer Methoxygruppe (OMe-4' 4.09 ppm) aufwiesen (Abbildung 37). Durch HMBC-Wechselwirkungen konnte dem Naphthalinteil zusätzlich ein isoliertes aromatisches Proton (H-7' 6.44 ppm) zugeordnet werden. Dieses Proton zeigte HMBC-Korrelationen zu zwei Kohlenstoffatomen, von denen eines Teil des benachbarten Isochinolins war (C-5), während das andere einem weiteren Naphthalinsystem, nämlich dem des 'süd-östlichen' Parts **33a-II** angehörte (Abbildung 37b). Das äquatoriale Proton an C-4 des Isochinolins sowie H-7 von **33a-I** wiesen ebenfalls eine HMBC-Wechselwirkung zu C-5 auf, sodass eine 5,8'-Kupplung innerhalb der Naphthylisochinolin-Hälfte **33a-I** angenommen wurde. Unterstützt wurde diese Annahme durch ROESY-Wechselwirkungen zwischen H_{ax}-4 und H-1' sowie zwischen H_{eq}-4 und H-7' (Abbildung 37b). Die ROESY-Sequenz H-1' – Me-2' – H-3' – OMe-4', die eine C,C-Verknüpfung an diesen Stellen ausschloss, sowie die HMBC-Korrelationen von H-7' zu C-5 und zu dem Kohlenstoffatom des zweiten Naphthalins und die ROESY-Korrelationen zwischen H-7' und Me-2'' (Abbildung 37b) wiesen C-6' als Kupplungsposition für die zentrale Achse aus.

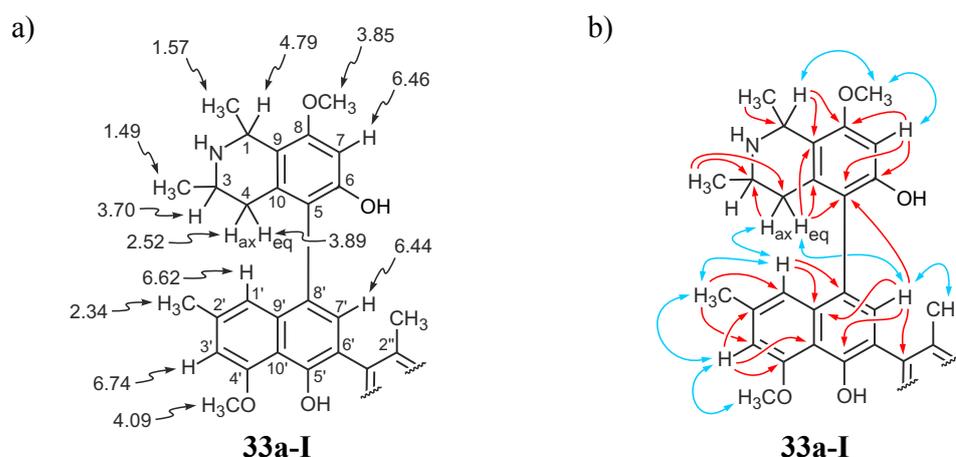


Abbildung 37. Ausgewählte NMR-Daten der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **33a-I** von **33a**: a) ¹H-NMR-Verschiebungen (ppm); sowie b) für die Strukturaufklärung wichtige ROESY- (blaue Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile).

Die ROESY-Sequenz H-1 – OMe-8 – H-7 bewies, dass an C-8 eine Methoxygruppe gebunden sein musste, während an C-6 eine freie OH-Gruppe vorhanden war (Abbildung 37b). Die Naphthylisochinolin-Hälfte entsprach somit konstitutionell 8-O-Methylkorupensamin A (Korupensamin A, **10a**; Abbildung 12, Kapitel 2.1).

In der 'süd-östlichen' Hälfte **33a-II** der Verbindung **33a** erschienen zwei aromatische Protonen (H-6'' 7.00 ppm und H-7'' 7.05 ppm) als AB-Spin-System, die Teil der ROESY-Sequenz OMe-5'' – H-6'' – H-7'' (Abbildung 38b) waren. Die HMBC-Signale von H-7'' zu C-5'' und zu C-9'', sowie von H-6'' zu C-8'' und zu C-10'' sprachen für ein Naphthalin mit einer 5''-Methoxygruppe (Abbildung 38b). Zusätzlich wurden zwei isolierte aromatische Protonen (H-7''' 5.32 ppm und H-1'' oder H-3'' 6.78 ppm) detektiert.

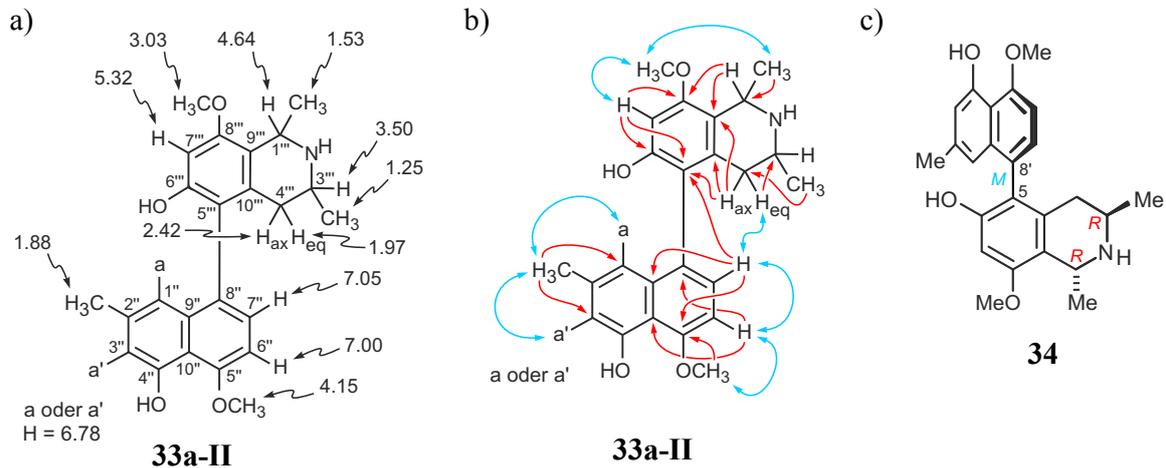


Abbildung 38. Ausgewählte NMR-Daten der 'süd-östlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **33a-II** von **33a**: a) ¹H-NMR-Verschiebungen (ppm); sowie b) für die Strukturaufklärung wichtige ROESY- (blaue Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile); und c) Struktur von Korupensamin E (**34**).

Die Verknüpfung in der 8''-Position mit C-5''' des Isochinolinteils wurde durch die ROESY-Interaktionen zwischen H-7'' und H_{eq}-4''' belegt, sowie durch die HMBC-Korrelationen von H-7'', H_{ax}-4''' und H-7''' zu C-5''' (Abbildung 38b). Demnach war auch die zweite Naphthylisochinolin-Hälfte von **33a** 5,8'-gekuppelt (also im Molekülkontext 5'', 8''). Die HMBC-Wechselwirkungen von H-1''' und H-7''' mit C-8''' (156.5 ppm) sowie die ROESY-Sequenz Me-1''' – OMe-8''' – H-7''' bewiesen, dass eine C-8'''-Methoxy- und eine C-6'''-Hydroxygruppe vorliegen mussten (Abbildung 38b). Somit entsprach diese Naphthylisochinolin-Hälfte konstitutionell Korupensamin E (**34**, Abbildung 38c).

In der 'nord-westlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte **33a-I** war die Position der zentralen Biarylachse eindeutig bestimmbar (Abbildung 37). Die 2''-Methyl-Gruppe der 'süd-östlichen' Hälfte **33a-II** wies ein Hochfeld-verschobenes ¹H-Signal von 1.88 ppm auf, verursacht durch die räumliche Nähe zu einem abschirmenden Substituenten, in diesem Fall dem Naphthalinsystem von **33a-I**. Bestätigt wurde dies durch eine ROESY-Wechselwirkung zwischen Me-2'' und H-7' (Abbildung 37b). Zudem zeigte diese Methylgruppe eine ROESY-Interaktion zu dem isolierten aromatischen Proton bei 6.78 ppm und ³J-HMBC-Korrelationen zu zwei aromatischen Kohlenstoffen (Abbildung 38b). Anhand dieser Hinweise konnte jedoch nur festgelegt werden, unterstützt

durch die ROESY-Sequenz 5''-OMe – H-6'' – H-7'', dass die zentrale Achse entweder an C-1'' oder an C-3'' lokalisiert sein musste (Abbildung 38b).

Bei den literaturbekannten Naphthylisochinolin-Dimeren sind meist Hydroxygruppen oder Protonen in *ortho*-Position der zentralen Achse vorhanden, welche somit nicht rotationsgehindert ist (Abbildung 39a).^[29,71] Die Verknüpfung der Monomere erfolgte also an sterisch wenig gehinderten Positionen. Bei sterisch anspruchsvolleren *ortho*-Substituenten wie Methylgruppen oder dem Isochinolin-Teil kann die Verknüpfung in dieser Position zwar erfolgen, die Rotation um die zentrale Achse ist jedoch nicht mehr möglich (Abbildung 38b/c).^[28,54] Bei all diesen Dimeren sind allerdings die zwei Naphthylisochinolin-Hälften über die gleiche Verknüpfungsposition miteinander verbunden, was eine diagonale Ausrichtung der Isochinolin-Teile und somit die Minimierung der sterischen Hinderung erlaubt (Abbildung 39).

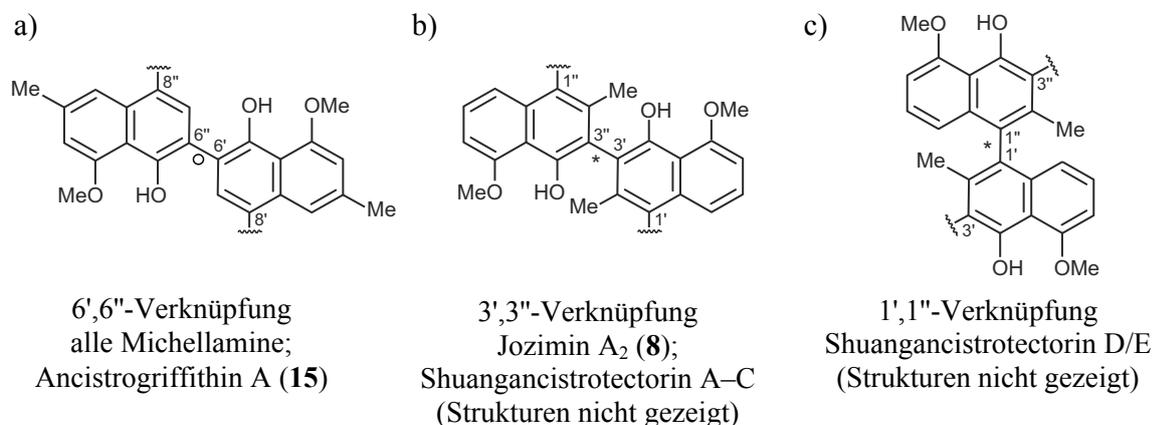


Abbildung 39. Verknüpfungspositionen der zentralen Achse in literaturbekannten Naphthylisochinolin-Dimeren: a) 6',6''-; b) 3',3''- und c) 1',1''-Verknüpfung.

Ausnahmen sind Korundamin A (**35**; Abbildung 40a),^[94] dessen Naphthylisochinolin-Hälften durch die unsymmetrische Verknüpfung in der 'nord-westlichen' Hälfte räumlich näher beieinander sind als bei den oben genannten Dimeren, sowie das synthetische Jozimin B (**36**; Abbildung 40b).^[95] Bei diesem Dimer ist die zentrale Achse in 6',8''-Position lokalisiert, was zu einer hohen sterischen Hinderung in der Mitte des Moleküls führt und die beiden Naphthylisochinolin-Hälften ineinander presst.

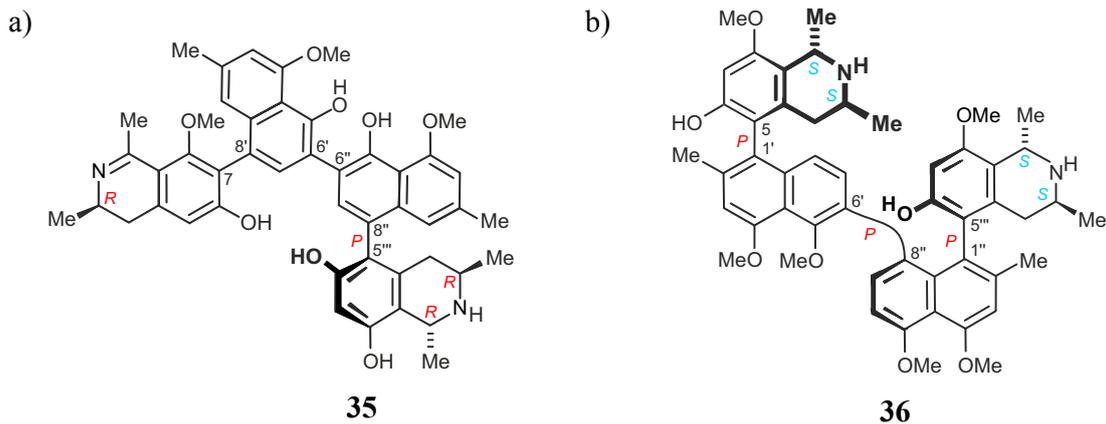


Abbildung 40. Naphthylisochinolin-Dimere mit unsymmetrisch verknüpften zentralen Achsen: a) Korundamin A (**35**; komplette Stereostruktur nicht aufgeklärt); und b) Jozimin B (**36**).

Im ROESY-Spektrum von Jozimin B (**36**) wurden diverse Korrelationen zwischen Protonen der 'nord-westlichen' und der 'süd-östlichen' Naphthylisochinolin-Hälfte beobachtet, die sich auf Grund der ungewöhnlichen Kupplung in der 8''-Position räumlich sehr nahe sind (Abbildung 41a).^[95] Auch bei Verbindung **33a** waren zahlreiche ROESY-Interaktionen zwischen den monomeren Hälften vorhanden, wie zum Beispiel zwischen OMe-4' und H-1''' / OMe-8''', zwischen H-1' / H-3' und OMe-8''', sowie zwischen den beiden Isochinolin-Teilen (Abbildung 41b). Diese Korrelationen belegten eindeutig, dass die zweite Naphthylisochinolin-Hälfte **33a-II** in der 1''-Position an **33a-I** geknüpft sein musste, denn eine Kupplung an C-3'' hätte die beiden Naphthylisochinolin-Hälften räumlich in entgegengesetzte Richtungen orientiert, wie bei den anderen bisher bekannten natürlichen Naphthylisochinolin-Dimeren.

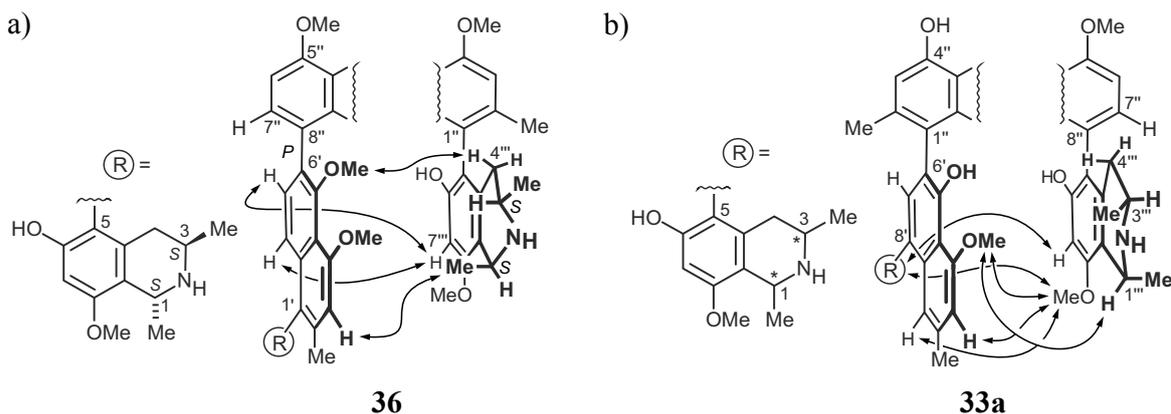


Abbildung 41. a) ROESY-Korrelationen in Jozimin B (**36**), welche die 6',8''-Kupplung beweisen; und b) ROESY-Korrelationen in **33a**, welche die 6',1''-Kupplung belegen.

Somit bestand **33a** konstitutionell aus einer 8-*O*-Methylkorupensamin-A- und einer Korupensamin-E-Hälfte (**34**, Abbildung 38c), die unsymmetrisch – in 6'- und 1''-Position – miteinander verknüpft waren. Die Relativkonfigurationen für die Zentren in den Isochinolin-Teilen waren in beiden Hälften, **33a-I** und **33a-II**, *trans*, erkennbar an den ROESY-Interaktionen zwischen Me-1 und H-3 beziehungsweise Me-1''' und H-3''' (Abbildung 42a). Der oxidative Abbau^[69] lieferte ausschließlich (*R*)-3-Aminobuttersäure, folglich waren alle Stereozentren *R*-konfiguriert.

Die ROESY-Sequenzen Me-1 – H-3 – H_{eq}-4 – H-7 und Me-1''' – H-3''' – H_{eq}-4''' – H-7'' (Abbildung 42a) in Kombination mit den Absolutkonfigurationen der Stereozentren (C-1, C-3, C-1''', C-3''' = *R*) definierten beide äußeren Biarylachsen als *P*-konfiguriert (Abbildung 42a). Die Konfiguration der inneren Achse war durch spezifische ROESY-Korrelationen (Abbildung 42a) ebenfalls als *P* festgelegt, sodass **33a** 1*R*,3*R*,1'''*R*,3'''*R*,*P*,*P*,*P*-konfiguriert war (Abbildung 42b). Die Substanz wurde – nach ihrem Sammelort – Mbandakamin A (**33a**) benannt.

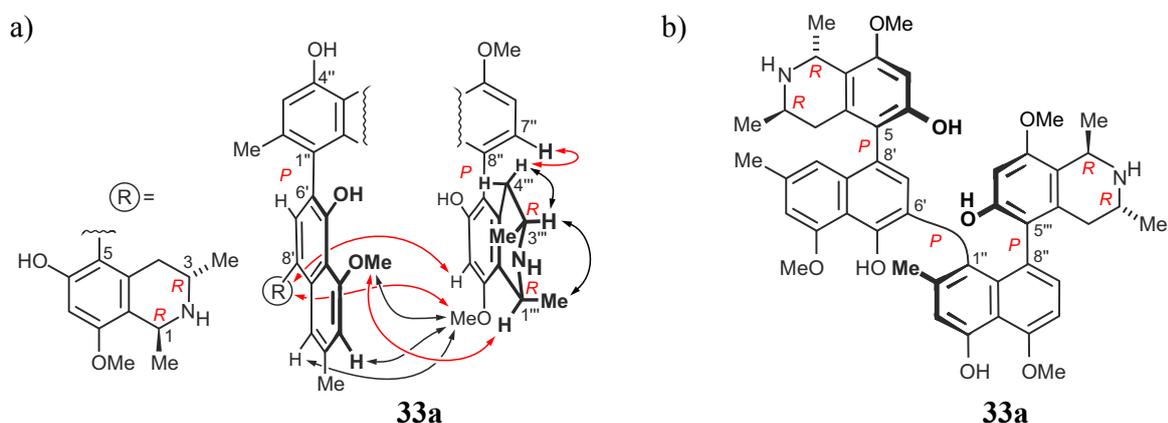


Abbildung 42. a) ROESY-Korrelationen in **33a**, welche die relative *trans*-Konfiguration der Zentren sowie die Konfigurationen der Biarylachsen (rot) festlegen; und b) absolute Stereostruktur von **33a** (Mbandakamin A).

Mbandakamin A (**33a**) ist in vielerlei Hinsicht ein außergewöhnliches Molekül. Es ist das erste Naphthylisochinolin-Dimer, das unsymmetrisch (6',1'') gekuppelt ist und zudem aus zwei konstitutionell verschiedenen Hälften (OH-4'/OMe-5' und OMe-4''/OH-5'') besteht. Von den drei konsekutiven chiralen Achsen ist die mittlere Achse diejenige mit der höchsten sterischen Hinderung aller bekannten Naphthylisochinoline. Die zentrale Achse im (rein synthetischen) Jozimin B (**36**; Abbildung 40b) weist die *ortho*-Substituenten OMe-5', H-7', H-7'' und den Naphthalinteil auf, in Mbandakamin A (**33a**; Abbildung 42) ist jedoch, auf Grund der Kupplung in 1''- statt in 8''-Position, das Proton 7'' durch die sterisch anspruchsvollere Me-2''-Gruppe ersetzt.

Zudem zeigte Mbandakamin A (**33a**) mit $0.039 \mu\text{g mL}^{-1}$ (IC_{50} , Diacetat)^[96] die höchste Bioaktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum* N474; Zytotoxizität gegen L6-Zellen: $\text{IC}_{50} = 5.03 \mu\text{g mL}^{-1}$; Selektivitätsindex = 129 ^[97]), im Vergleich zu allen anderen Naphthylisochinolin-Dimeren, die aus 5,8'-gekoppelten Monomeren bestehen. Laut WHO werden Substanzen mit einer Aktivität $< 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ und einem Selektivitätsindex > 100 als "Hit", also potenzieller Kandidat für die Entwicklung eines Medikaments gegen *P. falciparum*, angesehen.^[98] Somit ist Mbandakamin A (**33a**) eine vielversprechende Verbindung für SAR-Studien an dem Malariaerreger *P. falciparum*.

Die Isolierung neuartiger Verbindungen aus natürlichen Quellen lässt stets die Frage aufkommen, ob es sich um einen echten Naturstoff oder ein bei der Extraktionsprozedur entstandenes Artefakt handelt. Ein Indikator für echte Naturstoffe ist das Vorhandensein weiterer, strukturell ähnlicher Moleküle in der jeweiligen Quelle.

Es galt also, herauszufinden, ob in *Ancistrocladus spec. 032* Konfigurations- und / oder Konstitutionsisomere von Mbandakamin A (**33a**) vorhanden waren. Diese könnten dann – je nach ihrer strukturellen Beschaffenheit – Hinweise auf die (biosynthetische) Entstehung dieser besonderen Naphthylisochinolin-Alkaloide geben.

2.6.2.3 Isolierung und Strukturaufklärung von Mbandakamin B (**33b**)

Aus diesem Grund wurde der Blattextrakt von *Ancistrocladus spec. 032* gezielt nach Peaks mit der gleichen Masse ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 785.5 \text{ Da}$) durchsucht. In der Tat zeigte Peak 5 (Verbindung **33b**; Abbildung 43) neben einer anderen Masse (799.5 Da) auch die gesuchte Masse und wurde – äquivalent zu Mbandakamin A (**33a**) – mittels präparativer HPLC an RP- C_{18} -Phase isoliert.

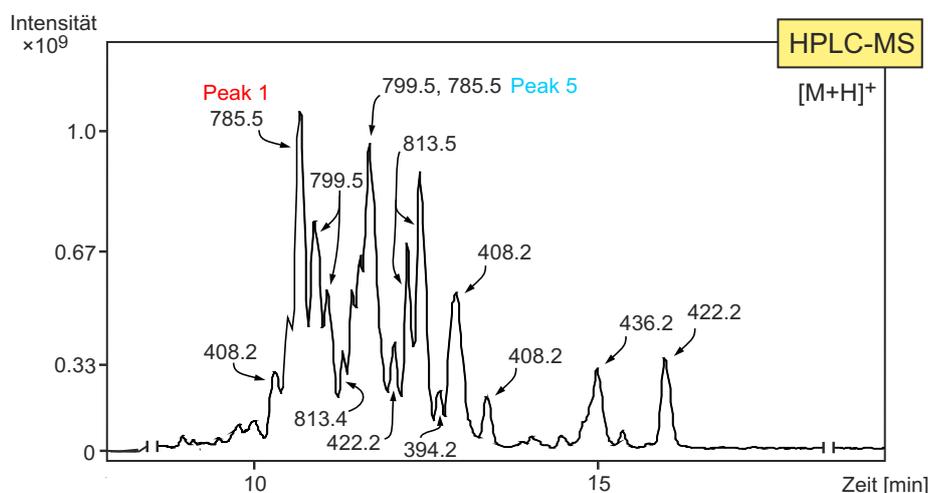


Abbildung 43. HPLC-MS-Chromatogramm des Blattextraktes von *Ancistrocladus spec. 032*.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Verbindung **33b** (Peak 5) waren, im Hinblick auf die COSY-Korrelationen und Kopplungsmuster, äquivalent zu denen von Mbandakamin A (**33a**), sodass die gleiche Konstitution für **33b** angenommen wurde. Die chemischen Verschiebungen der Protonen von **33b** (Abbildung 44) unterschieden sich nur wenig von denen der Protonen von Mbandakamin A (**33a**; Abbildung 37 und Abbildung 38).

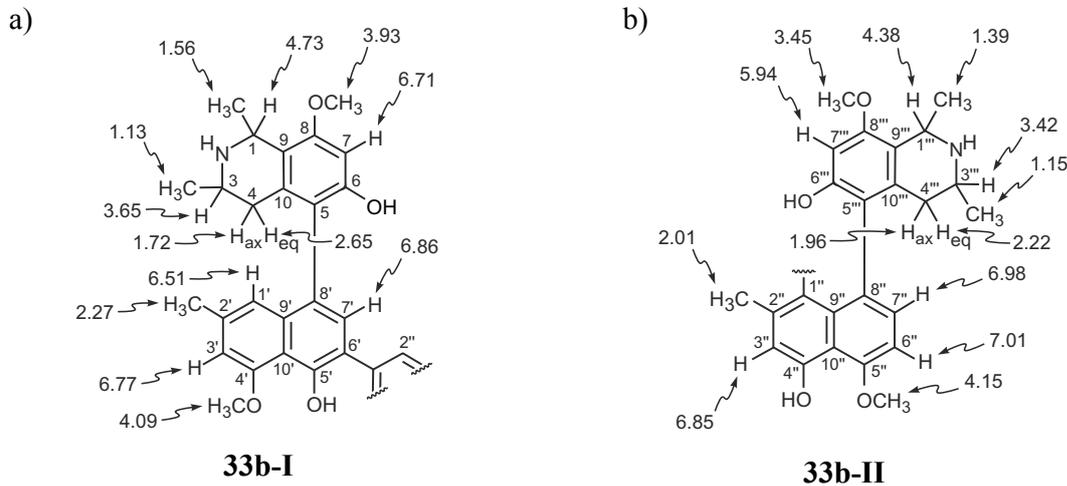


Abbildung 44. $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebungen (ppm) von Verbindung **33b**: a) 'nord-westliche' Naphthylisochinolin-Hälfte (**33b-I**); und b) 'süd-östliche' Naphthylisochinolin-Hälfte (**33b-II**).

Die HMBC- und ROESY-Wechselwirkungen bestätigten, dass **33b**, ebenso wie Mbandakamin A (**33a**), aus einer 8-*O*-Methylkorupensamin-A- und einer Korupensamin-E-Hälfte aufgebaut war, und dass die beiden Naphthylisochinolin-Hälften in 6'- und 1''-Position miteinander verknüpft waren (Abbildung 45).

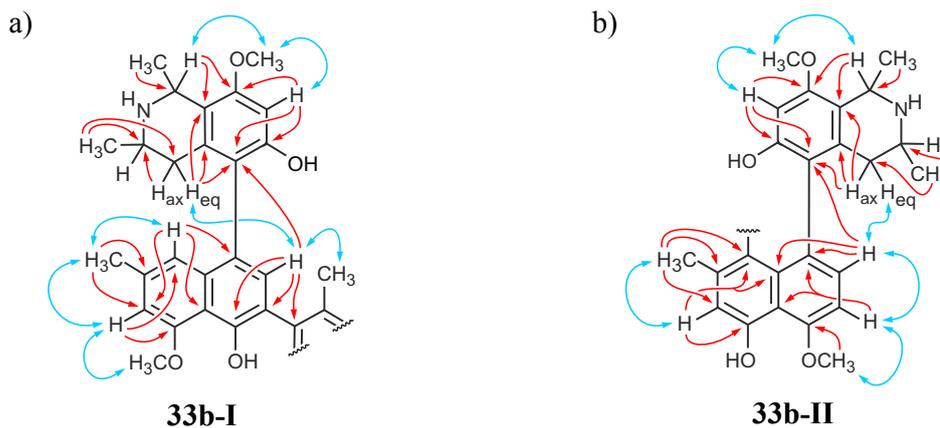


Abbildung 45. Für die Strukturaufklärung wichtige ROESY- (blaue Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile) von **33b**: a) 'nord-westliche' Naphthylisochinolin-Hälfte **33b-I**; und b) 'süd-östliche' Naphthylisochinolin-Hälfte **33b-II**.

Die Relativkonfigurationen für die Zentren in den Isochinolinteilen waren in beiden Hälften, **33b-I** und **33b-II**, *trans*, erkennbar an den ROESY-Interaktionen zwischen Me-1 und H-3 beziehungsweise Me-1''' und H-3''' (Abbildung 46a). Der oxidative Abbau lieferte ausschließlich (*R*)-3-Aminobuttersäure, folglich waren alle Stereozentren, ebenso wie bei Mbandakamin A (**33a**), *R*-konfiguriert.^[69]

Die ROESY-Sequenzen Me-1 – H-3 – H_{eq}-4 – H-7 und Me-1''' – H-3''' – H_{eq}-4''' – H-7''' in Kombination mit den Absolutkonfigurationen der Stereozentren (C-1, C-3, C-1''', C-3''' = *R*) definierten beide äußeren Biarylachsen als *P*-konfiguriert (Abbildung 46a).

Die Konfiguration der zentralen Achse von **33b** ließ sich jedoch anhand von spezifischen ROESY-Korrelationen, die zu denen in **33a** komplementär waren (Abbildung 46a, in blau), als *M* bestimmen, sodass **33b** 1*R*,3*R*,1'''*R*,3'''*R*,*P*,*M*,*P*-konfiguriert war (Abbildung 46b).

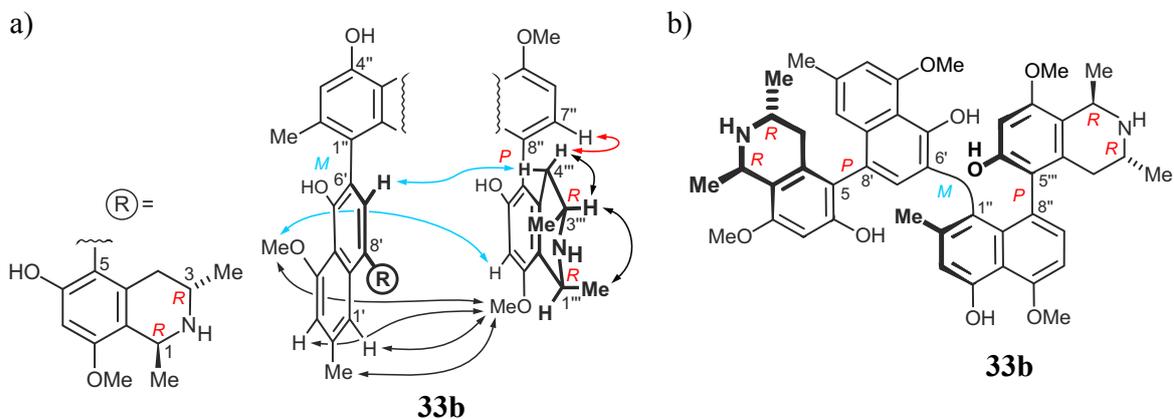


Abbildung 46. a) ROESY-Korrelationen in **33b**, welche die relative *trans*-Konfiguration der Zentren, sowie die Konfigurationen der Biarylachsen festlegen; und b) absolute Stereostruktur von **33b** (Mbandakamin B).

Somit war **33b** (Abbildung 46) – das Mbandakamin B genannt wurde – ein Atrop-Diastereomer von Mbandakamin A (**33a**; Abbildung 42), das sich nur in der Konfiguration der zentralen Achse unterschied. Obwohl dieses Stereoelement nur eines von sieben war, das die beiden Verbindungen unterschied, hatte es deutliche Auswirkungen auf die Eigenschaften.

Die Aktivität von Mbandakamin B (**33b**) gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (N474) war mit $0.123 \mu\text{g mL}^{-1}$ (IC_{50} , Diacetat) ^[96] um den Faktor drei schwächer als die von Mbandakamin A (**33a**; $\text{IC}_{50} = 0.039 \mu\text{g mL}^{-1}$). Die Zytotoxizität gegen L6-Zellen war jedoch zugleich um den Faktor sechs bis sieben herabgesetzt ($\text{IC}_{50} = 33.9 \mu\text{g mL}^{-1}$), sodass sich für Mbandakamin B (**33b**) sogar ein erhöhter Selektivitätsindex^[97] von 275 ergab. Da Mbandakamin B, **33b**, bei deutlich niedrigerer Zytotoxizität im Vergleich zu Mbandakamin A, **33a**, noch eine ausreichende Aktivität aufwies, wäre es nach WHO-Richtlinien (Aktivität $< 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$; Selektivitätsindex > 100)^[98] sogar ein noch aussichtsreicherer Kandidat für die Entwicklung eines Medikaments gegen *P. falciparum* als **33a**. Dies zeigt die Wichtigkeit und den Einfluss der Axialchiralität im Hinblick auf die Bioaktivität, sodass bei der Synthese von Mbandakamin-Verbindungen für Struktur-Aktivitäts-Studien bevorzugt Analoga mit einer *M*-Konfiguration an der zentralen Achse oder mit einem ähnlichen Binaphthalin-Kern in Betracht gezogen werden sollten.

Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen Mbandakamin A (**33a**) und Mbandakamin B (**33b**) waren die CD-Spektren. Bei monomeren Naphthylisochinolininen wird der CD-Effekt von der Konfiguration der Biarylachse dominiert, die Konfiguration der Stereozentren hat wenig bis keinen Einfluss auf das CD-Spektrum. Dabei besteht der Chromophor aus dem delokalisierten π -System zwischen dem Naphthalin und dem Phenol des Isochinolinteils. Die CD-Spektren der Shuangancistrotoctonine, dimere Naphthylisochinoline mit drei konsekutiven Biarylachsen, sind hauptsächlich von der Konfiguration der zentralen Biarylachse abhängig, die CD-Kurve von Shuangancistrotoctonin A ($1S,3S,1'''S,3'''S,P,M,P$) ist spiegelbildlich zu der von Shuangancistrotoctonin B ($1S,3S,1'''S,3'''S,P,P,P$).^[54] Dies ist verständlich, denn der Hauptchromophor bei diesen Molekülen ist der zentrale Binaphthalinteil und dominiert somit das CD-Spektrum.

Auch die CD-Spektren von Mbandakamin A (**33a**; $1R,3R,1'''R,3'''R,P,P,P$) und Mbandakamin B (**33b**; $1R,3R,1'''R,3'''R,P,M,P$) waren, wenn die Intensitäten angeglichen wurden, annähernd spiegelbildlich (Abbildung 47).

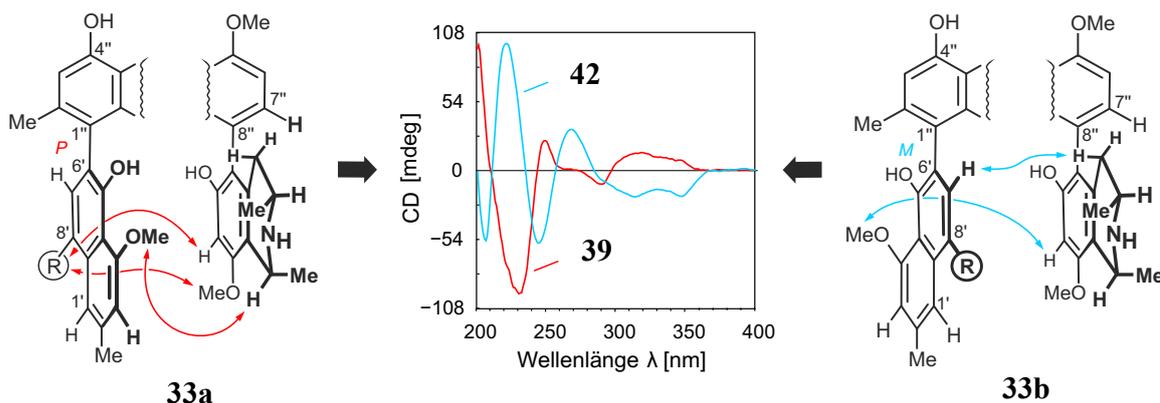


Abbildung 47. Konfigurationen der zentralen Achsen von Mbandakamin A (**33a**, links; R siehe Abbildung 42) und B (**33b**, rechts; R siehe Abbildung 46); sowie die daraus resultierenden CD-Spektren (mitte; Offline-Messungen); die Intensitäten der CD-Kurven wurden zum besseren Vergleich angepasst.

Die experimentellen Ergebnisse der CD-Spektroskopie sollten anhand von quantenchemischen Rechnungen bestätigt werden. Dies wurde von Félix Katele Zongwe, ebenfalls ein kongolesischer BEBUC-Exzellenz-Stipendiat,^[99] übernommen.

2.6.2.4 Berechnung der CD-Spektren von Mbandakamin A (**33a**) und B (**33b**)

Die in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse wurden von Félix Katele Zongwe (unter Betreuung von Dr. Torsten Bruhn) im Rahmen seiner Masterarbeit erzielt und sind dort im Detail aufgeführt.^[99,100]

Eine auf der Dichtefunktionaltheorie basierende Konformationsanalyse mit PM6 und anschließender Optimierung mit B97D/TZVP lieferte je sechs relevante Konformere ($\Delta E < 3 \text{ kcal mol}^{-1}$) für Mbandakamin A (**33a**) und Mbandakamin B (**33b**). Die Energien für die Boltzmann-Wichtung wurden durch SCS-MP2/de44-TZVP//B97D/TZVP-Rechnungen erhalten.^[99]

Mit der semi-empirischen Methode ZINDO wurden gute Übereinstimmungen der berechneten und der experimentellen CD-Spektren für beide Atropdiastereomere erreicht,^[99] wodurch die vorher bestimmten Absolutkonfigurationen für Mbandakamin A (**33a**) und B (**33b**) bestätigt wurden, zumindest in Bezug auf die zentralen Achsen (Abbildung 48).

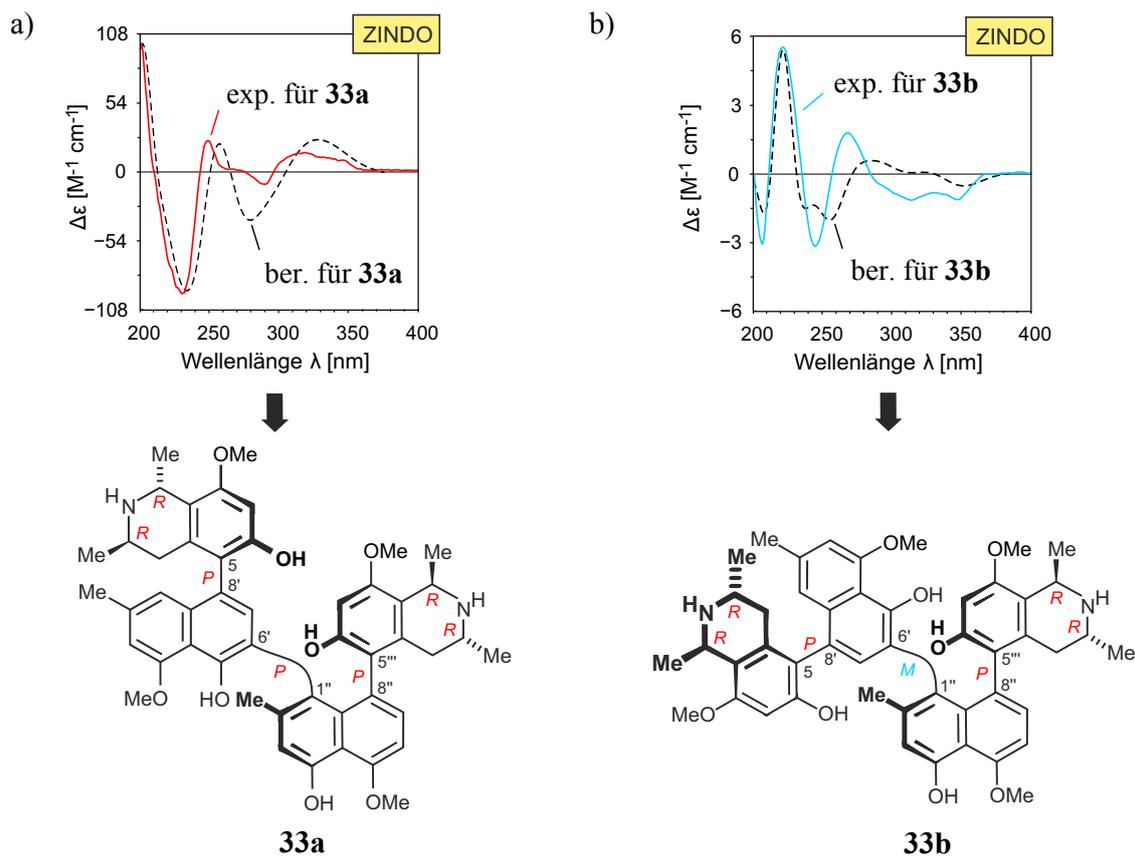


Abbildung 48. Zuordnung der Absolutkonfigurationen durch Vergleich der experimentellen und der berechneten CD-Spektren (ZINDO): a) Mbandakamin A (**33a**); und b) Mbandakamin B (**33b**).

Diese Ergebnisse sollten durch weiterführende TDDFT-Rechnungen validiert werden.

Die CD-Berechnungen mit CAM-B3LYP (6-31G*-Basissatz) lieferten für Mbandakamin A (**33a**) ein CD-Spektrum, das im Einklang mit dem experimentellen war (Abbildung 49a).^[99] Das berechnete CD-Spektrum für Mbandakamin B (**33b**) deckte sich zwar nur teilweise mit dem experimentellen (Abbildung 49b), ließ jedoch die Bestimmung der Konfiguration der zentralen Achse zu.^[99]

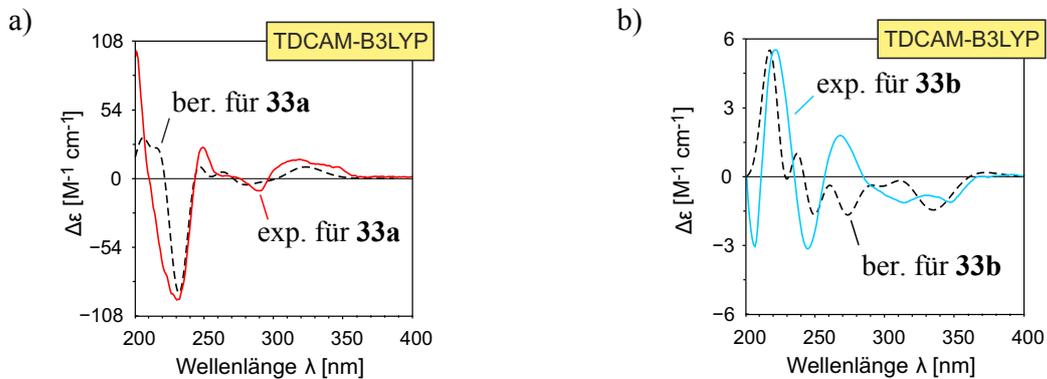


Abbildung 49. Experimentelle und berechnete (TDCAM-B3LYP) CD-Spektren von a) Mbandakamin A (**33a**); und b) Mbandakamin B (**33b**).

Der Ursprung dieser Diskrepanz der Spektren liegt vermutlich in Charge-Transfer-Effekten, die bei dieser Methode nicht berücksichtigt werden. Bei Mbandakamin A (**33a**) erfolgt jedoch eine zufällige Fehlerkompensation, die zu einer scheinbar besseren Kongruenz der beiden Kurven führt. Da jedoch auch die TDCAM-B3LYP-Methode die richtige Achsenkonfiguration zuweist, bestätigten die quantenchemischen Rechnungen die experimentell bestimmten Absolutkonfigurationen der Mbandakamine.

Die einzigartigen Eigenschaften von Mbandakamin A (**33a**) und B (**33b**), also im Speziellen die unsymmetrische Kupplung der Naphthylisochinolin-Hälften in der *peri*-Position, welche die höchste bekannte sterische Hinderung der zentralen Achse verursacht, die spiegelbildlichen CD-Spektren durch die entgegengesetzte Achsenkonfiguration in der Mitte der Moleküle, sowie die vielversprechenden Bioaktivitäten gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, machen die Moleküle zu faszinierenden Verbindungen, bei denen sich die Frage stellt, wie sie entstanden sein könnten.

Bei den Michellaminen, deren gerichtete Biosynthese durch ein aus der Pflanze isoliertes Kupplungsenzym nachgewiesen wurde,^[101] wurden auch alle monomeren Bausteine – zum Teil in hohen Mengen – in der Pflanze nachgewiesen.^[34,71] Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Rohextrakt von *Ancistrocladus* spec. 032 lediglich ein kleinerer Peak mit einer passenden Masse (*m/z* 394; Abbildung 35) detektiert. Für eine gerichtete, biosynthetische Entstehung spricht die Tatsache, dass Mbandakamin A (**33a**) und B (**33b**) nicht in einem 1:1-Verhältnis vorlagen, sondern (geschätzt anhand der isolierten Mengen) eher in einem Verhältnis von 9:1. Allerdings entstand bei der Synthese von Jozimin B (**36**; Abbildung 40) ausschließlich das *P*-Isomer,^[95] sodass dies auch nicht als Beweis für eine natürliche Entstehung herangezogen werden kann.

Da die Diskussion oder Evaluierung eines komplexen (bio-) chemischen Prozesses anhand nur zwei bekannter Vertreter einer neuartigen Verknüpfungsklasse der Naphthylisochinolin-Alkaloide nur hochspekulativ sein kann, soll an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen werden. Fakt ist, dass in *Ancistrocladus* spec. 032 noch zahlreiche weitere Dimere vorhanden sind (Abbildung 35), die zunächst isoliert und charakterisiert werden sollten. Sollten diese Verbindungen Stereoisomere oder Konstitutionsisomere in Bezug auf das *O*- oder *N*-Methylierungsmuster sein und nicht in Bezug auf die Achsen, so ist die Wahrscheinlichkeit einer natürlichen Entstehung höher.

Auch die anderen *Ancistrocladus*-Exemplare, die rund um die Stadt Mbandaka gesammelt wurden, sollten phytochemisch untersucht werden, da ein Großteil der in dieser Expedition untersuchten Pflanzen – darunter *Ancistrocladus* spec. 032 – genetische Besonderheiten aufweist.

2.6.3 Populationsgenetische Untersuchungen von *Ancistrocladus spec. 032*

Die populationsgenetischen Untersuchungen aller *Ancistrocladus*-Exemplare, die im Sommer 2008 nahe der Stadt Mbandaka gesammelt wurden, wurden von Florian Turini im Arbeitskreis von Prof. Günther Heubl (Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt und sind ausführlich in der Dissertation von F. Turini beschrieben.^[102] Hier soll nur die Einordnung der *Ancistrocladus*-Pflanze Nr. 032, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, diskutiert werden.

Phytochemisch ist die Pflanze *Ancistrocladus spec. 032* bereits eine Besonderheit.^[102,103] Für die *Ancistrocladus*-Arten, die spezifisch für das Kongobecken sind – *A. ileboënsis*, *A. letestui*, *A. likoko*, *A. ealaensis* und *A. congolensis* – wurden bis zur Anfertigung und den Ergebnissen dieser Arbeit nur monomere Naphthylisochinolin-Alkaloide beschrieben. Dabei waren aus *A. ileboënsis*, einer erst neulich von Bringmann & Heubl beschriebenen Art,^[48] je drei Monomere vom 5,1'- und vom 7,1'-Kupplungstyp bekannt.^[40] *A. letestui* enthielt hauptsächlich, als einzige Art aus dem Kongobecken, das Dioncophyllaceae-Typ-Alkaloid Dioncophyllin A.^[104] Aus *A. likoko* wurden ausschließlich 5,8'-gekuppelte Naphthylisochinoline isoliert,^[26,105] der häufigste Kupplungstyp bei *Ancistrocladus*-Arten aus dem Kongobecken. Auch die Metabolit-Spektren der eng verwandten Spezies *A. ealaensis* und *A. congolensis* werden vom 5,8'-Kupplungstyp dominiert. Dabei enthält *A. ealaensis* ausschließlich Naphthylisochinoline dieser Art,^[106] wohingegen in *A. congolensis* zusätzlich Vertreter gefunden wurden, die die Biarylachse in 5,1'- und 7,1'-Position aufweisen (Kapitel 2.3.1)^[40,73] sowie *N,C*-gekuppelte Alkaloide.^[27] Die Dimere vom Michellamin-Typ, die im Rahmen dieser Arbeit aus *A. congolensis* isoliert wurden (Kapitel 2.3.2), sind die ersten, die für diese Art beschrieben wurden.

Generell konnten bisher aus den afrikanischen *Ancistrocladus*-Arten Naphthylisochinolin-Dimere isoliert werden, die entweder aus 5,8'-gekuppelten Hälften (Michellamine; Kapitel 2.3.2) oder aus konstitutionell verschiedenen Hälften (Korundamin A, **35**; Abbildung 40)^[94] bestanden, sowie Dimere mit drei konsekutiven chiralen Achsen (Jozimin A₂, **8**; Abbildung 3),^[28] jedoch keine, die all diese Eigenschaften vereinen, wie die Mbandakamine (Kapitel 2.6.2).

Populationsgenetische Studien anhand von Mikrosatelliten sollten zeigen, ob sich die Besonderheiten des *Ancistrocladus*-Exemplars Nr. 032 auch auf genetischer Ebene manifestierten.

Von 82 *Ancistrocladus*-Exemplaren, die an zwölf verschiedenen Orten in der D. R. Kongo gesammelt worden waren, wurden von F. Turini genetische Fingerabdrücke anhand von Multilocus-Mikrosatelliten angefertigt.^[102,103] Die populationsgenetische Analyse wurde mit der Software "Structure 2.3.4"^[107] ausgeführt, und die wahrscheinlichste Anzahl vertretener genetischer Cluster wurde, durch Anwendung des Programms "Structure Harvester",^[108] nach der Evanno-Methode abgeleitet.^[109]

Dabei wurden in der Region Mbandaka *Ancistrocladus*-Exemplare identifiziert, die drei verschiedenen genetischen Clustern angehörten. Rund ein Fünftel ließ sich der *A. likoko*- / *A. letestui*-Gruppe zuordnen (Abbildung 50, in grün), die Arten *A. congolensis*, *A. ileboënsis* und *A. ealaensis* waren ebenfalls mit knapp 20% vertreten (Abbildung 50, in blau). Der Großteil der vorhandenen Genotypen, zu dem auch das Exemplar 032 gehörte, ließ sich jedoch keiner der bekannten Arten zuordnen (Abbildung 50, in orange). Eine detaillierte Analyse unter optimiertem Sampling lieferte ein ähnliches Ergebnis.^[102,103]

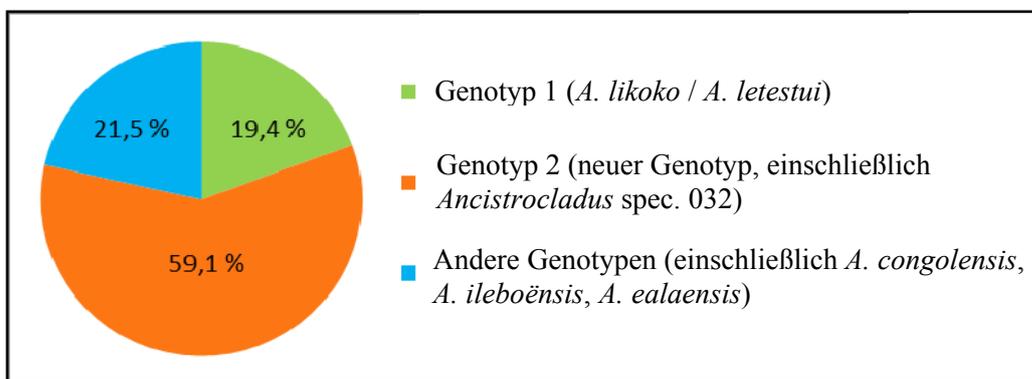


Abbildung 50. Häufigkeit der *Ancistrocladus*-Genotypen in der Region Mbandaka (D. R. Kongo), basierend auf einer populationsgenetischen Analyse von Mikrosatelliten. (Graphic erstellt von F.Turini)

Folglich liegt hier mit hoher Wahrscheinlichkeit eine neue *Ancistrocladus*-Art vor und die intensive phytochemische Untersuchung sowie die botanische Beschreibung der außergewöhnlichen Exemplare, die in dieser Region gesammelt wurden, scheinen lohnenswert und vielversprechend.

Die phytochemischen und populationsgenetischen Besonderheiten, die im Rahmen dieser Arbeit an nur einem *Ancistrocladus*-Exemplar beschrieben wurden, zeigen, dass das Kongobecken noch immer eine unerforschte Naturstoff- und Pflanzenquelle ist, die noch lange nicht ausgeschöpft scheint. Im Hinblick auf die aktuellen und zukünftigen Probleme der Resistenzbildung von Pathogenen sowie der weltweit fortschreitenden Minderung der Biodiversität, ist die Erforschung und Erhaltung dieser (und anderer) Regenwälder, die vielfältige Reservoirs von bioaktiven Substanzen bedeuten, essentiell für die Zukunft.

3 STRUKTURAUFKLÄRUNG VON POLYKETIDEN AUS DEM BAKTERIENSTAMM *STREPTOMYCES SPEC. AK 671*

Die in diesem Kapitel beschriebenen Strukturaufklärungen wurden in Zusammenarbeit mit G. Zhang^[110] durchgeführt. Die quantenchemischen Rechnungen wurden von Dr. T. Bruhn^[111] vorgenommen, die Online-CD-Messungen von F. Witterauf.^[112] Die Aufreinigung der Bakterienisolate erfolgte im Arbeitskreis von Prof. H.-P. Fiedler^[113] (Universität Tübingen), unter anderem durch P. Jetter.^[114,115] Die Bioaktivitätstests der Substanzen wurden im Arbeitskreis von Prof. J. Imhoff (GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung, Kiel) vorgenommen.^[116]

3.1 *Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe aus Streptomyces spec. AK 671*

Der Actinomyceten-Stamm AK 671 wurde von Prof. M. Goodfellow (Universität Newcastle, UK) aus Bodenproben des Kiefernwaldes 'Hamsterley Forest' (Durham, UK) isoliert und kultiviert. Das alkaliphile Bakterium gehört zur Gruppe der sogenannten OSMAC-Stämme (OSMAC = one strain many compounds)^[117,118] und kann, je nach Wahl der Fermentationsparameter, eine große Bandbreite an aromatischen Polyketiden synthetisieren. Bemerkenswerterweise produziert *Streptomyces spec. AK 671* nicht nur eine Vielzahl an Polyketid-Endprodukten, sondern akkumuliert auch Intermediate und sogenannte Shuntprodukte der Polyketid-Synthase. Diese Substanzen entstehen durch spontane Cyclisierung der Polyketidketten – wenn die Polyketid-Synthase die anfallenden Biosynthese-Vorstufen nicht vollständig oder zu langsam umsetzt – und waren *bis dato* nur aus Biosynthese-Block-Mutanten bekannt.^[119,120] In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. H.-P. Fiedler wurden in unserer Arbeitsgruppe durch A. Hamm, T. A. M. Gulder, I. Kajahn und M. Knauer^[121] die Strukturen vieler Polyketide charakterisiert.^[122-124]

Von den dabei aufgeklärten Verbindungen waren die Polyketid-Synthase-Shuntprodukte BSM1 (**37**),^[119] SEK4 (**38**) und SEK4b (**39**),^[125,126] Mutactin (**40**) und Dehydromutactin (**41**),^[127-129] EM18 (**42**),^[130] sowie die Verbindungen Bhimamycin A (**43**) und B (**44**),^[131] Juglomycin F (**45**),^[132] Utahmycin A (**46**),^[133] 3,8-Dihydroxy-1-methylanthrachinon-2-carbonsäure (DMAC, **47**)^[134] und Prächrysophanol (**48**)^[135] (Abbildung 51) bereits aus anderen *Streptomyces*-Stämmen isoliert worden.

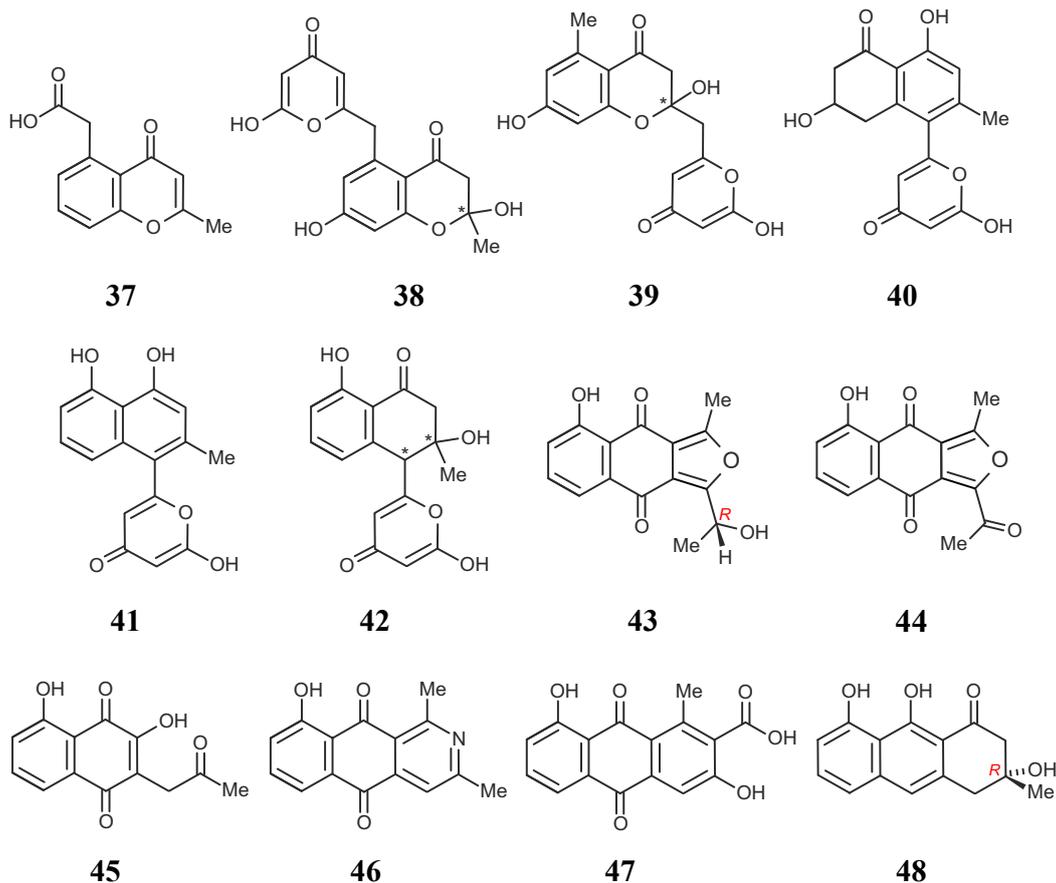


Abbildung 51. Aus *Streptomyces* spec. AK 671 isolierte, bekannte Verbindungen (37-48).

Es gelang allerdings auch die Aufklärung der damals unbekanntenen Naturstoffe Genoketid A1 (Harris-Franck-Keton, **49**) und Genoketid A2 (**50**), Prächrysophanol-8-*O*-Glucuronsäure (**51**) und Chrysophanol-8-*O*-Glucuronsäure (**52**).^[136] Durch Fütterungsexperimente mit [¹³C₂]-markierten Biosynthesestufen konnte gezeigt werden, dass das Octaketid **52** in *Streptomyces* spec. AK 671 über die Intermediate **49**, **50** und **51** gebildet wird (Abbildung 52).^[58]

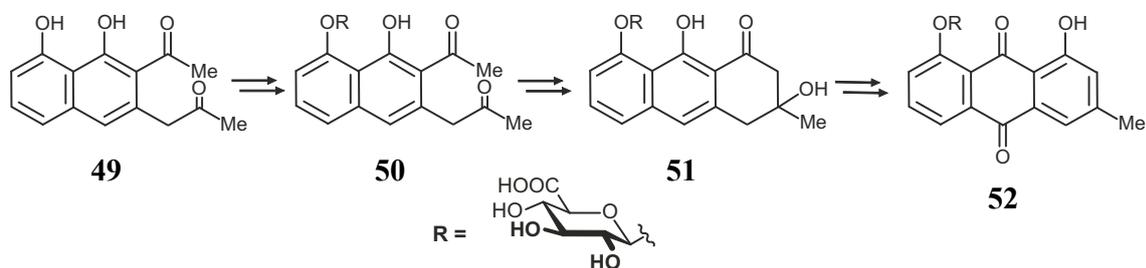


Abbildung 52. Entstehung des Chrysophanol-Glucuronids **52** aus dem Harris-Franck-Keton **49** in *Streptomyces* spec. AK 671.

3.2 Bestimmung der Absolutkonfiguration von EM18

Die Verbindung mit dem Arbeitsnamen 'AK-671-Rt.4.7' ('Rt.' = Retentionszeit in Minuten) wurde von M. Knauer als EM18 (**42**) identifiziert.^[124] Bei der Strukturaufklärung weiterer Metabolite aus dem Bakterienstamm im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Auswertung und Vergleich der NMR-Spektren die gleiche Konstitution für die Substanz mit dem Arbeitsnamen 'AK-671-Rt.6.4' ermittelt. EM18 (**42**) weist zwei Stereozentren – an C-6 und an C-15 – auf, deren Konfigurationen in der Literatur bisher nicht bestimmt worden waren.^[119,129,130,137] Da die Substanzen auf achiraler Phase signifikant getrennt voneinander eluierten ($\Delta t_R = 1.7$ min), konnte davon ausgegangen werden, dass 'AK-671-Rt.4.7' (**42a**) und 'AK-671-Rt.6.4' (**42b**) zwei Diastereomere von EM18 sein mussten. Es galt zu bestimmen, welche zwei der vier möglichen Stereoisomere – $6R,15S$ / $6S,15R$ (*unlike*-Isomer) oder $6S,15S$ / $6R,15R$ (*like*-Isomer)^[62] – hier vorlagen (Abbildung 53).

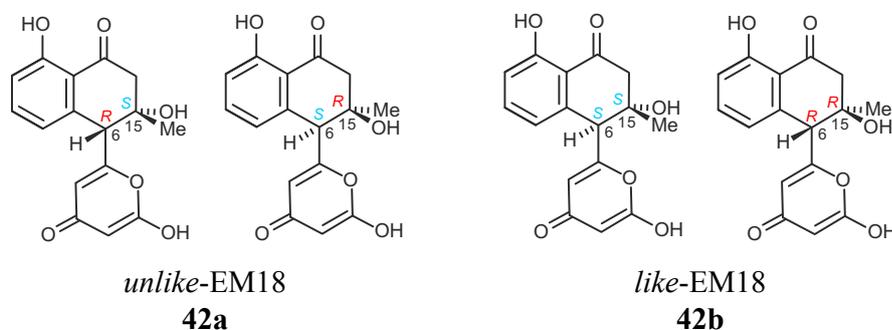


Abbildung 53. Die vier theoretisch möglichen Stereoisomere von EM18 (**42**).

42a und **42b** zeigten nahezu identische NMR-Spektren, einzig die chemischen Verschiebungen der Protonen an C-6 und C-14 waren leicht verschieden (**42a**: $\delta_{H6} = 4.17$ ppm, $\delta_{Ha14} = 2.75$ ppm, $\delta_{Hb14} = 3.27$ ppm; und **42b**: $\delta_{H6} = 4.23$ ppm, $\delta_{Ha14} = 3.22$ ppm, $\delta_{Hb14} = 2.87$ ppm). Dieser Unterschied wurde darauf zurückgeführt, dass die relative Orientierung (axial/äquatorial) des sterisch anspruchsvollen Pyranon-Substituenten an C-6 in **42a** und **42b** über das zeitliche Mittel verschieden war. Zudem musste die Orientierung des Pyranons gleichzeitig die Orientierung des Protons an C-6 diktieren, welches in der axialen Konformation einen NOE zu dem axialen Proton an C-14 zeigen sollte. Standard-NOE-Experimente (Mischzeit = 1 s) lieferten jedoch für **42a** und **42b** die gleichen Ergebnisse, deshalb wurden NOE-Experimente bei kürzeren Mischzeiten (50, 100, 200 und 400 ms) durchgeführt. Diese transienten NOE-Verstärkungen lassen die Abschätzung von internukleären Distanzen zu^[138] und sollten somit eine Unterscheidung zwischen *unlike*-EM18 (**42a**) und *like*-EM18 ermöglichen (**42b**). Substanz **42a** zeigte eine NOE-Korrelation zwischen H-6 und H_a-14 bei allen Mischzeiten, während diese Korrelation bei **42b** nur bei den längeren Mischzeiten (200 ms und 400 ms) zu beobachten war.

Diese Interaktion ist nur möglich, wenn die beiden Protonen (Abbildung 54, in gelb) beide axial stehen und der Pyranon-Substituent entsprechend äquatorial orientiert ist. Offensichtlich ist diese Anordnung in **42a** energetisch günstiger und somit bei allen Mischzeiten beobachtbar, wohingegen sie bei **42b** eine ungünstige Konformation bedeutet, seltener im zeitlichen Mittel vorhanden ist und daher nur bei den längeren Mischzeiten zu beobachten ist (Abbildung 54).

Eine Konformationsanalyse der theoretisch möglichen Diastereomere von EM18 auf der Basis von quantenchemischen Rechnungen (SCS-MP2/de44-TZVP//B97D/SVP und COSMO [Aceton]) bestätigte diese Beobachtungen. In der *unlike*-Konfiguration **42a** ist der Pyranon-Substituent zu 21% äquatorial orientiert, in der *like*-Konfiguration **42b** nur zu 6% (Abbildung 54). Folglich musste **42a** *unlike*- (*R,S* oder *S,R*) und **42b** *like*- (*R,R* oder *S,S*) konfiguriert sein.

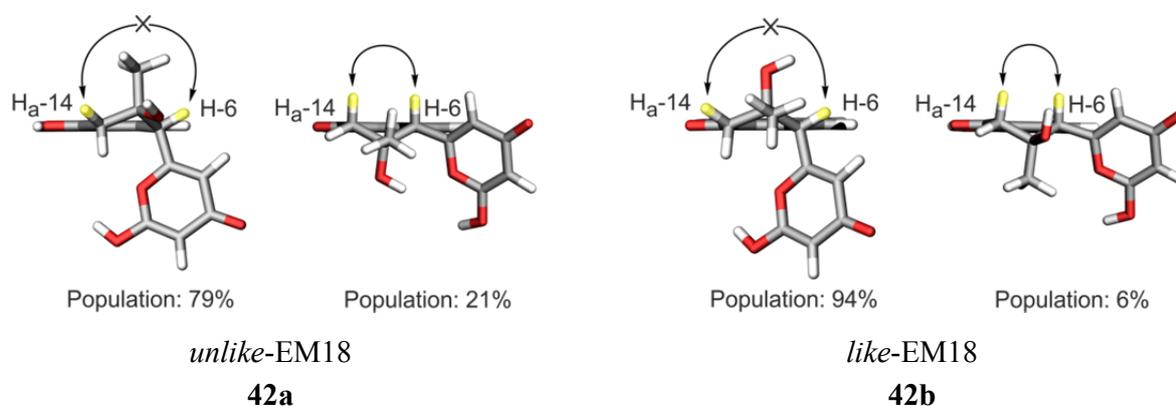


Abbildung 54. NOESY-Korrelationen zwischen H-6 und H_a-14 in den Diastereomeren von EM18. Die gezeigten Enantiomere (6*S*,15*R* für *unlike* und 6*S*,15*S* für *like*) wurden willkürlich zur Anschauung gewählt. Die Konformationsanalysen wurden mit SCS-MP2/de44-TZVP//B97D/SVP- und COSMO-Rechnungen durchgeführt.

Zur Aufklärung der Absolutkonfiguration wurden offline-CD-Spektren von **42a** und **42b** aufgenommen. Da keine der Verbindungen einen CD-Effekt zeigte, lag die Vermutung nahe, dass in beiden Fällen ein racemisches Gemisch vorlag. Eine erfolgreiche Auftrennung der Enantiomere an chiraler Phase wurde mit einer Lux-Cellulose-1-Säule (*Phenomenex*) erreicht. Somit konnten die CD-Spektren der einzelnen Peaks online im stopped-flow-Modus gemessen werden (Abbildung 55 und Abbildung 56).

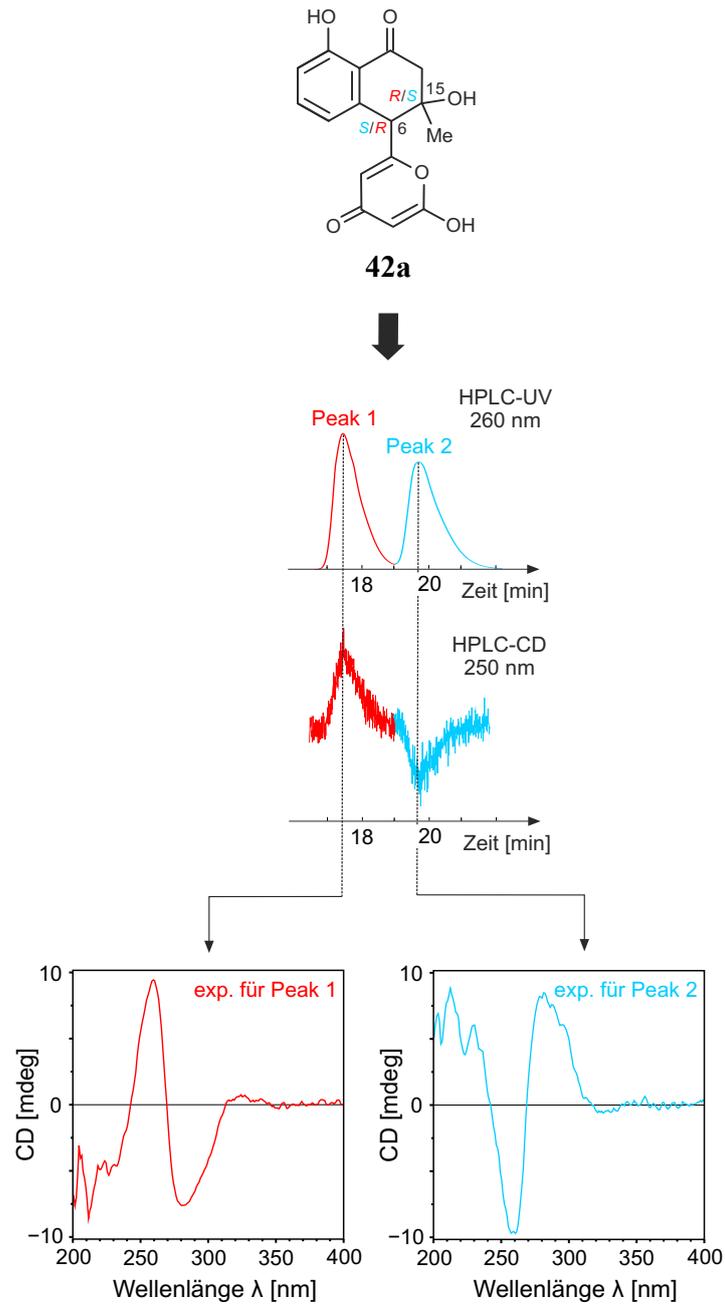


Abbildung 55. Online-CD-Messungen von **42a** (*unlike*-EM18).

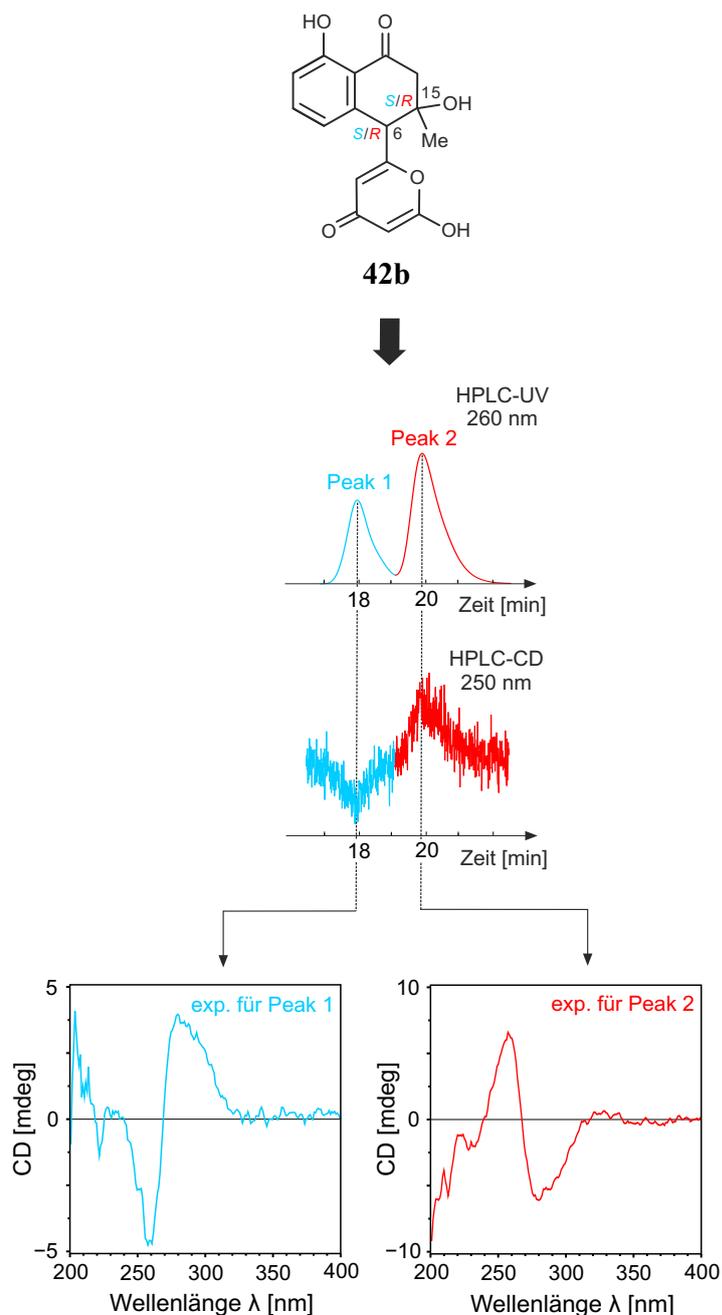


Abbildung 56. Online-CD-Messungen von **42b** (*like-EM18*).

Die CD-Spektren von **42a** und **42b** zeigten alle ein Couplet bei 270 nm, welches durch die Interaktionen des Phenol- und des Pyranon-Chromophors hervorgerufen wird. Essentiell ist dabei die Konfiguration am Stereozentrum zwischen den beiden Chromophoren, also an C-6 (Abbildung 57). Um nun die CD-Spektren dem jeweiligen Enantiomer zuordnen zu können, wurde die Exciton-Chirality-Methode angewandt. Diese beruht auf der Wechselwirkung von Chromophoren, genauer gesagt auf der Orientierung von Übergangsdipolmomenten zueinander.^[139-141]

Im Fall einer $6S$ -Konfiguration ergibt sich hiernach ein positives Couplet im CD-Spektrum (Abbildung 57), bei einer $6R$ -Konfiguration ist ein negatives Couplet zu erwarten.

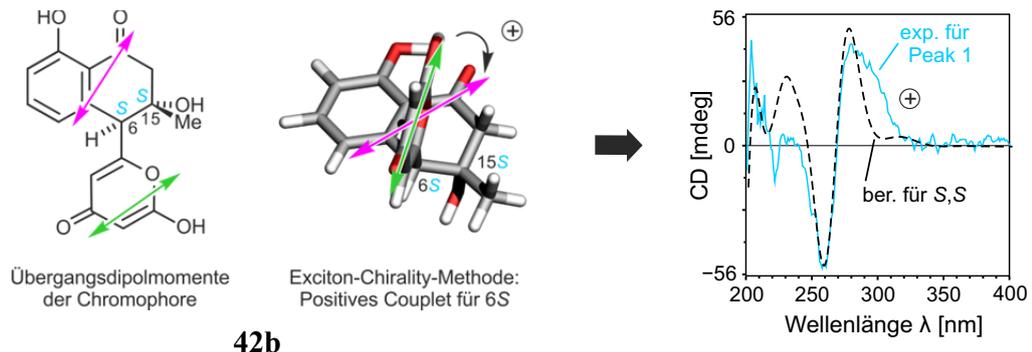


Abbildung 57. Anwendung der Exciton-Chirality-Methode zur Bestimmung der Absolutkonfiguration von EM18; für die Berechnungen wurde das S,S -Enantiomer (**42b**, Peak 1) willkürlich gewählt.

Demzufolge konnte Peak 1 von **42a** die Absolutkonfiguration $6R,15S$ -EM18 und Peak 2 von **42a** $6S,15R$ -EM18 zugeordnet werden (Abbildung 58). Peak 1 von **42b** mit dem positiven Cotton-Effekt repräsentierte $6S,15S$ -EM18 (Abbildung 57) und Peak 2, mit dem entgegengesetzten CD-Effekt, $6R,15R$ -EM18 (Abbildung 58).^[142]

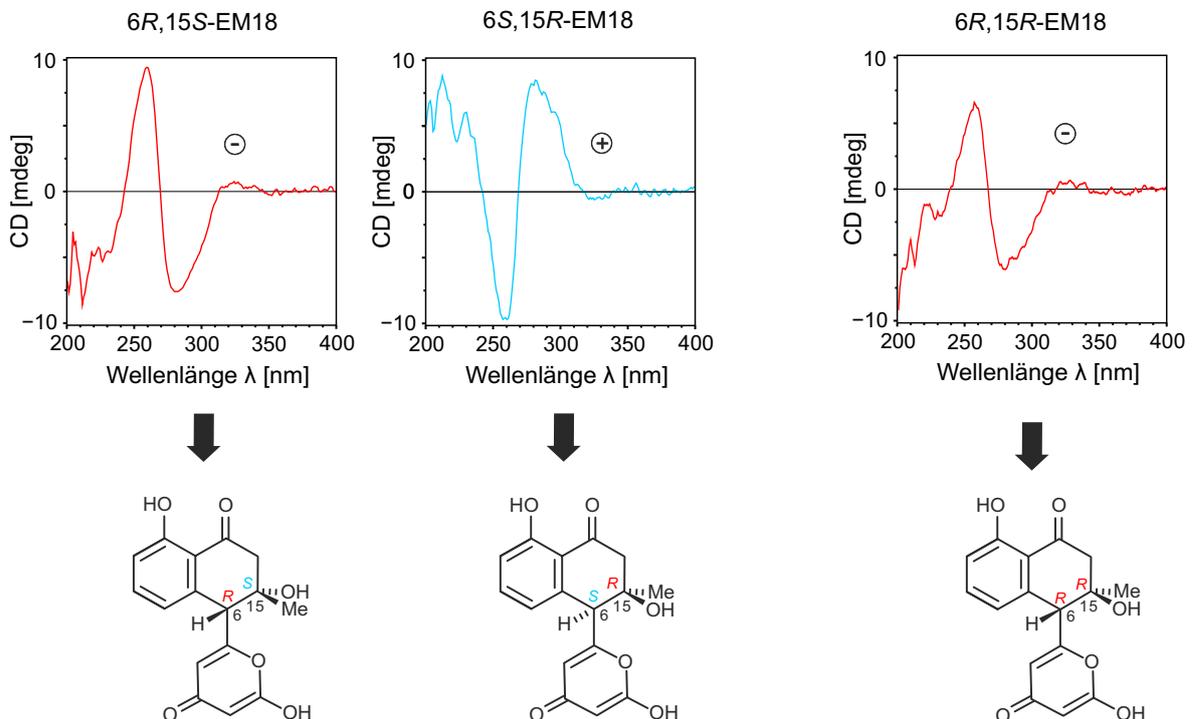


Abbildung 58. Zuordnung der Diastereomere von EM18 anhand der online-CD-Spektren und der Exciton-Chirality-Methode.

3.3 Identifizierung von Bhimamycin F (53)

Für die Verbindung mit dem Arbeitsnamen 'AK-671-Rt.15.5' (**53**) wurde aus der exakten Masse von 390.09821 Da ($[M-H]^-$) die Elementarzusammensetzung $C_{22}H_{17}NO_6$ errechnet. Im 1H -NMR-Spektrum waren die Signale von sieben aromatischen Protonen sichtbar, von denen drei Teil eines ABC-Spin-Systems (7.28, 7.74 und 7.78 ppm) waren. Die restlichen vier Protonen gehörten einem konsekutiven aromatischen System an und erschienen als überlagerte Multipletts (7.70–7.72 ppm und 8.31–8.33 ppm). Des Weiteren wurden zwei Methylgruppen (1.40 ppm und 2.43 ppm), ein Proton im Bereich eines R_2-CH-O -Fragments (4.51 ppm) sowie eine chelatisierte OH-Gruppe detektiert (Abbildung 59a). Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte die Verschiebungen von 15 sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen, zwei Keto-Funktionen (182.0 ppm und 188.0 ppm), einer Carbonsäure (166.7 ppm), einem gesättigten, Heteroatom-gebundenen Kohlenstoff (63.8 ppm), sowie von zwei Methylgruppen (12.3 ppm und 23.8 ppm). Anhand des DEPT-135-Spektrums ließen sich die Signale bei 117.6, 117.9, 118.4, 133.5, 136.6/136.7, 139.2, 140.0, 148.1 und 163.6/163.9 ppm quartären Kohlenstoffen zuordnen, während die restlichen sieben Signale CH-Funktionen [119.8, 124.6/124.7, 129.2/129.5 (2C), 132.1/132.3 (2C) und 136.6/136.7 ppm] repräsentierten. Mittels NOESY- und HMBC-Experimenten wurde eine Bhimamycin-A-ähnliche Struktur ermittelt (Abbildung 59b).

Anders als bei Bhimamycin A (**43**; Abbildung 51) fehlte **53** jedoch ein Sauerstoffatom, stattdessen wies die Substanz ein Stickstoffatom und zusätzlich einen aromatischen Substituenten mit einer Carbonsäure-Funktion auf. **53** wurde als Bhimamycin F identifiziert, ein Addukt aus Bhimamycin A (**43**) und Anthranilsäure, welches als Nebenprodukt bei der Synthese von Bhimamycin D charakterisiert wurde.^[127] Durch die Carbonsäure in *ortho*-Position zur N,C -Achse wird die Rotation der Achse eingeschränkt und Bhimamycin F (**53**) liegt als Atrop-Diastereomeren-Gemisch vor, was die Dopplung der 1H - und ^{13}C -Signale erklärt. **53** wurde nun zum ersten Mal aus einem lebenden Organismus isoliert.^[142]

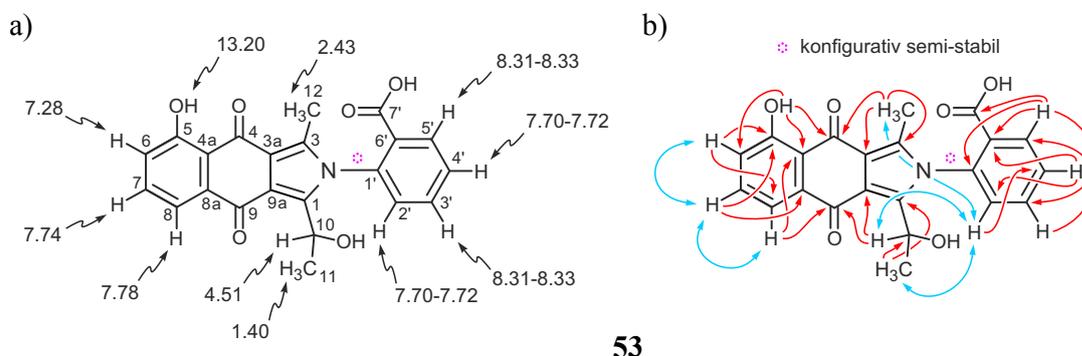


Abbildung 59. Ausgewählte NMR-Daten von Bhimamycin F (**53**): a) 1H -NMR-Verschiebungen (ppm); sowie b) für die Strukturaufklärung wichtige NOESY- (blaue Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile).

3.4 Strukturaufklärung von Bhimamycin H (54)

Die gemessene exakte Masse von 390.09596 Da ($[M+H]^+$) ergab für Verbindung **54** ('AK-671-Rt.15.7') die Elementarzusammensetzung $C_{22}H_{15}NO_6$. Das Protonenspektrum zeigte Signale von drei konsekutiven aromatischen Protonen (7.40, 7.64 und 7.95 ppm), einem A_2B_2 -Spin-System (7.66 ppm und 8.55 ppm, je zwei Protonen) und zwei Methylgruppen (2.48 ppm und 2.92 ppm, Abbildung 60a). Das ^{13}C -Spektrum erlaubte, in Kombination mit den Daten des DEPT-135-Spektrums, die Zuordnung der Signale zu fünf sp^2 -CH-Funktionen (119.7, 124.4, 128.2, 131.7 und 136.5 ppm), einer sp^2 -C-OH-Gruppe (163.4 ppm), acht aromatischen quartären Kohlenstoffatomen (117.9, 118.0, 122.2, 134.0, 134.9, 136.5, 140.6 und 141.3 ppm), drei Keto-Funktionen (180.1, 187.7 und 194.0 ppm), einer Carbonsäure (168.4 ppm) und zwei Methylgruppen (12.4 ppm und 31.3 ppm). Die verstärkten Intensitäten der sp^2 -CH-Signale bei 128.2 ppm und 131.7 ppm ließen auf vier Kohlenstoffatome – je zwei in chemisch identischer Umgebung – schließen, in Übereinstimmung mit dem A_2B_2 -Spin-System des Protonenspektrums.

Die Ähnlichkeit der NMR-Daten im Vergleich zu den vorher beschriebenen von Bhimamycin F (**53**) sprach bei **54** ebenfalls für eine Substanz mit einem Bhimamycin-Grundgerüst und einer zusätzlichen aromatischen Einheit. **54** musste jedoch ein Derivat von Bhimamycin B (**44**, Abbildung 51) sein, da das Proton und die Hydroxy-Gruppe an C-10 fehlten, dafür aber eine Keto-Funktion vorhanden war. Da sich die errechneten Elementarzusammensetzungen von **53** und **54** um genau diese zwei fehlenden Wasserstoffatome unterschieden, musste die zusätzliche aromatische Einheit ebenfalls Anthranilsäure oder ein Analogon sein. Aufgrund des reduzierten Signalsatzes im NMR, welcher für eine symmetrische Struktur sprach, wurde Anthranilsäure ausgeschlossen. Die komplette Struktur von **54** wurde mithilfe von NOESY- und HMBC-Spektren aufgeklärt (Abbildung 60b), es handelte sich um ein bisher unbekanntes Addukt aus Bhimamycin B (**44**) und *para*-Aminobenzoesäure. Die Verbindung **54** wurde aufgrund der Ähnlichkeit zu den anderen Bhimamycinen Bhimamycin H genannt.^[142]

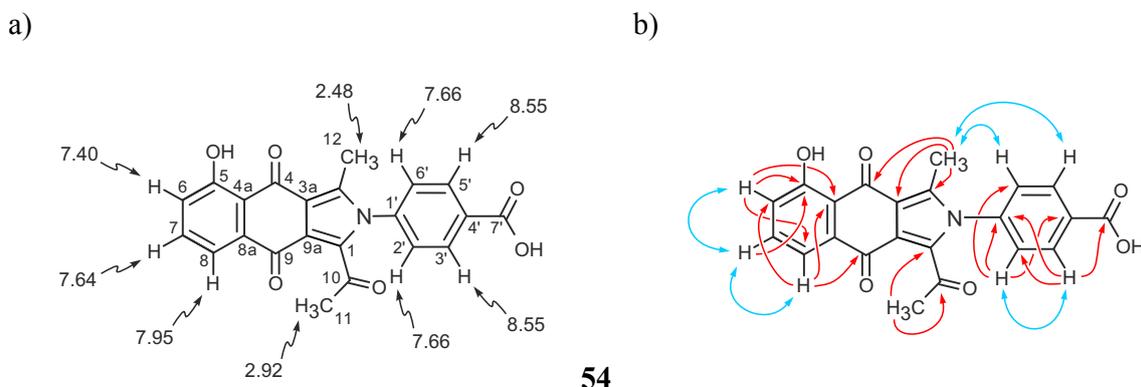


Abbildung 60: Ausgewählte NMR-Daten von Bhimamycin H (**54**): a) 1H -NMR-Verschiebungen (ppm); sowie b) für die Strukturaufklärung wichtige NOESY- (blaue Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile).

3.5 Strukturaufklärung von Bhimamycin I (55)

Mittels hochauflösender Masse wurde für 'AK-671-Rt.13.6' (**55**) die Elementarzusammensetzung $C_{17}H_{15}NNaO_4$ ($[M+Na]^+ = 320.08911$ Da) ermittelt. Im 1H -NMR-Spektrum waren, wie bei Bhimamycin F (**53**), die Signale von drei benachbarten aromatischen Protonen [7.17 ppm und 7.63–7.65 (2H) ppm], zwei Methylgruppen (1.66 ppm und 2.65 ppm) und einem Proton im Bereich eines R_2 -CH-O-Fragments (5.25 ppm) sichtbar (Abbildung 61a). Zusätzlich wurden noch drei weitere, Tieffeldverschobene Signale im Alkyl-Bereich detektiert [3.99–4.02, 4.04–4.06 (2H) und 4.24–4.27 ppm], die jeweils Aufspaltungen höherer Ordnung zeigten. Mithilfe des ^{13}C - und DEPT-135-Spektrums konnten die vorhandenen Signale zwei Keto-Gruppen (179.0 ppm und 188.2 ppm), sieben quartären Kohlenstoffatomen (115.9, 117.3, 118.5, 137.2, 137.7, 138.6 und 163.3 ppm), drei aromatischen CH-Funktionen (118.9, 123.4 und 136.2 ppm), zwei Methylen-Einheiten (43.3 und 60.3 ppm), einem Alkoxy-Kohlenstoff (R_2 -CH-O-, 70.4 ppm) und zwei Methylgruppen (10.7 ppm und 18.9 ppm) zugeordnet werden.

Auch bei Verbindung **55** schien ein Bhimamycin-Derivat vorzuliegen, diesmal jedoch mit einer 'einfachen' Ethylen- statt einer aromatischen Einheit. Nach Vergleich mit der Literatur wurde Bhimamycin C (**56**, Schema 2) als nahe, verwandte Struktur identifiziert, das zuvor ebenfalls aus einem *Streptomyces*-Stamm isoliert worden war.^[131] Im Gegensatz zu Bhimamycin C (**56**) wies Verbindung **55** jedoch zwei diastereotopie Protonen an der 2'-Methylen-Einheit auf, sowie eine Masse, die um 18 Da (= H_2O) niedriger war, so dass eine cyclische, kondensierte Form von **56** vermutet wurde. Diese Annahme wurde eindeutig durch NOESY- und HMBC-Experimente bewiesen, die essentielle Korrelationen zwischen H-10, C-10 und CH_3 -11 und den Protonen H_a -2' und H_b -2' an C-2 lieferten (Abbildung 61). Die neue Substanz **55** erhielt aufgrund der Ähnlichkeit zu den anderen Bhimamycinen den Namen Bhimamycin I.^[142]

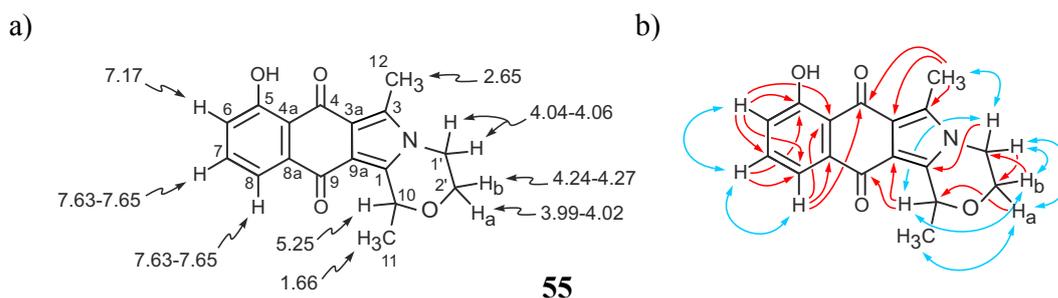


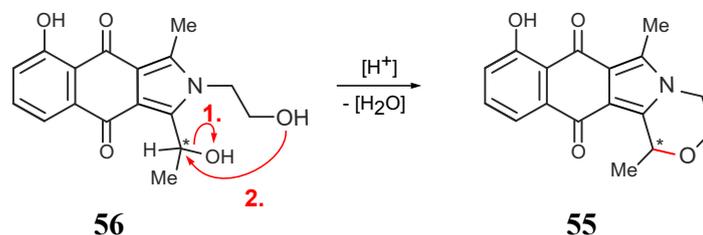
Abbildung 61. Ausgewählte NMR-Daten von Bhimamycin I (**55**): a) 1H -NMR-Verschiebungen (ppm); sowie b) für die Strukturaufklärung wichtige NOESY- (blaue Doppelpfeile) und HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile).

Bhimamycin I (**55**) zeigte keinen Drehwert und keinen offline-CD-Effekt, weshalb davon ausgegangen werden musste, dass es sich um ein racemisches Gemisch handelte. Trotz zahlreicher Versuche ließ sich **55** jedoch nicht an chiraler Phase trennen.

3.6 Bhimamycin F (53), H (54) und I (55) – echte Naturstoffe oder nicht?

Die spontane Entstehung von Bhimamycin F (**53**) aus Bhimamycin A (**43**) und Anthranilsäure sowie von Bhimamycin H (**54**) aus Bhimamycin B (**44**) und *para*-Aminobenzoesäure scheint unwahrscheinlich. Bhimamycin A (**43**) und B (**44**) wurden zwar in großer Menge von dem *Streptomyces*-Stamm produziert und waren somit in ausreichender Konzentration in der Flüssigkultur vorhanden, die entsprechenden Reaktanden – Anthranilsäure und *para*-Aminobenzoesäure – konnten jedoch nicht per HPLC-UV im Medium nachgewiesen werden.^[142] Zudem hätten auch die entsprechenden Kreuzkupplungsprodukte, Bhimamycin A (**43**) und *para*-Aminobenzoesäure sowie Bhimamycin B (**44**) und Anthranilsäure, in gleichen Mengen isoliert werden müssen, wenn die Entstehung von **53** und **54** ein spontaner chemischer Vorgang gewesen wäre. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Bhimamycine F (**53**) und H (**54**) echte Naturstoffe sind.

Ob Bhimamycin I (**55**) jedoch tatsächlich ein echter neuer Naturstoff ist, kann nicht bewiesen werden. Wie in Schema 2 dargestellt, wird Bhimamycin C (**56**) schon bei leicht sauren Bedingungen zu Bhimamycin I (**55**) abreagieren. Die S_N1-artige Reaktion wird dabei durch das an C-10 entstehende, Aromaten-stabilisierte Kation, die hohe Konzentration beider Reaktionspartner sowie die Senkung der Entropie durch Ausbildung des Ringsystems begünstigt. Hat die Reaktion einmal stattgefunden, so lässt sich der cyclische Ether nur unter extrem harschen Bedingungen wieder öffnen.^[143] Die Reaktion von **56** zu **55** kann schon im wässrigen Milieu – also bereits bei der Kultivierung im Fermenter – erfolgen, definitiv aber wird sie während der im Säuren durchgeführten Aufarbeitung^[142] stattfinden. Sollte also Bhimamycin C (**56**) von *Streptomyces* spec. AK 671 produziert worden sein, so hätte es vermutlich nie als solches detektiert oder isoliert werden können. Auch die Tatsache, dass Bhimamycin I (**55**) als Racemat isoliert wurde, spricht für eine spontane Entstehung der Verbindung.



Schema 2. Möglicher Reaktionsmechanismus von Bhimamycin C (**56**) zu Bhimamycin I (**55**).

3.7 Bioaktivitäten von *Bhimamycin F (53)*, *H (54)* und *I (55)*

Alle aus *Streptomyces spec.* AK 671 isolierten Substanzen, die bekannten sowie die neuen, gehören zur Klasse der Polyketide. Diese Naturstoffe sind pharmakologisch interessant, da sie oft eine antibiotische Wirkung besitzen, wie zum Beispiel das ebenfalls aus einem Streptomyeten isolierte Antibiotikum Tetracyclin,^[144] welches seit vielen Jahren eine breite pharmazeutische Anwendung findet. Wie bei den meisten Antibiotika, die schon seit längerem auf dem Markt sind und häufig eingesetzt werden, besteht jedoch die Gefahr der Resistenzbildung bei den Erregerstämmen. Werden keine neuen wirksamen Substanzen gefunden, so entstehen multiresistente Bakterien, gegen die keines der bekannten Medikamente mehr hilft. Deswegen ist es notwendig und sinnvoll, Verbindungen dieser (und anderer) Substanzklassen auf ihre biologischen Aktivitäten zu untersuchen und gegebenenfalls synthetisch zu verbessern.

Bhimamycin H (**54**) zeigte eine schwache Aktivität ($IC_{50} = 14.6 \mu\text{M}$) gegenüber dem Human-pathogenen Bakterium *Staphylokokkus epidermis* sowie eine Wachstums-Inhibierung ($IC_{50} = 13.5 \mu\text{M}$) des Methicillin-resistenten *Staphylokokkus aureus* (MRSA),^[142] eines Bakterienstamms, der heutzutage große Probleme durch Befall von geschwächten Patienten in Kliniken weltweit verursacht.^[145] Außerdem waren Bhimamycin H (**54**; $IC_{50} = 7.65 \mu\text{M}$) und Bhimamycin I (**55**; $IC_{50} = 6.05 \mu\text{M}$) aktiv gegen das Enzym Phosphodiesterase 4 (PDE4),^[142] welches für die Metabolisierung von cyclischem AMP (Adenosin-Monophosphat) in den Atemwegen und der glatten Lungenmuskulatur verantwortlich ist.^[146]

Die Untersuchung von weiteren Derivaten der Bhimamycine könnte daher für die Entwicklung von neuen Arzneistoffen gegen MRSA-Stämme sowie gegen Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)^[147] von Interesse sein.

4 METABOLITPROFILE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*: DETEKTION VON GLUCOSINOLATEN IM PHLOEMSAFT MITTELS CZE-ESI-OTOF-MS

Arabidopsis thaliana ist eine kleine, 20–25 cm hohe Pflanze, die in den gemäßigten Klimazonen von Europa, Asien und Nordafrika verbreitet ist. Sie ist durch eine basale Blattrosette, einen runden Stängel und weiße vierzählige Blüten charakterisiert (Abbildung 62a). Der deutsche Name 'Ackerschmalwand' deutet den bevorzugten Standort dieser der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae) angehörigen Pflanze an.^[148] Obwohl sie somit lokal direkt neben ihren kultivierten Familienmitgliedern wie zum Beispiel Raps, Brokkoli und Rettich gefunden werden kann, hat sie selbst keinerlei Bedeutung in der Landwirtschaft. In der Wissenschaft nimmt sie jedoch einen hohen Stellenwert ein, da sie nur fünf Chromosomenpaare besitzt, deren genetische Informationen seit dem Jahr 2000 entschlüsselt sind, und trotzdem die Physiologie höherer Pflanzen zeigt.^[149] Somit ist die genetische Manipulation vergleichbar einfach, und kann (zusätzlich) im äußeren Erscheinungsbild visualisiert werden. Zudem besitzt sie einen Generationscyclus von nur sechs Wochen und lässt sich in Europa problemlos in Gewächshäusern und auf kleinstem Raum handhaben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur der Wildtyp, *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0), verwendet.

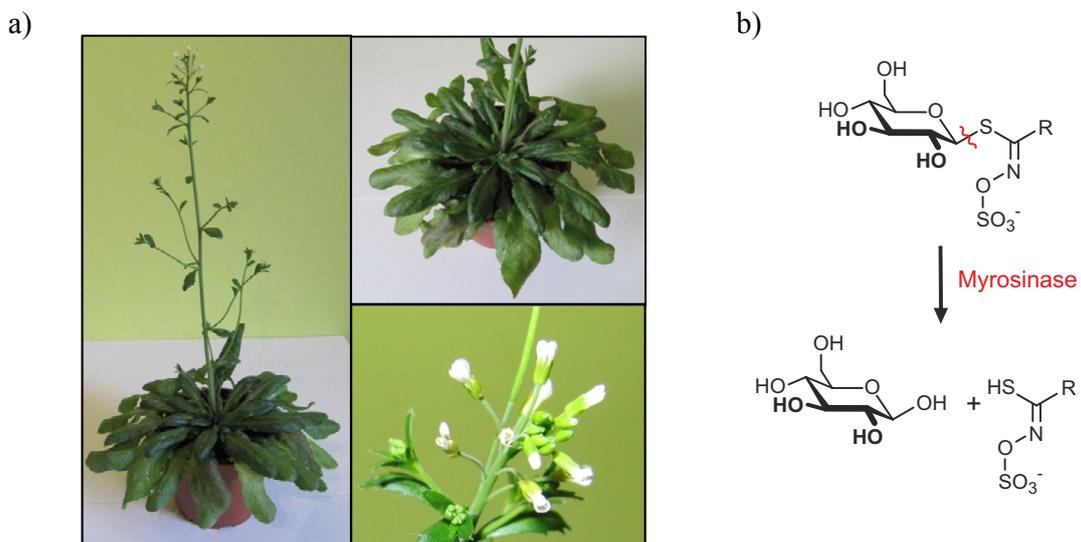


Abbildung 62. a) *Arabidopsis thaliana*: Gesamtpflanze, basale Rosette und Blüten; und b) Grundstruktur der Glucosinolate und Spaltung durch das Enzym Myrosinase.

Die Hauptinhaltsstoffe der Brassicaceae sind die Glucosinolate, auch Senfölglycoside genannt. Diese schwefelhaltigen, anionischen Naturstoffe sind aus einer β -Thioglucose-Einheit, einer *N*-Hydroxyiminosulfat-Gruppe und einem variablen Rest R aufgebaut (Abbildung 62b).^[10,42] Dieser Rest kann aliphatischer, aromatischer oder heteroaromatischer Natur sein, je nachdem welche Aminosäure bei der Biosynthese

verwendet wurde. Durch Folgereaktionen wie Kettenverlängerung, Hydroxylierung, Methylierung oder Acylierung wird die strukturelle Bandbreite dieser Verbindungen weiter erhöht,^[150-152] so dass mittlerweile fast 200 verschiedene Glucosinolate bekannt sind.^[42]

Kommen die Glucosinolate mit dem Enzym Myrosinase in Berührung, so wird zunächst die Glucose-Einheit abgespalten und das verbleibende Aglycon wird weiter zu (Iso-) Thiocyanaten und Nitrilen umgewandelt, die für den charakteristischen Kohlgeschmack der Brassicaceae-Gewächse verantwortlich sind.^[42] In der Pflanze liegen Glucosinolate und Myrosinase räumlich getrennt voneinander vor, erst eine Zerstörung der Kompartimentierung – zum Beispiel durch Fraßfeinde oder Pathogenbefall – löst die beschriebene Reaktionskaskade aus. Die Abbauprodukte haben eine toxische Wirkung auf Insekten, Pilze und Bakterien, wobei der genaue Mechanismus bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte.^[10,153]

Auf den Menschen hingegen scheinen die Glucosinolate und ihre Abbauprodukte eine vorteilhafte Wirkung zu haben, sie wirken als Radikalfänger, entzündungshemmend, antibakteriell und cardioprotektiv,^[154] doch vor allem ihre Rolle bei der Prävention von Krebserkrankungen aller Art wird seit langem intensiv untersucht und diskutiert. Dabei ist vor allem erstaunlich, dass sie über verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel durch Induktion von Apoptose, Hemmung des Zellzyklus und der Angiogenese, das Wachstum von Tumoren inhibieren können.^[154-156]

In Pflanzen sind die Glucosinolate durch die Speicherung in den Blättern und die damit garantierte schnelle Verfügbarkeit im Falle einer Verletzung der Pflanze Teil der lokalen Pflanzenabwehr. Jedes Auslösen der lokalen Abwehr verursacht jedoch auch die Aktivierung der globalen Abwehr der Pflanze, damit sie sich in ihrer Gesamtheit schützen kann. Dies geschieht zum Einen durch eine elektrische Potential- oder hydraulische Leitfähigkeitsänderung^[157] und zum Anderen durch die Entsendung von kleinen Molekülen vom Verletzungsort in andere Bereiche der Pflanze, in denen komplizierte Abwehrmechanismen, wie die Synthese von PR-Genen (pathogenesis-related) oder die Erzeugung von ROS (reaktive oxygen species), in Gang gesetzt werden. Bekannte Signaltransmitter dieser Art sind Jasmonsäure, Salicylsäure und Ethylen,^[43,158-160] die jeweils über das Phloem, das aus Siebröhrenelementen- und Geleitzellen bestehende Fernleitsystem der Pflanzen, verteilt werden.

Aufgrund ihrer Phloem-mobilen Eigenschaften,^[161] ihrer Akkumulation in Gegenwart anderer Signaltransmitter,^[162,163] ihrer Beteiligung an globalen Abwehrreaktionen,^[165-166] sowie der Tatsache, dass sie in dem Phloem benachbarten Zellen gespeichert und angereichert werden,^[167,168] werden die Glucosinolate als potentielle globale Signaltransmitter diskutiert.

4.1 Kenntnisstand über Glucosinolate im Phloemsaft von *Arabidopsis thaliana*

In Zusammenarbeit mit Dr. R. Deeken (Arbeitsgruppe Prof. R. Hedrich, Universität Würzburg) und Prof. C. Neusüß (Fachhochschule Aalen) wurden im Rahmen der Doktorarbeit von I. Kajahn die Metabolitprofile von Phloem-Exsudaten aus *A.-thaliana*-Blättern nach Pathogenbefall untersucht.^[45] Die Sammlung der Exsudate (Kapitel 4.1.2) erfolgte im Arbeitskreis von Prof. R. Hedrich, die Messung der Phloemproben wurde im Arbeitskreis von Prof. C. Neusüß mittels Kapillarzonenelektrophorese-Massenspektroskopie-Kopplung durchgeführt.

4.1.1 CZE-ESI-oTOF-MS-Methode

Für die Messung der Proben, welche die Glucosinolate in extrem geringen Mengen und mit zahlreichen höher-konzentrierten Nebenkomponenten enthielten, wurde eine in der Glucosinolat-Analytik neuartige Messmethode in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Neusüß entwickelt. Dabei wurde eine Kapillarzonenelektrophorese (CZE) über ein Sheath-Liquid-Interface und eine Elektrospray-Ionisierungseinheit (ESI) mit einem orthogonalen Time-of-Flight-Massendetektor (oTOF-MS) gekoppelt (Abbildung 63).^[169]

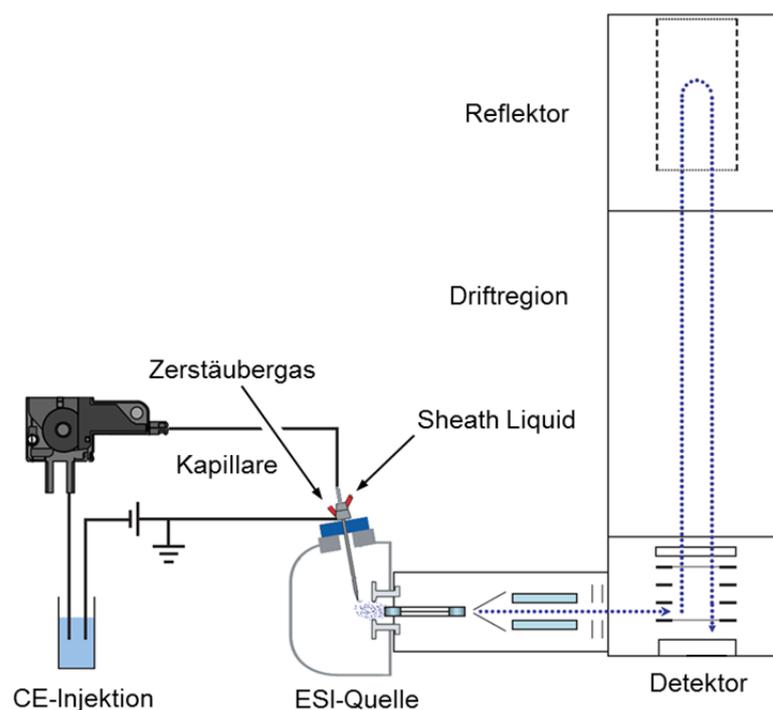


Abbildung 63. Aufbau einer CZE-ESI-oTOF-Kopplung (nach Bruker "microTOF-Q User Manual").

Die Kapillarelektrophorese wurde als Trennsystem gewählt, weil die physikalischen Eigenschaften der Glucosinolate – hydrophil, hohe Polarität und permanente negative Ladung – optimale Voraussetzungen zur elektrophoretischen Trennung bieten. Zudem ermöglicht die Kapillarzonenelektrophorese die Aufgabe von Proben im Nanolitermaßstab.

Für die Glucosinolate wurde ein saures Elektrolytsystem (0.5 M Ameisensäure) mit kathodischer Detektion eingesetzt, welches nur die Migration von Anionen starker Säuren, in diesem Fall von Sulfaten und Phosphaten, zuließ, und diese somit von allen anderen Komponenten der Proben separierte.^[44,45]

Da der Fluss der Kapillarelektrophorese, der in das Massenspektrometer einströmt, zu gering ist für eine optimale Zerstäubung, wird vor der Ionisationsquelle eine Hilfsflüssigkeit (Sheath Liquid) zugeführt, welche die Ionisierung der Analyten beeinflusst. Auch hier wurden durch den Einsatz von Ameisensäure selektiv die Signalintensitäten der der Glucosinolate erhöht und das Grundrauschen gesenkt. Die Sensitivität des orthogonalen Massendetektors erlaubte die Detektion der Glucosinolate im Picogrammbereich sowie deren Identifizierung über die genaue Masse und das Isotopenmuster. Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn die Analyten auf Grund von ähnlichen strukturellen und physikalischen Eigenschaften, wie es bei den Glucosinolaten der Fall ist, gleichzeitig von der Kapillare eluieren und simultan oder überlappend vom Massenspektrometer detektiert werden.^[44,45]

Mit der neuen Methodik wurden die Glucosinolate in Blatt- und Samenextrakten von *A. thaliana* untersucht. Dabei gelang der Nachweis fast aller aus Blättern und Samen bekannten Glucosinolate, sowie die Detektion von neun neuen Glucosinolaten.^[44,45]

4.1.2 Sammlung von Phloem-Exsudaten aus *A.-thaliana*-Blättern

Zur Sammlung der Phloemsäfte wurde im Arbeitskreis von Prof. H. Hedrich ein neues Verfahren entwickelt,^[170] dieses soll hier nur kurz zum Verständnis der folgenden Unterkapitel beschrieben werden. Eine ausführlichere Beschreibung ist im Zuge der Modifikationen, die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen wurden, in Kapitel 4.2.2 gegeben.

Bei der Phloemsammlung wurden Blätter von ca. drei Monate alten *Arabidopsis*-Pflanzen, die zuvor mit verschiedenen Lösungen infiltriert worden waren (Kapitel 4.1.3), mit einer chirurgischen Schere am Stiel abgeschnitten und sofort in eine Sammelvorrichtung (Abbildung 64) transferiert. In der Rinne dieser Vorrichtung befand sich eine Sammellösung aus H₂O, EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und Sorbitol, deren Aufgabe es war, das Phloem der Pflanzen offen zu halten, sodass die Blätter vital blieben. Da durch den osmotischen Sog bereits beim Transfer in die Vorrichtung Luft in den Stiel gesaugt werden kann, wurden die Stiele in der Lösung unter Luftausschluss nochmals abgeschnitten. In den darauffolgenden Stunden stellte man die Blätter ins Licht, um den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, sodass in den Blättern gebildete Metabolite und eventuell ausgeschüttete Signaltransmitter, die in andere Teile der Pflanze entsendet werden sollten, in der Sammellösung aufgefangen wurden. Nach ca. 1.5 h wurde die Lösung abgelassen, tiefgefroren und lyophilisiert.^[45,170]

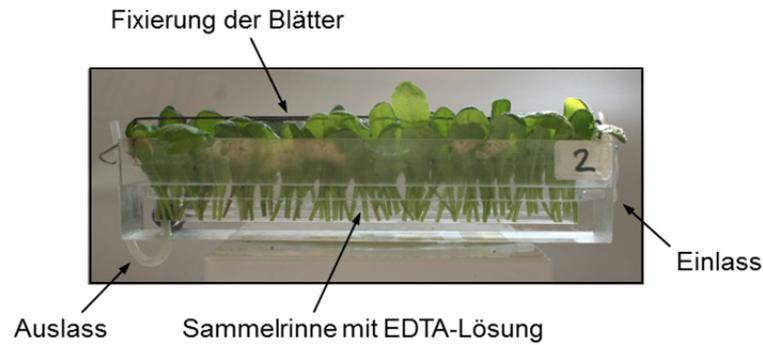


Abbildung 64. Sammelvorrichtung zur Sammlung von Phloem-Exsudaten von *A. thaliana*, entwickelt im Arbeitskreis von Prof. R. Hedrich.

4.1.3 Detektion von Glucosinolaten in Phloemsaften von *A. thaliana*

Waren die Glucosinolate in den oben genannten *A.-thaliana*-Blatt- und Samenextrakten hoch konzentriert, galt es nun noch zu zeigen, dass sie auch in den Phloemsaften nachweisbar waren. Dazu wurden die Phloemsaften von unbehandelten *A.-thaliana*-Blättern gesammelt und vermessen. Wie in Abbildung 65a gut zu sehen ist, wurden nur der nachträglich zugefügte Standard Sinigrin (**57**) und das im Phloem ubiquitäre Glucosinolat Methoxyglucobrassicin (**58**) in den Exsudaten detektiert.^[170]

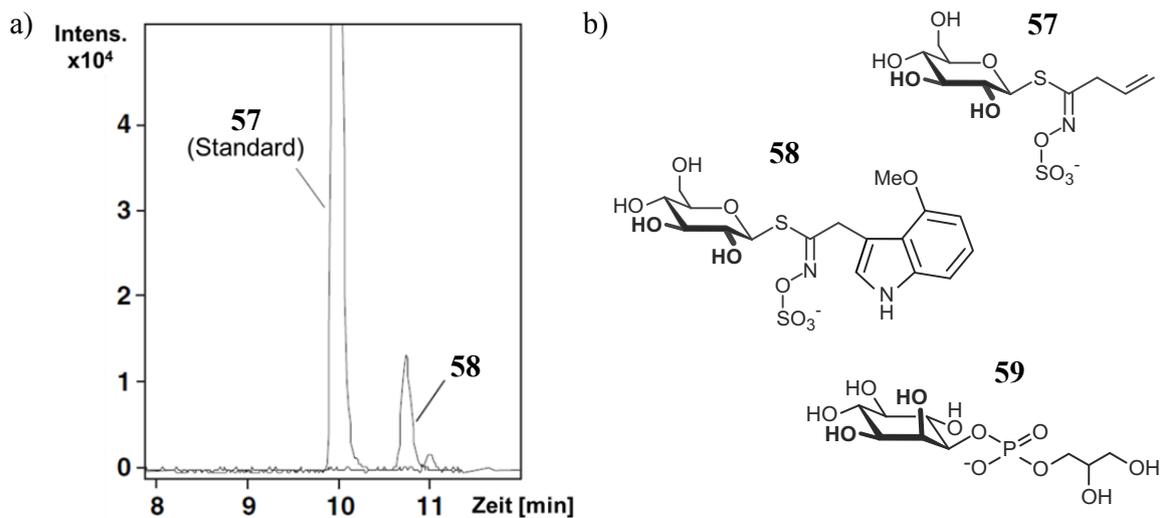


Abbildung 65. a) Phloemsaft-Elektropherogramm unbehandelter *A.-thaliana*-Blätter; und b) Strukturen von Sinigrin (**57**), Methoxyglucobrassicin (**58**) und 1-Glycero-1-myoinositolphosphat (**59**).

Somit waren die Glucosinolate in den Phloemsaften in ausreichend hoher Konzentration vorhanden, und die Sammelprozedur der Phloemsaften war nachgewiesenermaßen verunreinigungsarm.^[170] Zusätzlich gelang die Identifizierung des bis dahin im Phloem noch nie nachgewiesenen 1-Glycero-1-myoinositolphosphats (**59**; Abbildung 65b),^[45] die Bedeutung dieses Abbauprodukts aus dem für Pflanzen wichtigen Phospholipid-Signalweg, der ebenfalls der Pathogenabwehr dient, konnte im Rahmen der Experimente jedoch nicht geklärt werden.^[45]

Mit den entwickelten Methoden sollte nun das Glucosinolat-Spektrum im Phloem von *A. thaliana* nach simuliertem Pathogenbefall untersucht werden. Damit die Pflanze auf die Erreger reagieren konnte, mussten diese in die Blätter eingeschleust werden. Dies wurde durch die Infiltration der Blätter erreicht, dazu wurden (Erreger-haltige) Lösungen mit einer Spritze in die Spaltöffnungen an der Blattunterseite injiziert (Abbildung 66).

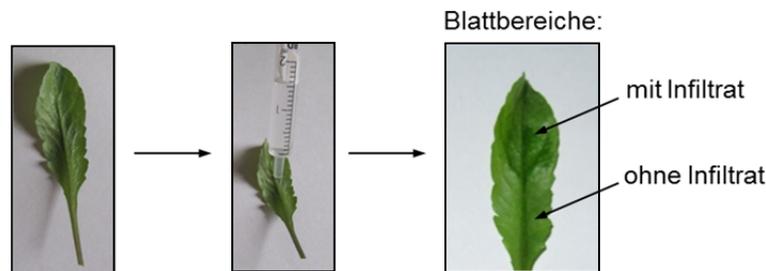


Abbildung 66. Infiltration von *A.-thaliana*-Blättern.

Als Erreger verwendete man verschiedene Stämme von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, einem gramnegativen Stäbchenbakterium aus der Familie der Pseudomonaden, welches bei Tomaten- und *Arabidopsis*-Pflanzen die sogenannte Blattfleckenkrankheit hervorruft.^[171] Nach Befall der Pflanzen kommt es zum Absterben der infizierten Blattbereiche und zu bräunlichen Nekrosen, sowie zu einer komplexen Reaktion der Pflanze, die noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt ist.^[172]

Bei den Infiltrationsexperimenten wurden drei verschiedene Infiltrations-Lösungen verwendet, mit denen unterschiedliche Abwehrreaktionen in *Arabidopsis thaliana* hervorgerufen werden sollten.

- a) Magnesiumchlorid ($MgCl_2$): Die Infiltration sollte keine Abwehrreaktion in der Pflanze auslösen, da sowohl Magnesium- als auch Chloridionen in der Pflanze ubiquitär sind.
- b) Virulente *Pseudomonas*-Bakterien: Virulente Pseudomonaden werden von der Pflanze nicht sofort als Eindringlinge erkannt und lösen daher erst nach einiger Zeit eine Immunantwort aus. Da die Phloemsammlung vier Stunden nach der Infiltration stattfand, einer Zeitspanne, in welcher der Erreger noch nicht als Pathogen erkannt wird, erwartete man allenfalls eine schwache Abwehrreaktion, oder zumindest eine ähnliche Phloemsaft-Zusammensetzung wie bei den Pflanzen, die mit $MgCl_2$ infiltriert worden waren.
- c) Avirulente *Pseudomonas*-Bakterien: Aufgrund ihrer Oberflächenantigen-Struktur werden avirulente Pseudomonaden sofort als Pathogene erkannt und lösen in der Pflanze über einen Calcium- und Sauerstoffradikal-Anstieg eine hypersensitive Immunantwort aus, die zur Apoptose-Induktion der befallenen Zellen führt.^[173] Somit erwartete man bei diesen Proben ein deutlich anderes Metabolitmuster als bei jenen, die von mit $MgCl_2$ oder virulenten Bakterien infiltrierten Pflanzen stammten.

Die Phloemsaft-Zusammensetzungen der verschiedenen Infiltrations-Experimente sind in Abbildung 67 gezeigt.^[45]

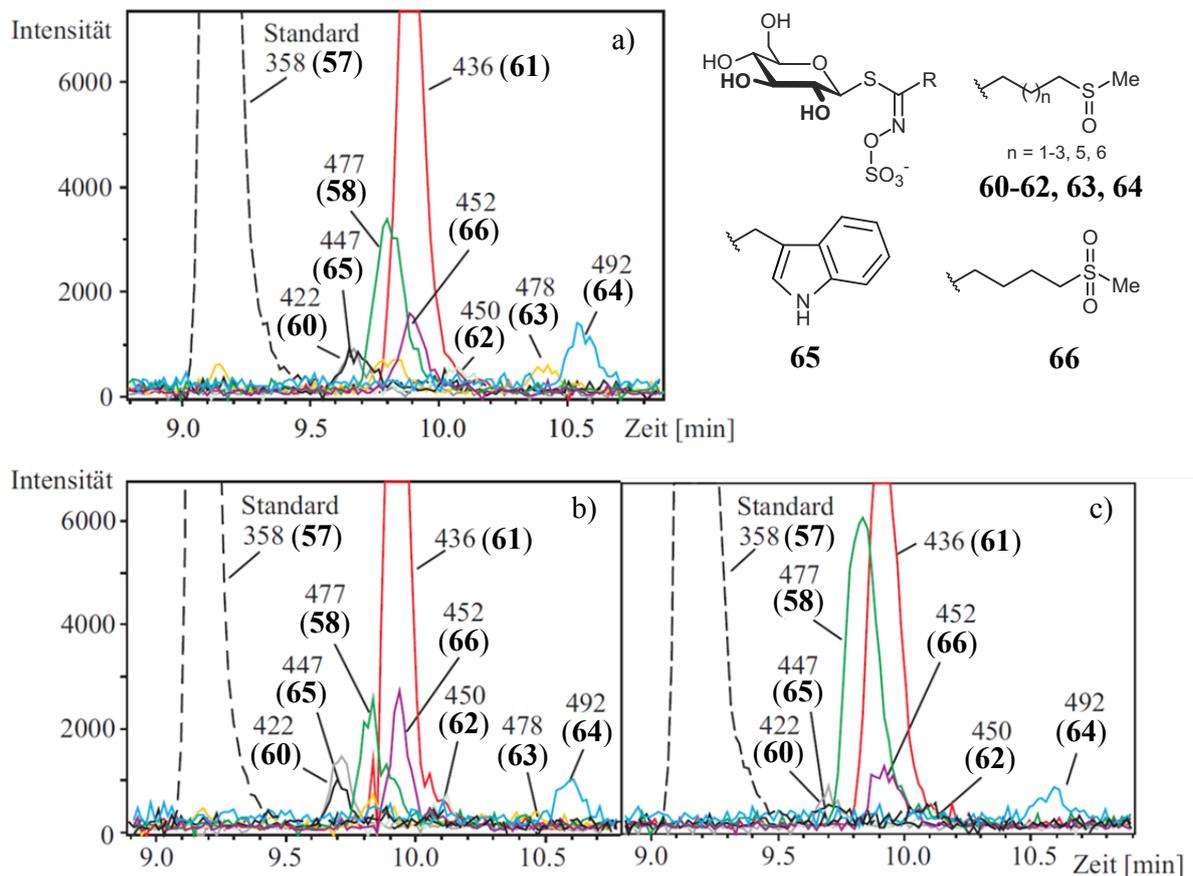


Abbildung 67. Elektropherogramme der Metabolitspektren in Phloemexsudaten von *Arabidopsis*-Pflanzen, die mit a) MgCl_2 ; b) einem virulenten; oder c) einem avirulenten *Pseudomonas*-Stamm infiltriert wurden. Die Strukturen von **57** und **58** sind in Abbildung 65b aufgeführt.

Wie in Abbildung 67a–c gut zu erkennen ist, wiesen alle Proben ungefähr das gleiche Glucosinolat-Muster auf, unabhängig davon, mit welcher Lösung die Blätter infiltriert worden waren. Manche Glucosinolate (**63** und **64**) waren sogar in den Phloemsaften der mit MgCl_2 -infiltrierten Blätter höher konzentriert als in denen der mit dem avirulenten *Pseudomonas*-Stamm infiltrierten, bei denen man die höchste Glucosinolat-Konzentration erwartet hatte. Lediglich der leichte Konzentrationsanstieg von Methoxyglucobrassicin (**58**) war im Einklang mit den in der Literatur berichteten Metabolitänderungen für Gesamtblattextrakte von *A. thaliana* nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.^[162,173,174]

Somit musste davon ausgegangen werden, dass die detektierten Glucosinolate durch die mechanische Reizung der Blätter beim Infiltrations-Prozess (Kapitel 4.2.2.2) als Teil der lokalen – und *nicht* der globalen – Abwehrantwort ausgeschüttet worden waren.

Des Weiteren könnte der Anstieg von **58** auch ein Artefakt gewesen sein, da die Konzentrationen, in welcher die Glucosinolate in den Proben vorhanden waren ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$), so niedrig waren, dass schon kleinste Änderungen der Messbedingungen einen großen Einfluss auf die Detektion gehabt hätten.

Dieser Effekt manifestierte sich ebenfalls beim Vergleich der Metabolitkonzentrationen in Proben, die unter gleichen Bedingungen gewonnen worden waren (Abbildung 68).^[45]

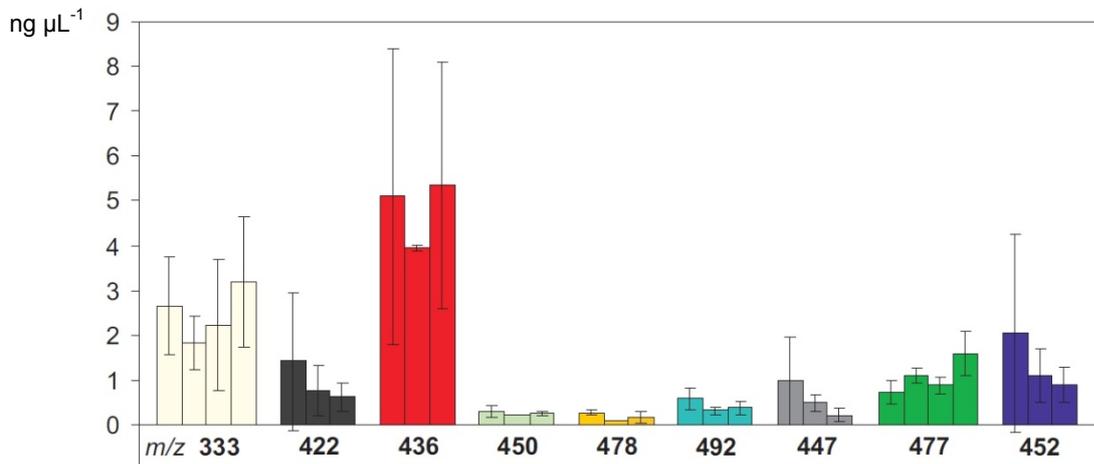


Abbildung 68. Konzentration des 1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphats [*m/z* 333 (**59**)] und der identifizierten Glucosinolate [*m/z* 422 (**60**), 436 (**61**), 450 (**62**), 478 (**63**), 492 (**64**), 447 (**65**), 477 (**58**) und 452 (**66**)] in den verschiedenen Phloemexsudaten: nach Infiltration der Blätter mit MgCl_2 (Säule 1), einem avirulenten (Säule 2) und einem virulenten (Säule 3) *Pseudomonas*-Stamm, sowie von nicht-infiltrierten Blättern (Säule 4).

Bei den sechs Proben, die jeweils von einem Infiltrat generiert und gemessen wurden, ließen sich bei jedem Glucosinolat und bei jeder Infiltrationsmethode starke Variationen der Konzentration erkennen. Bei vielen Glucosinolaten [436 (**61**), 450 (**62**), 492 (**64**) und 452 (**66**)] variierten die Konzentrationen in den äquivalent gewonnenen Proben um bis zu 50%, bei manchen [*m/z* 422 (**60**), 447 (**65**) und 452 (**66**)] sogar über 100% (Abbildung 68).

Aufschlussgebend waren vor allem die Konzentrationsschwankungen des 1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphats [*m/z* 333 (**59**)] sowie des Methoxyglucobrassicins [*m/z* 477 (**58**)] in den Phloemexsudaten der unbehandelten Blätter (jeweils Säule 4, Abbildung 68), da diese nicht durch Unregelmäßigkeiten während des Infiltrationsprozesses entstanden sein konnten. Folglich deuteten sie auf eine Schwäche der Messmethodik hin, entweder hervorgerufen durch inadäquate Einstellung der Geräteparameter oder durch die Inkompatibilität der Proben mit den Analysegeräten. Letzteres erschien plausibler, da die Probenmatrix hauptsächlich aus EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, **67**; Abbildung 70) bestand, einer Substanz, die aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften große Probleme bei der Kapillarelektrophorese verursachen kann (Kapitel 4.2.1).

4.2 Detektion von Glucosinolaten im Phloemsaft von *Arabidopsis thaliana*

Durch die vorher gewonnen Erkenntnisse (gleiches Glucosinolatmuster in den Phloem-exsudaten unabhängig von der Infiltrationslösung, Konzentrations-Schwankungen der Glucosinolate von bis zu 100%) ergaben sich folgende Aufgabenstellungen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollten:

- 1) Etablierung einer stabilen Analytik zur Detektion der Glucosinolate in Phloemsaft-Exsudaten, durch Verbesserung des Analyten-Matrix-Verhältnisses in den Proben.
- 2) Waren die Glucosinolate, die in den Phloemsaften infiltrierter Blätter detektiert worden waren, Teil der lokalen Abwehrantwort, ausgeschüttet aufgrund der mechanischen Reizung durch die Infiltration, oder kann ein Konzentrationsunterschied in Abhängigkeit der Zeit oder des Ortes nachgewiesen werden?

4.2.1 Verbesserung des Analyten-Matrix-Verhältnisses in Phloemsaft-Exsudaten

Die Proben der Phloemsaft-Exsudate enthalten EDTA (67; Abbildung 70), das als Komplexbildner bei der Sammlung benötigt wird, in einem großen Überschuss, was im Rahmen der Arbeit von I. Kajahn zwar die Messungen behindert, aber nicht unmöglich gemacht hatte (Kapitel 4.1.3). Im Rahmen dieser Arbeit stellte EDTA (67) jedoch von Anfang an ein großes Problem dar: es eluierte gleichzeitig mit den Glucosinolaten von der Kapillare und wurde als Eisenkomplex, gebildet bei der Zerstäubung an der ESI-Nadel, in einfach negativ geladener Form detektiert (Abbildung 69). Die Elution als zweifach negativ geladener Eisenkomplex ($t_R = 6-7$ min) konnte aufgrund einer zu hohen Massenungenauigkeit nicht eindeutig bewiesen werden.

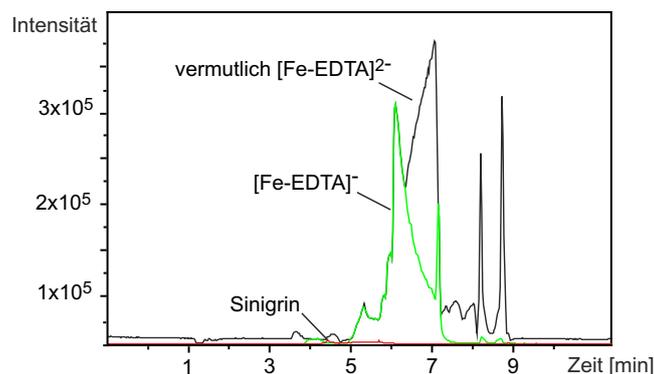


Abbildung 69. Elektropherogramm einer Phloemprobe, die nachträglich mit 100 ng Sinigrin (57; rote Kurve) versetzt wurde. Die schwarze Kurve repräsentiert das Basepeak-Elektropherogramm, die grüne Kurve den einfach negativ geladenen Eisen-EDTA-Komplex.

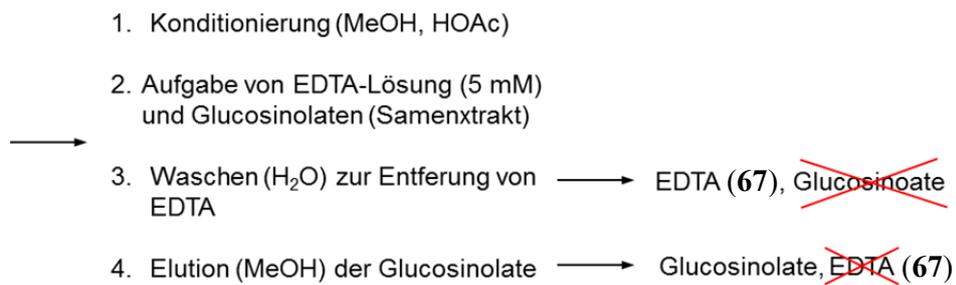
Der Phloemprobe, deren Metabolitmuster in Abbildung 69 gezeigt ist, wurden nachträglich 100 ng Standard Sinigrin (**57**; Abbildung 65b) hinzugefügt, sodass Peakform und Peakintensität vergleichbar zu jenen in Abbildung 65a und Abbildung 67 hätten sein müssen. Auch andere Glucosinolate hätten vorhanden sein sollen, konnten aber nicht detektiert werden. EDTA (**67**) war nicht nur vielfach höher konzentriert als die Analyten, es schien zudem noch die Silanolgruppen der Kapillare zu besetzen, da die Intensität des Sinigrin-Signals bei aufeinanderfolgenden Messungen derselben Probe nachließ.

Da diese Probleme bei allen Proben vorhanden waren und nicht durch Anpassung der Geräteparameter gelöst werden konnten, musste EDTA (**67**) aus den Proben vor der Messung entfernt werden.

4.2.1.1 Entfernung von EDTA (**67**) aus den Phloem-Exsudaten

Zunächst versuchte man die Fällung von EDTA (**67**) durch Zugabe von Eisenchlorid (FeCl_3 in H_2O) vor der Messung, dadurch wurde jedoch keine Verbesserung erreicht.

Als weitere Möglichkeit wurde die Entfernung von EDTA (**67**) durch Festphasen-Extraktion (SPE) mit einem Anionen-Austauscher in Betracht gezogen. Dazu wurden ein konzentrierter Samenextrakt von *A. thaliana* und eine den Phloemproben vergleichbar konzentrierte EDTA-Lösung auf SPE-Säulen (StrataTM X-AW, 500 mg, 3 mL; Phenomenex) gegeben. Die Glucosinolate sollten an das Säulenbett binden und beim Waschschrift gebunden bleiben, während EDTA (**67**) heruntergewaschen werden sollte. Es fanden sich jedoch sowohl Glucosinolate in der Waschlösung, als auch EDTA (**67**) in der Fraktion, die eigentlich nur Glucosinolate hätte enthalten sollen (Schema 3).



Schema 3. Festphasen-Extraktions-Prozedur zur Trennung von Glucosinolaten und EDTA (**67**) auf einem Anionen-Austauscher (StrataTM X-AW).

Die Ursache für die unvollständige Trennung der Substanzen lag in den physikalischen Eigenschaften, die offenbar so ähnlich waren, dass eine chromatographische Trennung per Festphasenextraktion nicht möglich war. Also sollte das EDTA durch eine Substanz mit vergleichbaren komplexbildenden jedoch anderen chromatographischen Eigenschaften ersetzt werden.

4.2.1.2 *Alternative Komplexbildner als Ersatz für EDTA (67)*

EDTA (**67**) wird bei der Phloemsammlung als Chelator für Ca^{2+} -Ionen verwendet, welche sonst die Entstehung eines Propfes an den Blattstielen induzieren würden, der das Phloem verschließt (Callose-Bildung).^[175] Zudem müssen auch andere zweiwertige Metallionen wie Magnesium, Eisen, Kupfer und Zink komplexiert werden, da diese Cofaktoren von Enzymen sind, die in den Phloemproben vorhandene Metabolite abbauen könnten.^[171] Dieser Abfang ist durch deren hohe Affinität zu EDTA (**67**) möglich.^[176]

Bei der Entwicklung der Prozedur zum Ausbluten des Phloems im Jahre 1974 wurde als optimale EDTA-Konzentration 20 mM etabliert,^[175] diese wurde jedoch im Rahmen der Phloemexperimente mit *A. thaliana* im Arbeitskreis von Prof. R. Hedrich auf 5 mM EDTA reduziert.^[170,177]

In der Literatur wurden Natriumcarboxycellulose (NaDCC; **68**), Natriumhexametaphosphat $[(\text{NaPO}_3)_6$; **69**] und Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA; **70**) zur Chelatisierung von Ca^{2+} -Ionen verwendet, wobei letztere bereits zur Phloemsammlung eingesetzt wurden (Abbildung 70).^[175,178-180]

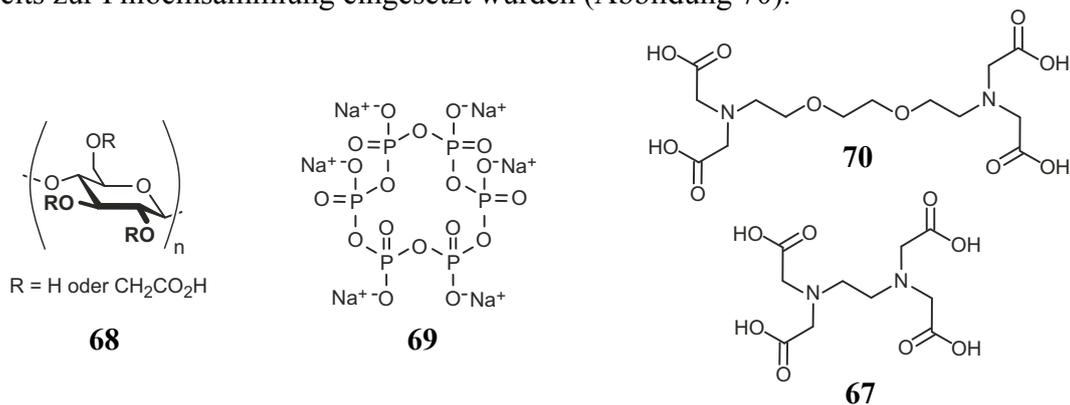


Abbildung 70. Strukturen von NaDCC (**68**), $(\text{NaPO}_3)_6$ (**69**), EGTA (**70**) und EDTA (**67**).

Um die Eignung dieser Komplexbildner zur Phloemsammlung im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, wurden die Substanzen zunächst in einfachen Experimenten zur Phloemsammlung getestet. Dabei wurden Tabakblätter (*Nicotiana tabacum* SR1) – die ein höheres Phloemvolumen als *Arabidopsis*-Blätter aufweisen – mit einer frischen Rasierklinge abgetrennt und in ein Becherglas mit H_2O überführt. Unter Wasser wurden die Stiele nochmals abgeschnitten, vorsichtig angehoben und mit einem Wassertropfen am unteren Ende des Stiels in Präparatgläser mit Lösungen der zu testenden Chelatbildner transferiert. So wurde sichergestellt, dass keine Luft während des Schnittprozesses in das Phloem gesaugt werden konnte. Wurden nun die entsprechenden Metallionen in den Lösungen komplexiert, so sollten Phloem (und Xylem) über Stunden hinweg geöffnet bleiben und die Blätter sollten ein vitales Aussehen zeigen. Zusätzlich zum äußeren Erscheinungsbild der Blätter wurde die Viskosität der Lösungen bei der benötigten

Konzentration beurteilt, da diese später für die Injektion in die Kapillarelektrophorese nicht zu hoch sein durfte.

Die Konzentrationen betragen bei EDTA (**67**; **A**) und EGTA (**70**; **B**) 5 mM,^[170,175] bei NaDCC (**68**; **C**) 100 mg mL⁻¹ ^[179] und bei (NaPO₃)₆ (**69**) 20 mM (**D**), 10 mM (**E**) und 7.5 mM (**F**; Abbildung 71).^[177,178]

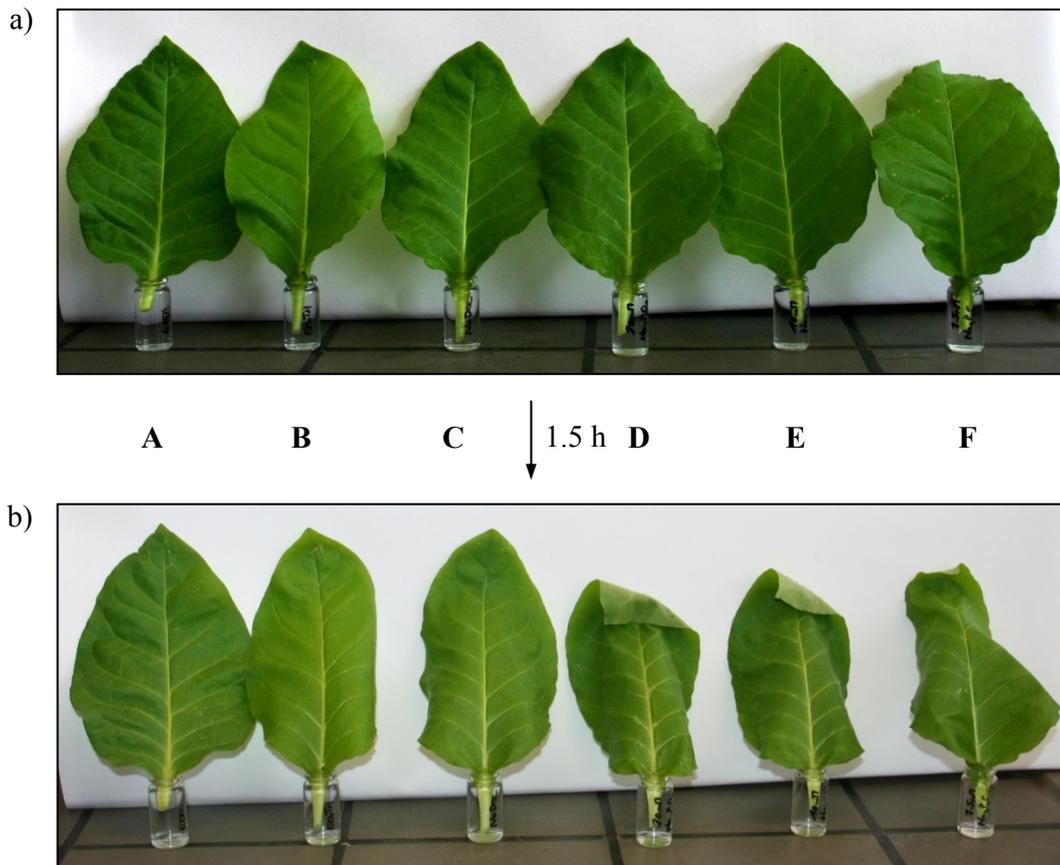
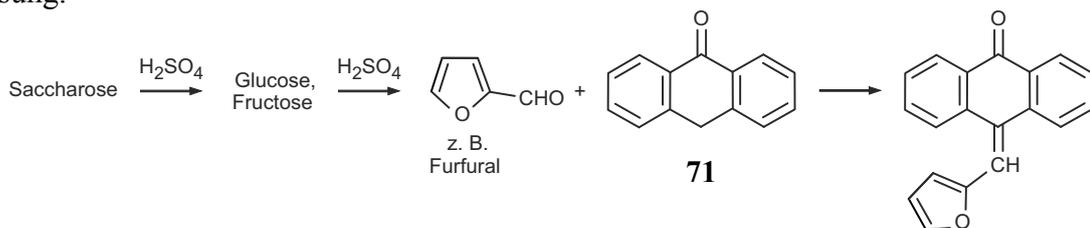


Abbildung 71. Tabakblätter (*Nicotiana tabacum* SR1) in Lösungen verschiedener Komplexbildner [A: EDTA (**67**); B: EGTA (**70**); C: NaDCC (**68**); D–F: (NaPO₃)₆ (**69**): a) kurz nach dem Abschneiden von der Tabakpflanze; und b) nach 1.5 h.

In Abbildung 71a ist gut zu sehen, dass alle Blätter kurz nach dem Abschneiden kräftig und vital aussahen. Nach 1.5 h wirkte das Blatt in der EDTA-Lösung noch genauso vital wie kurz nach dem Abschneiden (**A**; Abbildung 71b), die Blätter in der EGTA- und der NaDCC-Lösung wirkten leicht geschwächt (**B** und **C**; Abbildung 71b), die Blätter in den (NaPO₃)₆-Lösungen (**D–F**, Abbildung 71b) waren deutlich welker. Eine Schwächung der Blätter bedeutet, dass der Phloem- und Xylemtransport nicht aufrechterhalten werden konnte. Somit schied (NaPO₃)₆ als Komplexbildner für die Phloemexperimente aus, bei NaDCC erwies sich die Viskosität der Lösung als zu hoch, folglich blieb EGTA als potenzieller alternativer Chelator für die Phloemexperimente.

Da die Blätter in der EGTA-Lösung weniger vital gewesen waren als die Blätter in der EDTA-Lösung, dies aber nicht zwingend bedeuten musste, dass EGTA weniger für die Phloemsammlung geeignet war, sollten zum besseren Vergleich beide Substanzen in Experimenten mit *Arabidopsis-thaliana*-Blättern getestet werden.

Um die Vitalität von abgeschnittenen Blättern zu bewerten, gibt es neben der Beurteilung der Physis die Möglichkeit, Photosynthese-Produkte nachzuweisen. Vitale Blätter produzieren Zucker (in diesem Fall Saccharose), welche aus den Blättern in andere Teile der Pflanze transportiert werden sollen. Bei Experimenten mit abgeschnittenen Blättern reichern sich die Zucker in der Sammellösung an und können durch entsprechende Reagenzien nachgewiesen werden. Saccharose kann durch das Anthracen-Derivat Anthron (**71**) in konzentrierter Schwefelsäure angefärbt werden: Die Schwefelsäure spaltet das Disaccharid in Monosaccharide, welche weiter zum Furfural und entsprechenden Derivaten reagieren und mit Anthron ein Aldol-Kondensations-Produkt bilden, das im blau-grünen Wellenlängen-Bereich absorbiert (Schema 4).^[181,182] Bei Phloem-Exsudaten entsteht, aufgrund des vergleichbar geringen Saccharose-Gehaltes, eine bläulich gefärbte Lösung.



Schema 4. Reaktion von Anthron (**71**) in konzentrierter Schwefelsäure mit Sacchariden.

Zum Nachweis der Saccharose in Phloemexsudaten von *Arabidopsis*-Blättern in EDTA- und EGTA-Lösungen (5 mM) wurden Blätter von *A.-thaliana*-Pflanzen nach der oben beschriebenen Methode abgeschnitten und in Eppendorf-Caps mit 500 μ L Sammellösung gestellt. Die Blätter wurden anschließend 1.5 h lang bei Belichtung ausbluten gelassen (Abbildung 72).

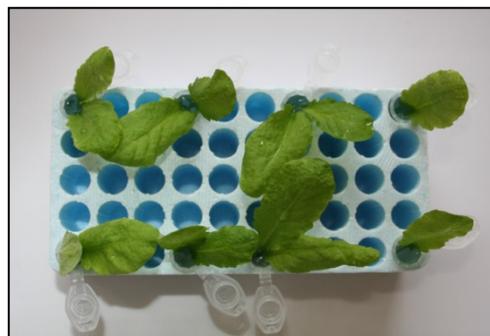


Abbildung 72. *A.-thaliana*-Blätter in Eppendorf-Caps mit je 500 μ L Sammellösung (EDTA und EGTA, je 5 mM).

Die Sammellösungen mit den Phloemexsudaten wurden nach den 1.5 h in Reagenzgläser überführt und mit je 1 mL Anthronreagenz (Anthon in konzentrierter Schwefelsäure) versetzt (C–F). Zum Vergleich gab man 1 mL Anthronreagenz in eine Saccharose-Lösung (1 mg mL⁻¹; A) und die reinen Sammellösungen (B). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 73 gezeigt.



Abbildung 73. Anfärbung von verschiedenen Lösungen (A: Saccharose-Lösung 1 mg mL⁻¹, B: Sammellösung pur, C–F: Sammellösungen mit Phloemexsudaten) mit dem Anthronreagenz nach Phloemsammlung aus *A. thaliana*-Blättern mit a) 5 mM EDTA-Lösung; und b) 5 mM EGTA-Lösung.

In Abbildung 73 ist deutlich zu sehen, dass die Saccharose-Lösung (A) eine tiefblaue Farbe aufwies, wohingegen die reinen Sammellösungen (B) keine Färbung zeigten. Die Sammellösungen, in denen Phloembestandteile angereichert wurden, waren leicht (C) oder etwas stärker bläulich (E, F) gefärbt. Bei zwei Proben (D) schien das Phloem verschlossen worden zu sein, oder die Konzentration der angereicherten Saccharose war zu gering, was bei Versuchen mit wenigen Blättern durchaus der Fall sein kann. Deshalb wurden auch bei den Phloemsammlungen für die Glucosinolat-Bestimmung mindestens 60 Blätter verwendet.^[45,170]

Die Proben, welche mit der EGTA-Lösung gesammelt worden waren, waren teilweise intensiver gefärbt als jene, welche mit der EDTA-Lösung gesammelt worden waren (Abbildung 73). Somit konnte erwiesenermaßen EGTA anstelle von EDTA zur Sammlung von Phloemexsudaten von *Arabidopsis thaliana* verwendet werden.

4.2.1.3 Modifizierung und Reproduzierbarkeit der CZE-ESI-oTOF-MS-Methodik

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente und Messungen wurden im Arbeitskreis von Prof. C. Neusüß (HTW Aalen)^[183] durch Tobias Bader (unter Betreuung von Svenja Bunz) im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt und sind dort ausführlich geschildert.^[184,185] Deshalb sollen hier nur die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst werden.

CZE-Parameter und Konditionierung der Kapillare

Im Rahmen der vorhergehenden Messungen von Glucosinolaten in Phloemsaft-Exsudaten war bereits eine Kapillarelektrophorese-Methodik etabliert worden.^[45] Basierend auf dieser konnten durch Modifizierung einiger Parameter die Intensitäten der Glucosinolat-Signale erhöht und die Migrationszeiten stabilisiert werden (Tabelle 1).^[185]

Tabelle 1. (Optimierte) Parameter der Kapillarelektrophorese

Parameter	Methodik 2008 ^[45]	Methodik 2012 ^[185]
Quarzglaskapillare	75 cm x 50 µm	Identisch
Spannung	-25 kV	-20 kV
Injektion	25 mbar, 0.1 min	50 mbar, 18 s
BGE*	0.5 M Ameisensäure	1 M Ameisensäure
Sheath Liquid	Isopropanol/H ₂ O (1:1, v/v)	Isopropanol/H ₂ O (1:1, v/v) + 0.2% Ameisensäure

*Hintergrund-Elektrolyt

Als besonders wichtig stellte sich die (Re-) Konditionierung der Kapillare zwischen den Messungen der einzelnen Proben heraus, da trotz der Verbesserung der Analytik durch den Einsatz von EGTA die Kapillare bei aufeinanderfolgenden Messungen an Trennkraft verlor. Die Konditionierung dient der Reinigung und Aktivierung der Silanolgruppen und wird normalerweise nur bei neuen Kapillaren vor der ersten Messung durchgeführt (Tabelle 2), da die dabei verwendete Natronlauge nicht ins Massenspektrometer gelangen darf und die Kapillare somit aus dem Interface entfernt werden muss. Trotz dieser aufwändigen Verfahrensweise, die eine Trennung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer nach jeder Messung erforderte, konnte nicht auf diesen Schritt verzichtet werden.

Tabelle 2. Konditionierungsparameter der Quarzglaskapillare

Eluent	Spülzeit bei 950 mbar [min]	
	Vor der 1. Messung	Vor jeder Messung
MeOH	10	--
H ₂ O	5	1
NaOH (1 M)	15	5
H ₂ O	5	2
BGE*	10	5

*Hintergrund-Elektrolyt (1 M Ameisensäure)

Detektion von Glucosinolaten in einer Phloemsaft-Probe

Mit der modifizierten CZE-ESI-oTOF-MS-Methodik ließen sich in einer Phloemsaft-Probe, die aus mit MgCl₂-infiltrierten Blättern gewonnen worden war, die Glucosinolate Methoxyglucobrassicin (**58**), Glucoiberin (**60**), Glucoraphanin (**61**), Glucoalyscin (**62**), Glucoibarin (**63**), Glucohirsutin (**64**), Glucobrassicin (**65**), Glucoerysolin (**66**), der interne Standard Sinigrin (**57**), sowie das 1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphat (**59**) detektieren (Abbildung 74a). Dies entsprach dem Glucosinolatmuster, welches ebenfalls in den vorhergehenden Untersuchungen in mit MgCl₂-infiltrierten Blättern gefunden worden war (Kapitel 4.1.3, Abbildung 67a).^[45] Zusätzlich wurden noch die Glucosinolate Hydroxy-Glucobrassicin (*m/z* 463) und 8-Methylsulfonyl-*n*-octyl-Glucosinolat (*m/z* 508) identifiziert. Die Identifizierung gleichzeitig eluierender Glucosinolate wurde anhand der exakten Masse sowie des charakteristischen Isotopenmusters vorgenommen.^[44,45,185]

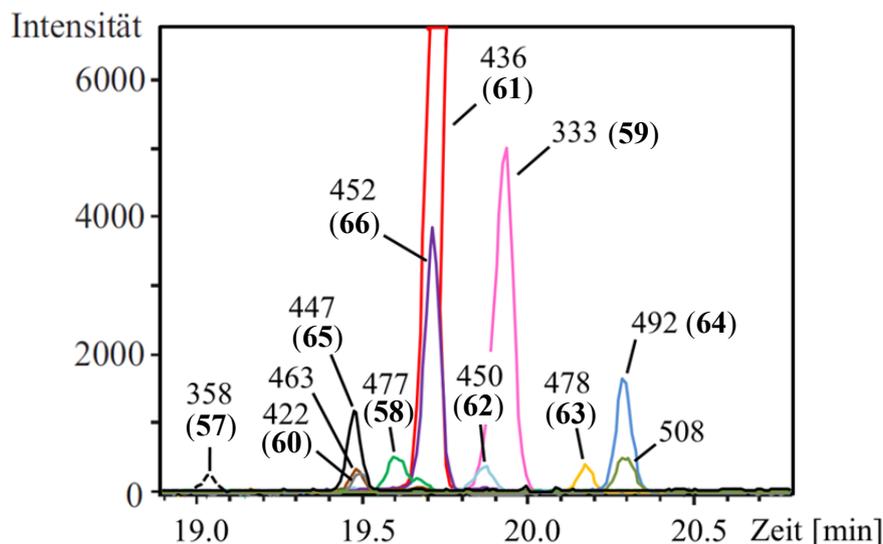


Abbildung 74. Glucosinolatmuster (Elektropherogramm) in einer Phloemsaft-Probe, welche aus mit MgCl₂-infiltrierten Blättern gewonnen worden war.

Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten

Eine stabile Analytik beinhaltet neben reproduzierbaren Peakflächen auch reproduzierbare Retentions- oder, wie hier bei der Kapillarelektrophorese, Migrationszeiten. Zur Überprüfung dieser Parameter wurde eine authentisch gewonnene Phloemsaftprobe, die nachweislich Glucosinolate enthielt, mehrmals vermessen und die Migrationszeiten der Glucosinolate Sinigrin (**57**; m/z 358; interner Standard), Methoxyglucobrassicin (**58**; m/z 477), Glucoiberin (**60**, m/z 422), Glucoraphanin (**61**; m/z 436), Glucoalyssin (**62**; m/z 450), Glucoibarin (**63**; m/z 478), Glucohirsutin (**64**; m/z 492), Glucobrassicin (**65**; m/z 447) und Glucoerysolin (**66**; m/z 452) in den verschiedenen Messungen verglichen.

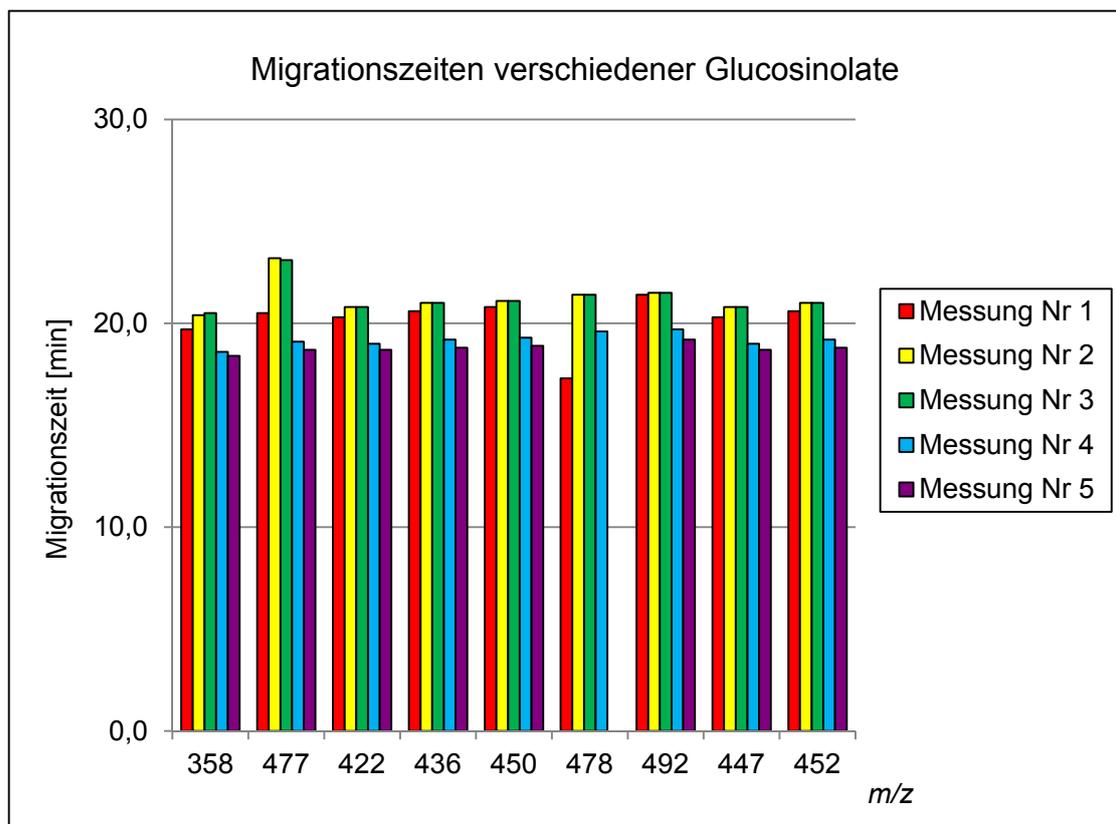


Abbildung 75. Vergleich der Migrationszeiten verschiedener Glucosinolate nach Mehrfachmessung einer Phloemsaft-Probe.

Die Migrationszeiten der detektierten Glucosinolate waren gut reproduzierbar, fast alle Analyten wiesen lediglich eine Standardabweichung von ca. 5% auf, nur bei Methoxyglucobrassicin (**58**; m/z 477) und Glucoibarin (**63**; m/z 478) betrug diese ca. 10%.^[186,187]

Zudem blieb die Elutionsreihenfolge der Glucosinolate konstant und die bereits erwähnte Charakterisierung anhand der exakten Masse sowie des Isotopenmusters bot eine weitere Sicherheit bei der Identifizierung der Analyten.

Reproduzierbarkeit der Peakfläche des internen Standards Sinigrin (57)

Wie in Kapitel 4.1.3 bereits erwähnt, wurden bei den Messungen der Phloemsaftproben 2008 starke Schwankungen der Peakflächen festgestellt, die entweder durch inadäquate Einstellung der Geräteparameter oder durch die Inkompatibilität der Proben mit den Analysegeräten hervorgerufen worden waren. Um die Ursache dieser Schwankungen zu untersuchen, wurde eine authentisch gewonnene Phloemsaftprobe mit 100 ng des internen Standards Sinigrin (57) dotiert und diese fünfmal hintereinander mit der oben beschriebenen CZE-ESI-oTOF-MS-Methodik vermessen. In Abbildung 76 ist gut zu erkennen, dass die absoluten Werte der gemessenen Peakflächen stark variierten, die Standardabweichung betrug 100.5%.^[186,187]

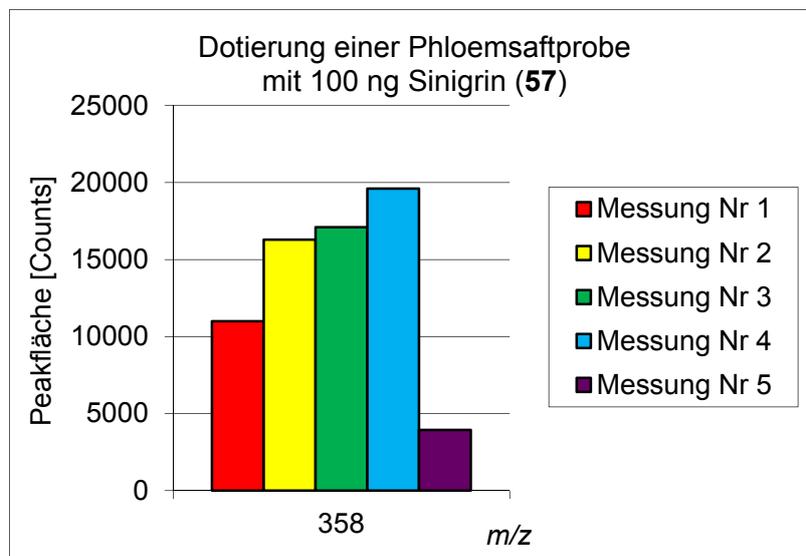


Abbildung 76. Vergleich der Peakflächen des internen Standards Sinigrin (57) nach Mehrfachmessung einer dotierten Phloemsaftprobe.

Diese Werte wiesen darauf hin, dass die Absolutwerte der Proben nicht miteinander verglichen werden konnten, da offensichtlich bei jeder Messung andere Bedingungen im gesamten Mess-System herrschten.

Variationen der Peakflächen sind nicht problematisch, solange jeder Analyt in der Probe in der gleichen Art und Weise durch die vorherrschenden Bedingungen beeinflusst wird. Die Verwendung eines internen Standards bietet daher die Möglichkeit eines Bezugspunktes, an dem alle anderen Analyten ausgerichtet werden können. Bezieht man also die Peakflächen der (anderen) Glucosinolate jeweils auf die Peakfläche des internen Standards Sinigrin (57), so lassen sich (relative) Aussagen über die Zu- oder Abnahme dieser Glucosinolate treffen.

Reproduzierbarkeit der Peakflächen verschiedener Glucosinolate bezogen auf den internen Standard Sinigrin (57)

Zur Untersuchung der Stabilität der relativen Glucosinolat-Peakflächen wurde eine Phloemsaftprobe, die nachweislich Glucosinolate enthielt, mehrmals vermessen und die Peakflächen der Glucosinolate Methoxyglucobrassicin (**58**; m/z 477), Glucoiberin (**60**; m/z 422), Glucoraphanin (**61**; m/z 436), Glucoalyssin (**62**; m/z 450), Glucoibarin (**63**; m/z 478), Glucohirsutin (**64**; m/z 492), Glucobrassicin (**65**; m/z 447) und Glucoerysolin (**66**; m/z 452) auf den internen Standard Sinigrin (**57**; m/z 358) bezogen (Abbildung 77).

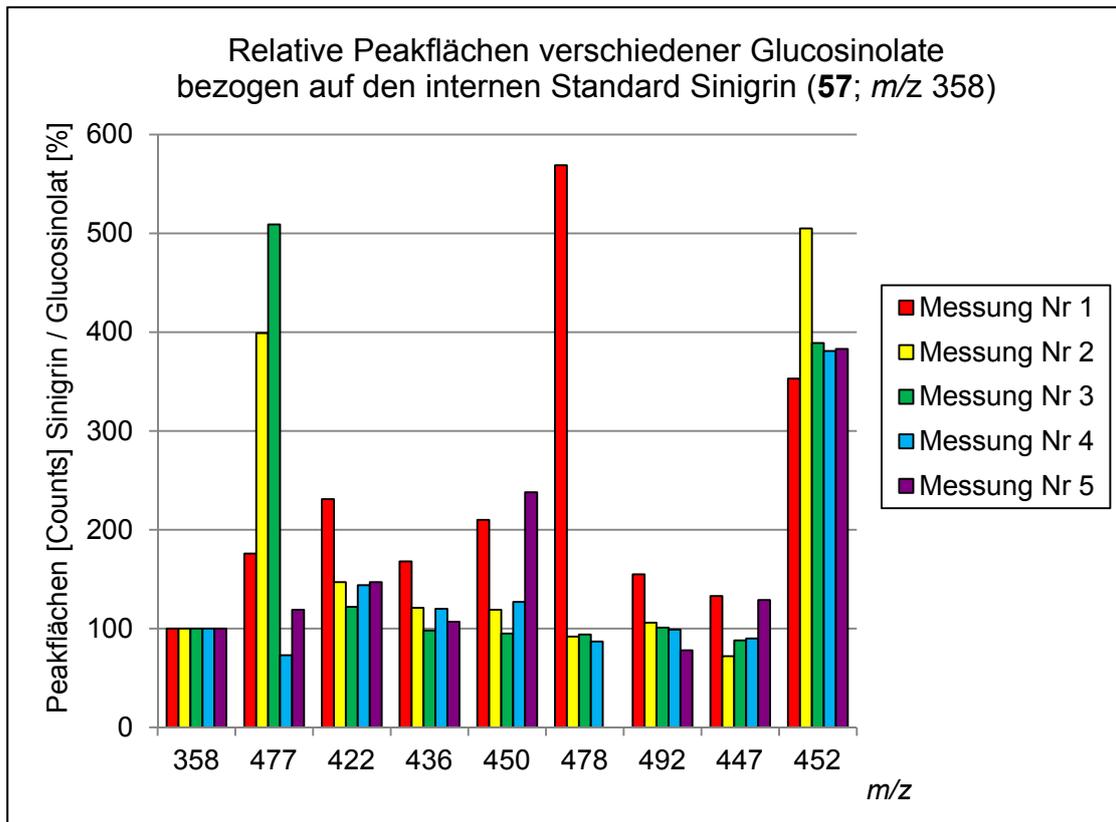


Abbildung 77. Vergleich der relativen Peakflächen von Glucosinolaten nach Mehrfachmessung einer Phloemsaftprobe.

Abbildung 77 zeigt deutlich, dass auch die relativen Peakflächen der Glucosinolate signifikante Variationen aufwiesen, die Standardabweichungen betragen 74% für Methoxyglucobrassicin (**58**; m/z 477), 27% für Glucoiberin (**60**; m/z 422), 22% für Glucoraphanin (**61**; m/z 436), 40% für Glucoalyssin (**62**; m/z 450), 135% für Glucoibarin (**63**; m/z 478), 26% für Glucohirsutin (**64**; m/z 492), 26% für Glucobrassicin (**65**; m/z 447) und 15% für Glucoerysolin (**66**; m/z 452).^[186,187] Die Schwankungen der Peakflächen ließen keinen Trend und keine Systematik erkennen, die eine Betrachtung der Proben als jeweils isoliertes System ermöglicht hätten. Betrachtet man beispielsweise Methoxyglucobrassicin (**58**; m/z 477) und Glucoraphanin (**61**; m/z 436), so weisen diese in

Messung 1 beide ungefähr die gleiche Peakfläche auf, wohingegen sich in Messung 3 die Peakflächen um den Faktor 5 unterscheiden (Abbildung 77).

Reproduzierbarkeit der Peakflächen verschiedener Glucosinolate und des 1-Glycero-1-myo-inositolphosphates (59) bezogen auf den Mittelwert aller Flächen

Zur weiteren Untersuchung der Schwankungen wurde die Zahl der zu detektierenden Glucosinolate gesenkt und die Zahl der durchzuführenden Messungen erhöht. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der gemessenen Peakflächen von Sinigrin (57), Glucoraphanin (61), Glucohirsutin (64), Glucobrassicin (65) und 1-Glycero-1-myo-inositolphosphat (59) der ersten Messung als 100% definiert und die Mittelwerte der Peakflächen aller weiteren Messungen auf den Mittelwert der ersten Messung bezogen (Abbildung 78).^[187] Im Idealfall hätte sich bei jeder Messung ein Mittelwert nahe der 100% sowie eine geringe Standardabweichung ergeben, denn nur dann hätte *jeder* Analyt eine Fläche vergleichbar zur ersten Messung geliefert.

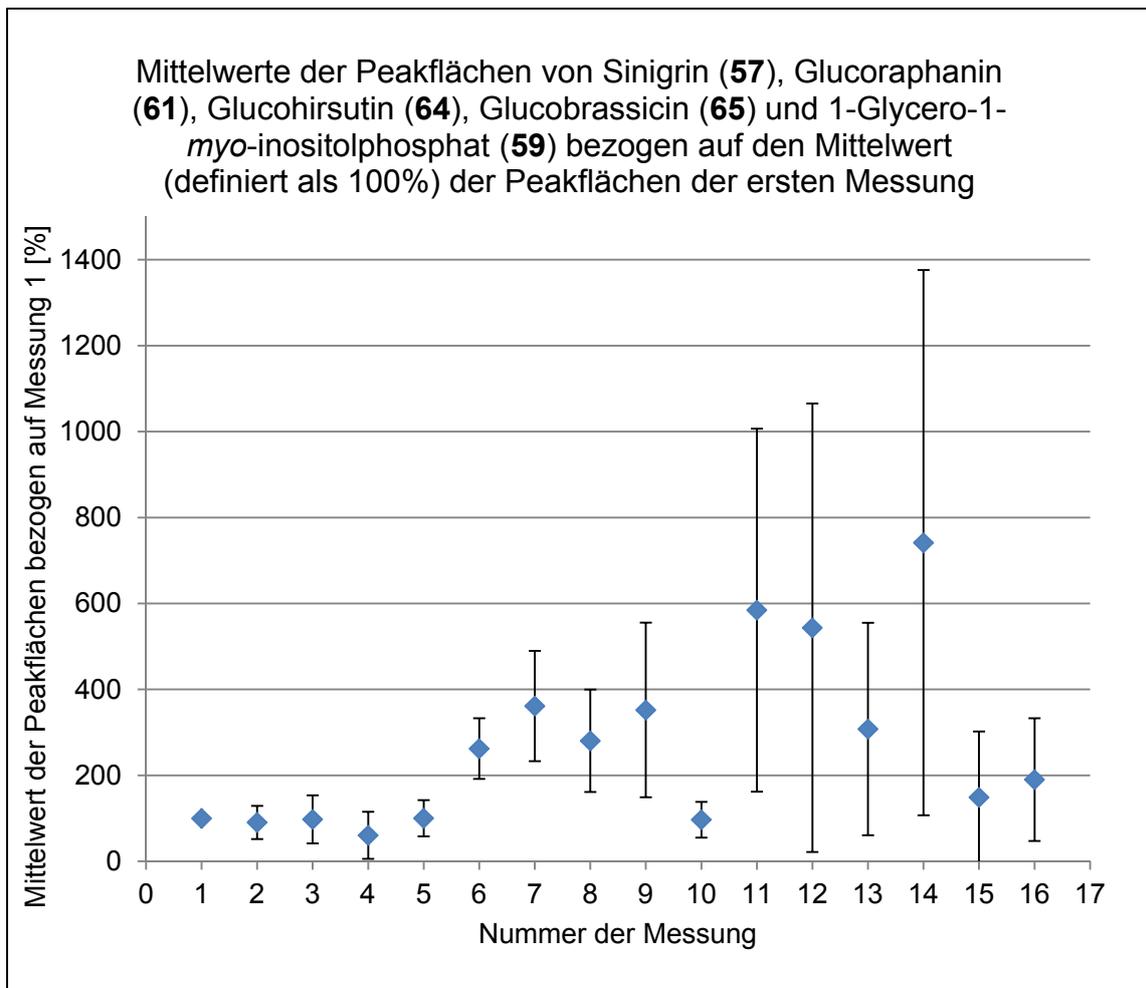


Abbildung 78. Vergleich der relativen Peakflächen von Glucosinolaten und dem 1-Glycero-1-myo-inositolphosphat nach Mehrfachmessung einer Phloemsaft-Probe.

Die Werte der Messungen 2, 3, 5 und 10 liegen zwar sehr nah an 100%, aber die Standardabweichungen von 38.5% (Messung 2), 56.0% (Messung 3), 54.7% (Messung 5) und 41.6% (Messung 10) geben Auskunft über eine hohe Streuung der Peakflächen der einzelnen Analyten, die sich nur durch die Summierung ausgleichen und somit nahe 100% liegen.^[186,187] Während die Werte dieser Messungen auf eine deutliche Schwäche der Reproduzierbarkeit und somit der Analytik hinweisen, sind die Werte der restlichen Messungen als völlig inakzeptabel einzustufen, im Hinblick auf eine Quantifizierung der Analyten. Derartig hohe Schwankungen der Peakflächen in ein- und derselben Probe schließen eine vergleichende Gehaltsbestimmung der detektierten Analyten, in diesem Fall der Glucosinolate, aus.

Trotz dieser elementaren Schwächen der Analytik sollte die Infiltration von *Arabidopsis thaliana* mit $MgCl_2$ zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden, da eine qualitative Bestimmung der Glucosinolate in den Phloemsäften nicht ausgeschlossen war.

4.2.2 Detektion von Glucosinolaten in Phloemsaft-Exsudaten von *A. thaliana* in Abhängigkeit von der Zeit nach Infiltration mit $MgCl_2$

4.2.2.1 Zielsetzung

Wie bereits zu Beginn von Kapitel 4.2 aufgeführt sollte untersucht werden, ob die Glucosinolate, die in den Phloemsaften von infiltrierten *A.-thaliana*-Blättern detektiert worden waren, nur aufgrund der mechanischen Reizung durch die Infiltration ausgeschüttet worden waren, oder ob auch Glucosinolate zur globalen Signaltransmission ausgesendet worden waren. Sollte dies der Fall sein, so müssten die Glucosinolate (oder zumindest einige davon) auch in den nicht-infiltrierten Blättern der Pflanze zu finden sein. Zudem sollte das Glucosinolat-Muster in den infiltrierten und nicht-infiltrierten Blättern über einen Zeitraum von 48 h variieren, je nachdem ob die Immunantwort der Pflanze aus aktiver oder abgeklungener lokaler Abwehr, aktiver oder abgeklungener globaler Abwehr (*de-novo*-Biosynthese), oder aus einer Kombination dieser beiden Faktoren besteht. Deshalb sollten die infiltrierten und die nicht-infiltrierten Blätter über einen Zeitraum von 0 bis 48 h (0, 0.5, 4, 24 und 48 h) parallel gesammelt werden. Diese Experimente sollten zunächst mit dem Infiltrat Magnesiumchlorid durchgeführt werden und bei erfolgreicher Durchführung im Anschluss mit den virulenten und avirulenten *Pseudomonas*-Stämmen.

Im Idealfall erwartete man in diesem Zeitraum folgende Verteilung und Konzentration der Glucosinolate (GLS) in den Phloemsaft-Exsudaten:

Tabelle 3. Theoretische (erwartete) Verteilung der Glucosinolate (GLS) in den Phloemsaft-Exsudaten von *A.-thaliana*-Blättern nach Infiltration mit $MgCl_2$.

Zeitpunkt	Infiltrierte Blätter	Nicht-infiltrierte Blätter	Erläuterung
0 h	Hohe GLS-Konzentration, viele verschiedene GLS	Keine GLS oder einige wenige GLS	Ausschüttung der GLS als Teil der lokalen Abwehr, globale Abwehr ist noch nicht oder wenig aktiv
0.5 h	Hohe GLS-Konzentration, viele verschiedene GLS	Einige, wenige GLS	Ausschüttung der GLS als Teil der lokalen Abwehr, Entsendung von GLS als Teil der globalen Abwehr
4 h	Hohe GLS-Konzentration, viele verschiedene GLS	Hohe GLS-Konzentration, viele verschiedene GLS	Lokale und globale Abwehr (<i>de-novo</i> -Biosynthese) sind aktiv
24 h	Mittlere GLS-Konzentration, viele verschiedene GLS	Mittlere GLS-Konzentration, viele verschiedene GLS	Lokale und globale Abwehr klingen langsam ab
48 h	Keine GLS	Keine GLS	Lokale und globale Abwehr sind inaktiv

4.2.2.2 Modifikation der Schnittmethodik

In den vorangegangenen Phloemsammlungen waren die *A.-thaliana*-Blätter mit einer chirurgischen Schere von den Pflanzen geschnitten, in die Sammelvorrichtung transferiert und in der Sammelösung unter Luftausschluss nochmals abgeschnitten worden.^[45,171] Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit dieser Methodik jedoch keine erfolgreichen Phloemsammlungen durchgeführt werden, in den Sammelösungen ließen sich nie Phloembestandteile nachweisen. Vermutlich war die verwendete Schere bereits abgestumpft und die Blattstiele wurden beim Abschneiden gequetscht, sodass das Phloem beim Schneiden verschlossen wurde.

Deshalb wurde in dieser Arbeit die "Rasierklingen-Methodik" angewendet, die bereits in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben ist: die Blätter wurden mit einer Rasierklinge von den *Arabidopsis*-Pflanzen geschnitten, in eine Schale mit Wasser und EGTA-Sammelösung (1:1, v/v) transferiert, in der Lösung unter der Oberfläche nochmals abgeschnitten und mit einem Tropfen am Stiel in ein Eppendorf-Cap mit EGTA-Sammelösung überführt. In diesem Eppendorf-Cap wurden die Blätter zur Sammelvorrichtung transportiert und, ebenfalls wieder mit einem Tropfen am Stiel, vorsichtig in die Sammelvorrichtung mit EGTA-Lösung gestellt (Abbildung 79). Somit wurde die Callose-Bildung am Stiel verhindert, die durch Luft oder das Quetschen der Stiele induziert wird und das Phloem verschließt. Für jede Phloemsammlung wurde eine neue Rasierklinge verwendet. Die erfolgreiche Funktionsweise dieser Methodik wurde durch den Nachweis von Photosynthese-Produkten aus *A.-thaliana*-Blättern mehrfach überprüft (Kapitel 4.2.1.2).

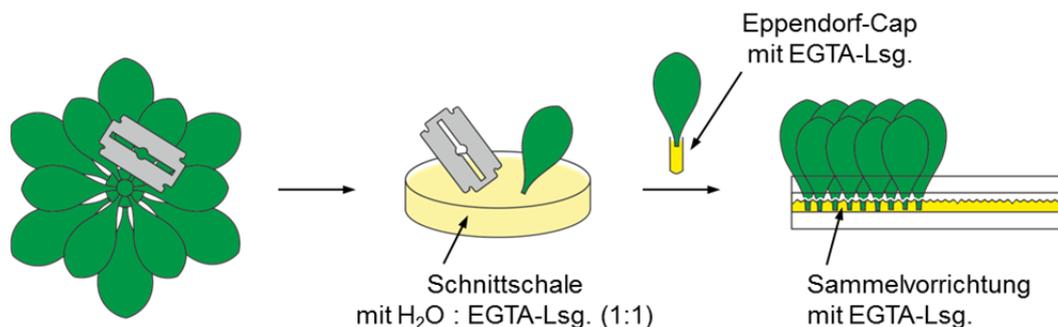


Abbildung 79. Schnittmethodik für die Sammlung von Phloem-Exsudaten aus *A.-thaliana*-Blättern.

4.2.2.3 Ausführliche Beschreibung der Prozedur zur Sammlung von Phloemsaft-Exsudaten aus *A.-thaliana*-Blättern nach Infiltration mit $MgCl_2$

Zur Phloemsammlung wurden je zehn ca. drei Monate alte *A.-thaliana*-Pflanzen (Columbia-0; Zucht im Gewächshaus) verwendet, mit möglichst großen und kräftigen Blättern. Vor der Infiltration, bei welcher Magnesiumchlorid (10 mM) in die Stomata an der Blattunterseite injiziert wurde (Abbildung 66; Kapitel 4.1.3), wurden die Pflanzen ca. 0.5 h Stunden lang zur Öffnung der Stomata unter eine Folie gestellt. Anschließend wurden fünf bis sechs Blätter pro Pflanze zu ca. 2/3 mit Magnesiumchlorid infiltriert und diese zusätzlich mit einem Stift markiert (Abbildung 80). Nach der Infiltration wurden die Pflanzen für die Probennahme nach 0.5 h und 4 h in eine belichtete und CO_2 -gesättigte Kammer gestellt und bis zur Phloemsammlung darin aufbewahrt. Die Pflanzen für die Probennahme nach 24 h und 48 h wurden bei einem Kurztages-Rhythmus (8 h Licht, 16 h Dunkel) in einem klimatisierten Phytotron (22 °C) bis zur Sammlung untergebracht. 4 h vor der Phloemsammlung wurden sie in die CO_2 -Kammer gestellt. Zur Phloemsammlung wurden die infiltrierten und die nicht-infiltrierten Blätter *gleichzeitig* (Versuchsdurchführung zu zwei Personen)^[184] wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben von den Pflanzen geschnitten und in getrennte Sammelvorrichtungen gestellt (Abbildung 80). Bei den Experimenten mit der Probennahme nach 0 h wurden die Blätter direkt nach der Infiltration der Pflanze abgeschnitten und gesammelt.

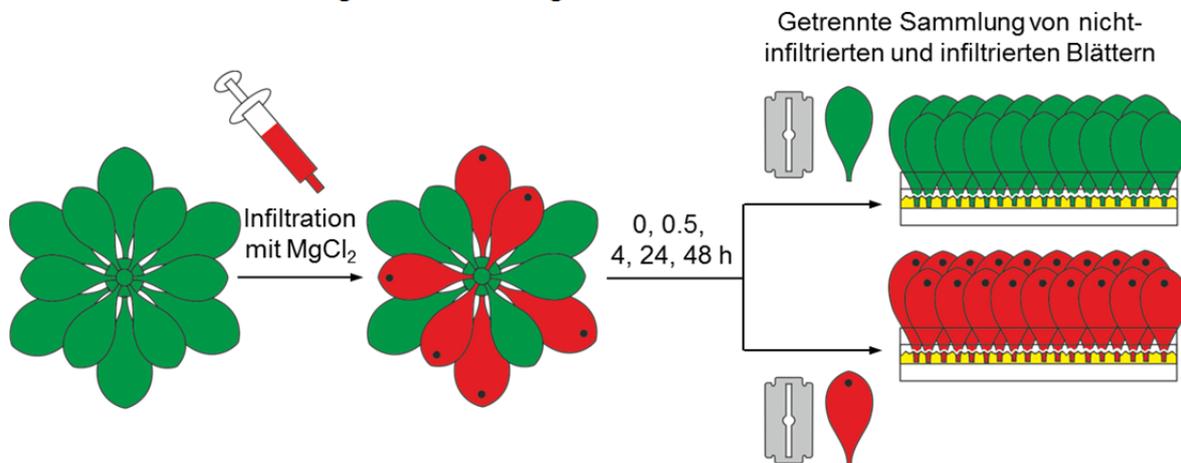


Abbildung 80. Prozedur zur Sammlung von Phloemsaft-Exsudaten aus *A.-thaliana*-Blättern nach Infiltration mit $MgCl_2$

Nachdem alle Blätter der Sammlung in den Sammelvorrichtungen standen, wurde die Flüssigkeit in der Sammelrinne herausgespült und durch frische ersetzt. Anschließend wurden die Blätter in beiden Sammelvorrichtungen zum Ausbluten 1.5 h lang bei Belichtung in die CO₂-Kammer gestellt (Abbildung 81).

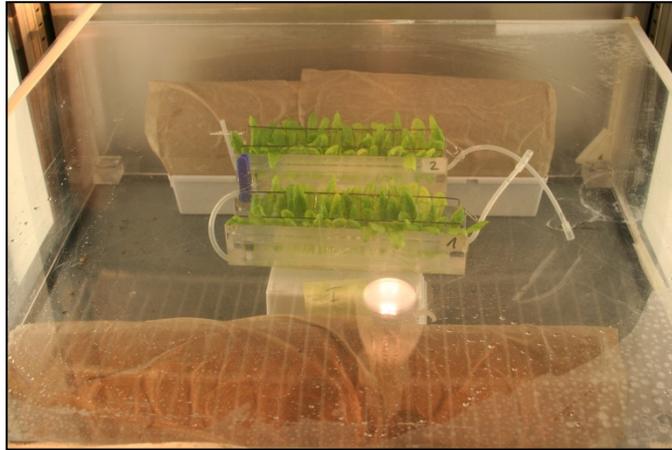


Abbildung 81. Belichtete CO₂-Kammer mit zwei Sammelvorrichtungen.

Nach 1.5 h wurde die Sammel Flüssigkeit vorsichtig mit einer Spritze aufgesogen und durch einen Spritzenvorsatzfilter (PTFE, 0.45 µm) filtriert. Die Rinne mit den Blattstielen wurde erneut mit 2 – 3 mL Wasser befüllt, die anschließend zum Nachspülen des Filters verwendet wurden. Die gesammelten Flüssigkeiten wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, lyophilisiert und bis zur Vermessung mittels CZE-ESI-oTOF-MS bei -20 °C in Eppendorf-Caps aufbewahrt.

4.2.2.4 Detektierte Glucosinolate in Phloemsaft-Exsudaten von *A.-thaliana*-Blättern

0, 0.5, 4, 24 und 48 h nach Infiltration mit $MgCl_2$

Um die Glucosinolat-Profile der infiltrierten und nicht-infiltrierten *A.thaliana*-Blätter zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infiltration mit Magnesiumchlorid zu vergleichen, wurden von jedem Sammelzeitpunkt je sechs Phloemexsudat-Proben generiert. Zusätzlich wurden sechs Proben von nicht-infiltrierten Pflanzen angefertigt, in denen man nur das ubiquitäre Glucosinolat Methoxyglucobrassicin (**58**) erwartete.^[171]

Bei den ersten CZE-ESI-oTOF-MS-Messungen der Phloemexsudate waren jedoch nur in wenigen Proben überhaupt Glucosinolate detektierbar. Da die Messungen wie in Kapitel 4.2.1.3 beschrieben einen hohen Aufwand für den Durchführenden und eine starke Matrixbelastung für die Geräte bedeuteten, verlegte man sich darauf, zuerst alle Proben von infiltrierten *A.-thaliana*-Blättern zu messen, da man hier das höhere Glucosinolat-Aufkommen erwartete. Waren im Exsudat der infiltrierten Blätter Glucosinolate detektierbar, so wurde die korrespondierende Probe aus den nicht-infiltrierten *A.-thaliana*-Blättern ebenfalls vermessen. In Tabelle 4 sind alle generierten Proben aufgeführt, die gemessenen Proben sind fett markiert, Phloemexsudate in denen Glucosinolate detektiert werden konnten, sind grün eingefärbt.

Tabelle 4. Proben der Phloemsammlung aus *A.-thaliana*-Blättern; mit CZE-ESI-oTOF-MS gemessene Proben sind fett markiert, Glucosinolat-haltige sind grün eingefärbt.

Keine	Infiltrations-Zeitpunkt									
	0 h		0.5 h		4 h		24 h		48 h	
	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

I: Phloemsaft-Probe aus *A.-thaliana*-Blättern, welche mit $MgCl_2$ (10 mM) infiltriert wurden.

NI: Phloemsaft-Probe aus *A.-thaliana*-Blättern, welche nicht mit $MgCl_2$ (10 mM) infiltriert wurden, welche sich aber in Nachbarschaft zu infiltrierten Blättern befanden.

Tabelle 4 ist zu entnehmen, dass nur 33.7% der untersuchten Phloemexsudate aus mit Magnesiumchlorid infiltrierten *A.-thaliana*-Blättern die Präsenz von Glucosinolaten zeigten. Zudem waren die detektierten Glucosinolate – Sinigrin (**57**; interner Standard), Methoxyglucobrassicin (**58**), Glucoraphanin (**61**), Glucoibarin (**63**), Glucohirsutin (**64**) und Glucoerysolin (**66**) – nicht in allen Proben vorhanden (Abbildung 82 und 80).^[185]

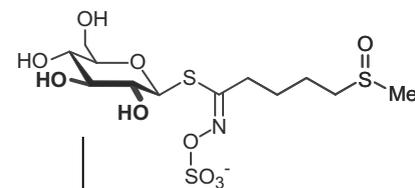
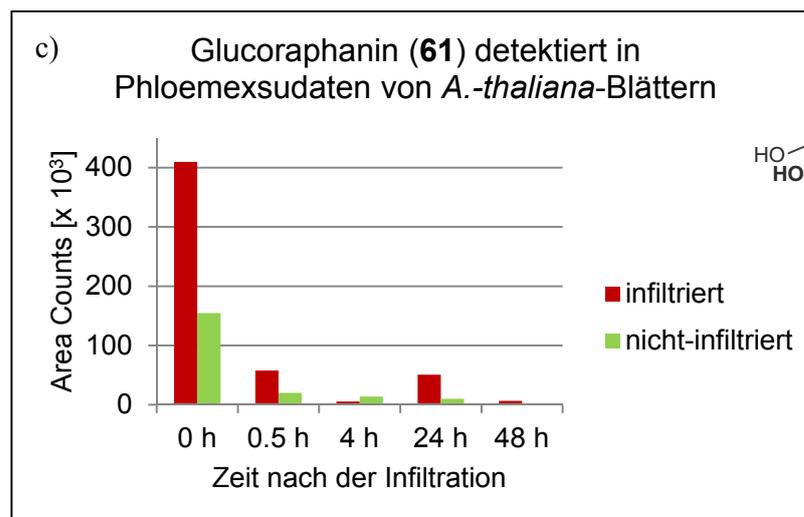
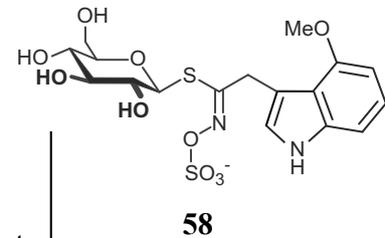
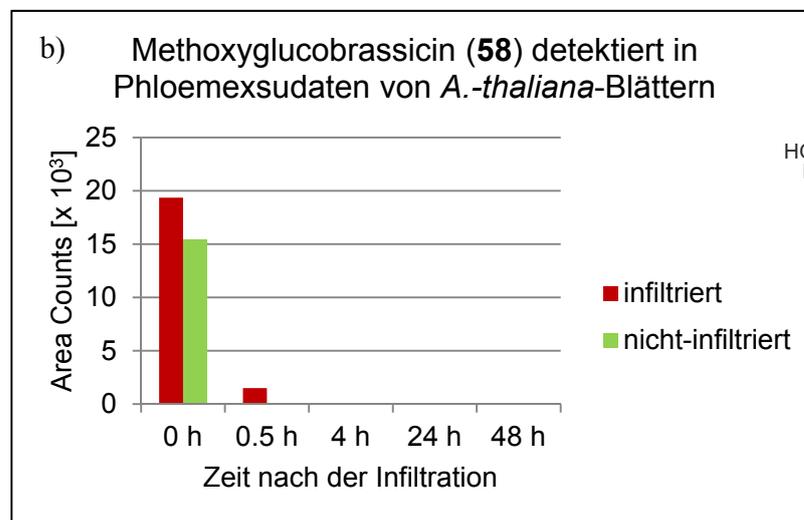
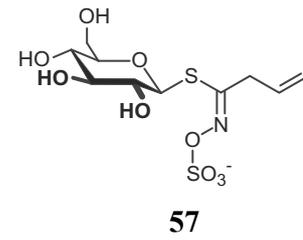
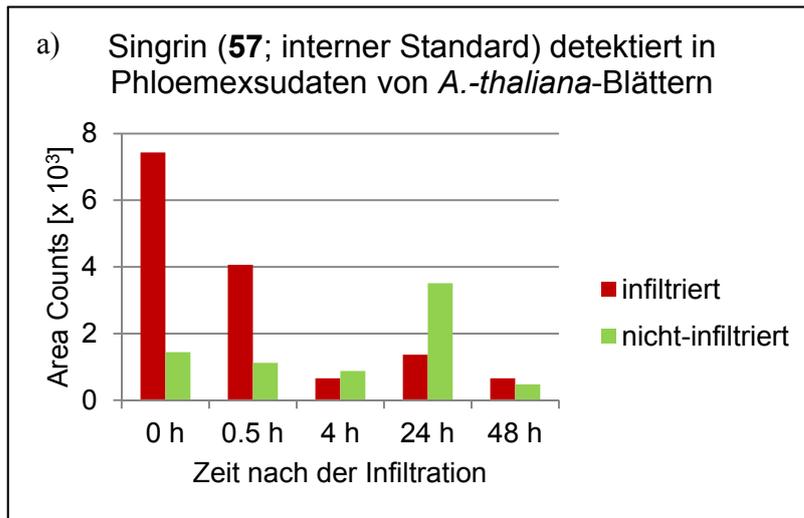


Abbildung 82. Qualitative Bestimmung von Glucosinolaten in Phloemexsudaten von *A.-thaliana*-Blättern nach Infiltration mit $MgCl_2$ (10 mM): a) Singrin (**57**; interner Standard); b) Methoxyglucobrassicin (**58**); und c) Glucoraphanin (**61**).

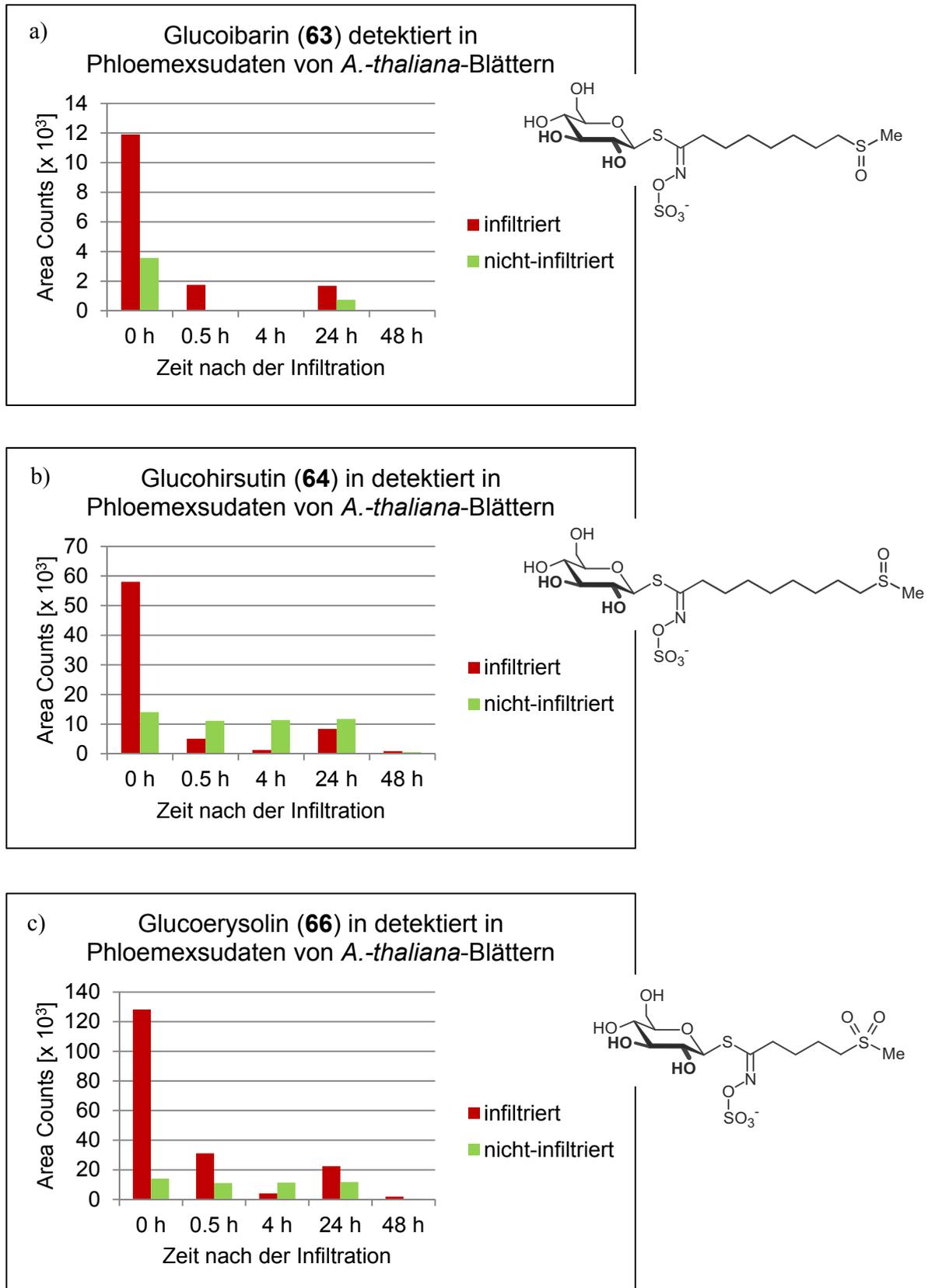


Abbildung 83. Qualitative Bestimmung von Glucosinolaten in Phloemexsudaten von *A.-thaliana*-Blättern nach Infiltration mit $MgCl_2$ (10 mM): a) Glucoibarin (**63**); b) Glucohirsutin (**64**); und c) Glucoerysolin (**66**).

Betrachtet man die in den infiltrierte und nicht-infiltrierte Blättern gemessenen Glucosinolate in Abhängigkeit der Zeit nach der Infiltration, so ergeben sich die in Abbildung 84 gezeigten Verläufe.

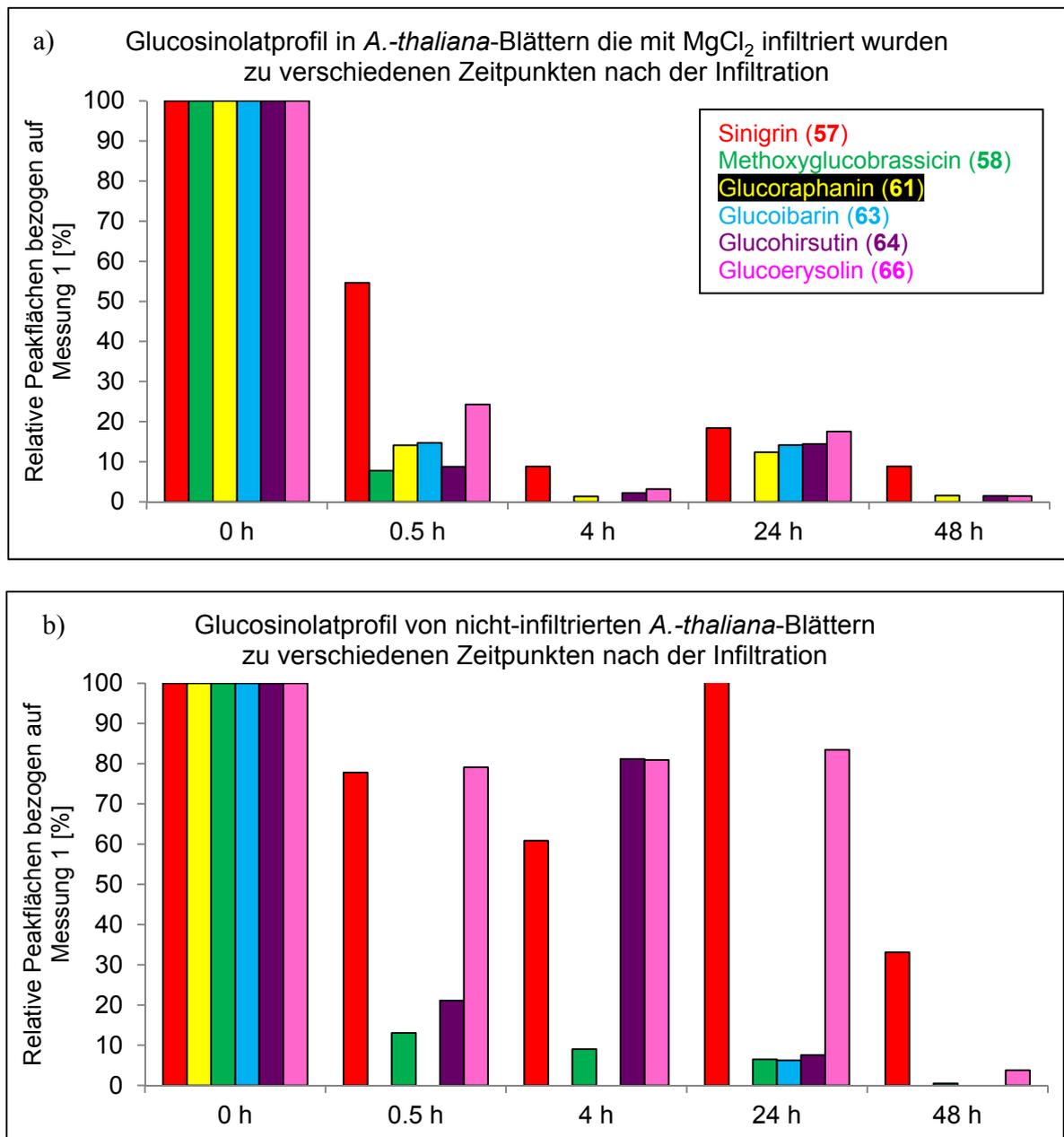


Abbildung 84. Mittels CZE-ESI-oTOF-MS detektierte Glucosinolate in Phloemsaft-Exsudaten von *A.-thaliana*-Blättern zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infiltration mit $MgCl_2$: a) infiltrierte Blätter; und b) nicht-infiltrierte Blätter.

Auch anhand dieser Darstellung lassen sich keine Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der Glucosinolate und dem Infiltrationszeitpunkt herstellen. Zwar zeigten die Proben der infiltrierte Blätter zum Zeitpunkt 0 das höchste Aufkommen an Glucosinolaten, gemäß der vorherigen Ergebnisse hätte sich dieses Muster aber auch nach 0.5 h und 4 h finden müssen. Bei den Proben der nicht-infiltrierte Blätter zeigte einzig

Glucosylolin (**66**) einen erwarteten Verlauf, dieser wäre aber nur im Vergleich mit den infiltrierten Blättern aussagekräftig.

Zusätzlich zu der Tatsache, dass überhaupt nur 19.4% der infiltrierten Proben Glucosinolate aufwiesen, war bei den vermessenen Proben auffällig, dass nur wenige Glucosinolate detektiert werden konnten. Deshalb wurden verschiedene Parameter der Phloemsammlung variiert, die bei fehlerhafter Ausführung zu einem Verlust an Glucosinolaten hätten führen können (Tabelle 5).

Tabelle 5. Variation verschiedener Parameter der Phloemsammlung aus *A.-thaliana*-Blättern nach Infiltration mit MgCl₂ zur Überprüfung, ob diese die Ursache für das geringe Glucosinolat-Aufkommen in den generierten Proben waren.

Mögliche Fehlerquelle	Maßnahme
Die durchführende Person machte systematische Fehler bei der Phloemsammlung, durch das parallele Arbeiten zu zwei Personen konnte nur etwa die Hälfte an Glucosinolaten angereichert werden.	Getrennte Durchführung der Phloemsammlung.
Die Infiltration von 5–6 Blättern pro Pflanze (ca. die Hälfte aller Blätter) bedeutete eine zu große Belastung für die Pflanze, so dass Prozesse wie Photosynthese und Metabolit-Transport nicht mehr stattfinden konnten.	Infiltration von 2–3 Blättern pro Pflanze.
Die Zeit, die zur Sammlung aller Blätter benötigt wurde, war zu lang, sodass sich die meisten Glucosinolate in der verworfenen Lösung befanden, welche durch die Sammellösung während der Zeit des Phloemblutens ausgetauscht wurde.	Auffangen und Eindampfen der EGTA-Lösung, welche sich während der Sammlung der Blätter in der Sammelvorrichtung befand.
Die Lösung, in welcher die Blattstiele unter Luftausschluss abgeschnitten wurden, war eine Mischung aus H ₂ O/EGTA (1:1, v/v), während die Lösung zum Bluten aus reiner EGTA-Lösung bestand. Möglicherweise war die EGTA-Konzentration in der Schnittlösung zu gering, um das Phloem offenzuhalten.	Verwendung von reiner EGTA-Lösung als Schnittlösung.
Beim Filtrieren der Sammellösung nach dem Ausbluten der Blätter blieben die Glucosinolate im Filter hängen.	Keine Filtration der Sammellösung nach dem Ausbluten der Blätter.
Die Lyophilisierung der Sammellösung bis zur Trockene führte zur Zersetzung der Glucosinolate.	Keine Lyophilisierung bis zur Trockene.

Es ließen sich jedoch in keiner der Proben, die gemäß der in Tabelle 5 genannten Maßnahmen angefertigt wurden, Glucosinolate detektieren.^[185]

Da keine (weiteren) Fehlerquellen gefunden werden konnten, welche die erhaltenen Ergebnisse erklärt oder beeinflusst haben könnten, wurden die Experimente an dieser Stelle beendet.

Die Ursache für die mangelhafte Detektion der Glucosinolate in den Phloemsäften liegt vermutlich in verschiedenen Faktoren begründet.

Die *Arabidopsis*-Pflanzen, die man im Rahmen dieser Arbeit für die Phloemsammlung verwendet hatte, waren im Gewächshaus gezüchtet worden, während die Pflanzen in den vorherigen Experimenten in einer klimatisierten Zuchtkammer mit definierten Licht- und Dunkelverhältnissen gewachsen waren. Dies hat vor allem Einfluss auf die Blätter, welche in der Zuchtkammer dunkelgrün und kräftig wachsen, wohingegen sie im Gewächshaus heller und dünner sind. Vor allem die Blattstiele, die für die Phloemsammlung möglichst kurz, breit und robust sein sollten, werden bei im Gewächshaus gezüchteten Pflanzen eher lang und dünn.

Zudem ist und bleibt die Matrix der Phloemsammlung inkompatibel mit der Kapillarzonenelektrophorese. Diese Tatsache ist gut am internen Standard abzulesen, der bei aufeinanderfolgenden Messungen derselben Probe eine Peakflächenvariation von knapp 100% zeigte (Abbildung 76). Zwar konnte die Methodik durch den Einsatz von EGTA anstatt von EDTA sowie der Re-Konditionierung der Kapillare nach jeder Messung verbessert werden, es traten jedoch häufig Probleme mit der Stabilität des Stromflusses auf, vermutlich hervorgerufen durch die hohe Viskosität der Proben. Bedingt durch die Herstellung der EGTA-Sammellösung enthielt jede "Charge" einen anderen Gehalt an Salzen, welche wiederum den Gehalt an Sorbitol bei Einstellung der Osmolarität diktierten. Somit verursachte die Matrix nicht nur Probleme durch Interaktion mit der Kapillare, sondern sie schuf zusätzlich nicht-vergleichbare Bedingungen in den Proben, was an der hohen Variation der Peakflächen bei Mehrfachmessung derselben Probe gut zu beobachten und festzustellen war (Abbildung 78).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die modifizierte Prozedur zur Sammlung von Phloemsäften geeignet ist, sofern kräftige und vitale *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen verfügbar sind. Die Vermessung der Phloemsaft-Exsudate sollte eher durch Kopplung einer HPLC mit einem hochauflösenden Massenspektrometer erfolgen, da die HPLC weniger anfällig gegenüber Matrixeffekten ist, die durch die Proben verursacht werden. Die verbesserte CZE-ESI-oTOF-MS-Methode kann als Glucosinolat- oder Sulfat-selektive Analytik eingesetzt werden, sofern die Proben in einer Kapillarzonenelektrophorese-kompatiblen Matrix vorliegen, wie zum Beispiel in einem wässrig-organischen Extrakt.

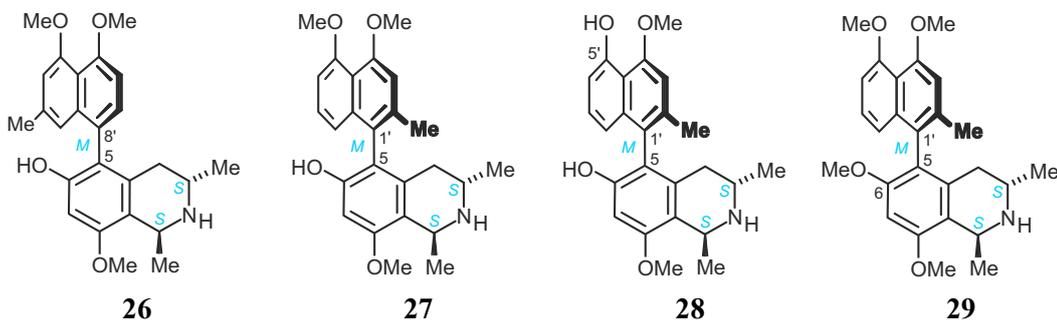
5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Produktion von Abwehr-, Signal- und Botenstoffen sichert vielen Pflanzen und Mikroorganismen das Überleben in einer sich ständig wandelnden Umwelt mit zahlreichen Konkurrenten und Feinden. Diese Sekundärmetabolite können oft medikamentös gegen Pathogene eingesetzt werden, die den Menschen befallen und Krankheiten verursachen. Die Herausforderung besteht dabei in der selektiven und sensitiven Detektion, der schonenden Isolierung und der richtigen und kompletten Strukturaufklärung dieser Moleküle, sowie der eventuellen synthetischen Modifikation, um eine bessere Verträglichkeit oder Wirkung für den menschlichen Körper zu erreichen. Leistungsfähige chromatographische Instrumente zur Trennung wie HPLC und CZE, empfindliche Detektoren wie UV- und Massenspektrometer, sowie aussagekräftige Messverfahren zur Charakterisierung struktureller Merkmale wie NMR- und CD-Spektroskopie und quantenchemische Rechnungen sind dabei von essentieller Bedeutung.

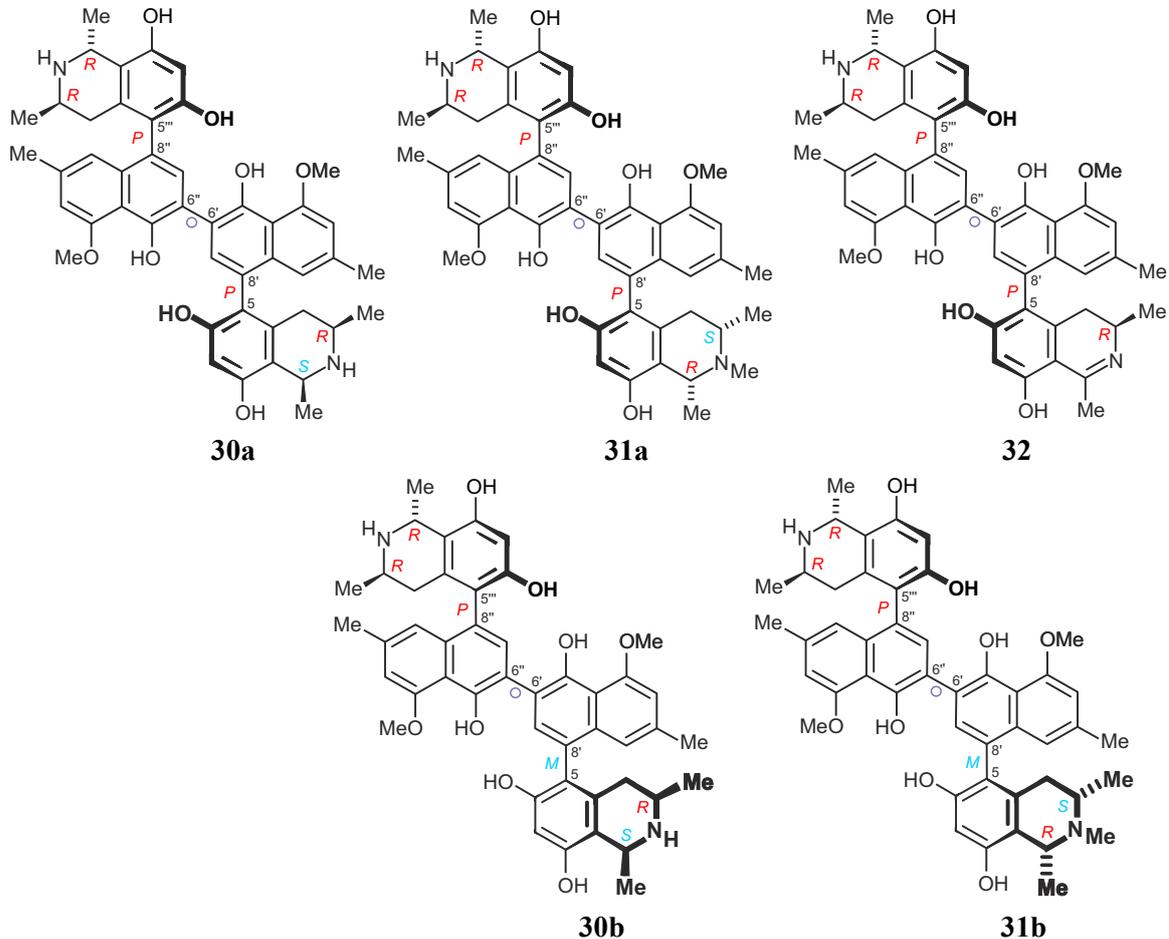
Mit diesen – und weiteren – Methoden gelang in der vorliegenden Arbeit die Detektion, Isolierung und Strukturaufklärung neuer Naphthylisochinolin-Alkaloide aus zwei tropischen *Ancistrocladus*-Lianen, die Charakterisierung von bekannten und neuen Polyketiden aus einem Pilz der Gattung *Streptomyces*, sowie die Analyse von Glucosinolaten im Phloensaft der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*.

Im Detail wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Naphthylisochinoline Ancistrobrevin B (**26**), Hamatin (**27**), 5'-O-Demethylhamatin (**28**) und 6-O-Methylhamatin (**29**) wurden erstmalig aus der *Ancistrocladus*-Art *A. congolensis* isoliert.



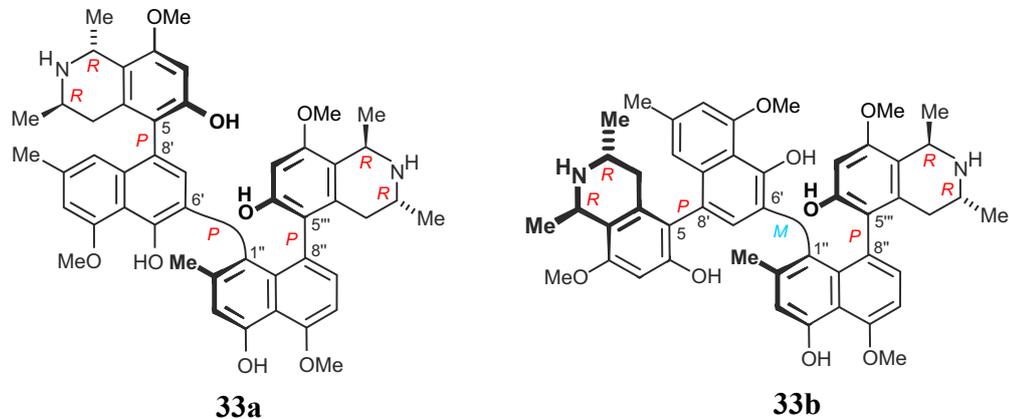
- Neben den bekannten Dimeren Michellamin A (**9a**) und B (**9b**) wurden die neuen Vertreter Michellamin A₂ (**30a**), A₃ (**31a**), A₄ (**32**), B₂ (**30b**) und B₃ (**31b**) aus *A. congolensis* isoliert.



Damit ist *A. congolensis* die erste *Ancistrocladus*-Art, aus der sieben dimere Naphthylisochinoline isoliert wurden. Des Weiteren ist die strukturelle Beschaffenheit der Dimere von Interesse, denn alle sieben Verbindungen enthalten eine konservierte 'nord-westliche' Korupensamin-A-Hälfte, die mit einer weiteren, mindestens konfigurativ – oder sogar konstitutionell – verschiedenen Korupensamin-Hälfte verknüpft ist. Somit produziert *A. congolensis* nicht nur Naphthylisochinoline vom *Ancistrocladaceae*- und vom *Dioncophyllaceae* / *Ancistrocladaceae*-Hybrid-Typ, sondern sogar Alkaloide, die beide Typen vereinen.

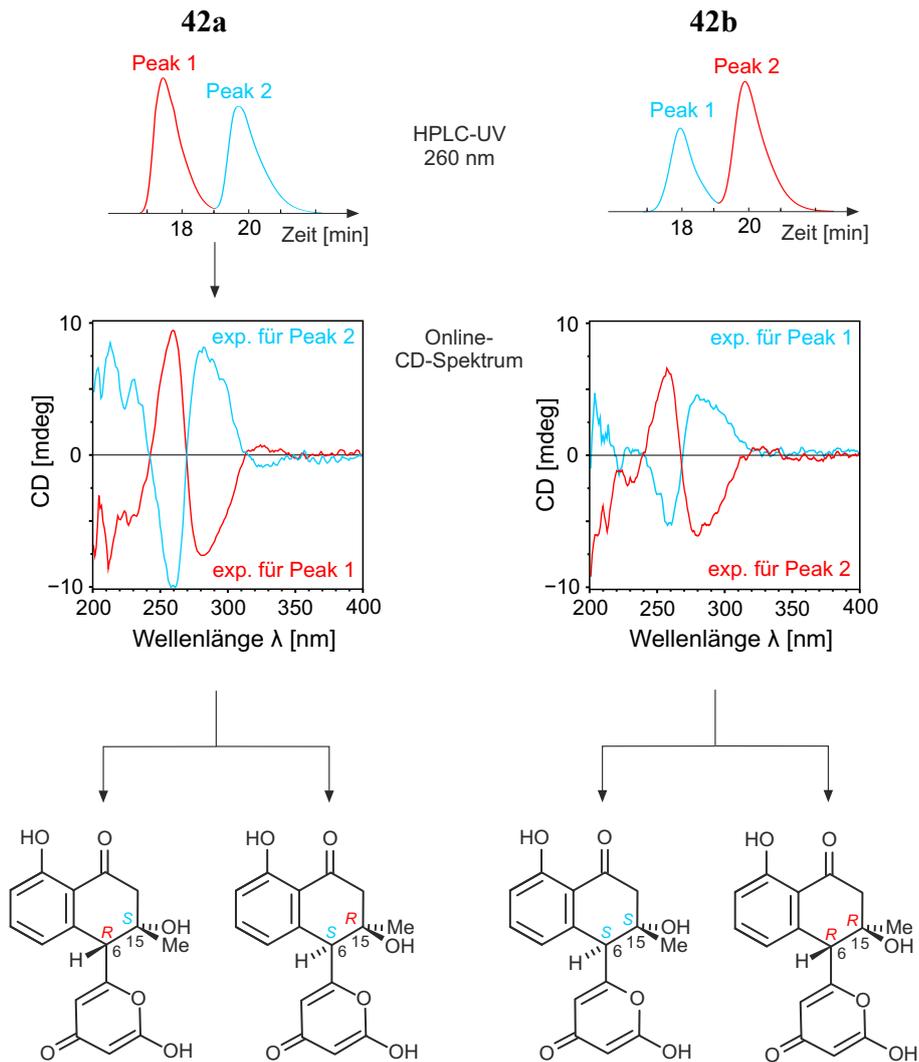
Die neuen Dimere Michellamin A₂ (**30a**), Michellamin A₃ (**31a**), und Michellamin A₄ (**32**) zeigten antiretrovirale Bioaktivitäten im Bereich von 15.8–30.0 μM, bei Michellamin B₃ (**31b**) konnte keine HIV-Inhibition beobachtet werden. Von Michellamin B₂ (**30b**) war nicht ausreichend Material für die Testungen vorhanden.

- Aus der bislang botanisch noch unbeschriebenen Art *Ancistrocladus* spec. 032, die 2008 in der Demokratischen Republik Kongo nahe der Stadt Mbandaka gesammelt worden war, wurden in Kooperation mit B. K. Lombe die neuartigen Naphthylisochinolin-Dimere Mbandakamin A (**33a**) und B (**33b**) isoliert.

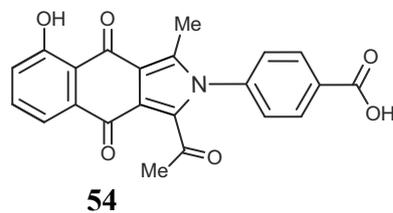


Die einzigartigen Eigenschaften von Mbandakamin A (**33a**) und B (**33b**) – die unsymmetrische Kupplung der Naphthylisochinolin-Hälften in der *peri*-Position, welche die höchste aus Naphthylisochinolin-Alkaloiden bekannte sterische Hinderung der zentralen Achse verursacht, die spiegelbildlichen CD-Spektren durch die entgegengesetzte Achsenkonfiguration in der Mitte der Moleküle, sowie die vielversprechenden Bioaktivitäten gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* – machen die Moleküle zu faszinierenden Verbindungen, deren Synthese und Modifikation lohnenswert erscheint. Ebenfalls empfehlenswert ist die Untersuchung von *Ancistrocladus* spec. 032 sowie den anderen *Ancistrocladus*-Exemplaren, die rund um die Stadt Mbandaka gesammelt wurden, auf weitere Naphthylisochinolin-Alkaloide dieses Strukturtyps.

- In Zusammenarbeit mit G. Zhang, Dr. T. Bruhn und F. Witterauf konnte die Absolutkonfiguration des bekannten Polyketidsynthase Shuntproduktes EM18 (**42**) aufgeklärt werden, welches durch P. Jetter aus dem *Streptomyces*-Stamm *Streptomyces* spec. AK 671 isoliert worden war. Dabei gelang die Zuordnung der *unlike*- (**42a**) und der *like*-Konfiguration (**42b**) durch NOE-NMR-Experimente mit verkürzten Mischzeiten, die Zuordnung der Absolutkonfiguration wurde durch den Vergleich der online gemessenen CD-Spektren mit quantenchemischen Rechnungen basierend auf der Exciton-Chirality-Methode erreicht.



- Weitere aus *Streptomyces* spec. AK 671 isolierte Polyketide waren das identifizierte Bhimamycin F (**53**) und die neuen Bhimamycine H (**54**) und I (**55**). Die Bhimamycine zeigten Bioaktivitäten gegen den MRSA-Stamm *Staphylokokkus aureus* und das Enzym Phosphodiesterase 4, welches bei Lungen- und Atemwegserkrankungen eine Rolle spielt.



- Die Prozedur zur Sammlung von Phloemsäften aus *Arabidopsis-thaliana*-Blättern wurde durch Etablierung der "Rasierklingenmethode" sowie durch den Einsatz des Komplexbildners EGTA anstelle von EDTA modifiziert. Im Arbeitskreis von Prof. Neusüß wurde die CZE-ESI-oTOF-MS-Messmethode durch den Zusatz von Ameisensäure zum Sheath Liquid sowie durch die Re-Konditionierung der Kapillare zwischen den Messungen optimiert. Die verbesserten Methodiken könnten – unabhängig voneinander – zur Sammlung von Phloemsäften und zur selektiven Trennung und Detektion von Glucosinolaten oder Sulfaten verwendet werden.

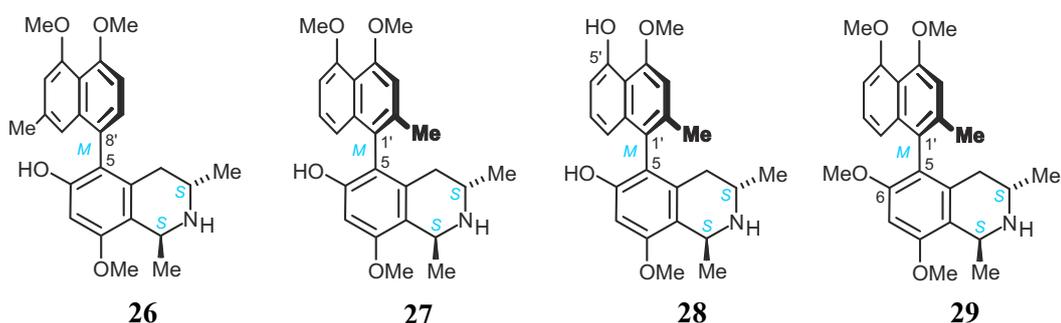
6 SUMMARY

Plants and microorganisms produce a plethora of substrates that ensure immediate and reliable defense and signal transmission processes, to survive in a mostly hostile and rival-dominated environment. These compounds often show pharmacological properties which are beneficial for the human health and/or can help to heal and prevent human diseases that are caused by pathogens. To profit from the favorable effects of the metabolites, it is essential to have a high sensitivity and selectivity for the detection, a smooth isolation procedure, and effective methods that lead to the unequivocal elucidation of the absolute stereostructure, which then can be synthetically modified in order to increase the pharmacological impact and/or the tolerance in the human body. Powerful tools to overcome these challenges are chromatographic instruments for the separation like HPLC and CZE, sensitive detection devices like UV and mass spectrometer, and specialized characterization methods like NMR- and CD spectroscopy and quantum-chemical calculations.

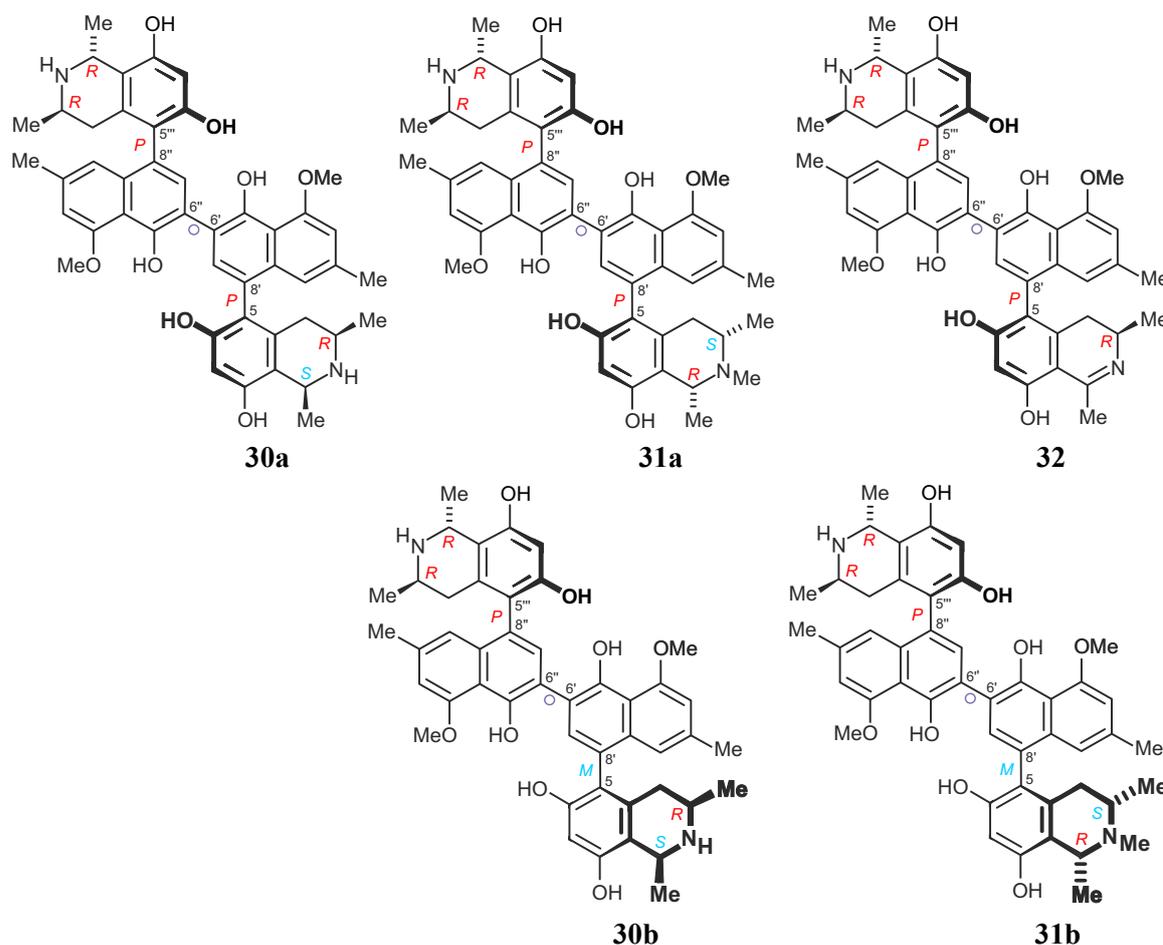
By applying these – and further – analytical and chiroptical methods, the detection, isolation, and structural elucidation of naphthylisoquinoline alkaloids from two tropical *Ancistrocladus* lianas, the characterization of known and new polyketides from a *Streptomyces* strain, and the analysis of glucosinolates in the phloem of the model plant *Arabidopsis thaliana* were achieved within this thesis.

In detail the following results were obtained:

- The naphthylisoquinoline alkaloids ancistrobrevine B (**26**), hamatine (**27**), 5'-*O*-demethylhamatine (**28**), and 6-*O*-methylhamatine (**29**) were isolated for the first time from the *Ancistrocladus* species *A. congolensis*.



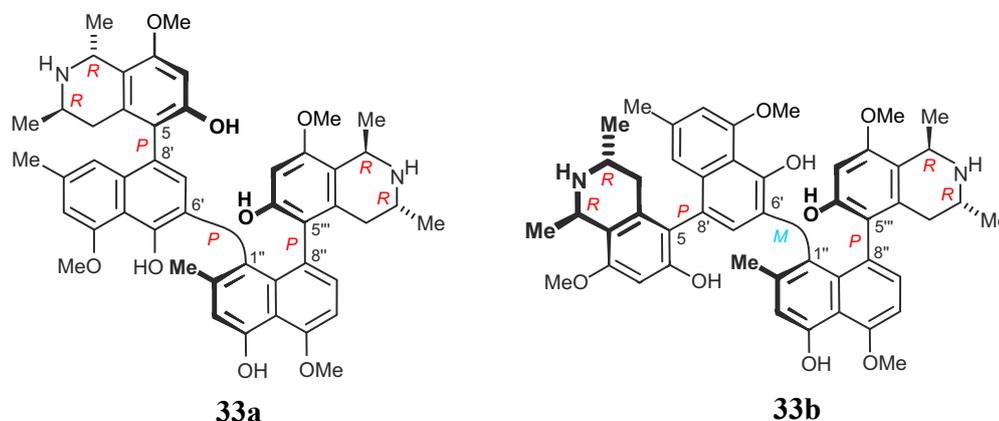
- Besides the known compounds michellamines A (**9a**) and B (**9b**), the new natural products michellamines A₂ (**30a**), A₃ (**31a**), A₄ (**32**), B₂ (**30b**) and B₃ (**31b**) were isolated from *A. congolensis*.



These results make *A. congolensis* the first *Ancistrocladus* species from which seven naphthylisoquinoline dimers were isolated. Furthermore, the structural properties of the isolated dimers – a conserved korupensamine A half in the the 'north-western' part and a configurationally and/or constitutionally different korupensamine half in the 'south-eastern part' – constitute an interesting coupling type. Hence, *A. congolensis* does not only produce naphthylisoquinoline alkaloids belonging to the Ancistrocladaceae- and the Dioncophyllaceae / Ancistrocladaceae hybrid type, but even alkaloids that combine both types.

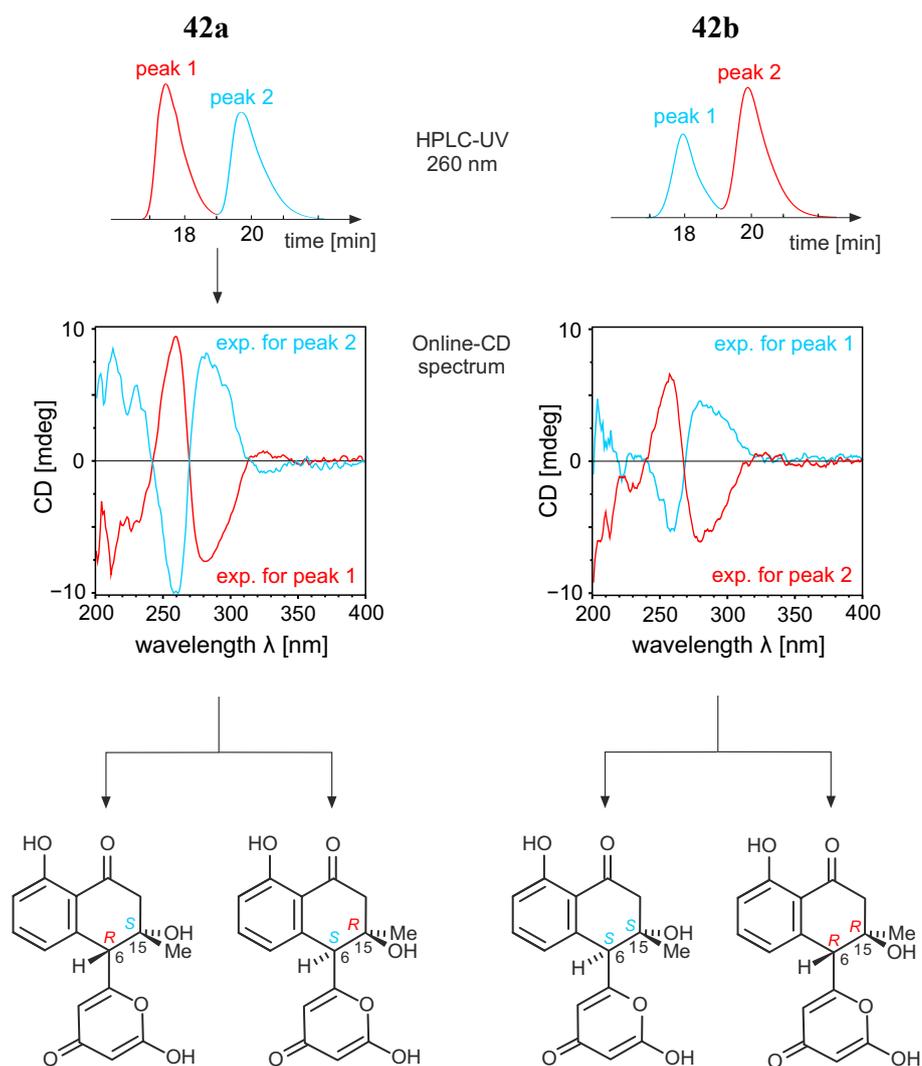
From the new dimers michellamine A₂ (**30a**), michellamine A₃ (**31a**), and michellamine A₄ (**32**) showed similar antiretroviral bioactivities, with IC₅₀'s between 15.8 μM and 30.0 μM. Michellamine B₃ (**31b**) did not exhibit HIV-inhibiting properties, michellamine B₂ (**30b**) was not tested due to lack of material.

- From the botanically as yet undescribed species *Ancistrocladus* spec. 032, which had been collected in the Democratic Republic of the Congo near the town of Mbandaka in 2008, the novel naphthylisoquinoline alkaloid dimers mbandakamine A (**33a**) and B (**33b**) were isolated in cooperation with B. K. Lombe.

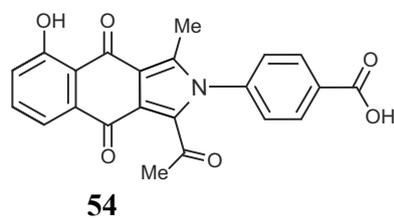


The unique structural properties of mbandakamine A (**33a**) and B (**33b**) – as there are the unsymmetric coupling of the naphthylisoquinoline halves in the *peri*-position creating the highest steric hindrance at a central axis known from any naphthylisoquinoline, the mirror-imaged CD spectra as a consequence of the opposite configurations of the axes in the heart of the molecule, and the promising bioactivities against the Malaria pathogen *Plasmodium falciparum* – make these molecules attractive targets for synthetic preparation and modification. Additionally, the continued search for further compounds from this structural type in *Ancistrocladus* spec. 032 and in other *Ancistrocladus* specimens that were collected around the town of Mbandaka seems promising.

- In cooperation with G. Zhang, Dr. T. Bruhn, and F. Witterauf the absolute configuration of the known polyketidsynthase shunt product EM18 (**42**), which had been isolated by P. Jetter from the *Streptomyces* strain *Streptomyces* spec. AK 671, was elucidated. The attribution of the *unlike*- and the *like* configurations in **42a** and **42b**, respectively, was achieved by NOE-experiments with short mixing times, while the assignment of the absolute configurations was completed by the comparison of the online-CD spectra with those quantum-chemically calculated on the basis of the Exciton Chirality Method.



- Further polyketides isolated from *Streptomyces* spec. AK 671 were the identified bhimamycin F (**53**) and the new compounds bhimamycin H (**54**) and I (**55**). The bhimamycins showed bioactivities against the MRSA strain *Staphylococcus aureus* and the enzyme phosphodiesterase 4, which is involved in diseases of the lung and the respiratory system.



- The procedure for the collection of phloem sap from leaves of *Arabidopsis thaliana* was modified by establishing the "razor blade methodology" and by using EGTA instead of EDTA as the complex-building agent. In the research group of Prof. Neusüß the CZE-ESI-oTOF-MS analytic was improved by adding formic acid to the sheath liquid and by reconditioning the capillary between the measurements. The optimized methods can be applied – independently from one another – for the collection of phloem saps and for the selective separation and detection of glucosinolates or sulfates.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Allgemeine Methoden

7.1.1 Verwendete Apparaturen und Messgeräte

Circulardichroismus-Spektroskopie (CD): Offline-CD-Spektren wurden an einem J-715-Spektropolarimeter (Fa. *Jasco*) aufgenommen und mit der dazugehörigen *Jasco*-Software verarbeitet. Die Scangeschwindigkeit betrug standardmäßig 200 nm min^{-1} bei einer Bandbreite von 1.0 nm sowie einer Antwortzeit von 0.25 s . Die differentiellen Absorptionskoeffizienten $\Delta\epsilon [\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}]$ wurden im jeweils angegebenen Lösungsmittel bei einer gegebenen Wellenlänge $\lambda [\text{nm}]$ bestimmt. Zur Korrektur der gemessenen Spektren wurde jeweils das Spektrum des reinen Lösungsmittels subtrahiert. Die erhaltenen CD-Kurven wurden mit einem Smoothing-Faktor von 5-7 geglättet.

Drehwerte ($[\alpha]_D^{20}$): Zur Drehwert-Bestimmung diente ein Polarimeter P-1020 der Fa. *Jasco*. Die Messungen wurden bei der Wellenlänge der Natrium-D-Line ($\lambda = 589 \text{ nm}$) durchgeführt. Die ermittelten Drehwerte sind in $^\circ$ angegeben.

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

Gefriertrocknung für Eppendorf-Caps: Die wässrigen Proben wurden mit dem Gerät SpeedVac Concentrator SVC100H (*Savant*), angeschlossen an eine vacUubrand-RD-8-Pumpe der Fa. *Brand*, vom Lösungsmittel befreit.

Infrarotspektroskopie (IR): Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit dem Spektrometer FT-IR-410 der Fa. *Jasco*. ' $\tilde{\nu}$ ' bezeichnet die Wellenzahl in cm^{-1} . Die Intensitäten der Absorptionsbanden sind gekennzeichnet durch: s = stark, m = mittel und w = schwach. Alle IR-Spektren wurden bei Raumtemperatur gemessen. Der Analyt wurde dabei in Reinform (Feststoff) mit Hilfe eines ATR-Aufsatzes vermessen.

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$): Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur an den Spektrometern Avance-400 oder DMX-600 (400 bzw. 600 MHz für Protonenspektren und 100 bzw. 150 MHz für ^{13}C -Spektren) der Fa. *Bruker* aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit den Software-Paketen 'Win-NMR' oder 'Topspin' (beide Fa. *Bruker*). Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala angegeben und beziehen sich auf $\delta(\text{TMS}) = 0 \text{ ppm}$. Zur Kalibrierung der ^1H -NMR-Spektren dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der

verwendeten deuterierten Lösungsmittel und bei den ^{13}C -NMR-Spektren die entsprechenden ^{13}C -Resonanzsignale als interner Standard: δ (MeOD) = 3.31 / 49.15 ppm, δ (Aceton) = 2.05 / 29.84 ppm, δ (Pyridin) = 8.72 / 149.9 ppm. Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: Singulett = s, Dublett = d, doppeltes Dublett = dd, Triplett = t, Pseudo-Triplett = pt, Quartett = q, Multiplett = m. Die Angabe der Kopplungskonstanten nJ erfolgt in Hertz (Hz), wobei 'n' die Anzahl der zwischen den Kopplungspartnern liegenden Bindungen angibt.

Massenspektrometrie (MS): Zur Aufnahme von hochaufgelösten Elektrosprayionisations-Massenspektren (ESI) wurde im 'stand-alone'-Betrieb ein orthogonal betriebener 'time-of-flight'-Massendetektor (micrOTOF, Fa. Bruker) verwendet.

In Kopplung mit der HPLC (HPLC-MS mit Agilent-1100-HPLC-System) wurde eine Agilent-Ionenfalle 1100SL (Kapillartemperatur: 210 °C; ESI-Spannung: 3.5–4.0 kV; N_2 als Trägergas) eingesetzt.

Die Glucosinolate wurden mit einem micrOTOF-Q-Gerät (Fa. Bruker Daltonik) an der Hochschule Aalen (Arbeitskreis Prof. Christian Neusüß) vermessen, in Kopplung mit einer Kapillarelektrophorese (s.u.).

Osmometer: Zur Bestimmung und Einstellung der Osmolarität wurde ein two-point-Osmometer VAPRO 5520 (Vapor Pressure Osmometer) von der Firma Wescor eingesetzt.

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

Ultraviolett-Spektroskopie (UV-Vis): Die Messung der UV-Vis-Spektren wurde an den Spektrometern CARY-50-Conc-UVvis oder V570-UV/Vis/NIR der Firmen Varian bzw. Jasco in dem jeweils angegebenen Lösungsmittel bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zentrifuge: Es wurden die DUPont-Geräte Microspin 12S und Sorvall® RC-5B (Kendro Laboratory Products GmbH) eingesetzt.

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

7.1.2 Chromatographische Methoden

HPLC-UV-Kopplung: Die Analyse von Proben mittels HPLC wurde auf einer computergesteuerten Anlage der Firma *Jasco* (Entgasungseinheit DG-2080, Mischer LG-2080, Pumpe PU-2080, Probengeber AS-2050, Diodenarray-Detektor MD-1510, Säulenofen CO-1560) mit dem Programmpaket 'Borwin' durchgeführt. Für die Standardmessungen wurde eine Chromolith-Performance-RP-18-Säule (100 x 4.6 mm, Fa. *Merck*) mit dem Gradienten: H₂O + 0.05% TFA (A) / MeCN (B) + 0.05% TFA, 0 min 10% B, 5 min 50% B, 7 min 97% B, 8 min 97% B, 8.5 min 10% B, 10 min 10% B und einer Flussrate von 3 mL min⁻¹ verwendet. Die präparative Aufreinigung von Extrakten wurde ebenfalls an einer computergesteuerten Anlage der Firma *Jasco* durchgeführt (PU-2087, UV-2077, LC-NetII/ADC), zur Auswertung wurde das Programmpaket 'Chrompass' verwendet. Es wurden entweder eine Chromolith SemiPrep-RP-18-Säule (10 x 100 mm, Fa. *Merck*) oder eine Symmetry-RP-18-Säule (7 µm, 19 x 300 mm, Fa. *Waters*) eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittelsysteme und Gradienten sind in den entsprechenden Kapiteln beschrieben. Die Abkürzung '*t_R*' bezeichnet die Retentionszeit einer Verbindung.

HPLC-MS-Kopplung: Für HPLC-MS-Untersuchungen wurde eine *Agilent-1100-SL*-Ionenfalle an ein *Agilent-1100-HPLC*-System angeschlossen. Die Steuerung der Systeme erfolgte mit der Software *ChemStation (Agilent)*. Zur Vermessung der Proben wurde eine *Symmetry-RP-C₁₈*-Säule (4.6 x 250 mm, 5 µm, Fa. *Waters*) mit dem Gradienten H₂O + 0.1% FA (A) / MeCN (B) + 0.1% FA, 0 min 5% B, 25 min 70% B, 26 min 100% B, 29 min 100% B, 30 min 5% B, 32 min 5% B und einer Flussrate von 0.8 mL min⁻¹ verwendet.

HPLC-CD-Kopplung: Das HPLC-System der Fa. *Jasco* bestand aus einer PU-1580-Pumpe, einem DG-2080-53-Entgaser, einem LG-980-02S-Gradientenmischer, einem AS-2055-Probengeber und einem Diodenarray-Detektor MD-2010. Als CD-Detektor wurde ein J-715-Spektropolarimeter (Fa. *Jasco*) verwendet, das mit einer über ein Motorventil 7010 (Fa. *Besta*) geschalteten 5-mm-Standard-Flusszelle der Fa. *Jasco* betrieben wurde. Säulen, Lösungsmittelsysteme und UV-Messbereich wurden den Analyten entsprechend angepasst und sind in den jeweiligen Kapiteln detailliert beschrieben. Die Messung der Online-CD-Spektren erfolgte im 'stopped-flow'-Modus mit drei bis zehn Akkumulationen im angegebenen Wellenlängenbereich, bei einer Scangeschwindigkeit von 500 nm min⁻¹, einer Antwortzeit von 0.5–1.0 s und einer Bandbreite von 0.5–1.0 nm. Das aus diesen Messungen gemittelte Spektrum wurde durch Subtraktion des CD-Spektrums des jeweiligen Laufmittelgemisches basislinienkorrigiert und mit einem Smoothing-Faktor von 5-7 geglättet.

Kapillarzonenelektrophorese (CZE): Für die kapillarelektrophoretischen Messungen wurde ein G7100A-Gerät der Firma *Agilent* verwendet, die Steuerung erfolgte über die ChemStation-Software (Fa. *Agilent*). Es wurden 75 cm lange fused-silica-Kapillaren von der Fa. *Polymicro Technologies* verwendet, der Innendurchmesser betrug 50 μm , der Außendurchmesser 375 μm . Die Konditionierung sowie die Messparameter sind in Kapitel 4.2.1.3 aufgeführt.

CZE-ESI-MS-Kopplung: Die Kapillarelektrophorese war mit dem oben beschriebenen Massendetektor micROTOF-Q verbunden. Für die Kopplung zwischen den Geräten wurde ein geerdetes co-axiales Sheath-Liquid-Interface (Fa. *Agilent*) genutzt. Das Sheath-Liquid wurde von einer Spritzenpumpe (Fa. *Cole Palmer*) mit einer Flussrate von 4 $\mu\text{L min}^{-1}$ über das Interface an die Sprüheinheit abgegeben. Die Geräteparameter für die Messung der Glucosinolate sind in Kapitel 4.2.1.3 aufgeführt.

7.1.3 Quantenchemische Rechnungen

Die in der Arbeit beschriebenen quantenchemischen Berechnungen wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Torsten Bruhn und Félix Katele mit den Programm-Paketen Gaussian03, ORCA oder Turbomole durchgeführt. Die im Einzelnen verwendeten Funktionale und Basissätze sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt.

7.1.4 Lösungsmittel und Chemikalien

Lösungsmittel: H₂O für die HPLC wurde über eine Milli-Q-Anlage der Fa. *Millipore* gereinigt und deionisiert. Acetonitril (Chromasolv[®], HPLC grade, Fa. *Sigma-Aldrich*) und Methanol (Uvasol[®], Fa. *Merck*) für die HPLC sowie für UV-Messungen, CD-Messungen und die Drehwertbestimmung wurden ebenso wie Trifluoressigsäure (TFA, Fa. *Sigma-Aldrich*) gekauft und ohne weitere Reinigung verwendet. Für die HPLC wurden die Laufmittel durch Verwendung von mechanischen Entgaser-Einheiten entgast. Ameisen- und Essigsäure (puriss.) wurden von der Firma *Fluka/Riedel-de-Haen* erworben.

Chemikalien: Die verwendeten Chemikalien Sinigrin, Sorbitol, Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA), Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA), Natriumcarboxycellulose (NaDCC), Natriumhexametaphosphat [(NaPO₃)₆], Anthron, Natriumhydrogencarbonat und Magnesiumchlorid-Lösung (1 M) wurden bei den Firmen *Acros*, *Sigma-Aldrich*, *Merck* oder *Fluka* erworben.

7.2 Isolierung von monomeren und dimeren Naphthylisochinolininen aus *Ancistrocladus congolensis*

7.2.1 Isolierungsprozedur

Insgesamt 1.1 kg (467 g + 338 g + 300 g) getrocknete Wurzelrinde von *Ancistrocladus congolensis* (Herbarium Bringmann, Exemplar Nr. 55) wurden mit der Mühle zermahlen. Das pulverisierte Material wurde mit Methanol und Dichlormethan (1:1, v/v; 250 mL auf 75 g Pulver) versetzt und 1 h lang im Ultraschallbad mazeriert. Das Lösungsmittelgemisch wurde ausgetauscht und das Wurzelmaterial für 2-3 Tage bei Raumtemperatur auf dem Schüttler extrahiert. Zur erschöpfenden Extraktion wurde dem darauffolgenden Lösungsmittelgemisch konzentrierte Salzsäure zugegeben (70 mL HCl auf 1 L MeOH / CH₂Cl₂). Der saure Extrakt wurde ebenfalls 1 h lang im Ultraschallbad mazeriert und ohne Lösungsmittelaustausch 2-3 Tage lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Die abfiltrierten wässrigen Phasen wurden zur restlosen Entfernung unpolarer Inhaltsstoffe mehrmals gegen Dichlormethan ausgeschüttelt.

Die weitere Aufreinigung aller Extrakte erfolgte über die präparative HPLC, zunächst über eine Symmetry-RP-18-Säule (7 µm, 19 x 300 mm, Fa. Waters) mit dem Gradientensystem H₂O + 0.05% TFA (A) / MeCN (B) + 0.05% TFA: 0 min 15% B, 15 min 40% B, 16 min 100% B, 20 min 100% B, 21 min 15% B, 23 min 15% B und einer Flussrate von 10 mL min⁻¹. Die Fraktionen 1 ($t_R = 14.5 - 14.8$ min; Michellamin A, **9a**), 2 ($t_R = 14.8 - 15.1$ min), 3 ($t_R = 15.1 - 16.1$ min), 4 ($t_R = 16.1 - 17.8$ min), 5 ($t_R = 17.8 - 18.1$ min) und 6 ($t_R = 20.2 - 20.8$ min; 6-O-Methylhamatin, **29**) (Abbildung 85) wurden aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

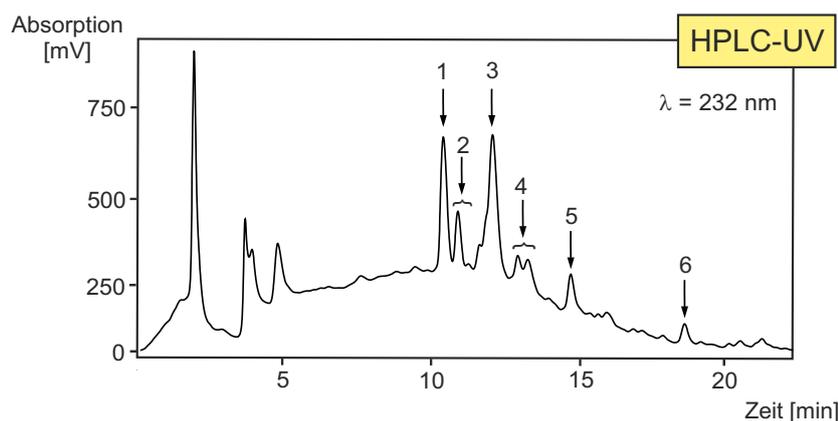


Abbildung 85. HPLC-UV-Chromatogramm und gesammelte Fraktionen des wässrigen Wurzelextrakts von *Ancistrocladus congolensis* nach Ausschütteln gegen Dichlormethan.

Fraktion 2 wurde weiter über eine Symmetry-RP-18-Säule (7 μm , 19 x 300 mm, Fa. *Waters*) aufgereinigt mit dem Gradientensystem 90% H_2O + 0.05% TFA (A) / 90% MeOH (B) + 0.05% TFA: 0 min 33.5% B, 20 min 47% B, 20.5 min 100% B, 23 min 100% B, 23.5 min 33.5% B, 25 min 33.5% B und einer Flussrate von 7.5 mL min^{-1} . Die Fraktionen 2.1 ($t_R = 15.0 - 16.0$ min; Michellamin A, **9a**), 2.2 ($t_R = 16.0 - 17.0$ min; Michellamin A₂, **30a**) und 2.3 ($t_R = 18.2 - 18.8$ min; Michellamin B₂, **30b**) wurden aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

Fraktion 3 wurde weiter aufgereinigt über eine Chromolith SemiPrep-RP-18-Säule (10 x 100 mm, Fa. *Merck*) mit dem Gradientensystem 90% H_2O + 0.05% TFA (A) / 90% MeCN (B) + 0.05% TFA: 0 min 0% B, 8 min 25% B, 8.5 min 100% B, 10 min 100% B, 10.5 min 0% B, 12 min 0% B und einer Flussrate von 8 mL min^{-1} . Fraktionen 3.1 ($t_R = 4.0 - 5.3$ min; Korupensamin A, **10a**) und 3.2 ($t_R = 6.5 - 7.8$ min) wurden aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

Fraktion 3.2 wurde weiter aufgereinigt über eine Symmetry-RP-18-Säule (7 μm , 19 x 300 mm, Fa. *Waters*) mit dem Gradientensystem 90% H_2O + 0.05% TFA (A) / 90% MeOH (B) + 0.05% TFA: 0 min 36% B, 22 min 53% B, 22.5 min 100% B, 25 min 100% B, 25.5 min 36% B, 27 min 36% B und einer Flussrate von 7.5 mL min^{-1} . Die Fraktionen 3.2.1 ($t_R = 17.2 - 18.4$ min; Michellamin A₃, **31a**), 3.2.2 ($t_R = 19.8 - 20.6$ min; Michellamin B₃, **31b**) und 3.2.3 ($t_R = 22.4 - 23.4$ min; Michellamin B, **9a**) wurden aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

Fraktion 4 wurde weiter aufgereinigt über eine Symmetry-RP-18-Säule (7 μm , 19 x 300 mm, Fa. *Waters*) mit dem Gradientensystem 90% H_2O + 0.05% TFA (A) / 90% MeOH (B) + 0.05% TFA: 0 min 36% B, 25 min 50% B, 26 min 100% B, 28.5 min 100% B, 29 min 36% B, 31 min 36% B und einer Flussrate von 7.5 mL min^{-1} . Die Fraktionen 4.1 ($t_R = 14.5 - 15.6$ min; Korupensamin D, **20**), 4.2 ($t_R = 18 - 18.8$ min; Hamatin, **27**), 4.3 ($t_R = 19 - 19.8$ min; Ancistrobrevin B, **26**) und 4.4 ($t_R = 23.8 - 24.2$ min; Michellamin A₄, **32**) wurden aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

Fraktion 5 wurde weiter aufgereinigt über eine Chromolith SemiPrep-RP-18-Säule (10 x 100 mm, Fa. *Merck*) mit dem Gradientensystem H_2O + 0.05% TFA (A) / MeCN (B) + 0.05% TFA: 0 min 10% B, 7 min 35% B, 7.5 min 100% B, 8 min 100% B, 8.5 min 10% B, 12 min 10% B und einer Flussrate von 9 mL min^{-1} . Die Fraktionen 5.1 ($t_R = 5.4 - 6.4$ min; 5'-*O*-Demethylhamatin, **28**) und 5.2 ($t_R = 8.2 - 9.4$ min) wurden aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Auf Grund zu geringer Mengen wurde 5.2 nicht weiter aufgereinigt.

Zur Generierung der HBr-Salze für die antiretroviralen Bioaktivitätstests wurden die Michellamine in je 960 μL Methanol gelöst, 40 μL 1%ige HBr dazugegen und diese Lösung am Rotationsverdampfer (30 °C) eingedampft. Der Rückstand wurde erneut in wenig Methanol gelöst, in ein Eppendorfcup überführt und darin endgültig eingedampft.

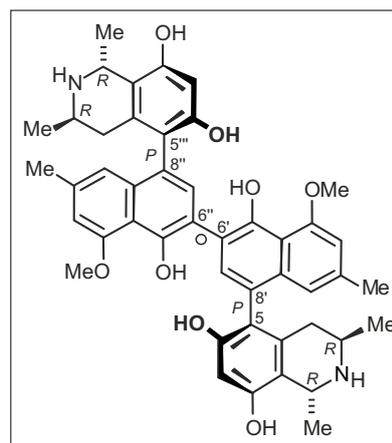
7.2.2 Aus *Ancistrocladus congolensis* isolierte Verbindungen7.2.2.1 Michellamin A (**9a**; Fraktionen 1 und 2.1).

Gelb-bräunlicher amorpher Feststoff (MeOH, 230 mg).

Schmp.: 228 °C (MeOH);

Lit.^[189]: 220 °C.

HRMS (ESI): berechnet $[C_{46}H_{49}N_2O_8]^+ = 757.34834$;
gemessen $[C_{46}H_{49}N_2O_8]^+ = 757.34812$.



$[\alpha]_D^{20}$: -14° (MeOH; $c = 0.025$);

Lit.^[29]: -10° .

UV: λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 201 (2.65), 228 (2.44), 263 (2.14), 303 (1.71), 311 (1.76),
315 (1.76), 331 (1.76), 333 (1.76), 344 (1.77) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{304} -4.1, \Delta\epsilon_{239} +10.5, \Delta\epsilon_{208} -18.8$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3344$ (br), 2982 (br), 1676 (s), 1617 (m), 1407 (w), 1353 (w), 1202 (s),
1140 (m), 1093 (w), 1070 (w), 838 (w), 721 (w) cm^{-1} ;

Lit.^[29]: 3550-3100, 2960, 2910, 1690, 1600, 1400, 1350, 1220, 1090, 1070 cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D-Alanin, (*R*)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.24$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 6 H, CH_3), 1.64 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 6H, CH_3), 2.15 (dd, $J = 11.6, 17.8$ Hz, 2 H, CH_2), 2.34 (s, 6 H, CH_3), 2.82 (dd, $^3J = 3.0, 17.8$ Hz, 2 H, CH_2), 3.69 (m, 2 H, CH), 4.09 (s, 6 H, OCH_3), 4.77 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 2 H, CH), 6.44 (s, 2 H, Ar-H), 6.74 (pt, $^4J = 1.1$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.84 (pt, $^4J = 1.1$ Hz, 2 H, Ar-H), 7.31 (s, 2 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.40$ (2 CH_3), 19.31 (2 CH_3), 22.15 (2 CH_3), 33.15 (2 CH_2), 45.13 (2 CH), 49.45 (2 CH), 56.98 (2 OCH_3), 102.07, 108.01, 113.00, 115.21, 119.10, 119.13, 120.43, 124.15, 133.08, 133.66, 134.70, 137.49, 152.26, 155.50, 156.94, 158.13, 158.14 (Ar-C) ppm.

Tabelle 6. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin A (**9a**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1, 1'''	49.45	4.77 q	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me	1-Me (6.7)
3, 3'''	45.13	3.69 m	3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 1-Me, 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 3-Me
4_{ax} , $4_{\text{ax}}'''$	33.15	2.15 dd	3, 5, 6, 8, 9, 10, 3-Me	3, 4_{eq} , 3-Me, 1'	3 (11.6), 4_{eq} (17.8)
4_{eq} , $4_{\text{eq}}'''$	33.15	2.82 dd	5, 9, 10	3, 4_{ax} , 7'	3 (3.0), 4_{ax} (17.8)
5, 5'''	119.13				
6, 6'''	156.94				
7, 7'''	102.07	6.44 s	1, 5, 6, 8, 9, 8'		
8, 8'''	155.50				
9, 9'''	113.00				
10, 10'''	133.08				
1', 1''	119.10	6.74 <i>pt</i>	3', 4', 5', 8', 9', 10', 2'-Me	4_{ax} , 2'-Me	3' (1.1)
2', 2''	137.49				
3', 3''	108.01	6.84 <i>pt</i>	1', 2', 4', 5', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	1' (1.1)
4', 4''	158.14				
5', 5''	152.26				
6', 6''	120.43				
7', 7''	134.70	7.31 s	5, 5', 6', 9', 10'	4_{eq}	
8', 8''	124.15				
9', 9''	133.66				
10', 10''	115.21				
1-Me, 1'''-Me	18.40	1.64 d	1, 9	1, 3-Me	1 (6.7)
3-Me, 3'''-Me	19.31	1.24 d	3, 4	3, 4_{ax} , 1-Me	3 (6.3)
2'-Me, 2''-Me	22.15	2.34 s	1', 2', 3'	1', 3'	
4'-OMe, 4''-OMe	56.98	4.09 s	4'	3'	

Die physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur^[29,84,189] berichteten Werten.

7.2.2.2 *Michellamin A₂* (**30a**; Fraktion 2.2).

Gelb-grünlicher amorpher Feststoff (MeOH, 40 mg).

Schmp.: 230 °C (MeOH).

HRMS (ESI): berechnet $[C_{46}H_{49}N_2O_8]^+$ = 757.34834;
gemessen $[C_{46}H_{49}N_2O_8]^+$ = 757.34721.

$[\alpha]_D^{20}$: -11° (MeOH; $c = 0.03$).

UV: λ_{\max} (log ϵ) = 201 (2.66), 228 (2.43), 262 (2.14), 301 (1.73), 311 (1.76), 316 (1.76), 331 (1.76), 333 (1.76), 343 (1.78) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{351} +1.8, \Delta\epsilon_{301} -8.0, \Delta\epsilon_{243} +11.3, \Delta\epsilon_{207} -28.2$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3336$ (br), 2982 (br), 1673 (s), 1617 (m), 1410 (w), 1353 (w), 1199 (s), 1140 (m), 1070 (w), 835 (w), 721 (w) cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D/L-Alanin, (R)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.22$ (d, $^3J = 5.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.25 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.63 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.81 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 2.14 (dd, $J = 12.3, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.27 (dd, $J = 12.1, 17.5$ Hz, 1 H, CH_2), 2.33 (s, 3 H, CH_3), 2.36 (s, 3H, CH_3), 2.64 (dd, $J = 3.1, 17.5$ Hz, 1 H, CH_2), 2.82 (dd, $J = 3.9, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 3.28 (m, 1 H, CH), 3.68 (m, 1 H, CH), 4.09 (s, 6H, 2 OCH_3), 4.64 (q, $^3J = 6.4$ Hz, 1 H, CH), 4.77 (q, $^3J = 6.5$ Hz, 1 H, CH), 6.45 (s, 1 H, Ar-H), 6.54 (s, 1 H, Ar-H), 6.74 (s, 1 H, Ar-H), 6.84 (m, 2 H, Ar-H), 6.85 (s, 1 H, Ar-H), 7.30 (s, 1 H, Ar-H), 7.32 (s, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.36$ (CH_3), 18.76 (CH_3), 19.27 (CH_3), 19.86 (CH_3), 22.11 (CH_3), 22.21 (CH_3), 33.08 (CH_2), 33.24 (CH_2), 45.13 (CH), 49.42 (CH), 50.87 (CH), 52.33 (CH), 57.00 (2 OCH_3), 102.02, 102.08, 107.98, 108.03, 112.82, 113.03, 115.21, 115.21, 119.11, 119.12, 119.16, 119.29, 120.28, 120.39, 124.15, 124.15, 133.09, 134.72, 134.84, 135.05, 136.65, 136.99, 137.51, 137.51, 152.24, 152.27, 155.49, 156.33, 156.66, 156.90, 158.11, 158.12 (Ar-C) ppm.

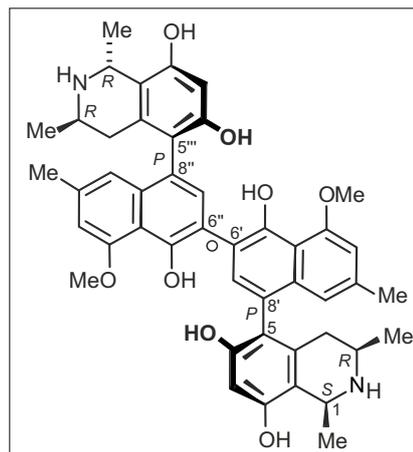


Tabelle 7. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin A₂ (**30a**) in CD₃OD.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	52.33	4.64 q	9, 10, 1-Me	3, 1-Me	1-Me (6.4)
3	50.87	3.28 m		1, 4 _{eq} , 3-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	33.24	2.27 dd		4 _{eq} , 1', 3-Me	3 (12.1), 4 _{eq} (17.5)
4 _{eq}	33.24	2.64 dd	5, 9, 10	3, 4 _{ax} , 7', 3-Me	3 (3.1), 4 _{ax} (17.5)
5	119.11				
6	156.90				
7	102.08	6.46 s	1, 5, 6, 8, 9, 8'		
8	155.49				
9	112.82				
10	135.05				
1'	119.29	6.84 s	3', 4', 8', 10', 2'-Me	4 _{ax} , 2'-Me	
2'	137.51				
3'	107.98	6.85 s	1', 2', 5', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	158.11				
5'	152.27				
6'	120.28				
7'	134.72	7.30 s	5, 5', 9', 6''	4 _{eq}	
8'	124.15				
9'	136.99				
10'	115.21				
1''	119.12	6.74 s	3'', 4'', 8'', 10'', 2''-Me	2''-Me, 4 _{ax} '''	
2''	137.51				
3''	108.03	6.85 s	1'', 2'', 5'', 10'', 2''-Me	2''-Me, 4''-OMe	
4''	158.11				
5''	152.24				
6''	120.39				
7''	134.84	7.32 s	6', 5'', 9'', 5'''	4 _{eq} '''	
8''	124.15				
9''	136.65				

Tabelle 7. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin A₂ (**30a**) in CD₃OD. (Fortsetzung)

10 ^{'''}	115.21				
1 ^{'''}	49.42	4.77 q	3 ^{'''} , 6 ^{'''} , 9 ^{'''} , 10 ^{'''} , 1 ^{'''} -Me	1 ^{'''} -Me	1 ^{'''} -Me (6.5)
3 ^{'''}	45.13	3.68 m		1 ^{'''} -Me, 3 ^{'''} -Me	4 _{ax} ^{'''} , 4 _{eq} ^{'''} , 3 ^{'''} -Me
4 _{ax} ^{'''}	33.08	2.14 dd	3 ^{'''} , 10 ^{'''} , 3 ^{'''} -Me	4 _{eq} ^{'''} , 1 ^{'''} , 3 ^{'''} -Me	3 ^{'''} (12.3), 4 _{eq} ^{'''} (18.0)
4 _{eq} ^{'''}	33.08	2.82 dd		3 ^{'''} , 4 _{ax} ^{'''} , 7 ^{''}	3 ^{'''} (3.9), 4 _{ax} ^{'''} (18.0)
5 ^{'''}	119.16				
6 ^{'''}	156.66				
7 ^{'''}	102.02	6.45 s	5 ^{'''} , 6 ^{'''} , 8 ^{'''} , 9 ^{'''}		
8 ^{'''}	156.33				
9 ^{'''}	113.03				
10 ^{'''}	133.09				
1-Me	19.86	1.81 d	1, 9	1	1 (6.4)
3-Me	18.76	1.25 d	3, 4	3, 4 _{ax} , 4 _{eq}	3 (6.7)
2'-Me	22.21	2.36 s	1', 3', 9'	1', 3', 4'-OMe	
4'-OMe	57.00	4.09 s	4'	3'	
2''-Me	22.11	2.33 s	1'', 3'', 9''	1'', 3''	
4''-OMe	57.00	4.09 s	4''	3''	
1 ^{'''} -Me	18.36	1.63 d	1 ^{'''} , 9 ^{'''}	1 ^{'''} , 3 ^{'''}	1 ^{'''} (6.5)
3 ^{'''} -Me	19.27	1.22 d	3 ^{'''} , 4 ^{'''}	3 ^{'''} , 4 _{ax} ^{'''} , 4 _{eq} ^{'''}	3 ^{'''} (5.7)

7.2.2.3 *Michellamin B₂* (**30b**; Fraktion 2.3).

Gelb-bräunlicher amorpher Feststoff (MeOH, 17 mg).

Schmp.: 227 °C (MeOH).

HRMS (ESI): berechnet $[C_{46}H_{49}N_2O_8]^+ = 757.34834$;
gemessen $[C_{46}H_{49}N_2O_8]^+ = 757.34646$.

$[\alpha]_D^{20}$: -3° (MeOH; $c = 0.03$);

Drehwert schwankt zwischen positiven und negativen Werten.

UV: λ_{\max} (log ϵ) = 201 (2.67), 229 (2.43), 262 (2.14), 302 (1.75), 311 (1.75), 315 (1.75), 332 (1.75), 334 (1.76), 342 (1.78) nm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}_{\max}$ = 3344 (br), 2975 (s), 2924 (s), 1662 (m), 1601 (s), 1455 (m), 1350 (m), 1245 (m), 1074 (m), 959 (w), 835 (w) cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D/L-Alanin, (*R*)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ = 1.23 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.25 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3 H, CH_3), 1.64 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.75 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 2.13 (dd, $J = 11.5, 17.7$ Hz, 1 H, CH_2), 2.21 (dd, $J = 3.0, 17.4$ Hz, 1 H, CH_2), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 2.35 (s, 3 H, CH_3), 2.58 (dd, $J = 12.2, 17.4$ Hz, 1 H, CH_2), 2.78 (dd, $J = 4.6, 17.7$ Hz, 1 H, CH_2), 3.22 (m, 1 H, CH), 3.68 (m, 1 H, CH), 4.10 (s, 6 H, 2 OCH_3), 4.66 (q, $^3J = 6.5$ Hz, 1 H, CH), 4.76 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 6.45 (s, 1 H, Ar-H), 6.47 (s, 1 H, Ar-H), 6.73 (d, $^4J = 0.3$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.76 (s, 1 H, Ar-H), 6.86 (d, $^4J = 0.3$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.86 (s, 1 H, Ar-H), 7.30 (s, 1 H, Ar-H), 7.31 (s, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): δ = 18.34 (CH_3), 18.73 (CH_3), 19.22 (CH_3), 19.71 (CH_3), 22.12 (CH_3), 22.17 (CH_3), 33.05 (CH_2), 34.21 (CH_2), 45.06 (CH), 49.29 (CH), 50.98 (CH), 52.30 (CH), 57.08 (2 OCH_3), 102.02, 102.54, 108.12, 108.14, 113.17, 113.20, 115.01, 115.15, 119.09, 119.15, 119.18, 119.18, 120.17, 120.22, 124.20, 124.34, 133.11, 134.53, 134.91, 135.28, 136.31, 136.65, 137.68, 137.70, 152.18, 152.29, 156.31, 156.47, 156.55, 156.76, 158.01, 158.06 (Ar-C) ppm.

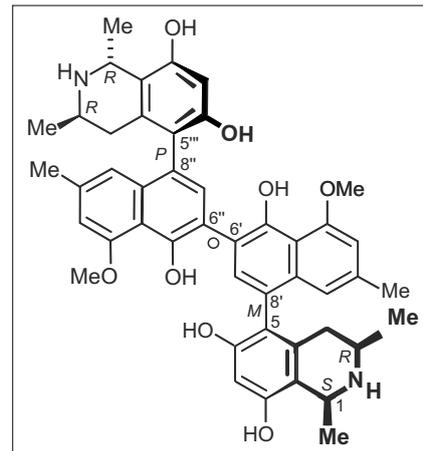


Tabelle 8. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin B₂ (**30b**) in CD₃OD.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	52.30	4.66 q	9, 1-Me	3, 1-Me	1-Me (6.5)
3	50.98	3.22 m		1, 4 _{eq} , 3-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	34.21	2.58 dd	3, 10	3, 4 _{eq} , 7', 3-Me	3 (12.2), 4 _{eq} (17.4)
4 _{eq}	34.21	2.21 dd	5, 9, 10	4 _{ax} , 1', 3-Me	3 (3.0), 4 _{ax} (17.4)
5	119.18				
6	156.55				
7	102.54	6.46 s	1, 5, 6, 8, 9		
8	156.31				
9	113.20				
10	134.91				
1'	119.15	6.76 s	3', 4', 8', 9', 10', 2'-Me	4 _{eq} , 2'-Me	
2'	137.70				
3'	108.14	6.86 s	1', 2', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	158.01				
5'	152.29				
6'	120.17				
7'	135.28	7.31 s	5, 5', 9', 6''	4 _{ax}	
8'	124.34				
9'	136.31				
10'	115.01				
1''	119.09	6.73 d	1', 2', 4', 10', 2'-Me	2''-Me, 4 _{ax} '''	3'' (0.3)
2''	137.68				
3''	108.12	6.86 d	3', 4', 8', 9', 10', 2'-Me	2''-Me, 4''-OMe	1'' (0.3)
4''	158.06				
5''	152.18				
6''	120.22				
7''	134.53	7.30 s	6', 5'', 9'', 5'''	4 _{eq} '''	
8''	124.20				
9''	136.65				

Tabelle 8. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin B₂ (**30b**) in CD₃OD. (Fortsetzung)

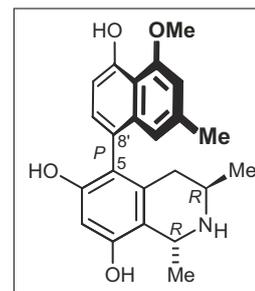
10''	115.15				
1'''	49.29	4.76 q	3''', 8''', 9''', 10''', 1'''-Me	1'''-Me	1'''-Me (6.7)
3''	45.06	3.68 m	1''	1'''-Me, 3'''-Me	4 _{ax} ''', 4 _{eq} ''', 3'''-Me
4 _{ax} '''	33.05	2.13 dd	3''', 10''', 3'''-Me	1', 4 _{eq} ''', 3'''-Me	3''' (11.5), 4 _{eq} ''' (17.7)
4 _{eq} '''	33.05	2.78 dd	10''	4 _{ax} ''', (3''', 3'''-Me)	3''' (4.6), 4 _{ax} ''' (17.7)
5''	119.18				
6''	156.76				
7''	102.02	6.47 s	1''', 5''', 6''', 8''', 9''		
8''	156.47				
9''	113.17				
10''	133.11				
1-Me	19.71	1.75 d	1, 9	1	1 (6.5)
3-Me	18.73	1.25 d	3, 4	3, 4 _{ax}	3 (6.6)
2'-Me	22.12	2.35 s	1', 2', 3'	1', 3'	
4'-OMe	57.08	4.10 s	4'	3'	
2''-Me	22.17	2.34 s	1'', 2'', 3''	1'', 3''	
4''-OMe	57.08	4.10 s	4''	3''	
1'''-Me	18.34	1.64 d	1''', 9'''	1''', 3'''	1''' (6.7)
3'''-Me	19.22	1.23 d	3''', 4'''	3''', 4 _{ax} ''', 4 _{eq} '''	3''' (6.5)

7.2.2.4 *Korupensamin A (10a; Fraktion 3.1)*.

Grünlicher amorpher Feststoff (MeOH, 110 mg).

Schmp.: 232 °C (MeOH);

Lit.^[190]: 177 °C.



HRMS (ESI): berechnet $[C_{23}H_{25}NO_4]^+ = 380.18563$;
gemessen $[C_{23}H_{25}NO_4]^+ = 380.18579$.

$[\alpha]_D^{20}$: -10° (MeOH; $c = 0.05$);

Lit.^[72]: -75.5°

UV: λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 204 (2.60), 208 (2.79), 231 (2.50), 286 (1.75), 304 (1.71), 311 (1.75), 331 (1.61) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{240} +8.3, \Delta\epsilon_{226} -21.3, \Delta\epsilon_{210} -14.9$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$;

Lit.^[72]: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{248} +24, \Delta\epsilon_{237} +44, \Delta\epsilon_{222} -119, \Delta\epsilon_{210} -120$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3370$ (br), 3029 (br), 1674 (s), 1614 (m), 1430 (w), 1353 (w), 1255 (w), 1200 (s), 1137 (m), 1070 (w), 835 (w) cm^{-1} ;

Lit.^[190]: 3600-3000, 2960, 1600, 1570, 1420, 1250, 1120, 1060.

Oxidativer Abbau: D-Alanin, (R)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.19$ (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.65 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 2.05 (dd, $J = 11.6, 18.4$ Hz, 1 H, CH_2), 2.31 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 3 H, CH_3), 2.62 (dd, $J = 4.7, 18.4$ Hz, 1 H, CH_2), 3.66 (m, 1 H, CH), 4.08 (s, 3 H, OCH_3), 4.76 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 6.44 (s, 1 H, Ar-H), 6.69 (pt, $J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.78 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.80 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.09 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.37$ (CH_3), 19.22 (CH_3), 22.25 (CH_3), 32.97 (CH_2), 56.78 (OCH_3), 45.11 (CH), 49.45 (CH), 101.99, 107.48, 110.47, 112.96, 115.01, 119.02, 119.37, 124.79, 131.27, 132.99, 137.22, 137.41, 155.44, 155.66, 156.94, 158.02 (Ar-C) ppm.

Tabelle 9. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Korupensamin A (**10a**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.45	4.76 q	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me	1-Me (6.7)
3	45.11	3.66 m	3-Me	4_{eq} , 1-Me, 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 3-Me
4_{ax}	32.97	2.05 dd	3, 5, 9, 10, 3-Me	4_{eq} , 1', 3-Me	3 (11.6), 4_{eq} (18.4)
4_{eq}	32.97	2.62 dd	3, 5, 9, 10	3, 4_{ax} , 3-Me, 7'	3 (4.7), 4_{ax} (18.4)
5	119.37				
6	156.94				
7	101.99	6.44 s	1, 5, 6, 8, 9		
8	155.44				
9	112.96				
10	132.99				
1'	119.02	6.69 <i>pt</i>	2', 3', 4', 8', 10', 2'-Me	4_{ax} , 2'-Me	3' (1.0)
2'	137.41				
3'	107.48	6.78 d	1', 2', 3', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	1' (1.0), 2'-Me
4'	158.02				
5'	155.66				
6'	110.47	6.80 d	5', 8', 10'	4'-OMe	7' (7.8)
7'	131.27	7.09 d	5, 5', 6', 9'	4_{eq}	6' (7.8)
8'	124.79				
9'	137.22				
10'	115.01				
1-Me	18.37	1.65 d	1, 9	1, 3	1 (6.7)
3-Me	19.22	1.19 d	1, 3, 4, 10	3, 4_{ax} , 4_{eq}	3 (6.4)
2'-Me	22.15	2.31 s	1', 2', 3'	1', 3'	1'
4'-OMe	56.78	4.08 s	4'	3'	

Die physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur^[72,190] berichteten Werten.

7.2.2.5 *Michellamin A₃* (**31a**; Fraktion 3.2.1).

Gelb-bräunlicher amorpher Feststoff (MeOH, 31 mg).

Schmp.: 232 °C (MeOH).

HRMS (ESI): berechnet $[C_{47}H_{51}N_2O_8]^+ = 771.36399$;
gemessen $[C_{47}H_{51}N_2O_8]^+ = 771.36483$.

$[\alpha]_D^{20}$: +14° (MeOH; $c = 0.015$).

UV: λ_{\max} (log ϵ) = 204 (2.67), 230 (2.49), 261 (2.17), 301 (1.80), 303 (1.8), 311 (1.83),
316 (1.83), 330 (1.83), 332 (1.83), 335 (1.83), 345 (1.84) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{339} +3.9$, $\Delta\epsilon_{302} -11.6$, $\Delta\epsilon_{241} +23.2$, $\Delta\epsilon_{209} -30.2$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3350$ (br), 1673 (s), 1617 (m), 1417 (w), 1356 (w), 1251 (w), 1199 (s), 1140
(m), 1070 (w), 835 (w), 721 (w) cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D/L-Alanin, (R/S)-3-Aminobuttersäure, (S)-N-Methyl-3-amino-
buttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.23$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3 H, CH_3), 1.32 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.63 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.75 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3 H, CH_3), 2.17 (dd, $J = 11.7, 18.4$ Hz, 1 H, CH_2), 2.32 (dd, $J = 3.0, 17.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 2.35 (s, 3 H, CH_3), 2.70 (dd, $J = 11.2, 17.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.80 (dd, $J = 4.8, 18.1$ Hz, 1 H, CH_2), 3.02 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, NCH_3), 3.19 (m, 1 H, CH), 3.69 (m, 1 H, CH), 4.09 (s, 3 H, OCH_3), 4.10 (s, 3 H, OCH_3), 4.62 (q, $^3J = 6.6$ Hz, 1 H, CH), 4.76 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 6.47 (s, 1 H, Ar-H), 6.48 (s, 1 H, Ar-H), 6.74 (pt, $^3J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.77 (pt, $^3J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.85 (m, 2 H, Ar-H), 7.30 (s, 1 H, Ar-H), 7.31 (s, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.00$ (CH_3), 18.37 (CH_3), 19.25 (CH_3), 19.45 (CH_3), 22.13 (CH_3), 22.17 (CH_3), 33.03 (CH_2), 34.27 (CH_2), 41.27 (CH_3), 45.09 (CH), 49.30 (CH), 57.05 (2 OCH_3), 60.50 (CH), 62.46 (CH), 102.04, 102.52, 108.05, 108.07, 113.13, 113.37, 114.95, 115.12, 118.85, 119.11, 119.11, 119.18, 120.17, 120.22, 123.94, 124.20, 133.13, 134.55, 134.74, 135.45, 136.36, 136.58, 137.61, 137.66, 152.17, 152.22, 155.42, 155.43, 156.71, 156.73, 158.02, 158.04 (Ar-C) ppm.

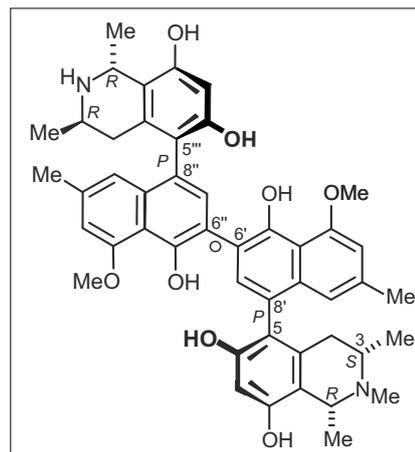


Tabelle 10. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin A₃ (**31a**) in CD₃OD.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	62.46	4.62 q	8, 9, 10, 1-Me, <i>N</i> -Me	3, 1-Me, <i>N</i> -Me	1-Me (6.6)
3	60.50	3.19 m	(4), 3-Me	1, 4 _{eq} , 1', <i>N</i> -Me, 3-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	34.27	2.70 dd	3, 5, 9, 10, 1-Me	3, 4 _{eq} , 7', 1-Me, 3-Me	3 (11.2), 4 _{eq} (17.0)
4 _{eq}	34.27	2.32 dd	(3), 5, 9, 10, 1-Me	3, 4 _{ax} , 1', 3-Me	3 (3.0), 4 _{ax} (17.0)
5	118.85				
6	156.71				
7	102.52	6.48 s	1, 5, 6, 8, 9, 8'		
8	155.42				
9	113.37				
10	134.74				
1'	119.18	6.77 s	3', 4', 5', 8', 9', 10', 2'-Me	4 _{eq} , 2'-Me	
2'	137.66				
3'	108.07	6.85 s	1', 2', 4', 5', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	158.02				
5'	152.22				
6'	120.17				
7'	135.45	7.31 s	5, 5', 9', 10', 6''	4 _{ax}	
8'	123.94				
9'	136.36				
10'	114.95				
1''	119.11	6.74 s	3'', 4'', 5'', 8'', 9'', 10'', 2''-Me	2''-Me, 4 _{ax} '''	
2''	137.61				
3''	108.05	6.85 s	1'', 2'', 4'', 5'', 10'', 2''-Me	2''-Me, 4''-OMe	
4''	158.04				
5''	152.17				
6''	120.22				
7''	134.55	7.30 s	6', 5'', 9'', 10'', 5'''	4 _{eq} '''	
8''	124.20				

Tabelle 10. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin A₃ (**31a**) in CD₃OD. (Fortsetzung)

9"	136.58				
10"	115.12				
1'''	49.30	4.76 q	3''', 8''', 9''', 10''', 1'''-Me	1'''-Me	1'''-Me (6.7)
3'''	45.09	3.69 m	1''', 4''', 3'''-Me	4 _{eq} ''', 1'''-Me, 3'''-Me	4 _{ax} ''', 4 _{eq} ''', 3'''-Me
4 _{ax} '''	33.03	2.17 dd	3''', 5''', 9''', 10''', 3'''-Me	4 _{eq} ''', 1'', 3'''-Me	3''' (11.7), 4 _{eq} ''' (18.4)
4 _{eq} '''	33.03	2.80 dd	3''', 5''', 9''', 10'''	7'', 4 _{ax} ''', 3''', 3'''-Me	3''' (4.5), 4 _{eq} ''' (18.4)
5'''	119.11				
6'''	156.73				
7'''	102.04	6.47 s	8'', 1''', 5''', 6''', 8''', 9'''		
8'''	155.43				
9'''	113.13				
10'''	133.13				
1-Me	19.45	1.75 d	1, 9	1, N-Me, 3-Me	1 (6.6)
N-Me	41.27	3.02 s	1, 3	1, 3, 1-Me, 3-Me	
3-Me	18.00	1.32 d	3, 4, 10	3, 4 _{ax} , 4 _{eq} , 1-Me, N-Me	3 (6.4)
2'-Me	22.17	2.35 s	1', 2', 3'	1', 3'	
4'-OMe	57.05	4.09 s	4'	3'	
2''-Me	22.13	2.34 s	1'', 2'', 3''	1'', 3''	
4''-OMe	57.05	4.10 s	4''	3''	
1'''-Me	18.37	1.63 d	1''', 9'''	1''', 3'''	1''' (6.7)
3'''-Me	19.25	1.23 d	3''', 4''', 10'''	3''', 4 _{ax} ''', 4 _{eq} '''	3''' (6.3)

7.2.2.6 *Michellamin B₃* (**31b**; Fraktion 3.2.2).

Gelb-bräunlicher amorpher Feststoff (MeOH, 11 mg).

Schmp.: 234 °C (MeOH).

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_8]^+ = 771.36399$;
gemessen $[\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_8]^+ = 771.36463$.

$[\alpha]_D^{20}$: +2.5° (MeOH; $c = 0.004$);

Drehwert schwankt zwischen positiven und negativen Werten.

UV: λ_{max} (log ϵ) = 204 (2.66), 231 (2.50), 261 (2.17), 302 (1.80), 303 (1.8), 310 (1.82),
315 (1.83), 329 (1.83), 332 (1.83), 335 (1.84), 345 (1.8) nm.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3350$ (br), 1676 (s), 1617 (m), 1427 (w), 1353 (w), 1251 (w), 1200 (s), 1140
(m), 1093 (w), 1074 (w), 835 (w), 724 (w) cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D/L-Alanin, (R/S)-3-Aminobuttersäure, (S)-N-Methyl-3-amino-
buttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.22$ (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.32 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.64 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.80 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 2.15 (dd, $J = 11.8, 17.4$ Hz, 1 H, CH_2), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 2.37 (s, 3 H, CH_3), 2.39 (dd, $J = 11.2, 17.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.63 (dd, $J = 2.7, 17.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.77 (dd, $J = 4.5, 17.4$ Hz, 1 H, CH_2), 2.99 (s, 3 H, NCH_3), 3.22 (m, 1 H, CH), 3.67 (m, 1 H, CH), 4.10 (s, 6 H, 2 OCH_3), 4.59 (q, $^3J = 6.4$ Hz, 1 H, CH), 4.76 (q, $^3J = 6.8$ Hz, 1 H, CH), 6.46 (s, 1 H, Ar-H), 6.50 (s, 1 H, Ar-H), 6.74 (s, 1 H, Ar-H), 6.81 (s, 1 H, Ar-H), 6.86 (s, 1 H, Ar-H), 6.87 (s, 1 H, Ar-H), 7.29 (m, 2 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.04$ (CH_3), 18.35 (CH_3), 19.22 (CH_3), 19.63 (CH_3), 22.12 (CH_3), 22.23 (CH_3), 32.99 (CH_2), 33.10 (CH_2), 41.43 (CH_3), 45.06 (CH), 49.34 (CH), 57.06 (2 OCH_3), 60.23 (CH), 62.09 (CH), 102.03, 102.77, 108.08, 108.13, 113.05, 113.14, 115.07, 115.10, 118.75, 119.03, 119.08, 119.29, 120.06, 120.22, 123.85, 124.25, 133.08, 134.50, 134.65, 135.71, 136.66, 137.03, 137.70, 137.71, 152.19, 152.22, 155.45, 155.54, 156.71, 156.76, 158.03, 158.04 (Ar-C) ppm.

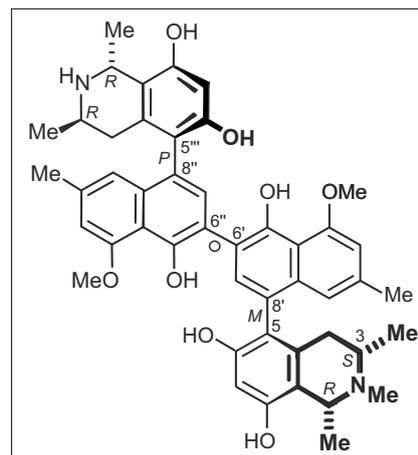


Tabelle 11. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin B₃ (**31a**) in CD₃OD.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	62.09	4.59 q	8, 9, 10, 1-Me, N-Me	3, 1-Me, N-Me	1-Me (6.4)
3	60.23	3.22 m	1	1, 4 _{eq} , 1-Me, N-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	33.10	2.39 dd	3, 10	4 _{eq} , 1', 1-Me, 3-Me	3 (11.2), 4 _{eq} (17.0)
4 _{eq}	33.10	2.63 dd	5, 10	4 _{ax} , 3, 7', 3-Me	3 (2.7), 4 _{ax} (17.0)
5	118.75				
6	156.71				
7	102.77	6.50 s	5, 6, 8, 9		
8	155.45				
9	113.05				
10	134.65				
1'	119.29	6.81 s	3', 4', 8', 9', 10', 2'-Me	4 _{ax} , 2'-Me	
2'	137.70				
3'	108.08	6.87 s	1', 2', 10'	2'-Me, 4'-OMe	
4'	158.04				
5'	152.19				
6'	120.06				
7'	135.71	7.29 s	5, 5', 9', 10', 6''	4 _{eq}	
8'	123.85				
9'	137.03				
10'	115.07				
1''	119.08	6.74 s	3'', 4'', 9'', 10'', 2''-Me	4 _{ax} '', 2''-Me	
2''	137.71				
3''	108.13	6.86 s	1'', 2'', 4'', 2''-Me	2''-Me, 4''-OMe	
4''	158.03				
5''	152.22				
6''	120.22				
7''	134.50	7.29 s	6', 5'', 9'', 10'', 5'''	4 _{eq} '''	
8''	124.25				
9''	136.66				

Tabelle 11. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin B₃ (**31a**) in CD₃OD. (Fortsetzung)

10''	115.10				
1'''	49.34	4.76 q	3''', 8''', 9''', 10''', 1'''-Me	1'''-Me	1'''-Me (6.8)
3'''	45.06	3.67 m	3'''-Me	4 _{eq} ''', 1'''-Me, 3'''- Me	4 _{ax} ''', 4 _{eq} ''', 3'''-Me
4 _{ax} '''	32.99	2.15 dd	3''', 9''', 10''', 3'''-Me	1'', 4 _{eq} ''', 3'''-Me	3''' (11.8), 4 _{eq} ''' (17.4)
4 _{eq} '''	32.99	2.77 dd	5''', 10'''	7'', 3''', 4 _{ax} ''', 3'''-Me	3''' (4.5), 4 _{ax} ''' (17.4)
5'''	119.03				
6'''	156.76				
7'''	102.03	6.46 s	8'', 5''', 6''', 8''', 9'''		
8'''	155.54				
9'''	113.14				
10'''	133.08				
1-Me	19.63	1.80 d	1, 9	1, 4 _{ax} , N-Me, 3-Me	1 (6.4)
N-Me	41.43	2.99 s	1, 3	1, 1-Me, 3-Me	
3-Me	18.04	1.32 d	3, 4	3, 4 _{ax} , 4 _{eq} , 1-Me, N-Me	3 (6.4)
2'-Me	22.23	2.37 s	1', 2', 3', 10'	1', 3'	
4'-OMe	57.06	4.10 s	4'	3'	
2''-Me	22.12	2.34 s	1'', 2'', 3'', 10''	1'', 3''	
4''-OMe	57.06	4.10 s	4''	3''	
1'''-Me	18.35	1.64 d	1''', 9'''	1''', 3'''	1''' (6.8)
3'''-Me	19.22	1.22 d	3''', 4'''	3''', 4 _{ax} ''', 4 _{eq} '''	3''' (6.4)

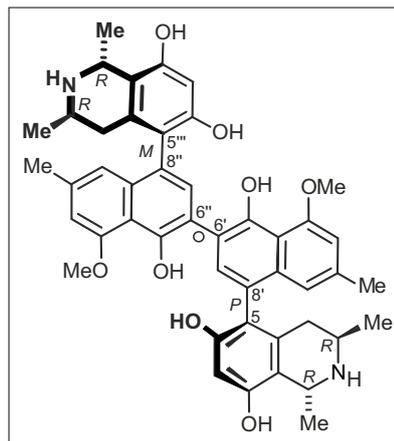
7.2.2.7 *Michellamin B (9b; Fraktion 3.2.3)*

Grünlich-violetter amorpher Feststoff (MeOH, 12 mg).

Schmp.: 233 °C (MeOH);

Lit.^[24]: 230 °C (MeOH).

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_8]^+ = 757.34834$;
gemessen $[\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_8]^+ = 757.34868$.



$[\alpha]_D^{20}$: +1.3° (MeOH; $c = 0.01$);

Drehwert schwankt zwischen positiven und negativen Werten;

Lit.^[29]: -14.8°.

UV: λ_{max} ($\log \varepsilon$) = 202 (2.65), 228 (2.44), 262 (2.14), 304 (1.69), 311 (1.72), 313 (1.73), 331 (1.73), 333 (1.73), 344 (1.73) nm.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3360$ (br), 2960 (w), 1674 (s), 1618 (m), 1424 (w), 1353 (w), 1199 (s), 1143 (m), 1070 (w), 838 (w), 722 (w) cm^{-1} ;

Lit.^[191]: 3600-3150, 2960, 2910, 1600, 1400, 1350, 1240, 1140, 1070 cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D-Alanin, (*R*)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.23$ (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.27 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.64 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.69 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 2.12 (dd, $J = 11.7, 18.1$ Hz, 1 H, CH_2), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 2.35 (m, Hz, 1 H, CH_2), 2.36 (s, 3 H, CH_3), 2.53 (dd, $J = 11.7, 18.1$ Hz, 1 H, CH_2), 2.80 (dd, $J = 4.8, 18.1$ Hz, 1 H, CH_2), 3.65 (m, 1 H, CH), 3.69 (m, 1 H, CH), 4.10 (s, 3 H, OCH_3), 4.11 (s, 3 H, OCH_3), 4.74 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 4.77 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 6.45 (s, 2 H, Ar-H), 6.74 (pt, $J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.84 (pt, $J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.85 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.86 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.31 (s, 1 H, Ar-H), 7.32 (s, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.36$ (CH_3), 18.39 (CH_3), 19.26 (2 CH_3), 22.12 (CH_3), 22.19 (CH_3), 33.05 (CH_2), 33.96 (CH_2), 45.12 (CH), 45.76 (CH), 49.29 (CH), 49.58 (CH), 57.00 (OCH_3), 57.01 (OCH_3), 102.01, 102.12, 108.07, 108.12, 113.04, 113.19, 115.19, 115.23, 118.99, 119.09, 119.14, 119.15, 120.21, 120.30, 124.12, 124.12, 133.02, 133.08, 134.71, 135.15, 136.50, 136.67, 137.54, 137.62, 152.24, 152.31, 155.54, 155.58, 156.90, 156.94, 158.05, 158.10 (Ar-C) ppm.

Tabelle 12. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin B (**9b**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.58	4.74 q	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me	1-Me (6.7)
3	45.76	3.65 m	4_{eq} , (4_{ax}), 1-Me, 3-Me	4_{eq} , 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 3-Me
4_{ax}	33.96	2.53 dd	3, 5, 9, 10, 3-Me	(3), 4_{eq} , 7', 3-Me	3 (11.7), 4_{eq} (18.1)
4_{eq}	33.96	2.35 m	3, 5, 9, 10	3, 4_{ax} , 3-Me	3, 4_{ax}
5	118.99				
6	156.90				
7	102.12	6.45 s	1, 5, 6, 8, 9, 8'		
8	155.58				
9	113.19				
10	133.02				
1'	119.15	6.84 <i>pt</i>	5, 3', 8', 9', 2'-Me	2'-Me	3' (1.0)
2'	137.62				
3'	108.12	6.86 d	1', 2', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	1' (1.0)
4'	158.05				
5'	152.24				
6'	120.21				
7'	135.15	7.32 s	5, 5', 9', 10', 6''	4_{ax}	
8'	124.12				
9'	136.50				
10'	115.19				
1''	119.14	6.74 <i>pt</i>	3'', 4'', 9'', 10'', 2''-Me	2''-Me	3'' (1.0)
2''	137.54				
3''	108.07	6.85 d	1'', 2'', 4'', 10'', 2''-Me	2''-Me, 4''-OMe	1'' (1.0)
4''	158.10				
5''	152.31				
6''	120.30				
7''	134.71	7.31 s	6', 4'', 9'', 10'', 5'''	$4_{\text{eq}}'''$	
8''	124.12				
9''	136.67				
10''	115.23				

Tabelle 12. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin B (**9b**) in CD_3OD .
(Fortsetzung)

1'''	49.29	4.77 q	3''', 8''', 9''', 10''', 1'''-Me	1'''-Me	1'''-Me (6.7)
3'''	45.12	3.69 m	1''', 4''', 3'''-Me	4 _{eq} ''', 1'''-Me, 3'''-Me	4 _{ax} ''', 4 _{eq} ''', 3'''-Me
4 _{ax} '''	33.05	2.12 dd	3''', 5''', 9''', 10''', 3'''-Me	1'', 3''', 4 _{eq} ''', 3'''-Me	3''' (11.7), 4 _{eq} ''' (18.1)
4 _{eq} '''	33.05	2.80 dd	3''', 5''', 9''', 10'''	3, 4 _{ax} ''', 7'', 3'''-Me	3''' (4.8), 4 _{ax} ''' (18.1)
5'''	119.09				
6'''	156.94				
7'''	102.01	6.45 s	8'', 1''', 5''', 6''', 8''', 9'''		
8'''	155.54				
9'''	113.04				
10'''	133.08				
1-Me	18.39	1.69 d	1, 9	1, 3	1 (6.7)
3-Me	19.26	1.27 d	3, 4, 10	3, 4 _{ax} , 4 _{eq}	3 (6.4)
2'-Me	22.19	2.36 s	2', 3', 10'	1', 3'	
4'-OMe	57.01	4.11 s	3', 4'	3'	
2''-Me	22.12	2.34 s	2'', 3'', 10''	1'', 3''	
4''-OMe	57.00	4.10 s	3'', 4''	3''	
1'''-Me	18.36	1.64 d	1''', 9'''	1''', 3'''	1''' (6.7)
3'''-Me	19.26	1.23 d	3''', 4''', 10'''	3''', 4 _{ax} ''', 4 _{eq} '''	3''' (6.4)

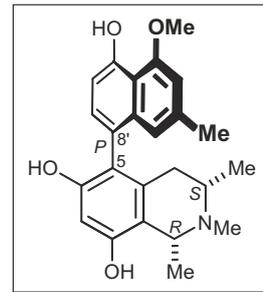
Die physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur^[24,29,83,191] berichteten Werten.

7.2.2.8 *Korupensamin D (20; Fraktion 4.1)*.

Hellgelber amorpher Feststoff (MeOH, 36 mg).

Schmp.: 230 °C (MeOH);

Lit.^[72]: 232 °C (MeOH).



HRMS (ESI): berechnet $[C_{24}H_{27}NO_4]^+ = 394.20120$;
gemessen $[C_{24}H_{27}NO_4]^+ = 394.19970$.

$[\alpha]_D^{20}$: -2° (MeOH; $c = 0.07$);

Lit.^[72]: -6.7° .

UV: λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 204 (2.60), 209 (2.78), 231 (2.47), 285 (1.75), 303 (1.70), 311 (1.75),
332 (1.65) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{286} -1.3, \Delta\epsilon_{236} +14.1, \Delta\epsilon_{209} -17.4, \Delta\epsilon_{200} +13.7$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3372$ (br), 1675 (s), 1615 (m), 1432 (m), 1395 (w), 1356 (w), 1251 (m),
1201 (s), 1132 (s), 1074 (w), 838 (w), 803 (w) cm^{-1} ;

Lit.^[72]: 3387, 3000, 1615, 1458 cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D/L-Alanin, (S)-3-Aminobuttersäure, (S)-N-Methyl-3-aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.26$ (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.76 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 2.19 (dd, $J = 3.0, 17.4$ Hz, 1H, CH_2), 2.32 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 3H, CH_3), 2.56 (dd, $J = 11.4, 17.4$ Hz, 1H, CH_2), 3.02 (s, 3H, NCH_3), 3.16 (m, 1H, CH), 4.07 (s, 3H, OCH_3), 4.62 (q, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, CH), 6.46 (s, 1H, Ar-H), 6.73 (pt, $J = 1.2$ Hz, 1H, Ar-H), 6.78 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.79 (m, 1H, Ar-H), 7.00 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 17.96$ (CH_3), 19.52 (CH_3), 22.21 (CH_3), 34.22 (CH_2), 41.31 (NCH_3), 56.79 (OCH_3), 60.48 (CH), 62.53 (CH), 102.47, 107.62, 110.31, 113.15, 114.82, 119.02, 119.17, 124.50, 131.99, 134.52, 136.99, 137.51, 155.45, 155.78, 156.88, 157.93 (Ar-C) ppm.

Tabelle 13. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Korupensamin D (**20**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	62.53	4.62 q	(3), 8, 9, 10, 1-Me, <i>N</i> -Me	3, 1-Me, <i>N</i> -Me	1-Me (6.6)
3	60.48	3.16 m	<i>N</i> -Me	1, 4 _{eq} , <i>N</i> -Me, 3-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	34.22	2.56 dd	3, 5, 8, 9, 10, 3-Me	4 _{eq} , 7', 1-Me, 3-Me	3 (11.5), 4 _{eq} (17.4)
4 _{eq}	34.22	2.19 dd	9, 10, 3-Me	3, 4 _{ax} , 1', 3-Me	3 (3.0), 4 _{ax} (17.4)
5	119.02				
6	156.88				
7	102.47	6.46 s	1, 5, 6, 8, 9, 8'	1-Me	
8	155.45				
9	113.15				
10	134.52				
1'	119.17	6.73 <i>pt</i>	3', 8', 9', 10', 2'-Me	3, 4 _{eq} , 2'-Me	3' (1.2)
2'	137.51				
3'	107.62	6.79 m	1', 2', 4', 10', 2'- Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	157.93				
5'	155.78				
6'	110.31	6.78 d	5, 5', 8', 10'	7'	7' (7.8)
7'	131.99	7.09 d	5, 5', 6', 9', 10'	4 _{ax} , 4 _{eq} , 6'	6' (7.8)
8'	124.50				
9'	136.99				
10'	114.82				
1-Me	19.52	1.76 d	1, 9	1, <i>N</i> -Me, 3-Me	1 (6.6)
<i>N</i> -Me	41.31	3.02 s	1, 3, 9	1, 3, 1-Me, 3-Me	
3-Me	17.96	1.26 d	3, 4 _{ax} , 4 _{eq} , 1-Me, <i>N</i> -Me	3, 4, 10	3 (6.6)
2'-Me	22.21	2.32 d	1', 2', 3'	1', 3'	1'
4'-OMe	56.79	4.07 s	3', 4'	3'	

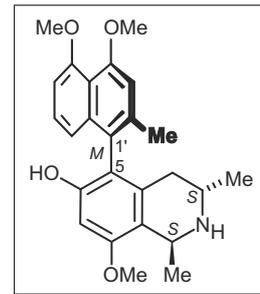
Die physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur^[72] berichteten Werten.

7.2.2.9 Hamatin (27; Fraktion 4.2).

Brauner amorpher Feststoff (MeOH, 13 mg).

Schmp.: 239 °C (MeOH);

Lit.^[81]: 240



HRMS (ESI): berechnet $[C_{25}H_{30}NO_4]^+ = 408.21693$;
gemessen $[C_{25}H_{30}NO_4]^+ = 408.21613$.

$[\alpha]_D^{20}$: +16° (MeOH; $c = 0.11$);

Lit.^[191]: +16°

UV: λ_{\max} (log ϵ) = 204 (2.58), 207 (2.60), 228 (2.48), 287 (1.73), 305 (1.69), 318 (1.89), 335 (1.5) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{240} -1.9, \Delta\epsilon_{228} +9.2, \Delta\epsilon_{213} +5.2, \Delta\epsilon_{210} +6.1, \Delta\epsilon_{201} -5.0$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3364$ (br), 1674 (s), 1608 (m), 1452 (w), 1392 (w), 1363 (w), 1338 (w), 1261 (w), 1201 (s), 1137 (m) cm^{-1} ;

Lit.^[191]: 3380, 2980, 2965, 2955, 1600, 1580, 1505, 1260, 1200, 1082 cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: L-Alanin, (S)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.18$ (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.63 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 2.06 (dd, $J = 11.7, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.13 (s, 3 H, CH_3), 2.36 (dd, $J = 4.8, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 3.68 (m, 1 H, CH), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 3.96 (s, 3 H, OCH_3), 4.77 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 6.60 (s, 1 H, Ar-H), 6.77 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.86 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.92 (s, 1 H, Ar-H), 7.18 (pt, $J = 7.8$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.54$ (CH_3), 19.15 (CH_3), 20.42 (CH_3), 32.76 (CH_2), 44.85 (CH), 49.07 (CH), 55.85 (OCH_3), 56.62 (OCH_3), 56.74 (OCH_3), 98.55, 106.88, 110.44, 114.23, 117.91, 118.73, 118.76, 125.10, 127.78, 132.86, 137.14, 137.84, 157.00, 157.64, 157.97, 158.87 (Ar-C) ppm.

Tabelle 14. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Hamatin (**27**) in CD_3OD .

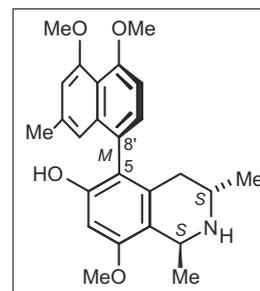
Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.07	4.77 q	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me, 8-OMe	1-Me (6.7)
3	44.85	3.68 m	1, 4, 3-Me	4_{eq} , 1-Me, 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 3-Me
4_{ax}	32.76	2.06 dd	3, 5, 6, 9, 10, 3-Me	3 , 4_{eq} , 8', 3-Me	3 (11.7), 4_{eq} (18.0)
4_{eq}	32.76	2.36 dd	3, 6, 5, 9, 10	4_{ax} , 3	3 (4.8), 4_{ax} (18.0)
5	118.73				
6	157.00				
7	98.55	6.60 s	1, 5, 6, 8, 9, 1'	8-OMe	
8	157.64				
9	114.23				
10	132.86				
1'	125.10				
2'	137.14				
3'	110.44	6.92 s	1', 2', 4', 5', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	157.97				
5'	158.87				
6'	106.88	6.86 d	4', 5', 8', 10'	7', 5'-OMe	7' (7.8)
7'	127.78	7.18 <i>pt</i>	5', 6', 9', 10'	6', 8'	6' (7.8), 8' (7.8)
8'	118.76	6.77 d	1', 4', 5', 6', 9', 10'	4_{ax} , 7'	7' (7.8)
9'	137.84				
10'	117.91				
1-Me	18.54	1.63 d	1, 9	1, 3	1 (6.7)
3-Me	19.15	1.18 d	3, 4	3 , 4_{ax}	3 (6.5)
8-OMe	55.85	3.92 s	8	1, 7	
2'-Me	20.42	2.13 s	5, 1', 2', 3', 4', 10'	3'	
4'-OMe	56.62	3.96 s	4'	3'	
5'-OMe	56.74	3.92 s	5'	6'	

Die physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur^[24,80,191,192] berichteten Werten.

7.2.2.10 *Ancistrobrevin B (26; Fraktion 4.3)*.

Brauner amorpher Feststoff (MeOH, 10 mg).

Schmp.: 165 °C (MeOH);

Lit.^[79]: 122 °C.

HRMS (ESI): berechnet $[C_{25}H_{30}NO_4]^+ = 408.21693$;
 gemessen $[C_{25}H_{30}NO_4]^+ = 408.21641$.

$[\alpha]_D^{20}$: -16° (MeOH; $c = 0.05$);

Lit.^[79]: -68° .

UV: λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 203 (2.58), 209 (2.63), 228 (2.52), 286 (1.73), 303 (1.57), 311 (1.89), 333 (1.48) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{239} -2.7, \Delta\epsilon_{227} +10.5, \Delta\epsilon_{200} -4.2$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3729$ (br), 2947 (br), 1676 (s), 1614 (m), 1456 (w), 1199 (s), 1140 (w), 1055 (s), 1032 (m), 1010 (w) cm^{-1} ;

Lit.^[79]: 3400, 2940, 2910, 2820, 1600, 1570, 1260 cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: L-Alanin, (S)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.18$ (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.62 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 2.08 (dd, $J = 11.7, 17.7$ Hz, 1 H, CH_2), 2.29 (s, 3 H, CH_3), 2.65 (dd, $J = 4.8, 17.7$ Hz, 1 H, CH_2), 3.66 (m, 1 H, CH), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 3.95 (s, 3 H, OCH_3), 4.77 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 6.58 (s, 1 H, Ar-H), 6.65 (pt, $J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.78 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.94 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.15 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.60$ (CH_3), 19.14 (CH_3), 22.99 (CH_3), 32.86 (CH_2), 44.98 (CH), 49.18 (CH), 56.06 (OCH_3), 56.76 (OCH_3), 56.98 (OCH_3), 98.59, 106.83, 109.94, 113.97, 117.63, 118.20, 120.31, 126.42, 130.20, 133.16, 137.71, 137.84, 157.25, 157.53, 158.33, 158.79 (Ar-C) ppm.

Tabelle 15. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Ancistrobrevin B (**26**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.18	4.77 q	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me, 8-OMe	1-Me (6.7)
3	44.98	3.66 m	4, 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 1-Me, 3-Me	
4_{ax}	32.86	2.08 dd	5, 9, 10, 3-Me	3, 4_{eq} , 8', 3-Me	4_{eq} (17.7), 3 (11.7)
4_{eq}	32.86	2.65 dd	3, 5, 9, 10	4_{ax} , 3, 7', 3-Me	4_{ax} (17.7), 3 (4.8)
5	120.31				
6	157.25				
7	98.59	6.58 s	5, 6, 8, 9, 8'	8-OMe	
8	157.53				
9	113.97				
10	133.16				
1'	118.20	6.65 <i>pt</i>	2', 3', 4', 10', 2'-Me	4_{ax} , 2'-Me	3' (1.0), 2'-Me
2'	137.84				
3'	109.94	6.78 d	1', 2', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	1' (1.0)
4'	158.79				
5'	158.33				
6'	106.83	6.94 d	4', 5', 8', 10'	7', 5'-OMe	7' (7.9)
7'	130.20	7.15 d	5, 5', 6', 9', 10'	4_{eq} , 6'	6' (7.9)
8'	126.42				
9'	137.71				
10'	117.63				
1-Me	18.60	1.62 d	1, 9	1, 3, 8-OMe	1 (6.7)
3-Me	19.14	1.18 d	3, 4	3, 4_{ax} , 4_{eq}	3 (6.5)
8-OMe	56.06	3.92 s	8	7, 1-Me	
2'-Me	22.99	2.29 s	1', 2', 3'	1', 3'	1'
4'-OMe	56.98	3.92 s	4'	3'	
5'-OMe	56.76	3.95 s	5'	6'	

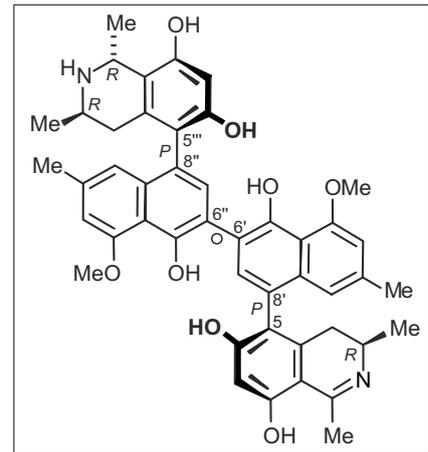
Die physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur^[79] berichteten Werten.

7.2.2.11 Michellamin A₄ (**32**; Fraktion 4.4).

Brauner amorpher Feststoff (MeOH, 17 mg).

Schmp.: 210 °C (MeOH).

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{46}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_8]^+ = 755.33269$;
 gemessen $[\text{C}_{46}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_8]^+ = 755.33246$.


 $[\alpha]_D^{20}$: +20° (MeOH; $c = 0.01$).

UV: λ_{max} (log ϵ) = 203 (2.72), 231 (2.53), 265 (2.13), 301 (1.74), 310 (1.74), 313 (1.74), 332 (1.75), 335 (1.74), 345 (1.76) nm.

CD: λ_{max} = $\Delta\epsilon_{350} +2.9$, $\Delta\epsilon_{295} -3.3$, $\Delta\epsilon_{238} +11.9$, $\Delta\epsilon_{227} -3.4$, $\Delta\epsilon_{220} +0.1$, $\Delta\epsilon_{207} -19.3$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3341$ (br), 1673 (s), 1620 (m), 1429 (w), 1354 (w), 1262 (w), 1199 (s), 1138 (m), 1079 (w), 837 (w), 722 (w) cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D-Alanin, (R)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.22$ (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6 H, CH_3), 1.64 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 2.13 (dd, $J = 12.1, 17.4$ Hz, 1 H, CH_2), 2.32 (m, 1 H, CH_2), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 2.36 (s, 3 H, CH_3), 2.79 (m, 1 H, CH_2), 2.81 (s, 3 H, CH_3), 2.83 (dd, $J = 5.5, 17$ Hz, 1 H, CH_2), 3.69 (m, 1 H, CH), 3.76 (m, 1 H, CH), 4.08 (s, 3 H, OCH_3), 4.09 (s, 3 H, OCH_3), 4.77 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 6.45 (s, 1 H, Ar-H), 6.54 (s, 1 H, Ar-H), 6.73 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.74 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.84 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.86 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.31 (s, 1 H, Ar-H), 7.32 (s, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 17.99$ (CH_3), 18.36 (CH_3), 19.26 (CH_3), 22.11 (2 CH_3), 24.51 (CH_3), 32.88 (CH_2), 33.07 (CH_2), 45.12 (CH), 48.92 (CH), 49.44 (CH), 57.03 (OCH_3), 59.99 (OCH_3), 102.02, 102.64, 107.28, 108.02, 108.08, 113.06, 115.05, 115.20, 118.89, 119.12, 119.12, 120.17, 120.25, 122.05, 122.71, 124.13, 133.08, 134.67, 134.67, 136.43, 136.65, 137.54, 137.83, 141.67, 152.31, 152.61, 155.50, 156.88, 158.13, 158.13, 165.11, 167.25, 175.38 (Ar-C) ppm.

Tabelle 16. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin A₄ (**32**) in CD₃OD.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	175.38				
3	48.92	3.76 m		4 _{eq} , 3-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	32.88	2.32 m	3, 5, 9, 10, 3-Me	4 _{eq} , 1', 3-Me	3, 4 _{eq}
4 _{eq}	32.88	2.83 dd	3, 5, 9, 10, 3-Me	3, 4 _{ax} , 7', 3-Me	3 (5.5), 4 _{ax} (17.0)
5	122.05				
6	167.25				
7	102.64	6.54 s	5, 6, 8, 9, 8'		
8	165.11				
9	107.28				
10	141.67				
1'	118.89	6.73 d	3', 4', 8', 9', 10', 2'-Me	4 _{ax} , 2'-Me	3' (1.0)
2'	137.83				
3'	108.08	6.86 d	1', 2', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	1' (1.0)
4'	158.13				
5'	152.61				
6'	120.25				
7'	134.67	7.32 s	5, 5', 9', 10', 6"	4 _{eq}	
8'	122.71				
9'	136.43				
10'	115.05				
1"	119.12	6.74 d	3", 4", 8", 9", 10", 2"-Me	2"-Me	3" (1.0)
2"	137.54				
3"	108.02	6.84 d	1", 2", 4", 5", 8", 10", 2"-Me	2"-Me, 4"-OMe	1" (1.0)
4"	158.13				
5"	152.31				
6"	120.17				
7"	134.67	7.31 s	6', 4", 9", 10", 5'''	4 _{eq} '''	
8"	124.13				
9"	136.65				
10"	115.20				

Tabelle 16. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Michellamin A₄ (**32**) in CD₃OD.
(Fortsetzung)

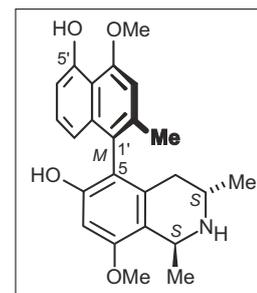
1'''	49.44	4.77 q	3''', 8''', 9''', 10''', 1'''-Me	1'''-Me	1'''-Me (6.7)
3'''	45.12	3.69 m		4 _{eq} ''', 1'''-Me, 3'''- Me	4 _{ax} ''', 4 _{eq} ''', 3'''-Me
4 _{ax} '''	33.07	2.13 dd	3''', 9''', 10''', 3'''-Me	4 _{eq} ''', 1'''-Me	3''' (12.1), 4 _{eq} ''' (17.4)
4 _{eq} '''	33.07	2.79 m		4 _{ax} ''', 7''	3''', 4 _{ax} '''
5'''	119.12				
6'''	156.88				
7'''	102.02	6.45 s	8'', 5''', 6''', 8''', 9'''		
8'''	155.50				
9'''	113.06				
10'''	133.08				
1-Me	24.51	2.81 s	1, 9		
3-Me	17.99	1.22 d	3, 4	3, 4 _{ax} , 4 _{eq}	3 (6.5)
2'-Me	22.11	2.36 s	1', 2', 3', 10'	1', 3'	
4'-OMe	57.03	4.09 s	4'	3'	
2''-Me	22.11	2.34 s	1'', 2'', 3'', 10''	1'', 3''	
4''-OMe	59.99	4.08 s	4''	3''	
1'''-Me	18.36	1.64 d	1''', 9'''	1''', 3'''	1''' (6.7)
3'''-Me	19.26	1.22 d	3''', 4'''	3''', 4 _{ax} '''	3''' (7.0)

7.2.2.12 5'-O-Demethylhamatin (**28**; Fraktion 5.1).

Brauner amorpher Feststoff (MeOH, 20 mg).

Schmp.: 231 °C (MeOH);

Lit.^[40]: 175 °C (MeOH).



HRMS (ESI): berechnet $[C_{24}H_{27}NO_4]^+ = 394.20120$;
gemessen $[C_{24}H_{27}NO_4]^+ = 394.20015$.

$[\alpha]_D^{20}$: +9.3° (MeOH; $c = 0.055$);

Lit.^[40]: +26°.

UV: λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 203 (2.58), 207 (2.60), 227 (2.48), 288 (1.73), 305 (1.69), 316 (1.89), 336 (1.5) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{239} -12.3, \Delta\epsilon_{226} +25.4, \Delta\epsilon_{216} +12.4, \Delta\epsilon_{209} +16.9, \Delta\epsilon_{198} -14.9$ (MeOH;
 $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3396$ (br), 2979 (br), 1673 (s), 1609 (m), 1449 (w), 1428 (w), 1392 (w),
1363 (w), 1202 (s), 1137 (m), 1114 (m), 835 (w) cm^{-1} ;

Lit.^[40]: 2937, 2848, 1680, 1610, 1447, 1427, 1392, 1363, 1204, 1136, 838 cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: L-Alanin, (S)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.19$ (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.63 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 2.08 (dd, $J = 11.7, 18.2$ Hz, 1 H, CH_2), 2.14 (s, 3 H, CH_3), 2.38 (dd, $J = 4.8, 18.2$ Hz, 1 H, CH_2), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 3.16 (m, 1 H, CH), 4.11 (s, 3 H, OCH_3), 4.77 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 6.60 (s, 1 H, Ar-H), 6.63 (dd, $J = 0.9, 7.6$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.71 (dd, $J = 0.9, 7.6$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.93 (s, 1 H, Ar-H), 7.13 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.66$ (CH_3), 19.14 (CH_3), 20.62 (CH_3), 32.82 (CH_2), 44.98 (CH), 49.2 (CH), 56.07 (OCH_3), 56.71 (OCH_3), 98.76, 108.10, 110.46, 114.33, 115.16, 116.86, 118.38, 125.99, 128.78, 132.78, 136.68, 137.35, 156.21, 156.95, 157.20, 157.66 (Ar-C) ppm.

Tabelle 17. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von 5'-*O*-Demethylhamatin (**28**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.2	4.77 q	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me, 8-OMe	1-Me (6.7)
3	44.98	3.69 m	1, 3, 10, 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 1-Me, 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 3-Me
4_{ax}	32.83	2.08 dd	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 3-Me	3, 4_{eq} , (8'), 3-Me	3 (11.7), 4_{eq} (18.2)
4_{eq}	32.83	2.38 dd	3, 5, 6, 9, 10	3, 4_{ax} , 3-Me	3 (4.8), 4_{ax} (18.2)
5	118.38				
6	156.95				
7	98.76	6.60 s	1, 5, 6, 8, 9, 10, 1'	8-OMe	
8	157.66				
9	114.33				
10	132.78				
1'	125.99				
2'	136.68				
3'	108.10	6.93 s	5, 1', 2', 4', 5', 6', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	157.20				
5'	156.21				
6'	110.46	6.71 dd	5', 8', 9', 10'	7'	7' (7.6), 8' (0.9)
7'	128.78	7.13 dd	5', 6', 8', 9', 10'	6', 8'	6' (7.6), 8' (7.6)
8'	116.86	6.63 dd	1', 4', 5', 6', 7', 9', 10'	4_{ax} , 7'	6' (0.9), 7' (7.6)
9'	137.35				
10'	115.16				
1-Me	18.66	1.63 d	1, 9	1, 3, 8-OMe	1 (6.7)
3-Me	19.14	1.19 d	3, 4, 10	3, 4_{ax} , 4_{eq}	3 (6.5)
8-OMe	56.07	3.92 s	8	7	
2'-Me	20.62	2.14 s	1', 2', 3', 5'	3'	
4'-OMe	56.71	4.11 s	4'	3'	

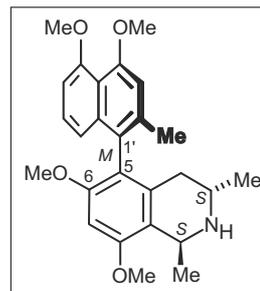
Die physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur^[40] berichteten Werten.

7.2.2.13 6-O-Methylhamatin (**29**; Fraktion 6).

Brauner amorpher Feststoff (MeOH, 23 mg).

Schmp.: 239 °C (MeOH);

Lit.^[193]: 272 °C.



HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{NO}_4]^+ = 422.23258$;
gemessen $[\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{NO}_4]^+ = 422.23145$.

$[\alpha]_D^{20}$: +20° (MeOH; $c = 0.03$);

Lit.^[193]: +28°.

UV: λ_{max} ($\log \varepsilon$) = 204 (2.58), 207 (2.60), 228 (2.48), 287 (1.73), 305 (1.69), 318 (1.89), 335 (1.5) nm.

CD: $\lambda_{\text{max}} = \Delta\varepsilon_{240} -14.9, \Delta\varepsilon_{229} +28.0, \Delta\varepsilon_{203} -14.0$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2960$ (br), 2841 (br), 1673 (s), 1596 (m), 1460 (w), 1387 (w), 1361 (w), 1326 (w), 1260 (w), 1202 (s), 1137 (m), 1131 (s), 1077 (m) cm^{-1} ;

Lit.^[193]: 3420 (br), 2954 (m), 2938m, 2654m, 2475m, 1597 (m), 1584s, 1483 (w), 1461m, 1458m, 1439m, 1384 (m), 1324 (s), 1260 (s), 1206 (s), 1127 (m), 1112m, 1076 (s), 1039 (m), 951 (w), 812 (w), 757 (w) cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: L-Alanin, (S)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.18$ (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.64 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 2.06 (s, 3 H, CH_3), 2.07 (dd, $J = 11.7, 18.1$ Hz, 1 H, CH_2), 2.39 (dd, $J = 4.7, 18.1$ Hz, 1 H, CH_2), 3.66 (s, 3 H, OCH_3), 3.91 (s, 3 H, OCH_3), 3.95 (s, 3 H, OCH_3), 4.00 (s, 3 H, OCH_3), 4.81 (q, $^3J = 6.8$ Hz, 1 H, CH), 6.67 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.77 (s, 1 H, Ar-H), 6.84 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.90 (s, 1 H, Ar-H), 7.15 (pt, $J = 7.8$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.56$ (CH_3), 19.12 (CH_3), 20.55 (CH_3), 32.80 (CH_2), 44.99 (CH), 49.17 (CH), 56.22 (OCH_3), 56.27 (OCH_3), 56.87 (OCH_3), 56.95 (OCH_3), 95.44, 107.00, 110.39, 115.09, 117.77, 118.69, 120.71, 125.71, 127.69, 132.83, 136.42, 137.59, 157.70, 157.89, 158.81, 159.53 (Ar-C) ppm.

Tabelle 18. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von 6-*O*-Methylhamatin (**29**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.17	4.81 q	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me	1-Me (6.8)
3	44.99	3.69 m	1, 3, 3-Me	(4 _{ax}), 4 _{eq} , 1-Me, 3-Me	4 _{ax} , 4 _{eq} , 3-Me
4 _{ax}	32.80	2.07 dd	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 3-Me	(3), 4 _{eq} , 8', 3-Me	3 (11.7), 4 _{eq} (18.1)
4 _{eq}	32.80	2.39 dd	3, 5, 6, 7, 9, 10, 3-Me	4 _{ax} , 3, 3-Me	3 (4.7), 4 _{ax} (18.1)
5	120.71				
6	159.53				
7	95.44	6.77 s	1, 5, 6, 8, 9, 10, 1'	6-OMe, 8-OMe	
8	157.89				
9	115.09				
10	132.83				
1'	125.71				
2'	136.42				
3'	110.39	6.90 s	5, 7, 1', 2', 4', 5', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe	
4'	157.70				
5'	158.81				
6'	107.00	6.84 d	4', 5', 8', 9', 10'	7', 5'-OMe	7' (7.8)
7'	127.69	7.15 <i>pt</i>	5', 6', 8', 9', 10'	6', 8'	6' (7.8), 8' (7.8)
8'	118.69	6.67 d	1', 4', 5', 6', 9', 10'	4 _{ax} , 7', 6-OMe	7' (7.8)
9'	137.59				
10'	117.77				
1-Me	18.56	1.64 d	1, 9	1, 3	1 (6.8)
3-Me	19.12	1.18 d	3, 4, 10	3, 4 _{ax} , 4 _{eq}	3 (6.4)
6-OMe	56.22	3.66 s	6	7, 8'	
8-OMe	56.27	4.00 s	8	7	
2'-Me	20.55	2.06 s	1', 2', 3', 5', 8', 9'	3'	
4'-OMe	56.87	3.95 s	4'	3'	
5'-OMe	56.95	3.91 s	5'	6'	

Die physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur^[40,193] berichteten Werten.

7.3 *Isolierung von dimeren Naphthylisochinolininen aus Ancistrocladus spec. 032*

7.3.1 *Isolierungsprozedur*

Das botanisch noch nicht bestimmte *Ancistrocladus*-Material wurde im August 2008 in der Demokratischen Republik Kongo nahe der Stadt Mbandaka gesammelt (Sammelexemplar Nummer 032, GPS-Koordinaten: 00°06.191S, 018°20.506E). Ein Herbar-Beleg (Nr. 093) wurde im Herbarium Bringmann, Universität Würzburg angelegt. 400 g Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit einem sauren Dichlormethan / Ethanol-Gemisch (1:1, v/v, 15 mL konz. HCl auf 200 mL Lösungsmittelgemisch) für 1.5 h im Ultraschallbad extrahiert. Nach Austausch der Lösungsmittel wurden die Blätter erneut 1 h lang im Ultraschallbad extrahiert und anschließend zwei Tage auf dem Schüttler. Nach Abfiltration der Blattreste und Neutralisation mit NaOH wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der trockene Rohextrakt (25 g) wurde in Chloroform im Ultraschallbad mazeriert und der verbleibende Rückstand (5.7 g) in Methanol gelöst für die weitere Aufarbeitung mittels präparativer HPLC.

An einer Symmetry-RP-18-Säule (7 μm , 19 x 300 mm, Fa. *Waters*) mit dem Gradientensystem H_2O + 0.05% TFA (A) / 90% MeOH (B) + 0.05% TFA: 0 min 18% B, 35.5 min 33% B, 36 min 100% B, 38 min 100% B, 38.5 min 18% B, 42 min 18% B und einer Flussrate von 8 mL min^{-1} wurde der Extrakt in 13 Fraktionen aufgetrennt. Die Fraktionen 1 ($t_R = 26.5 - 27.5$ min; Mbandakamin A, **33a**) und 11 ($t_R = 33.3 - 34.4$ min) wurden aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

In Fraktion 1 enthaltene Minderkomponenten wurden mittels einer Chromolith SemiPrep-RP-18-Säule (10 x 100 mm, Fa. *Merck*) und dem Gradientensystem 90% H_2O + 0.05% TFA (A) / 90% MeOH (B) + 0.05% TFA: 0 min 0% B, 7 min 25% B, 7.5 min 100% B, 8.5 min 100% B, 9 min 0% B, 11 min 0% B und einer Flussrate von 8 mL min^{-1} entfernt.

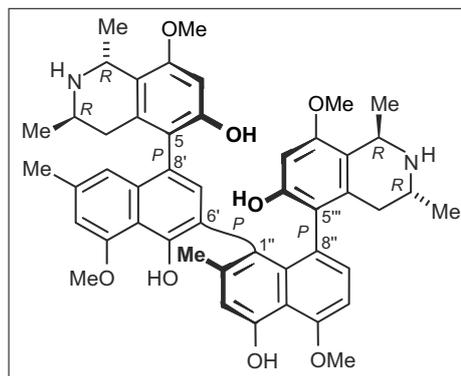
Fraktion 2 wurde über eine Chromolith SemiPrep-RP-18-Säule (10 x 100 mm, Fa. *Merck*) mit dem Gradientensystem H_2O + 0.05% TFA (A) / 90% MeCN (B) + 0.05% TFA: 0 min 15% B, 7 min 25% B, 7.5 min 100% B, 8.5 min 100% B, 9 min 15% B, 11 min 15% B und einer Flussrate von 8 mL min^{-1} weiter aufgereinigt. Fraktion 2.2 ($t_R = 6.8 - 7.2$ min; Mbandakamin B, **33b**) wurde aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

7.3.2 Aus *Ancistrocladus spec. 032* isolierte Verbindungen7.3.2.1 Mbandakamin A (**33a**; Fraktion 1).

Gelber amorpher Feststoff (MeOH, 30 mg).

Schmp.: > 360 °C (MeOH).

HRMS (ESI): berechnet $[C_{48}H_{53}N_2O_8]^+ = 785.37980$;
gemessen $[C_{48}H_{53}N_2O_8]^+ = 785.37964$.



$[\alpha]_D^{20}$: +38° (MeOH; $c = 0.01$).

UV: λ_{\max} (log ϵ) = 348 (3.7), 332 (3.8), 318 (3.8), 290 (3.7), 230 (4.4) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{319} +4, \Delta\epsilon_{290} -3.6, \Delta\epsilon_{248} +7, \Delta\epsilon_{230} -30, \Delta\epsilon_{200} +32$ (MeOH; $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3140$ (s), 3047 (s), 1617 (w), 1595 (w), 1442 (w), 1406 (s), 1108 (w), 1077 (w) cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D-Alanin, (R)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.25$ (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.49 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.53 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.57 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.88 (s, 3 H, CH_3), 1.97 (dd, $J = 4.3, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 2.42 (dd, $J = 11.7, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 2.52 (dd, $J = 11.7, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 3.03 (s, 3 H, OCH_3), 3.50 (m, 1 H, CH), 3.70 (m, 1 H, CH), 3.89 (dd, $J = 4.5, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 3.85 (s, 3 H, OCH_3), 4.09 (s, 3 H, OCH_3), 4.15 (s, 3 H, OCH_3), 4.64 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 4.79 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, CH), 5.32 (s, 1 H, Ar-H), 6.44 (s, 1 H, Ar-H), 6.46 (s, 1 H, Ar-H), 6.62 (pt, $^4J = 1.2$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.74 (d, $^4J = 1.2$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.78 (s, 1 H, Ar-H), 7.00 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.05 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.7$ (2 CH_3), 18.8 (CH_3), 19.6 (CH_3), 21.3 (CH_3), 22.0 (CH_3), 32.9 (CH_2), 33.1 (CH_2), 45.6 (CH), 46.1 (CH), 49.4 (CH), 49.9 (CH), 55.3 (OCH_3), 55.9 (OCH_3), 56.7 (OCH_3), 56.8 (OCH_3), 96.8, 98.5, 104.7, 106.9, 113.1, 113.4, 114.4, 114.5, 116.2, 118.8, 120.5, 122.7, 124.1, 124.3, 126.3, 127.8, 132.2, 133.5, 133.6, 134.4, 135.9, 136.4, 138.1, 140.9, 151.0, 154.3, 155.3, 156.5, 157.3, 157.4, 157.6, 158.4 (Ar-C) ppm.

Tabelle 19. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Mbandakamin A (**33a**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.4	4.79 q	3, 8, 9, 1-Me	1-Me, 8-OMe	1-Me (6.7)
3	45.6	3.70 m	3-Me	4_{eq} , 1-Me, 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 3-Me
4_{ax}	32.9	2.52 dd	3, 9, 10, 3-Me	3 , 4_{eq} , $1'$, $7'''$, 3-Me, $8'''$ -OMe	3 (11.7), 4_{eq} (18.0)
4_{eq}	32.9	3.89 dd	5, 9, 10	3 , 4_{ax} , $7'$, $7'''$, 3-Me	3 (4.5), 4_{ax} (18.0)
5	120.5				
6	157.6				
7	98.5	6.46 s	1, 5, 6, 8, 9	8-OMe	
8	157.3				
9	113.1				
10	133.6				
$1'$	118.8	6.62 <i>pt</i>	$3'$, $4'$, $8'$, $9'$, $10'$, 2'-Me	4_{ax} , 2'- CH_3 , $8'''$ -OMe	$3'$ (1.2)
$2'$	136.4				
$3'$	106.9	6.74 d	$1'$, $2'$, $4'$, $9'$, 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe, $8'''$ -OMe	$1'$ (1.2)
$4'$	157.4				
$5'$	151.0				
$6'$	124.1				
$7'$	134.4	6.44 s	5, $5'$, $9'$, $1''$	4_{eq} , 2''-Me	
$8'$	124.3				
$9'$	135.9				
$10'$	114.4				
$1''$	127.8				
$2''$	140.9				
$3''$	114.5	6.78 s	$1''$, $4''$, $10''$, 2''-Me	2''-Me	
$4''$	155.3				
$5''$	158.4				
$6''$	104.7	7.00 d	$5''$, $8''$, $10''$	$5''$ -Me, $7''$	$7''$ (7.9)
$7''$	132.2	7.05 d	$5''$, $9''$, $5'''$	$6''$, $4_{\text{eq}}'''$	$6''$ (7.9)
$8''$	126.3				
$9''$	138.1				
$10''$	116.2				

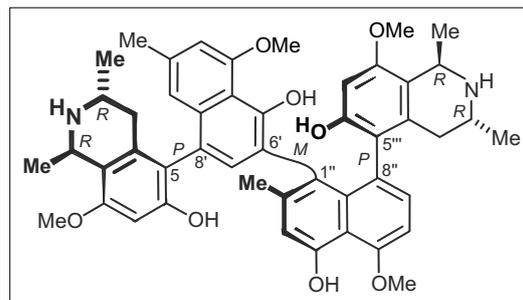
Tabelle 19. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Mbandakamin A (**33a**) in CD_3OD . (Fortsetzung)

1 ^{'''}	49.9	4.64 q	3 ^{'''} , 8 ^{'''} , 9 ^{'''} , 1 ^{'''} -Me	4'-OMe, 1 ^{'''} -Me, 8 ^{'''} -OMe	1 ^{'''} -Me (6.7)
3 ^{'''}	46.1	3.50 m		4 _{eq} ^{'''} , 1 ^{'''} -Me, 3 ^{'''} -Me	4 _{ax} ^{'''} , 4 _{eq} ^{'''} , 3 ^{'''} -Me
4 _{ax} ^{'''}	33.1	2.42 dd	3 ^{'''} , 5 ^{'''} , 9 ^{'''} , 10 ^{'''} , 3 ^{'''} -Me	3 ^{'''} , 4 _{eq} ^{'''} , 3 ^{'''} -Me	3 ^{'''} (11.7), 4 _{eq} ^{'''} (18.0)
4 _{eq} ^{'''}	33.1	1.97 dd	5 ^{'''} , 9 ^{'''} , 10 ^{'''}	7 ^{'''} , 3 ^{'''} , 4 _{ax} ^{'''} , 3 ^{'''} -Me	3 ^{'''} (4.3), 4 _{ax} ^{'''} (18.0)
5 ^{'''}	122.7				
6 ^{'''}	154.3				
7 ^{'''}	96.8	5.32 s	8 ^{'''} , 5 ^{'''} , 6 ^{'''} , 8 ^{'''} , 9 ^{'''}	4 _{ax} , 3-Me, 8-OMe, 8 ^{'''} -OMe	
8 ^{'''}	156.5				
9 ^{'''}	113.4				
10 ^{'''}	133.5				
1-Me	18.7	1.57 d	1	1, 3, 8-OMe	1 (6.7)
3-Me	19.6	1.49 d	3, 4	3, 4 _{ax} , 4 _{eq} , 7 ^{'''} , 8 ^{'''} -OMe	3 (6.5)
8-OMe	55.9	3.85 s	8	1, 7, 1-Me	
2'-Me	22.0	2.34 s	1', 2', 3', 9', 10'	1', 3', 8 ^{'''} -OMe	
4'-OMe	56.7	4.09 s	4'	3', 1 ^{'''} , 8 ^{'''} -OMe	
2''-Me	21.3	1.88 s	6', 1'', 2'', 3'', 8'', 9''	7', 3''	
4''-OMe	56.8	4.15 s	5''	6'', 7''	
1 ^{'''} -Me	18.8	1.53 d	1 ^{'''}	1 ^{'''} , 3 ^{'''} , 8 ^{'''} -OMe	1 ^{'''} (6.7)
3 ^{'''} -Me	18.7	1.25 d	3 ^{'''} , 4 ^{'''}	3 ^{'''} , 4 _{ax} ^{'''} , 4 _{eq} ^{'''}	3 ^{'''} (6.5)
8 ^{'''} -OMe	55.3	3.03 s	8 ^{'''}	4 _{ax} , 1', 3', 1 ^{'''} , 7 ^{'''} , 3-Me, 2'-Me, 4'-OMe, 1 ^{'''} -Me	

7.3.2.2 *Mbandakamin B (33b; Fraktion 2.2).*

Gelber amorpher Feststoff (MeOH, 3.5 mg).

Schmp.: > 360 °C (MeOH).



HRMS (ESI): berechnet $[C_{48}H_{53}N_2O_8]^+ = 785.37964$;
 gemessen $[C_{48}H_{53}N_2O_8]^+ = 785.37899$.

$[\alpha]_D^{20}$: -38° (MeOH; $c = 0.01$).

UV: λ_{\max} (log ϵ) = 345 (3.4), 330 (3.5), 319 (3.5), 293 (3.4), 230 (4.2) nm.

CD: $\lambda_{\max} = \Delta\epsilon_{348} -0.9, \Delta\epsilon_{311} -1.1, \Delta\epsilon_{269} +1.7, \Delta\epsilon_{244} -3.6, \Delta\epsilon_{221} +6, \Delta\epsilon_{206} -4$ (MeOH;
 $c = 0.1$) $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2924$ (m), 2852 (w), 1677 (s), 1204 (m), 1137 (m), 1054 (w), 841 (w),
 803 (w) cm^{-1} .

Oxidativer Abbau: D-Alanin, (*R*)-3-Aminobuttersäure.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.13$ (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.15 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.39 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.56 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.72 (dd, $J = 11.7, 18.1$ Hz, 1 H, CH_2), 1.96 (dd, $J = 10.9, 18.2$ Hz, 1 H, CH_2), 2.01 (s, 3 H, CH_3), 2.22 (dd, $J = 4.1, 18.2$ Hz, 1 H, CH_2), 2.27 (s, 3 H, CH_3), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 2.65 (dd, $J = 4.5, 18.0$ Hz, 1 H, CH_2), 3.42 (m, 1 H, CH), 3.45 (s, 3 H, OCH_3), 3.65 (m, 1 H, CH), 3.93 (s, 3 H, OCH_3), 4.09 (s, 3 H, OCH_3), 4.15 (s, 3 H, OCH_3), 4.38 (q, $^3J = 6.8$ Hz, 1 H, CH), 4.73 (q, $^3J = 6.8$ Hz, 1 H, CH), 5.94 (s, 1 H, Ar-H), 6.51 (pt, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.71 (s, 1 H, Ar-H), 6.77 (pt, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.85 (s, 1 H, Ar-H), 6.86 (s, 1 H, Ar-H), 6.98 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.01 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.51$ (CH_3), 18.55 (CH_3), 18.98 (CH_3), 19.09 (CH_3), 22.21 (CH_3), 22.77 (CH_3), 33.23 (CH_2), 33.62 (CH_2), 44.71 (CH), 45.42 (CH), 49.01 (CH), 49.33 (CH), 55.63 (OCH_3), 56.21 (OCH_3), 56.91 (OCH_3), 56.96, 98.70, 98.83, 104.89, 107.78, 113.08, 114.73, 115.05, 115.36, 116.16, 118.59, 120.20, 122.89, 123.69, 126.65, 127.38, 131.17, 132.69, 133.26, 133.96, 136.13, 137.16, 137.43, 139.56, 139.57, 153.17, 155.61, 155.91, 156.22, 156.31, 157.61, 158.01, 158.13 (Ar-C) ppm.

Tabelle 20. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Mbandakamin B (**33b**) in CD_3OD .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.01	4.73 q	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me, 8-OMe	1-Me (6.8)
3	44.71	3.65 m		4_{eq} , 1-Me, 3-Me	4_{ax} , 4_{eq} , 3-Me
4_{ax}	33.23	1.72 dd	3, 10, 3-Me	4_{eq} , 3-Me	3 (11.7), 4_{eq} (18.1)
4_{eq}	33.23	2.65 dd	5, 9, 10	3, 4_{ax} , 7', 3-Me, 2''-Me	3 (4.9), 4_{ax} (18.1)
5	120.20				
6	155.91				
7	98.83	6.71 s	5, 6, 8, 9	8-OMe	
8	157.61				
9	115.36				
10	133.96				
1'	118.59	6.51 <i>pt</i>	3', 8', 10', 2'-Me	2'-Me	3' (0.9)
2'	139.57				
3'	107.78	6.77 d	1', 4', 10', 2'-Me	2'-Me, 4'-OMe, 8'''-OMe	1' (0.9)
4'	158.01				
5'	153.17				
6'	136.13				
7'	133.26	6.86 s	5, 5', 6', 6''	4_{eq} , 4_{ax} ''', 2''-Me	
8'	122.89				
9'	137.16				
10'	115.05				
1''	126.65				
2''	139.56				
3''	114.73	6.85 s	1'', 4'', 5'', 9'', 2''-Me	2''-Me	
4''	155.61				
5''	158.13				
6''	104.89	7.01 d	4'', 8'', 9'', 10''	5''-OMe	7'' (8.1)
7''	132.69	6.98 d	8'', 9'', 10'', 5''	5''-OMe, 4_{eq} '''	6'' (8.1)
8''	127.38				
9''	137.43				
10''	116.16				

Tabelle 20. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Mbandakamin B (**33b**) in CD_3OD . (Fortsetzung)

1'''	49.33	4.38 q	3''', 8''', 9''', 10''', 1'''-Me	1'''-Me, 8'''-OMe	1'''-Me (6.8)
3'''	45.42	3.42 m	1'''	4 _{eq} ''', 1'''-Me, 3'''-Me	4 _{ax} ''', 4 _{eq} ''', 3'''-Me
4 _{ax} '''	33.62	1.96 dd	3''', 10'''	4 _{eq} ''', 7', 3'''-Me	3''' (10.9), 4 _{eq} ''' (18.2)
4 _{eq} '''	33.62	2.22 dd	5''', 9''', 10'''	7'', 4 _{ax} '''	3''' (4.1), 4 _{ax} ''' (18.2)
5'''	123.69				
6'''	156.22				
7'''	98.70	5.94 s	8'', 5''', 6''', 9''', 10'''	4'-OMe, 8'''-OMe	
8'''	156.31				
9'''	113.08				
10'''	131.17				
1-Me	18.55	1.56 d	1, 9	1, 3, 8-OMe	1 (6.8)
3-Me	19.09	1.13 d	3, 4	3, 4 _{ax} , 4 _{eq} , 2''-OMe	3 (6.4)
8-OMe	56.21	3.93 s		7, 1-Me	
2'-Me	22.21	2.27 s	1', 2', 3', 9'	1', 3', 8'''-OMe	
4'-OMe	56.91	4.09 s	4'	3', 7''', 8'''-OMe	
2''-Me	22.77	2.01 s	1'', 2'', 3''	4 _{eq} '', 3'', 1-Me	
4''-OMe	56.96	4.15 s	5''	6'', 7''	
1'''-Me	18.51	1.39 d	1''', 9'''	1''', 3'''	1''' (6.8)
3'''-Me	18.98	1.15 d	3''', 4'''	3''', 4 _{ax} ''', 4 _{eq} '''	3''' (6.5)
8'''-OMe	55.63	3.45 s	8'''	1', 3', 1''', 7''', 2'-Me, 4'-OMe	

7.4 Strukturaufklärung von Polyketiden aus *Streptomyces spec. AK671*

7.4.1 Aufklärung der Absolutkonfiguration von EM18 (42)

7.4.1.1 Unlike-EM18 ('AK-671-Rt.4.7', 42a)^[121]

Beiger amorpher Feststoff (MeOH, 20 mg).

HRMS (ESI): berechnet $[C_{16}H_{14}NaO_6]^+ = 325.06826$;
gemessen $[C_{16}H_{14}NaO_6]^+ = 325.06901$.

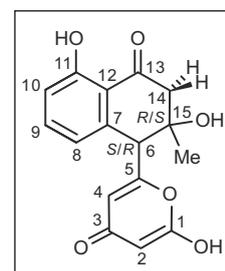


Tabelle 21. NMR-Daten (1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von *unlike*-EM18 (42a) in $(CD_3)_2CO$.

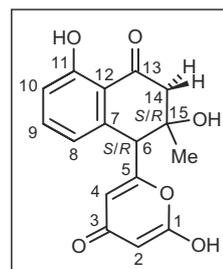
Position	^{13}C [ppm]	1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	163.7				
2	90.6	5.29 s	1, 3, 4	4	
3	170.6				
4	103.1	6.21 s	2, 3, 5, 6	2, 6, 8	
5	165.3				
6	56.5	4.17 s	4, 5, 7, 8, 12, 14, 15, 15-Me	4, 8, 15-Me	
7	142.7				
8	121.4	6.87 dd	6, 10, 12	9	9 (8.4), 10 (1.0)
9	137.5	7.49 dd	7, 11	8, 10	8, 10 (8.4)
10	117.4	6.85 dd	8, 11, 12	9	8 (1.0), 9 (8.4)
11	163.4	12.5 s	10, 11, 12		
12	117.4				
13	205.0				
14 _{ax}	49.6	2.75 d	6, 12, 13, 15, 15-Me	15-Me	14 _{eq} (17.5)
14 _{eq}	49.6	3.27 d	6, 12, 13, 15, 15-Me	15-Me	14 _{ax} (17.5)
15	72.5				
15-Me	28.2	1.41 s	6, 13, 14, 15	14 _{ax} , 14 _{eq}	

Die Daten von 42a wurden von M. Knauer aufgenommen und bereitgestellt.^[121]

7.4.1.2 *Like-EM18* ('AK-671-Rt.6.4', **42b**)

Beiger amorpher Feststoff (MeOH, 2.5 mg).

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NaO}_6]^+ = 325.06826$;
 gemessen $[\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NaO}_6]^+ = 325.06872$.

Tabelle 22. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von *like-EM18* (**42b**) in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

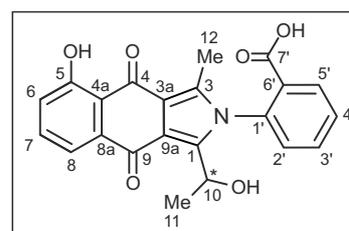
Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	163.4				
2	90.4	5.31 s	1, 3, 4	4	
3	170.6				
4	104.0	6.21 s	2, 3, 5, 6	2, 6, 8	
5	165.2				
6	56.2	4.23 s	4, 5, 7, 8, 12, 14, 15, 15-Me	4, 8, 15-Me	
7	142.8				
8	120.8	6.87 dd	6, 10, 12	9	9 (7.8), 10 (1.0)
9	137.5	7.50 dd	7, 11	8, 10	8, 10 (7.8)
10	117.4	6.83 dd	8, 11, 12	9	8 (1.0), 9 (7.8)
11	163.4	12.45 s	10, 11, 12		
12	117.4				
13	204.8				
14 _{ax}	49.7	3.22 d	6, 12, 13, 15, 15-Me	15-Me	14 _{eq} (17.5)
14 _{eq}	49.7	2.87 d	6, 12, 13, 15, 15-Me	15-Me	14 _{ax} (17.5)
15	72.2				
15-Me	28.8	1.41 s	6, 13, 14, 15	14 _{ax} , 14 _{eq}	

7.4.2 Identifizierung von bekannten Substanzen

7.4.2.1 Bhimamycin F ('AK-671-Rt.15.5', **53**)^[131]

Gelber amorpher Feststoff (MeOH, 1 mg).

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{NO}_6]^- = 390.09831$;
gemessen $[\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{NO}_6]^- = 390.09821$.



$[\alpha]_D^{20}$: -4.5° (MeOH; $c = 0.2$).

UV: λ_{max} ($\log \epsilon$) = 247 (4.73), 275 (4.35), 405 (4.18) nm.

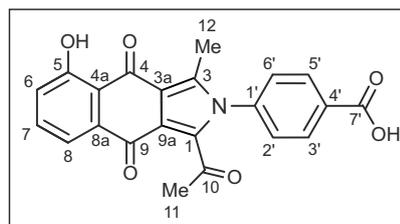
Tabelle 23. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Bhimamycin F (**53**) in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	148.1				
2					
3	139.2				
3a	117.9				
4	188.0				
4a	118.4				
5	163.6, 163.9	13.20 s	4, 4a, 5, 6	6	
6	124.6, 124.7	7.28 m	4, 4a, 5, 8	5, 7	7, 8
7	136.6, 136.7	7.74 dd	5, 8a, 9	6, 8	6 (7.5), 8 (8.4)
8	119.8	7.78 dd, 7.79 dd	4, 4a, 5, 6, 9	7	6 (1.2), 7 (8.4)
8a	136.6, 136.7				
9	182.0				
9a	117.6				
10	63.8	4.51 q	1, 9a, 11	11, 2'	11 (6.6)
11	23.8	1.40 d	1, 10	10, 2'	10 (6.6)
12	12.3	2.43 s	3, 3a, 4	2'	
1'	140.0				
2', 4'	129.2, 129.5	7.71 m	1', 2', 4', 6', 7'	10, 11, 12, 3', 5'	
3', 5'	132.1, 132.3	8.32 m	1', 2', 3', 4', 5', 7'	2', 4'	
6'	133.5				
7'	166.7				

7.4.3 *Strukturaufklärung von neuen Substanzen*7.4.3.1 *Bhimamycin H ('AK-671-Rt.15.7', 54).*

Gelber amorpher Feststoff (MeOH, 3 mg).

HRMS (ESI): berechnet $[C_{22}H_{16}NO_6]^+ = 390.09721$;
 gemessen $[C_{22}H_{16}NO_6]^+ = 390.09596$.

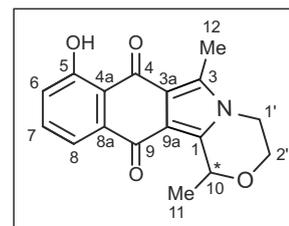
UV: λ_{\max} (log ϵ) = 250 (4.81), 409 (4.21) nm.Tabelle 24. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Bhimamycin H (**54**) in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	134.9				
2					
3	141.3				
3a	117.9				
4	187.7				
4a	118.0				
5	163.4				
6	124.4	7.40 dd	4, 4a, 5, 8	7	7 (8.4), 8 (1.2)
7	136.5	7.64 dd	5, 8a	6, 8	6 (8.4), 8 (7.5)
8	119.7	7.95 d	4, 4a, 6, 9	7	7 (7.5)
8a	136.5				
9	180.1				
9a	122.2				
10	194.0				
11	31.3	2.92 s	1, 10		
12	12.4	2.48 s	3, 3a, 4	2'	
1'	140.6				
2', 6'	128.2	7.66 d	1', 3', 4', 5'	12, 3', 5'	3', 5' (8.6)
3', 5'	131.7	8.55 d	1', 2', 6', 7'	2', 6'	2', 6' (8.6)
4'	134.0				
7'	168.4				

7.4.3.2 *Bhimamycin I* ('AK-671-Rt.13.6', **55**).

Gelber amorpher Feststoff (MeOH, 4 mg).

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NNaO}_4]^+ = 320.08933$;
 gemessen $[\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NNaO}_4]^+ = 320.08911$.



$[\alpha]_D^{20}$: 0° (MeOH; $c = 0.2$);
 Drehwert schwankt zwischen positiven und negativen Werten.

UV: λ_{max} ($\log \varepsilon$) = 242 (4.60), 267 (4.20), 275 (4.15), 405 (4.15) nm.

Tabelle 25. NMR-Daten (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) von Bhimamycin I (**55**) in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC [2J - 4J]	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	138.6				
2					
3	137.7				
3a	117.3				
4	188.2				
4a	118.5				
5	163.3				
6	123.4	7.17 dd	4, 4a, 5, 8, 8a	7	7, 8 (6.3, 6.6)
7	136.2	7.64 m	4a, 5, 6, 8a, 9	6, 8	6, 8
8	118.9	7.64 m	4, 4a, 5, 6, 8a, 9	7	6, 7
8a	137.2				
9	179.0				
9a	115.9				
10	70.4	5.25 q	1, 9, 11, 2'	11, 1', 2b'	11 (6.5)
11	18.9	1.66 d	1, 10	10, 2a'	10 (6.5)
12	10.7	2.65 s	3, 3a, 4	1'-H	
1'	43.3	4.05 m	1, 3, 2'	2a', 2b'	2a', 2b'
2a'	60.3	4.01 m	10, 1'	10, 11, 1', 2b'	1', 2b'
2b'	60.3	4.25 m	10, 1'	10, 11, 1', 2a'	1', 2a'

7.5 Detektion von Glucosinolaten im Phloemsaft von *Arabidopsis thaliana* mittels CZE-ESI-oTOF-MS

7.5.1 Auflistung der durchgeführten Phloemsammlungen

Die Prozedur zur Sammlung von Phloemsäften ist ausführlich in Kapitel 4.2.2.3 beschrieben, die Parameter der Messgeräte in Kapitel 4.2.1.3 und 7.1.2. In Tabelle 26 sind die genauen Daten der durchgeführten Phloemsammlungen aufgeführt.

I =	Phloemsaft-Probe aus <i>A.-thaliana</i> -Blättern, welche mit MgCl ₂ (10 mM) infiltriert wurden.
NI =	Phloemsaft-Probe aus <i>A.-thaliana</i> -Blättern, welche nicht mit MgCl ₂ infiltriert wurden, welche sich aber in Nachbarschaft zu infiltrierten Blättern befanden.
Prä-Inkubation:	Zeitspanne, in welcher sich die <i>A.-thaliana</i> -Pflanzen zur Öffnung der Stomata unter einer Plastiktüte befanden (ca. 0.5 h).
Infiltration:	Zeitspanne, die benötigt wurde, um ca. 60–80 Blätter von <i>A.-thaliana</i> -Pflanzen (5–6 Blätter pro Pflanze) mit MgCl ₂ zu infiltrieren.
Sammlung:	Sammlung von infiltrierten und nicht-infiltrierten <i>A.-thaliana</i> -Blättern nach der modifizierten Sammelprozedur (Kapitel 4.2.2.2).
Phloembluten:	Zeitspanne, in welcher die <i>A.-thaliana</i> -Blätter unter Belichtung in den Sammelvorrichtungen in der CO ₂ -gesättigten Kammer standen (ca. 1.5 h).
Blank:	Phloemsaft-Probe aus <i>A.-thaliana</i> -Blättern, bei welchen die gesamte Pflanze nicht mit MgCl ₂ infiltriert wurde.

Tabelle 26. Probenamen, Zeitpunkte und Blattgewichte aller durchgeführten Phloemsammlungen

Name	Datum	Prä- Inkubation	Infiltration	Sammlung	Phloembluten	Anzahl Blätter		Bemerkungen
						I	NI	
Blank-1	02.03.2012	--	--	9h55–10h25	10h25–12h00	69		
Blank-2	08.03.2012	--	--	10h00–10h35	10h35–12h00	77		
Blank-3	08.03.2012	--	--	10h35–11h10	11h10–13h00	73		
Blank-4	08.03.2012	--	--	12h30–13h00	13h00–14h30	67		
Blank-5	09.03.2012	--	--	8h25–8h55	9h00–12h15	75		
Blank-6	21.03.2012	--	--	13h20–13h50	13h50–15h50	72		Pflanzen blühen
I-0-1, NI-0-1	23.02.2012	9h05–9h40	9h50	10h50	10h50–12h30	65	61	
I-0-2, NI-0-2	29.02.2012	9h30–10h00	10h00	11h00	11h00–12h30	70	67	
I-0-3, NI-0-3	05.03.2012	11h00–12h15	12h15	13h05	13h05–14h45	67	62	Blätter nach Blüten sehr schwach
I-0-4, NI-0-4	20.03.2012	10h30–11h00	11h00	11h40	11h45–13h15	76	72	
I-0-5, NI-0-5	17.04.2012	9h30–10h10	10h25	11h05	11h05–12h50	63	66	
I-0-6, NI-0-6	08.05.2012	9h30–10h00	10h15	11h10	11h10–12h35	60	60	Pflanzen verlaust
I-0.5-1, NI-0.5-1	28.02.2012	9h00–9h45	9h45–10h05	10h20–11h00	11h10–13h50	71	82	
I-0.5-2, NI-0.5-2	05.03.2012	8h30–9h00	9h00–9h30	09h30–10h15	10h15–12h00	70	74	
I-0.5-3, NI-0.5-3	12.03.2012	9h30–10h30	10h40–11h05	11h10–11h50	11h50–14h15	72	77	
I-0.5-4, NI-0.5-4	19.03.2012	9h00–10h00	10h00–10h20	10h30–11h00	11h00–12h30	70	71	Pflanzen blühen
I-0.5-5, NI-0.5-5	27.03.2012	9h15–9h55	9h55–10h25	10h25–11h00	11h00–12h45	68	71	Blätter sehr dünn
I-0.5-6, NI-0.5-6	18.04.2012	9h30–10h00	10h00–10h20	10h20–11h05	11h10–13h00	68	68	

Tabelle 26. Probenamen, Zeitpunkte und Blattgewichte aller durchgeführten Phloemsammlungen (*Fortsetzung*)

Name	Datum	Prä- Inkubation	Infiltration	Sammlung	Phloembluten	Anzahl Blätter		Bemerkungen
						I	NI	
I-4-1, NI-4-1	23.02.2012	8h05–8h35	8h35–9h05	12h45–13h20	13h20–16h00	65	64	
I-4-2, NI-4-2	29.02.2012	8h10–8h35	8h35–9h00	12h30–13h20	13h20–15h00	71	67	
I-4-3, NI-4-3	06.03.2012	8h10–8h35	8h35–8h55	12h30–13h05	13h05–14h45	71	74	
I-4-4, NI-4-4	15.03.2012	8h15–8h45	8h45–9h05	12h30–13h15	13h15–15h00	67	64	
I-4-5, NI-4-5	29.03.2012	8h00–8h30	8h30–9h10	12h30–13h05	13h10–14h40	70	73	
I-4-6, NI-4-6	10.05.2012	8h00–8h25	8h25–8h45	12h30–13h00	13h00–14h50	64	67	
I-24-1, NI-24-1	21.02.2012	9h00–9h30	10h00–10h30					
	22.02.2012			12h25–13h05	13h15–14h45	60	61	
I-24-2, NI-24-2	29.02.2012	10h30–11h00	11h00–11h20					
	01.03.2012			12h40–13h15	13h15–14h45	65	68	
I-24-3, NI-24-3	05.03.2012	9h30–10h30	10h30–10h45					
	06.03.2012			09h45–10h25	10h25–12h15	61	74	
I-24-4, NI-24-4	12.03.2012	8h30–9h00	9h00–9h25					
	13.03.2012			10h35–11h35	11h40–13h30	63	65	
I-24-5, NI-24-5	19.03.2012	8h15–8h45	8h45–9h10					
	20.03.2012			08h30–09h05	09h05–10h45	72	72	Pflanzen blühen
I-24-6, NI-24-6	27.03.2012	11h40–12h10	12h10–12h40					
	28.03.2012			12h15–12h55	13h00–14h30	70	73	

Tabelle 26. Probenamen, Zeitpunkte und Blattgewichte aller durchgeführten Phloemsammlungen (*Fortsetzung*)

Name	Datum	Prä- Inkubation	Infiltration	Sammlung	Phloembluten	Anzahl Blätter		Bemerkungen
						I	NI	
I-48-1, NI-48-1	20.02.2012	9h30–10h00	10h15–11h00					
	22.02.2012			12h25–13h05	13h15–14h45	60	61	
I-48-2, NI-48-2	28.02.2012	8h00–8h30	8h30–9h00					
	01.03.2012			10h10–11h00	11h00–12h30	80	78	
I-48-3, NI-48-3	13.03.2012	9h00–9h45	10h00–10h35					
	15.02.2012			09h55–10h30	10h30–12h55	64	71	
I-48-4, NI-48-4	19.03.2012	11h15–12h00	12h00–12h25					Pflanzen blühen
	21.03.2012			10h45–11h15	11h15–13h00	64	69	
I-48-5, NI-48-5	27.03.2012	8h30–9h15	9h15–9h50					
	29.03.2012			10h15–11h00	11h00–12h30	70	72	
I-48-6, NI-48-6	07.05.2012	12h30–13h00	13h00–13h20					
	09.05.2012			12h15–13h00	13h00–14h30	61	66	

7.5.2 Messdaten und Berechnungen der Glucosinolate in den gemessenen Phloemsaft-Proben

Tabelle 27. Peakflächen der Glucosinolate in Proben gewonnen aus infiltrierten Blättern

Glucosinolat	<i>m/z</i>	Peakflächen [counts] in Probe				
		I-0 h-5	I-0.5 h-2	I-4 h-3	I-24 h-2	I-48 h-2
Sinigrin (57)	358	7434	4061	656	1368	659
Methoxy-Glucobrassicin (58)	477	19346	1505	0	0	0
Glucoraphanin (61)	436	409786	57840	5520	50670	6518
Glucoibarin (63)	478	11904	1753	0	1683	0
Glucohirsutin (64)	492	58023	5073	1284	8384	873
Glucoerysolin (66)	452	128204	31149	4070	22492	1847

Tabelle 28. Peakflächen der Glucosinolate in Proben gewonnen aus nicht-infiltrierten Blättern

Glucosinolat	<i>m/z</i>	Peakflächen [counts] in Probe				
		NI-0 h-5	NI-0.5 h-2	NI-4 h-3	NI-24 h-2	NI-48 h-2
Sinigrin (57)	358	1442	1122	878	3511	477
Methoxy-Glucobrassicin (58)	477	15451	0	0	0	0
Glucoraphanin (61)	436	154616	20137	13942	10026	783
Glucoibarin (63)	478	3562	0	0	741	0
Glucohirsutin (64)	492	20439	4309	16594	1543	0
Glucoerysolin (66)	452	14058	11121	11376	11731	530

Tabelle 29. Relative Peakflächen der Glucosinolate in den Phloemsaft-Proben gewonnen aus infiltrierten Blättern, bezogen auf die 0-h-Probe

Glucosinolat	<i>m/z</i>	Peakflächen [%] in Probe				
		I-0 h-5	I-0.5 h-2	I-4 h-3	I-24 h-2	I-48 h-2
Sinigrin (57)	358	100	54.6	8.8	18.4	8.9
Methoxy-Glucobrassicin (58)	477	100	7.8	0.0	0.0	0.0
Glucoraphanin (61)	436	100	14.1	1.3	12.4	1.6
Glucoibarin (63)	478	100	14.7	0.0	14.1	0.0
Glucohirsutin (64)	492	100	8.7	2.2	14.4	1.5
Glucoerysolin (66)	452	100	24.3	3.2	17.5	1.4

Tabelle 30. Relative Peakflächen der Glucosinolate in den Phloemsaft-Proben gewonnen aus nicht-infiltrierten Blättern, bezogen auf die 0-h-Probe

Glucosinolat	<i>m/z</i>	Peakflächen [%] in Probe				
		NI-0 h-5	NI-0.5 h-2	NI-4 h-3	NI-24 h-2	NI-48 h-2
Sinigrin (57)	358	100	77.8	60.9	243.5	33.1
Methoxy-Glucobrassicin (58)	477	100	0.0	0.0	0.0	0.0
Glucoraphanin (61)	436	100	13.0	9.0	6.5	0.5
Glucoibarin (63)	478	100	0.0	0.0	6.2	0.0
Glucuhirsutin (64)	492	100	21.1	81.2	7.5	0.0
Glucoerysolin (66)	452	100	79.1	80.9	83.4	3.8

7.5.3 Messdaten und Berechnungen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-4-2

Tabelle 31. Retentionszeiten der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-4-2

Glucosinolat	<i>m/z</i>	Retentionszeit [min] in Messung Nr.					Standard- Abweichung ¹
		1	2	3	4	5	
Sinigrin (57)	358	19.7	20.4	20.5	18.6	18.4	5.0%
Methoxy-Glucobrassicin (58)	477	20.5	23.2	23.1	19.1	18.7	10.2%
Glucoiberin (60)	422	20.3	20.8	20.8	19.0	18.7	5.0%
Glucoraphanin (61)	436	20.6	21.0	21.0	19.2	18.8	5.4%
Glucualysson (62)	450	20.8	21.1	21.1	19.3	18.9	5.2%
Glucoibarin (63)	478	17.3	21.4	21.4	19.6	0*	9.8%
Glucuhirsutin (64)	492	21.4	21.5	21.5	19.7	19.2	5.4%
Glucobrassicin (65)	447	20.3	20.8	20.8	19.0	18.7	5.0%
Glucoerysolin (66)	452	20.6	21.0	21.0	19.2	18.8	5.2%

¹Zur Berechnung der Standardabweichung siehe Literaturstelle 186.

*wurde nicht in die Berechnungen einbezogen.

Tabelle 32. Peakflächen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-4-2

Glucosinolat	<i>m/z</i>	Peakflächen [counts] in Messung Nr.				
		1	2	3	4	5
Sinigrin (57)	358	10989	16296	17102	19608	3931
Methoxy-Glucobrassicin (58)	477	1699	5698	7624	1260	410
Glucoiberin (60)	422	5753	5445	4760	6399	1316
Glucoraphanin (61)	436	123862	132095	112012	157678	28127
Glucoalyssin (62)	450	1350	1132	955	1461	547
Glucoibarin (63)	478	2269	547	587	626	0
Glucohirsutin (64)	492	2779	2816	2824	3182	501
Glucobrassicin (65)	447	1679	1341	1729	2019	581
Glucoerysolin (66)	452	14516	30788	24930	27957	5636

Tabelle 33. Relative Peakflächen und Standardabweichungen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-4-2, bezogen auf den internen Standard Sinigrin (**57**)

Glucosinolat	<i>m/z</i>	Peakflächen [%] in Messung Nr.					Standard- Abweichung ¹
		1	2	3	4	5	
Sinigrin (57)	358	100	100	100	100	100	--
Methoxy-Glucobrassicin (58)	477	176	399	509	73	119	74.1%
Glucoiberin (60)	422	231	147	122	144	147	26.6%
Glucoraphanin (61)	436	168	121	98	120	107	22.0%
Glucoalyssin (62)	450	210	119	95	127	238	39.5%
Glucoibarin (63)	478	569	92	94	87	0	135.0%
Glucohirsutin (64)	492	155	106	101	99	78	26.4%
Glucobrassicin (65)	447	133	72	88	90	129	26.4%
Glucoerysolin (66)	452	353	505	389	381	383	14.7%

¹Zur Berechnung der Standardabweichung siehe Literaturstelle 186.

7.5.4 Messdaten und Berechnungen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-0-5

Tabelle 34. Peakflächen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-0-5

Analyt	<i>m/z</i>	Peakflächen [counts] in Messung Nr.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Sinigrin (57)	358	2581	4264	5113	3954	2829	8383	12485	5841
Glucoraphanin (61)	436	30303	29425	26318	9976	28418	93434	138416	90593
Glucohirsutin (64)	492	3902	2744	3101	948	4675	9534	13208	8158
Glucobrassicin (65)	447	2257	1398	603	0	3677	7253	10259	10827
Glucoerysolin (66)	452	23301	16311	20785	19831	8816	33392	36460	32007
1-Glycero-1- <i>myo</i> -inositolphosphat (59)	333	26202	20425	27581	17530	20163	60607	72823	86732

Tabelle 34. Peakflächen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-0-5 (*Fortsetzung*)

Analyt	<i>m/z</i>	Peakflächen [counts] in Messung Nr.							
		9	10	11	12	13	14	15	16
Sinigrin (57)	358	10182	2440	35487	40555	20155	49877	11730	11491
Glucoraphanin (61)	436	84690	38692	161141	101414	78140	184625	45147	64193
Glucohirsutin (64)	492	11514	5897	17764	19888	6555	21837	2253	5360
Glucobrassicin (65)	447	16393	2458	13625	9803	7237	7782	1936	1017
Glucoerysolin (66)	452	28474	10295	25986	23921	16433	31077	13884	19150
1-Glycero-1- <i>myo</i> -inositolphosphat (59)	333	77492	14230	112728	80838	65452	227949	22842	57406

Tabelle 35. Relative Peakflächen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-0-5 bezogen auf die erste Messung

Analyt	<i>m/z</i>	Peakflächen [%] in Messung Nr.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Sinigrin (57)	358	100	165.2	198.1	153.2	109.6	324.8	483.7	226.3
Glucoraphanin (61)	436	100	97.1	86.9	32.9	93.8	308.3	456.8	298.9
Glucohirsutin (64)	492	100	70.3	79.5	24.3	119.8	244.3	338.5	209.1
Glucobrassicin (65)	447	100	62.0	26.7	0.00	162.9	321.4	454.6	479.8
Glucoerysolin (66)	452	100	70.0	89.2	85.1	37.8	143.3	156.5	137.4
1-Glycero-1- <i>myo</i> -inositolphosphat (59)	333	100	77.9	105.3	66.9	76.9	231.3	277.9	331.0
Standardabweichung ^[186]	--	--	38.5%	56.0%	54.7%	42.1%	70.7%	128.2%	119.3%

Tabelle 35. Relative Peakflächen der Glucosinolate in der Phloemsaft-Probe I-0-5 bezogen auf die erste Messung (*Fortsetzung*)

Analyt	<i>m/z</i>	Peakflächen [%] in Messung Nr.							
		9	10	11	12	13	14	15	16
Sinigrin (57)	358	394.5	94.5	1374.8	1571.1	780.8	1932.3	454.4	445.2
Glucoraphanin (61)	436	279.5	127.7	531.8	334.7	257.9	609.3	149.0	211.8
Glucohirsutin (64)	492	295.1	151.1	455.2	509.7	168.0	559.6	57.7	137.4
Glucobrassicin (65)	447	726.4	108.9	603.8	434.4	320.7	344.9	85.8	45.1
Glucoerysolin (66)	452	122.2	44.2	111.5	102.7	70.5	133.4	59.6	82.2
1-Glycero-1- <i>myo</i> -inositolphosphat (59)	333	295.8	54.3	430.2	308.5	249.8	869.9	87.2	219.1
Standardabweichung ^[186]	--	203.2%	41.6%	422.4%	521.9%	247.2%	634.4%	153.2%	142.7%

8 LITERATURVERZEICHNIS UND ANMERKUNGEN

- [1] A. De Pasquale; Pharmacognosy: The Oldest Modern Science; *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *11*, 1–16.
- [2] M. Heinrich; *Ethnopharmazie und Ethnobotanik (Eine Einführung)*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2002**.
- [3] The European Parliament and the council of the European Union; Directive on the Release of Genetically Modified Organisms (GMOs) Directive 2001/18/EC ANNEX I A; *Official Journal of the European Communities* **2001**.
- [4] A. R. Leach; *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Pearson Education Limited, Essex, **2001**.
- [5] T. Proft; *Microbial Toxins: Current Research and Future Trends*; Caister Academic Press, Norfolk, **2009**.
- [6] A. Dieter, A. Hamm, H.-P. Fiedler, M. Goodfellow, W. E. G. Müller, R. Brun, W. Beil, G. Bringmann; Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic, and antitumor compound produced by a novel alkalophilic *Streptomyces* strain; *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 639–646.
- [7] K. Gebhardt, S. W. Meyer, J. Schinko, A. Zeeck, G. Bringmann, H.-P. Fiedler; Phenalinolactones A–D, novel terpenoglycoside antibiotics from *Streptomyces* sp. Tü 6071; *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 229–232.
- [8] D. Guest, J. Brown; Plant Defenses Against Pathogens; S. 263–285; (http://www.appsnet.org/Publications/Brown_Ogle/17%20Defence%20mechanisms%20%28DIG%26JFB%29.pdf).
- [9] B. C. Freeman, G. A. Beattie; An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores; *The Plant Health Instructor* **2008**, DOI 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- [10] B. A. Halkier; Glucosinolates; in *Naturally Occurring Glycosides: Chemistry Distribution and Biological Properties*; Wiley & Sons, Chichester, **1999**.
- [11] G. S. Fraenkel; The raison d'Être of secondary plant substances; *Science* **1959**, *129*, 1466–1470.
- [12] A. Buchner; Über das rigatellische Fiebermittel und über eine in der Weidenrinde entdeckte alkaloidische Substanz; *Rep. Pharm.* **1828**, *29*, 405–421.
- [13] H.-J. Quadbeck-Seeberger, R. Faust, G. Knaus, A. Maelicke, U. Siemeling; *Chemierekorde*; John Wiley & Sons, Weinheim, **1999**.
- [14] U. Holzgrabe; 200 Years of Morphine: New Developments from Research; *Pharm. Ztg.* **2005**, *150*, 32–38.
- [15] M. de Ridder; *Heroin: vom Arzneimittel zur Droge*; Campus Verlag, Frankfurt/Main, **2000**.

- [16] H. Engelhardt; *Practice of High Performance Liquid Chromatography - Applications, Equipment and Quantitative Analysis*; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo, **1986**.
- [17] A. L. Yergey; *Liquid chromatography/mass spectrometry: techniques and applications*; Springer Verlag, New York, **1990**.
- [18] J. A. Olivares, N. T. Nguyen, C. R. Yonker, R. D. Smith; On-line MS detection for capillary zone electrophoresis; *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1230–1232.
- [19] M. Greiner; Capillary Electrophoresis coupling to Mass Spectrometry (CE-MS), an advanced technique orthogonal to LC-MS for high resolution separation and accurate molecule identification; *Chromatography today* **2010**, 9–10.
- [20] C. E. Mortimer; *Das Basiswissen der Chemie*; Thieme, Stuttgart, **2001**.
- [21] D. H. Russell, R. D. Edmondson; High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; *J. Mass Spec.* **1997**, *32*, 263–276.
- [22] W. Dietrich, H. Duddeck; *Structure Elucidation by Modern NMR – A workbook*; Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, **1992**.
- [23] N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody; Principles and Applications; in *Circular Dichroism*, Wiley-VCH, New York, **2000**.
- [24] G. Bringmann, F. Pokorny; The Naphthylisoquinoline Alkaloids; in *The Alkaloids, Bd. 46* (Hrsg.: G. A. Cordell), Academic Press, New York, **1995**.
- [25] G. François, G. Timperman, J. Holenz, L. Aké Assi, T. Geuder, L. Maes, J. Dubois, M. Hanocq, G. Bringmann; Naphthylisoquinoline alkaloids exhibit strong growth-inhibiting activities against *Plasmodium falciparum* and *P. berghei in vitro* - Structure-activity relationships of dioncophylline C; *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1996**, *90*, 115–123.
- [26] G. Bringmann, C. Günther, W. Saeb, J. Mies, A. Wickramasinghe, V. Mudogo, R. Brun; Ancistolikokines A – C: New 5,8'-Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus likoko*; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1333–1337.
- [27] G. Bringmann, I. Kajahn, M. Reichert, S. E. H. Pedersen, J. H. Faber, T. Gulder, R. Brun, S. B. Christensen, A. Ponte-Sucre, H. Moll, G. Heubl, V. Mudogo; Ancistrocladinium A and B, the First *N,C*-Coupled Naphthyldihydroisoquinoline Alkaloids, from a Congolese *Ancistrocladus* Species; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9348–9356.
- [28] G. Bringmann, G. Zhang, T. Büttner, G. Bauckmann, T. Kupfer, H. Braunschweig, R. Brun, V. Mudogo; Jozimine A2: The First Dioncophyllaceae-Type Naphthylisoquinoline Dimer, with Three Chiral Axes and High Antimalarial Activity; *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 916–923.
- [29] K. P. Manfredi, J. W. Blunt, J. H. Cardellina II, J. B. McMahon, L. L. Pannell, G. M. Cragg, M. R., Boyd; Novel Alkaloids from the Tropical Plant *Ancistrocladus*

- abbreviatus* Inhibit Cell Killing by HIV-1 and HIV-2; *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3402–3405.
- [30] J. B. McMahon, M. J. Currens, R. J. Gulakowski, R. W. Buckheit Jr., C. Lackman-Smith, Y. F. Hallock, M. R. Boyd; Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 484–488.
- [31] M. R. Boyd, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, K. P. Manfredi, J. W. Blunt, J. B. McMahon, R. W. Buckheit, Jr., G. Bringmann, M. Schäffer, G. M. Cragg, D. W. Thomas, J. G. Jato; Anti-HIV Michellamines from *Ancistrocladus korupensis*; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1740–1745.
- [32] G. Bringmann, S. Harmsen, J. Holenz, T. Geuder, R. Götz, P. A. Keller, R. Walter, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, M. R. Boyd; 'Biomimetic' Oxidative Dimerization of Korupensamine A: Completion of the First Total Synthesis of Michellamines A, B, and C; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9643–9648.
- [33] P. D. Hobbs, V. Upender, J. Liu, D. J. Pollart, D. W. Thomas, M. I. Dawson; The first stereospecific synthesis of michellamine B; *Chem. Commun.* **1996**, *8*, 923–924.
- [34] T. R. Hoye, M. Chen, B. Hoang, L. Mi, O. P. Priest; Total Synthesis of Michellamines A–C, Korupensamines A–D, and Ancistrobrevine B; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7184–7201.
- [35] G. Bringmann, W. Saeb, D. Koppler, G. François; Jozimine A ('Dimeric' Dioncophylline A), A Non-Natural Michellamine Analog with High Antimalarial Activity; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13409–13418.
- [36] G. Bringmann, R. Götz, P. A. Keller, R. Walter, M. R. Boyd, F. Lang, A. Garcia, J. J. Walsh, I. Tellitu, K. V. Bhaskar, T. R. Kelly; A Convergent Total Synthesis of the Michellamines; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1090–1097.
- [37] G. Bringmann, M. Wohlfarth; H. Rischer, M. Heubes, W. Saeb, S. Diem, M. Herderich, J. Schlauer; A Photometric Screening Method for Dimeric Naphthylisoquinoline Alkaloids and Complete On-Line Structural Elucidation of a Dimer in Crude Plant Extracts, by the LC-MS/LC-NMR/LC-CD Triad; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2571–2577.
- [38] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, J. Schlauer, R. Brun; Extract Screening by HPLC Coupled to MS-MS, NMR, and CD: A dimeric and three monomeric naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus griffithii*; *Phytochemistry* **2002**, *61*, 195–204.
- [39] G. Bringmann, B. K. Lombe, C. Steinert, K. N. Ioset, R. Brun, F. Turini, G. Heubl, V. Mudogo; Mbandakamines A and B, Unsymmetrically Coupled Dimeric Naphthylisoquinoline Alkaloids, from a Congolese *Ancistrocladus* Species; *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2590–2593.
- [40] G. Bringmann, J. Spuziak, J. H. Faber, T. Gulder, I. Kajahn, M. Dreyer, G. Heubl, R. Brun, V. Mudogo; Six naphthylisoquinoline alkaloids and a related benzopyranone from

- a Congolese *Ancistrocladus* species related to *Ancistrocladus congolensis*; *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1065–1075.
- [41] M. Unger, M. Dreyer, S. Specker, S. Laug, M. Pelzing, C. Neusüß, U. Holzgrabe, G. Bringmann; Analytical Characterisation of Crude Extracts from an African *Ancistrocladus* Species Using High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis Coupled to Ion Trap Mass Spectrometry; *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 21–26.
- [42] D. B. Clarke; Glucosinolates, structures and analysis in food; *Anal. Methods* **2010**, *2*, 310–325.
- [43] Y. Sasaki-Sekimoto, N. Taki, T. Obayashi, M. Aono, F. Matsumoto, N. Sakurai, H. Suzuki, M. Y. Hirai, M. Noji, K. Saito, T. Masuda, K. Takamiya, D. Shibata, H. Ohta; Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*; *Plant Journal* **2005**, *44*, 653–668.
- [44] G. Bringmann, I. Kajahn, C. Neusüß, M. Pelzing, S. Laug, M. Unger, U. Holzgrabe, Analysis of the glucosinolate pattern of *Arabidopsis thaliana* seeds by capillary zone electrophoresis coupled to electrospray ionization-mass spectrometry; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1513–1522.
- [45] I. Kajahn; Kopplungsmethoden in der Naturstoffanalytik: Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* und an *Ancistrocladus*-Pflanzen; Dissertation, Universität Würzburg, **2008**.
- [46] C. M. Taylor, R. E. Gereau, G. M. Walters; Revision of *Ancistrocladus* Wall. (Ancistrocladaceae); *Ann. Missouri. Bot. Gard.* **2005**, *92*, 360–399.
- [47] H. Rischer, G. Heubl, H. Meimberg, M. Dreyer, H. A. Hadi, G. Bringmann; *Ancistrocladus benomensis* (Ancistrocladaceae): a new species from Peninsular Malaysia; *Blumea* **2005**, *50*, 357–365.
- [48] G. Heubl, F. Turini, V. Mudogo, I. Kajahn, G. Bringmann; *Ancistrocladus ileboensis* (D. R. Congo), a new liana with unique alkaloids; *Pl. Ecol. Evol.* **2010**, *143*, 63–69.
- [49] H. K. Airy Shaw; On the Dioncophyllaceae, A Remarkable New Family of Flowering Plants; *Kew Bull* **1951**, *6*, 327–347.
- [50] N. H. Anh, A. Porzel, H. Rippberger, G. Bringmann, M. Schäffer, R. God, T. V. Sung, G. Adam; Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus cochinchinensis*; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1287–1291.
- [51] N. Ruangrungsi, V. Wongpanich, P. Tanitvana, H. J. Cowe, P. J. Cox, S. Funayama, G. A. Cordell; Ancistrotectorine, a new naphthalene-isoquinoline alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus*; *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 529–535.
- [52] J. M. Watt and M. G. Breyer-Brandwijk; *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa* (2nd Ed.); Livingstone, London, **1962**.

- [53] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy; Ancistrocladine, a new type of isoquinoline alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus*; *Tetrahedron* **1971**, *27*, 1013–1026.
- [54] M. Xu, T. Bruhn, B. Hertlein, R. Brun, A. Stich, J. Wu, G. Bringmann; Shuangancistrocladines A–E, Dimeric Naphthylisoquinoline Alkaloids with Three Chiral Biaryl Axes, from the Chinese Plant *Ancistrocladus tectorius*; *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4206–4216.
- [55] G. Bringmann, G. Zhang, T. Ölschläger, A. Stich, J. Wu, M. Chatterjee, R. Brun; Highly Selective Antiplasmodial Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*; *Phytochemistry* **2013**, *91*, 220–228.
- [56] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Grüne, J. Schlauer; A New Biosynthetic Pathway to Alkaloids in Plants: Acetogenic Isoquinolines; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1523–1525; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1464–1466.
- [57] G. Bringmann, T. F. Noll, T. A. M. Gulder, M. Grüne, M. Dreyer, C. Wilde, F. Pankewitz, M. Hilker, G. D. Payne, A. L. Jones, M. Goodfellow, H.-P. Fiedler; Different Polyketide Folding Modes Converge to an Identical Molecular Architecture; *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 429–433.
- [58] G. Bringmann, T. A. M. Gulder, A. Hamm, M. Goodfellow, H.-P. Fiedler; Multiple Convergence in Polyketide Biosynthesis: A Third Folding Mode to the Anthraquinone Chrysophanol; *Chem. Commun.* **2009**, 6810–6812.
- [59] G. Bringmann, B. Hertlein-Amslinger, I. Kajahn, M. Dreyer, R. Brun, H. Moll, A. Stich, K. Ndjoko Ioset, W. Schmitz, L. Ngoc; Phenolic analogs of the *N,C*-coupled naphthylisoquinoline alkaloid ancistrocladinium A, from *Ancistrocladus cochinchinensis* (Ancistrocladaceae), with improved antiprotozoal activities; *Phytochemistry* **2011**, *72*, 89–93.
- [60] G. Bringmann, G. Lang; Full Absolute Stereostructures of Natural Products Directly From Crude Extracts: the HPLC-MS/MS-NMR-CD 'Triad'; in *Marine Mol. Biol.*, Springer Verlag, Berlin, **2003**.
- [61] G. Bringmann, R. Weirich, H. Reuscher, J. R. Jansen, L. Kinzinger, T. Ortmann; The Synthesis of All Possible Isomeric 6,8-Dioxygenated 1,3-Dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Methyl Ethers - Useful Chiral Building Blocks for Naphthylisoquinoline Alkaloids; *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 877–888.
- [62] D. Seebach, V. Prelog; The unambiguous specification of the steric course of asymmetric syntheses; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 654–660.
- [63] W.-D. Müller Jahnke, C. Friedrich, U. Meyer; *Arzneimittelgeschichte*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **2005**.
- [64] T. Eriksson, S. Björkman, B. Roth, P. Höglund; Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man; *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 807–17.

- [65] M. Reist, P. A. Carrupt, E. Francotte, B. Testa; Chiral inversion and hydrolysis of thalidomide: mechanisms and catalysis by bases and serum albumin, and chiral stability of teratogenic metabolites; *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1521–1528.
- [66] C. Wolf; *Dynamic stereochemistry of chiral compounds: principles and applications*; The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2008**.
- [67] P. Atkins, J. de Paula; *Elements of Physical Chemistry*; Oxford University Press, Oxford, **2005**.
- [68] G. Bringmann, T. Geuder, M. Rübenacker, R. Zagst; A Facile Degradation Procedure for Determination of the Absolute Configuration in 1,3-Dimethyltetra- and Dihydroisoquinolines; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2067–2070.
- [69] G. Bringmann, R. God, M. Schäffer; An Improved Degradation Procedure for Determination of the Absolute Configuration in Chiral Isoquinoline and β -Carboline Derivatives; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1393–1403.
- [70] G. Bringmann, T. Geuder, F. Pokorny, M. Schäffer, R. Zagst; The Determination of the Absolute Configuration of *N*-Methylated 1,3-Dimethyltetrahydroisoquinolines, by Oxidative Degradation; *Planta Med.* **1993**, *59* (Suppl.), 619–620.
- [71] Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J.-R. Dai, J. H. Cardellina II, R. J. Gulakowski, J. B. McMahon, M. Schäffer, M. Stahl, K.-P. Gulden, G. Bringmann, G. François, M. R. Boyd; Michellamines D–F, New HIV-Inhibitory Dimeric Naphthylisoquinoline Alkaloids, and Korupensamine E, a New Antimalarial Monomer, from *Ancistrocladus korupensis*; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 677–683.
- [72] Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J. W. Blunt, J. H. Cardellina II, M. Schäffer, K.-P. Gulden, G. Bringmann, A. Y. Lee, J. Clardy, G. François, M. R. Boyd; Korupensamines A–D, Novel Antimalarial Alkaloids from *Ancistrocladus korupensis*; *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6349–6355.
- [73] G. Bringmann, K. Messer, R. Brun, V. Mudogo; Ancistrocongolines A–D, New Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus congolensis*; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1096–1101.
- [74] Ich danke Virima für die Sammlung des Pflanzenmaterials.
- [75] N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody; Principles and Applications; in *Circular Dichroism*, Wiley-VCH, New York, **2000**.
- [76] G. Snatzke; Circular Dichroism and Optical Rotary Dispersion. Principles and Application to the Investigation of the Stereochemistry of Natural Products; *Angew. Chem.* **1968**, *80*, 15–26; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 14–25.
- [77] G. Snatzke; Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil I; *Chemie unserer Zeit* **1981**, *15*, 78–87.
- [78] S. G. Allenmark; Chiroptical methods in the stereochemical analysis of natural products; *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 145–155.

- [79] G. Bringmann, R. Zagst, H. Reuscher, L. Aké Assi; Ancistrobrevine B, the First Naphthylisoquinoline Alkaloid with a 5,8'-Coupling Site, and Related Compounds from *Ancistrocladus abbreviatus*; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4011–4014.
- [80] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy, T. G. Rajagopalan, H. K. Desai, K. S. Ramachandran, E. Lee; Hamatine, a new isoquinoline alkaloid from *Ancistrocladus hamatus*; *Ind. J. Chem.* **1975**, *13*, 641–643.
- [81] G. Bringmann, F. Teltschik, M. Schäffer, R. Haller, S. Bär, M. A. Robertson, M. Isahakia; Ancistrobertsonine A and Related Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus robertsoniorum*; *Phytochemistry* **1998**, *47*, 31–35.
- [82] C. Cai, W. Mei, W. Zuo, Z. Guo, H. Wang, H. Gu, H. Dai; Antibacterial components from the branches of *Ancistrocladus tectorius* (Lour.) Merr.; *Redai Yaredai Zhiwu Xuebao* **2013**, *21*, 184–188.
- [83] G. Bringmann, R. Zagst, M. Schäffer, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, M. R. Boyd; The Absolute Configuration of Michellamine B, a "Dimeric", Anti-HIV-Active Naphthylisoquinoline Alkaloid; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1190–1191.
- [84] G. Bringmann, K.-P. Gulden, Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J. H. Cardellina II, M. R. Boyd, B. Kramer, J. Fleischhauer; Circular Dichroism of Michellamines: Independent Assignment of Axial Chirality by Calculated and Experimental CD Spectra; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7807–7814.
- [85] J. Betzin; Der Einfluss von polyzyklischen Naturstoffen auf die HIV-Replikation; Bachelorarbeit; Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbiologie, **2014**.
- [86] Ich danke Julia Betzin für die Bestimmung der antiretroviralen Eigenschaften.
- [87] Ich danke Prof. C. Scheller für die angenehme Zusammenarbeit und für seinen Einsatz, der die Bestimmung der anti-HIV-Aktivität in seinem Arbeitskreis ermöglicht hat.
- [88] G.-L. Zhang; Phytochemical Research on Two *Ancistrocladus* species, Semi-synthesis of Dimeric Naphthylisoquinoline Alkaloids, and Structure Optimization of Antitumoral Naphthoquinones; Dissertation, Universität Würzburg, **2012**.
- [89] Ich danke Virima, Pascal und Andreas für eine unvergessliche Zeit.
- [90] I thank the crew for the search and the exhausting collection of the *Ancistrocladus* plants.
- [91] BEBUC: Bourse d'Excellence Bringmann aux Universités Congolaises; <http://www.foerdereverein-uni-kinshasa.de>.
- [92] B. K. Lombe; Mbandakamines, nouveaux dimères alcaloïdiques de type naphthylisoquinoléine, isolés d'*Ancistrocladus* sp.; Mémoire de maîtrise, Université de Kinshasa, Faculté des Sciences, Département de Chimie, **2013**.
- [93] Ich danke B. K. Lombe für seine Mitarbeit und seinen Einsatz, sowie für unsere freundschaftliche Kooperation.

- [94] Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, M. Schäffer, G. Bringmann, G. François, M. R. Boyd; Korundamine A, a Novel HIV-Inhibitory and Antimalarial "Hybrid" Naphthylisoquinoline Alkaloid Heterodimer from *Ancistrocladus korupensis*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1729–1734.
- [95] G. Bringmann, W. Saeb, J. Kraus, R. Brun, G. François; Jozimine B, a Constitutionally Unsymmetric, Antiplasmodial 'Dimer' of the Naphthylisoquinoline Alkaloid Ancistrocladine; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3523–3531.
- [96] Ich danke Prof. Reto Brun *et al.*, Schweizerisches Tropeninstitut Basel, für die Bestimmung der bioaktiven Eigenschaften.
- [97] Der Selektivitäts-Index errechnet sich aus dem Quotienten von Zytotoxizität und Aktivität (jeweils als IC₅₀-Wert).
- [98] S. Nwaka, B. Ramirez, R. Brun, L. Maes, F. Douglas, R. Ridley; Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases - Criteria for Lead Progression; *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e440.
- [99] F. Z. Katele; Chemical profiling of wild and cultivated African ginger and absolute configurations of compounds from mangrove and *Ancistrocladus* species; University of Pretoria, **2015**. Z. ; Mbandakamines, nouveaux dimères alcaloïdiques de type naphthylisoquinoléine, isolés d'*Ancistrocladus* sp.; Mémoire de maîtrise, Université de Kinshasa, Faculté des Sciences, Département de Chimie, **2013**.
- [100] Ich danke F. Katele und Dr. Torsten Bruhn für die quantenmechanische Berechnung der Mbandakamin-Spektren.
- [101] J. Schlauer, M. Rückert, B. Wiesen, M. Herderich, L. Aké Assi, R. D. Haller, S. Bär, K.-U. Fröhlich, G. Bringmann; Characterization of Enzymes from *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae) and *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae) Catalyzing Oxidative Coupling of Naphthylisoquinoline Alkaloids to give Michellamines; *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *350*, 87–94.
- [102] F. Turini; Phylogenetic und population genetic studies of non-core Caryophyllales with special focus on Ancistrocladaceae; Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität München, **2014**.
- [103] F. G. Turini, C. Steinert, G. Heubl, G. Bringmann, B. K. Lombe, V. Mudogo, H. Meimberg; Microsatellites facilitate species delimitation in Congolese *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae), a genus with pharmacologically potent naphthylisoquinoline alkaloids; *Taxon* **2014**, *13*, 329–341.
- [104] Y. F. Hallock, C. B. Hughes, J. H. Cardellina II, M. Schäffer, K.-P. Gulden, G. Bringmann, M. R. Boyd; Dioncophylline A, the Principal Cytotoxin from *Ancistrocladus letestui*; *Nat. Prod. Lett.* **1995**, *6*, 315–320.
- [105] G. Bringmann, W. Saeb, M. Rückert, J. Mies, M. Michel, V. Mudogo, R. Brun; Ancistolikokine D, a 5,8'-coupled naphthylisoquinoline alkaloid, and related natural products from *Ancistrocladus likoko*; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 631–636.

- [106] G. Bringmann, A. Hamm, C. Günther, M. Michel, R. Brun, V. Mudogo; Ancistroealaines A and B, Two New Bioactive Naphthylisoquinolines, and Related Naphthoic Acids from *Ancistrocladus ealaensis*; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1465–1470.
- [107] D. A. Earl, B. M. von Holdt; STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method; *Conserv. Genet. Resour.* **2012**, *4*, 359–361.
- [108] J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly; Inference of population structure using multilocus genotype data; *Genetics* **2000**, *155*, 945–959.
- [109] G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet; Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study; *Mol. Ecol.* **2005**, *14*, 2611–2620.
- [110] I thank G.-L. Zhang for his great support in the structural elucidation, not only during this project.
- [111] Ich danke Dr. T. Bruhn für die Berechnung der CD-Spektren und die gesamte Unterstützung bei der Aufklärung der Absolutkonfiguration von EM18 sowie bei der Erstellung der Publikation.
- [112] Ich danke F. Witterauf für die zügige und verlässliche Messung der Online-CD-Spektren.
- [113] Ich danke P. Jetter für die angenehme und reibungslose Kooperation sowie die konstante Unterstützung.
- [114] P. Jetter; Aromatische Polyketide aus *Streptomyces* spec. AK 671 und Untersuchung ihrer Biosynthese; Diplomarbeit, Universität Tübingen, **2010**.
- [115] Ich danke P. Jetter für die Aufreinigung der Bakterienisolate sowie für den netten Kontakt per E-Mail und bei den diversen gemeinsamen Treffen.
- [116] Ich danke Prof. Johannes Imhoff und Dr. Jutta Wiese für die Bestimmung der bioaktiven Eigenschaften.
- [117] H.-J. Schiewe, A. Zeeck; Cineromycins, γ -Butyrolactones and Amycins by Analysis of the Secondary Metabolite Pattern Created by a Single Strain of *Streptomyces*; *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 635–642.
- [118] H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck; Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity; *ChemBioChem.* **2002**, *3*, 619–627.
- [119] J. A. Kalaitzis, B. S. Moore; Heterologous biosynthesis of truncated hexaketides derived from the actinorhodin polyketide synthase; *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *67*, 1419–1422.
- [120] J. Krupa, H. Lessmann, H. Lackner; Ein α -Methylanthrachinon aus Streptomyceten; *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 699–701.
- [121] Ich danke M. Knauer für die Arbeiten im Vorfeld und für die Unterstützung während des Projektes im Rahmen meiner Arbeit.

- [122] A. Hamm; Isolierung, Strukturaufklärung, und Totalsynthese von Naturstoffen aus tropischen Heilpflanzen und Bodenorganismen; Dissertation, Universität Würzburg, **2003**.
- [123] T. A. M. Gulder; Neue Bioaktive Naturstoffe: Strukturaufklärung, Biosynthese und Synthese sowie Stereochemische Analyse von Naturstoffen und Synthetischen Verbindungen durch HPLC-CD; Dissertation, Universität Würzburg, **2008**.
- [124] M. Knauer; Aufklärung der Konstitution und Konfiguration von Sekundärmetaboliten und Syntheseprodukten mittels NMR, MS, HPLC, CD und ORD sowie Beiträge zur Totalsynthese bioaktiver axialchiraler Naturstoffe; Dissertation, Universität Würzburg, **2011**.
- [125] H. Hong, D. Spiteller, J. B. Spencer; Incorporation of fluoroacetate into an aromatic polyketide and its influence on the mode of cyclization; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6028-6032; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6117–6121.
- [126] A. Das, P.-H. Szu, J. T. Fitzgerald, C. Khosla; Mechanism and Engineering of Polyketide Chain Initiation in Fredericamycin Biosynthesis; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8831–8833.
- [127] C. Khosla, R. McDaniel, S. Ebert-Khosla, R. Torres, D. H. Sherman, M. J. Bibb, D. A. Hopwood; Genetic Construction and Functional Analysis of Hybrid Polyketide Synthases Containing Heterologous Acyl Carrier Proteins; *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2197–2204.
- [128] N.-C. Meisner, M. Hintersteiner, K. Mueller, R. Bauer, J.-M. Seifert, H.-U. Naegeli, J. Ottl, L. Oberer, C. Guenat, S. Moss, N. Harrer, M. Woisetschlaeger, C. Buehler, V. Uhl, M. Auer; Identification and mechanistic characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR; *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 508–517.
- [129] H.-I. Zhang, X.-G. He, A. Adefarati, J. Gallucci, S. P. Cole, J. M. Beale, P. J. Keller, C.-J. Chang, H. G. Floss; Mutactin, a Novel Polyketide from *Streptomyces coelicolor*. Structure and Biosynthetic Relationship of Actinorhodin; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1682–1684.
- [130] M. A. Alvarez, H. Fu, C. Khosla, D. A. Hopwood, J. E. Bailey; Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides: Properties of the *whiE* Aromatase/Cyclase; *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 335–338.
- [131] S. Fotso, R. P. Maskey, I. Gruen-Wollny, K.-P. Schulz, M. Munk, H. Laatsch; Bhimamycin A–E and Bhimanone: Isolation, structure elucidation and biological activity of novel quinone antibiotics from a terrestrial Streptomyces; *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 931–941.
- [132] H. Lessmann, J. Krupa, H. Lackner, P. G. Jones; New juglomycins; *Z. Naturforsch., B* **1989**, *44*, 353–363.
- [133] J. D. Bauer, R. W. King, S. F. Brady; Utahmycins A and B, azaquinones produced by an environmental DNA clone; *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 976–979.

- [134] T. Taguchi, Y. Ebizuka, D. A. Hopwood, K. Ichinose; Identification of a Novel Shunt Product Produced by a Disruptant of the ActVI-ORFA Gene Involved in the Biosynthesis of Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2); *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5253–5256.
- [135] A. Yenesew, J. A. Ogur, H. Duddeck; (*R*)-Prechrysophanol from *Aloe graminicola*; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1442–1444.
- [136] H.-P. Fiedler, A. Dieter, T. A. M. Gulder, I. Kajahn, A. Hamm, R. Brown, A. L. Jones, M. Goodfellow, W. E. G. Müller, G. Bringmann; Genoketides A1 and A2, new octaketides and biosynthetic intermediates of chrysophanol produced by *Streptomyces* sp. AK 671; *J. Antibiot.* **2003**, *61*, 464–473.
- [137] L. K. Xiang, A. John, B. S. Moore; EncM, a versatile enterocin biosynthetic enzyme involved in Favorskii oxidative rearrangement, aldol condensation, and heterocycle-forming reactions; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15609–15614.
- [138] T. D. Claridge; *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*; Tetrahedron Organic Chemistry Series, Oxford, **2009**.
- [139] N. Berova, P. L. Polavarapu, K. Nakanishi, R. W. Woody; *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*; Wiley & Sons, Hoboken, **2012**.
- [140] G. Pescitelli, L. Di Bari, N. Berova; Conformational aspects in the studies of organic compounds by electronic circular dichroism; *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4603–4625.
- [141] N. Berova, L. Di Bari, G. Pescitelli; Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds; *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 914–931.
- [142] P. Jetter, C. Steinert, M. Knauer, G. Zhang, T. Bruhn, J. Wiese, J. F. Imhoff, H.-P. Fiedler, G. Bringmann; New bhimamycins from *Streptomyces* sp. AK 671; *J. Antibiot.* **2013**, *66*, 719–726.
- [143] G. Bringmann, J. R. Jansen; A first and general route to naphthylisoquinoline alkaloids: The total synthesis of *O*-methyl-tetradhydro-triphyphylline; *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2537–2540.
- [144] P. M. Dewick; *Medicinal Natural Products*; Wiley & Sons, Weinheim, **2002**.
- [145] D. B. Nguyen, F. C. Lessa, R. Belflower, Y. Mu, M. Wise, J. Nadle, W. M. Bamberg, S. Petit, S. M. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. Thompson, W. Schaffner, P. R. Patel; Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections Among Patients on Chronic Dialysis in the United States, 2005-2011; *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, 1393–1400.
- [146] M. D. Houslay; Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown; *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 91–100.
- [147] C. P. Page, D. Spina; Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases; *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 275–286.

- [148] www.arabidopsis.org
- [149] Arabidopsis Genome Initiative; Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*; *Science* **2000**, *408*, 796–815.
- [150] J. W. Fahey, A. T. Zalcmann, P. Talalay; The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants; *Phytochemistry* **2001**, *56*, 5–51.
- [151] B. A. Halkier, J. Gershenzon; Biology and biochemistry of glucosinolates; *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 303–333.
- [152] R. F. Mithen, M. Dekker, R. Verkerk, S. Rabot, I. T. Johnson; The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods; *J. Sci. Food. Agric.* **2000**, *80*, 967–984.
- [153] R. J. Hopkins, J. Richard, N. M. von Dam, J. J. A. von Loon; Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions; *Ann. Rev. Entomol.* **2009**, *54*, 57–83.
- [154] M. Traka, R. Mithen; Glucosinolates, isothiocyanates and human health; *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 269–282.
- [155] M. E. Cartea, P. Velasco; Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health; *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 213–229.
- [156] A. P. Vig, G. Rampal, T. S. Thind, S. Arora; Bio-protective effects of glucosinolates – A review; *LWT-Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1561–1572.
- [157] B. Stankovic, E. Davies; Intercellular communication in plants: electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato; *Planta* **1997**, *202*, 402–406.
- [158] J. Glazebrook, W. Chen, B. Estes, H.-S. Chang, C. Nawrath, J.-P. Métraux, T. Zhu, F. Katagiri; Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping; *Plant Journal* **2003**, *34*, 217–228.
- [159] J. Ton, M. De Vos, C. Robben, A. Buchala, J. P. Métraux, L. P. Van Loon, C. M. J. Pieterse; Characterization of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance; *Plant Journal* **2002**, *29*, 11–21.
- [160] W. Truman, M. H. Bennett, I. Kubigsteltig, C. Turnbull, M. Grant; *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates; *PNAS* **2007**, *104*, 1075–1080.
- [161] S. Chen, B. L. Petersen, C. E. Olsen; A. Schulz, B. A. Halkier; Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*; *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 194–201.
- [162] G. Brader, E. Tas, E. T. Palva; Jasmonate-Dependent Induction of Indole Glucosinolates in *Arabidopsis* by Culture Filtrates of the Nonspecific Pathogen *Erwinia carotovora*; *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 849–860.

- [163] I. Mewis, H. M. Appel, A. Hom, R. Raina, J. C. Schultz; Major Signaling Pathways modulate *Arabidopsis* Glucosinolate Accumulation and Response to Both Phloem-Feeding and Chewing Insects; *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 1149–1162.
- [164] M. D. Mikkelsen, B. L. Petersen, E. Glawischnig, A. B. Jensen, E. Andreasson, B. A. Halkier; Modulation of CYP79 Genes and Glucosinolate Profiles in *Arabidopsis* by Defense Signaling Pathways; *Plant Physiol.* **2003**, *131*, 298–308.
- [165] N. K. Clay, A. M. Adio, C. Denoux, G. Jander, F. M. Ausubel; Glucosinolate Metabolites Required for an *Arabidopsis* Innate Immune Response; *Science* **2009**, *323*, 95–101.
- [166] P. Bednarek, M. Pislewska-Bednarek, A. Swatos, B. Schneider, J. Doubsky, M. Mansurova, M. Humphrey, C. Consonni, R. Panstruga, A. Sanchez-Vallet, A. Moline, P. Schulze-Lefert; A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense; *Science* **2009**, *323*, 101–106.
- [167] O. A. Koroleva, A. Davies, R. Deeken, M. R. Thorpe, A. D. Tomos, R. Hedrich; Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk; *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 599–608.
- [168] H. Husebye, S. Chadchawan, P. Winge, O. P. Thangstad, A. M. Bones; Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in *Arabidopsis*; *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 1180–1188.
- [169] Bruker Daltonik GmbH, "micrOTOF-Q User Manual", Version 1.0, 2006.
- [170] R. Deeken, P. Ache, I. Kajahn, C. J. Klinkenberg, G. Bringmann, R. Hedrich; Identification of *Arabidopsis thaliana* phloem RNAs provides a search criterion for phloem-based transcripts hidden in complex data sets of microarray experiments; *Plant Journal* **2008**, *55*, 746–759.
- [171] E. Reinhard, W. Kreis, H. Rimpler; *Pharmazeutische Biologie*, 5. Ausg., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1995**.
- [172] D. J. Kliebenstein; Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses; *Plant, Cell and Environment* **2004**, *27*, 675–684.
- [173] J. Hagemeyer, B. Schneider, N. J. Oldham, K. Hahlbrock; Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains; *Plant Biol.* **2001**, *98*, 753–758.
- [174] J. Tan, P. Bednarek, J. Liu, B. Schneider, A. Svatos, K. Hahlbrock; Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 691–699.
- [175] R. W. King, J. A. D. Zeevaart; Enhancement of Phloem Exudation from Cut Petioles by Chelating Agents; *Plant Physiol.* **1974**, *53*, 96–103.

- [176] L. G. Sillen, A. E. Martell; Stability Constants of Metal-Ion Complexes; *The Chemical Society* **1971**, Special Publication No. 25.
- [177] S. Schneider, A. Gessler, P. Weber, D. von Sengbusch, U. Hanemann, H. Rennenberg; Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N: a comparison of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) grown under field conditions; *New Phytol.* **1996**, *134*, 103–114.
- [178] A. Gessler, H. Renneberg, C. Keitel; Stable Isotope Composition of Organic Compounds Transported in the Phloem of Europe Beech – Evaluation of Different Methods of Phloem Sap Collection and Assessment of Gradients in Carbon Isotope Composition during Leaf-to-Stem Transport; *Plant Biol.* **2004**, *6*, 721–729.
- [179] E. Maekawa, T. Koshijima; Properties of 2,3-Dicarboxy Cellulose Combined with Various Metallic Ions; *J. Appl. Polymer Sci.* **1984**, *29*, 2289–2297.
- [180] M. Floor, J. A. Peters, H. van Bekkum, A. P. G. Kieboom, J. H. Koek, F. L. M. Smeets, R. E. Niemantsverdriet; Structural and conformational effects on the complexation of calcium by 2,3-dicarboxy derivatives of β -cyclodextrin (cyclomaltoheptaose), amylose, and cellulose; *Carbohydr. Res.* **1990**, *203*, 19–32.
- [181] http://elearning.najah.edu/OldData/docs/29763_Carbohydrates.pdf.
- [182] http://tu-freiberg.de/fakult2/bio/ag_mikrobio/lehre/biochemie_skript_1-4.pdf.
- [183] Ich danke Prof. C. Neusüß für die angenehme Zusammenarbeit und für seinen Einsatz sowie für die investierte Zeit bei dieser komplizierten Thematik.
- [184] Ich danke T. Bader für seine herausragenden und selbstständig erzielten Leistungen in der Glucosinolat-Analytik, welche die Vermessung der Phloemsaft-Exsudate erst möglich gemacht haben. Ich danke S. C. Bunz aus ganzem Herzen für ihre Arbeit und konstante Unterstützung bei der Detektion von Glucosinolaten sowie für die Betreuung der Bachelorarbeit von T. Bader.
- [185] T. Bader; Method development for separation of anions in an acid background-electrolyte and the application-related analysis of the glucosinolate pattern in phloem saps by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry; Bachelorarbeit, Technische Hochschule Aalen, **2012**.
- [186] Berechnung der Standardabweichung: $s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}} \div \hat{y}_i \times 100$
- [187] Für die Werte der Peakflächen und alle weiteren berechneten Werte siehe Kapitel 7.5.
- [188] Ich danke M. Michel von ganzem Herzen für die fleißige und geduldige Hilfe bei den zahlreichen Phloemsammelexperimenten.
- [189] W. Saeb; Synthese biologisch aktiver mono- und dimerer Naphthylisochinolin-Alkaloide sowie Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen aus tropischen Heilpflanzen; Dissertation, Universität Würzburg, **2001**.

- [190] R. Götz; Die Totalsynthese der anti-HIV-aktiven Michellamine und verwandter Strukturanaloga; Dissertation, Universität Würzburg, **1996**.
- [191] F. Teltschik; Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen tropischer Heilpflanzen und Etablierung neuer Methoden zur Isolierung von Naturstoffen; Dissertation, Universität Würzburg, **1999**.
- [192] G. Bringmann, K.-P. Gulden, H. Busse, J. Fleischhauer, B. Kramer, E. Zobel; Circular Dichroism of Naphthyltetrahydroisoquinoline Alkaloids: Calculation of CD Spectra by Semi-empirical Methods; *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3305–3312.
- [193] M. A. Rizzacasa, M. V. Sargent; The total synthesis of (-)-*O*-methylancistrocladine and (+)-*O*-methylhamatine and their enantiomers; *J. Chem. Soc.*, **1991**, Perkin Trans. I, 845–854.
- [194] <http://www.beilstein.tv/tvpost/mbandakamine-a-a-unique-alkaloid-from-an-african-liana/>

DANKE! ...

... an alle Personen, die bei der Inspiration, Realisierung / Durchführung und Finalisierung dieser Arbeit beteiligt waren, sei es durch wissenschaftliche oder private Unterstützung gewesen.

Insbesondere danke ich (in beliebiger Reihenfolge):

- all meinen wissenschaftlichen Kooperationspartnern, ohne deren Einsatz, Mitwirkung, Fleiß und Unterstützung ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit nicht zustande gekommen wär.

Prof. Virima Mudogo von der Universität Kinshasa danke ich von ganzem Herzen für die Sammlung des *Ancistrocladus-congolensis*-Pflanzenmaterials, aus dem ich die fünf neuen Michellamine isolieren konnte. Zusätzlich danke ich ihm und Prof. Pascal Kalenda für ihren Einsatz und ihre Begleitung bei unserer Sammelexpedition rund um Mbandaka, sowie für die Organisation des NAPRECA-Symposiums 2009 in Kinshasa. Diese schönen Zeiten sind und bleiben für mich unvergesslich.

Prof. R. Hedrich, Dr. Rosalie Deeken, Dr. Peter Ache und Brigitte Neumann aus der Botanik I der Universität Würzburg danke ich für die Anzucht der *Arabidopsis*-Pflanzen, die Bereitstellung der Sammelapparatur, das Lehren der ursprünglichen Sammelprozedur und insbesondere Peter und Rosalie für Ihre Geduld bei meinen zahllosen Fragen zu und Problemen mit "dem ganzen Pflanzenkram".

Prof. Christian Neusüß von der Hochschule Aalen danke ich für Möglichkeit, die Phloemsaft-Exsudate bei ihm im Arbeitskreis mit CE-ESI-oTOF-MS zu vermessen, und dafür, dass er trotz seines vollen Terminkalenders immer die Zeit gefunden hat, die kapillarelektrophoretischen und massenspektrometrischen Probleme (mit mir) zu beheben. Svenja Bunz und Tobias Bader danke ich besonders für die aufwändige Methodenetablierung und Vermessung der Proben in Aalen während meiner Abwesenheit, ohne Euch hätte es (gar) keine Ergebnisse gegeben!

Prof. Peter Fiedler von der Universität Tübingen danke ich für die reibungslose und angenehme Zusammenarbeit bei dem *Streptomyces*-Projekt, über das wir eine schöne Publikation schreiben konnten. Philipp Jetter danke ich für die Aufreinigung der Bakterien-Isolate und den netten "virtuellen" Kontakt sowie den reellen auf den Tübinger Gesprächen und dem SFB-Symposium.

Prof. Carsten Scheller aus der Virologie der Universität Würzburg danke ich für die Bereitschaft zur Methodenetablierung in seinem Arbeitskreis zur Bestimmung der anti-HIV-Aktivität der Michellamine, für die Betreuung der Bachelorarbeit von Julia Betzin und die sehr angenehme und ergebnisreiche Zusammenarbeit.

To Guo-Liang Zhang, my longtime lab partner, I am grateful not only for our successful joint projects but also for his assistance in all questions regarding structure elucidation. He always shared his expertise with me and was an eligible instance for discussion. I also enjoyed our badminton games and our "National Dinner Evenings".

Blaise Kimbadi Lombe danke ich für seine gute Mitarbeit und seinen Fleiß bei unserem gemeinsamen Mbandakamin-Projekt, und ich hoffe und wünsche ihm, dass er im Rahmen seiner Dissertation noch weitere interessante Verbindungen dieser Strukturklasse wird isolieren können.

Dr. Torsten Bruhn danke ich für die Berechnungen der EM18-Konformere und der Mbandakamin-Spektren (gemeinsam mit Félix Katele) sowie die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen, Publikationen, Präsentationen und (anderen) Computer-bedingten Problemen.

Franziska Witterauf danke ich für die Online-CD-Messungen und die gute Instandhaltung und Pflege der Geräte im Arbeitskreis.

Manuela Michel danke ich für ihre Offenheit und Geduld, mir bei den Phloem-sammlungen zur Seite gestanden zu haben. Diese Sammlungen waren unvorstellbar kompliziert, aufwändig und nur mit großer Sorgfalt und Persistenz zu bewältigen, und dafür warst Du genau die Richtige. Schade, dass trotz unserer Bemühungen die Ergebnisse nicht den gewünschten Ausgang genommen haben.

Ich danke den Mitarbeitern der Messabteilungen der Universität – Dr. Matthias Grüne und Elfriede Ruckdeschel (NMR) und Dr. Michael Büchner und Fritz Dadrach (Masse) – für die gute Arbeit bei der Aufnahme aller Spektren.

Dr. Alfons Ledermann danke ich für die Unterstützung in allen Fragen hinsichtlich der Organisation der Vorlesung.

- allen Mitgliedern vom Arbeitskreis Bringmann, die durch die angenehme und kameradschaftliche Atmosphäre auch einen Großteil zur Ermöglichung dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich Doris, "der guten Seele vom AK", für Ihr offenes Ohr und ihre Unterstützung in jeder Lebens- bzw. Problemlage. Andreas Irmer danke ich für die Unterstützung im Labor – also im Grunde für die Einarbeitung in die Analytik, Isolierung und Strukturaufklärung – sowie die zahlreichen privaten Aktivitäten (unter anderem als "Trio Infernale"), die eine wirkliche Stütze in dieser Zeit waren. Der Kaffeeraum-Crew (Barbara, Carina, Danny, Gerry, Foxi, Froschi, Manu, Micha, Patricia und Steffi) danke ich für die (vielen) sehr unterhaltsamen Pausen, in denen so manche Träne gelacht wurde. Anu, meiner tapferen Mitstreiterin im "PowerPoint-/CorelDraw-/ChemDraw-Mastern", danke ich für Ihren Einsatz und Ihre Hilfe bei allen Zeichenprojekten – ich sag nur: über 1000 Vorlesungsfolien – sowie Ihre bereitwillige Vertretung bei Urlaub und Krankheit. Jan und Christina ("Froschi"), meinen "Schäfchen", danke ich für eine schöne Zeit im

Labor gegen Ende meiner praktischen Arbeiten und für die Übernahme der noch offenen Projekte.

- all meinen Freunden und Bekannten innerhalb und außerhalb Würzburgs, die mir den privaten Ausgleich gegeben haben, den ich brauchte. Ich freue mich, dass viele Freundschaften über diese Zeit gehalten haben (Michi, Tim, Melle & Svenja) und dass ich noch mehr schließen konnte (Lui & Bianca "u. Co.", Froschi, Silke "u. Co."), die hoffentlich auch in den nächsten (50) Jahren (weiterhin) bestehen bleiben.
- and last, but definitely not least, meiner Familie (insbesondere meinen Eltern), der ich – außer meiner Existenz natürlich – auch so ziemlich alles andere zu verdanken habe, was ich in meinem Leben auf die Beine gestellt habe. Ohne die Bereitstellung der Ressourcen – Gehirn und Geld – und dem Wissen, dass ich immer ein Netz mit doppeltem Boden unter mir habe, wäre ich nie so hoch gesprungen und somit auch nie so weit oben gelandet. Ich hoffe, ich kann es Euch irgendwann "heimzahlen" :).